

**UNIVERSIDADE REGIONAL INTEGRADA E DO ALTO URUGUAI E DAS
MISSÕES
PRÓ-REITORIA DE ENSINO, PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
CAMPUS DE ERECHIM
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS PROGRAMA DE PÓS-
GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

KARINE ANGÉLICA DALLA COSTA

SÍNTESE ENZIMÁTICA E ENCAPSULAMENTO DE OLEATO DE ASCORBILA

ERECHIM - RS

2018

KARINE ANGÉLICA DALLA COSTA

SÍNTESE ENZIMÁTICA E ENCAPSULAMENTO DE OLEATO DE ASCORBILA

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

Orientadoras: Dr^a. Natalia Paroul

Dr^a. Jamile Zeni

ERECHIM - RS

2018

KARINE ANGÉLICA DALLA COSTA

SÍNTESE ENZIMÁTICA E ENCAPSULAMENTO DE OLEATO DE ASCORBILA

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

Erechim, 07 de março de 2018.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Natalia Paroul
URI Erechim

Prof. Jamile Zeni
URI Erechim

Prof. Rogério Marcos Dallago
URI Erechim

Prof. Clarissa Dalla Rosa
UFFS Erechim

Dedico este trabalho aos meus pais, meus
grandes incentivadores.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por ter me guiado ao caminho dessa conquista e por ter me dado condições de lutar e alcançar o objetivo pretendido.

A todos da minha família que, de alguma forma, incentivaram-me na constante busca pelo conhecimento. Em especial à minha mãe Ivete Kurtz Dalla Costa, meu pai Ivalino Domingos Dalla Costa e minha avó materna Albertina. Agradeço a vocês pelo grande amor, pelo apoio nas horas fáceis e difíceis, pela ajuda financeira, pelo incentivo, por estarem sempre ao meu lado acompanhando os desafios e conquistas ao decorrer da minha vida, por sempre acalmar meus anseios, dúvidas, entender minhas distâncias, e me fazer ver que família é de fato, a base de tudo. Amo vocês, Muito obrigada.

As minhas orientadoras, professora Natália Paroul e Jamile Zeni, pela oportunidade de trabalharmos juntas, pela paciência, ensinamentos, confiança e por todas as contribuições para o desenvolvimento do trabalho e de meu crescimento pessoal.

Ao professor Rogério Cansian pelas ideias e assistências ao decorrer da realização deste trabalho e ao professor Rogério Dallago por todas as contribuições e esclarecimento de dúvidas, além da grande ajuda para as análises de quantificação.

Às pós-doutorandas Sandi e Rosi pelas dicas e auxílios no desenvolvimento das análises em laboratório, ao técnico de laboratório Jasan, pela ajuda nas análises no CLAE e as meninas da central de materiais por colaborarem diretamente.

À bolsista Tatiane por todo o apoio prestado no início do desenvolvimento do trabalho.

À todos os professores do curso que foram tão importantes.

Aos meus queridos colegas e amigos Amanda, Maiara e Jean, obrigada por dividirem comigo as dificuldades e os prazeres da vida de pós-graduando. Foram muitas festas, risos, choros e muito estudo!

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

À CAPES, pela concessão da bolsa de Mestrado.

À banca avaliadora, por fazerem parte da mesma.

Agradeço a todos que de uma forma ou de outra colaboraram para a realização deste trabalho.

Minha sincera gratidão.

*"É necessário abrir os olhos e
perceber que as coisas boas estão dentro
de nós, onde os sentimentos não precisam
de motivos nem os desejos de razão. O
importante é aproveitar o momento e
aprender sua duração, pois a vida está
nos olhos de quem saber ver".*

- Gabriel García Márquez

RESUMO

O ácido ascórbico é um potente antioxidante natural, porém por ser hidrofílico o seu emprego em alguns produtos alimentícios é limitado. Uma das formas de modificar sua solubilidade é provocar sua esterificação com ácidos graxos para então aplicação em alimentos lipofílicos. A maior dificuldade de aplicação dos antioxidantes em formulações de alimentos industrializados é a sensibilidade deles à variação de pH, temperatura e luminosidade. Uma das alternativas para aumentar a estabilidade dos mesmos é a microencapsulação do antioxidante obtido antes de sua utilização. Dentro desse contexto o objetivo do trabalho foi realizar a síntese enzimática do ácido L-ascórbico e ácido oleico e microencapsular em *spray-dryer* o produto obtido. Para selecionar o melhor solvente reacional, os substratos foram submetidos a ensaios de solubilidade em diferentes solventes orgânicos. O terc-butanol demonstrou ser apropriado para a síntese, pois menos interferiu na atividade enzimática nas primeiras horas de reação. A conversão máxima obtida para produção de oleato de ascorbila foi de 69 % utilizando a Novozym 435 e 51 % para NS 88011, nas seguintes condições: temperatura de 70 °C, razão molar de 1:9 (ácido ascórbico: ácido oleico), solvente terc-butanol, 1h30min de reação em shaker a 125 rpm, sendo utilizado 30 e 35 % (m/m substratos) de NS 88011 e Novozym 435, respectivamente. Ambas as lipases demonstraram ter ótima estabilidade operacional, já que apresentaram em torno de 15 ciclos de reuso para atingir atividade residual de 50 %, destacando a lipase NS 88011 devido ser menos afetada nas primeiras horas pelas condições reacionais utilizadas. Além disso, os biocatalisadores usados neste estudo possuem diferença no custo, sendo a NS 88011 uma preparação enzimática imobilizada em custo inferior. Avaliando a atividade antioxidante, observou-se que o produto formado tanto para Novozym 435 (0,423 mg mL⁻¹) quanto a NS 88011 (0,304 mg mL⁻¹) apresentaram semelhança no IC₅₀, não havendo diferença significativa a nível de 5 %, bem como entre o produto encapsulado (1,464 e 1,493 mg mL⁻¹, respectivamente). Os IC₅₀ obtidos do encapsulado demonstraram potencialidade à técnica de encapsulação utilizada. Oleato de ascorbila não apresentou toxicidade, podendo ser aplicado como aditivo alimentar sem causar danos à saúde dos consumidores.

Palavras-chave: Ácido ascórbico. Antioxidante. Esterificação. Novozym 435. NS 88011. Spray-drier.

ABSTRACT

Ascorbic acid is a potent natural antioxidant, however, for being hydrophilic, its use in some food products is limited. One of the ways to modify its solubility is to cause its esterification with fatty acids for then application in lipophilic foods. The greatest difficulty in the application of antioxidants in industrialized food formulations is their sensitivity to variations in pH, temperature and luminosity. One of the alternatives for increasing their stability is the microencapsulation of the antioxidant obtained before use. Within this context, the objective of the work was to perform the enzymatic synthesis of L-ascorbic acid and oleic acid and microencapsular in spay-dryer the product obtained. To select the best reaction solvent, the substrates were submitted to solubility tests in different organic solvents. The tert-butanol was shown to be appropriate for the synthesis, since it less interfered in the enzymatic activity in the first few hours of reaction. The maximum conversion obtained for ascorbyl oleate production was 69 % using Novozym 435 and 51 % for NS 88011 under the following conditions: temperature of 70 °C, molar ratio of 1:9 (ascorbic acid: oleic acid), tert-butanol solvent, 1h30min shaker reaction at 125 rpm, using 30 and 35 % (m/m substrates) of NS 88011 and Novozym 435, respectively. Both lipases showed to have an excellent operational stability, since they had around 15 cycles of reuse to reach residual activity of 50 %, highlighting the lipase NS 88011 due to being less affected in the first hours by the reactional conditions used. In addition, the biocatalysts used in this study have a difference in cost, with NS 88011 being an immobilized enzyme preparation at lower cost. The antioxidant activity of Novozym 435 (0.423 mg mL⁻¹) and NS 88011 (0.304 mg mL⁻¹) was similar in the IC₅₀, with no significant difference at 5 % and as between the encapsulation product (1.464 and 1.493 mg mL⁻¹, respectively). The IC₅₀ obtained from the encapsulation demonstrated potentiality to the encapsulation technique used. Ascorbyl oleate had no toxicity and could be applied as a food additive without causing harm to consumers health.

Keywords: Ascorbic acid. Antioxidant. Esterification. Novozym 435. NS 88011. Spray-drier.

LISTA DE ABREVIATURAS

pH - potencial hidrogeniônico

% - porcentagem

°C - grau Celsius

h - hora

min - minuto

rpm - rotações por minuto

mg - miligrama

mL - mililitros

IC₅₀ - metade da concentração inibitória máxima

BHA - butil-hidroxi-anisol

BHT - butil-hidroxi-tolueno

PG - propilgalato

TBHQ - terciobutilhidroxinona

DPPH - 2,2-difenil-1-picrilhidrazila

m/m - massa do soluto por massa da solução

nm - nanômetros

g - gramas

AE - atividade de esterificação (U.g⁻¹)

Va - volume de NaOH gasto na titulação da amostra retirada após 40 min

Vb - volume de NaOH gasto na titulação da amostra retirada no tempo zero

NaOH – hidróxido de sódio

M - molaridade da solução de NaOH

Vf - volume final de meio reacional

t - tempo

Mel - massa da preparação enzimática utilizada na reação

Vc - volume da alíquota do meio reacional retirada para titulação

v/v - volume/volume

Rf - fator de retenção

a - distância percorrida pelo composto

v - distância percorrida pelo solvente

CLAE - cromatografia líquida de alta eficiência

ANOVA - análise de variância

μm - micrometro

mm - milímetro

μL - microlitro

μg - miligrama

L - litro

Abs - absorbância

AA - atividade antioxidante

kgf - quilograma força

cm - centímetros

log P - logaritmo do coeficiente de partição

CCD - cromatografia em camada delgada

DMSO - dimetilsulfóxido

RMN - espectroscopia de ressonância magnética nuclear

U - unidade

ppm - partes por milhão

UV – ultra-violeta

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fórmula estrutural do ácido L-ascórbico	19
Figura 2 – Oxidação do ácido ascórbico ao ácido dehidroascórbico	20
Figura 3 - Fórmula estrutural do ácido oleico	21
Figura 4 - Esquema reacional da síntese oleato de ascorbila	25
Figura 5 – Esquema geral do mecanismo de auto-oxidação lipídica	28
Figura 6 - Estrutura do radical DPPH.....	30
Figura 7 - Estabilização do radical DPPH.....	30
Figura 8 - Modelo de <i>spray-dryer</i> de bancada	31
Figura 9 - Etapas desenvolvidas no estudo da síntese enzimática e encapsulação de oleato de ascorbila.....	33
Figura 10 – Sistema de aspersão: <i>Spray Drier</i>	40
Figura 11 – Efeito dos solventes (terc-butanol, etanol e DMSO) na atividade de esterificação da lipase Novozym 435	43
Figura 12 - Cromatografia em camada delgada, apresentando as bandas para ácido ascórbico (1), ácido oleico (2) e reação (3).....	47
Figura 13 - Conversão de oleato de ascorbila (%) em função do tempo.....	48
Figura 14 – Produção de oleato de ascorbila à 70, 55 e 40 °C em função do tempo.....	49
Figura 15 - Cromatograma da mistura reacional (branco* (a)), reação final (b) e reação final após extração líquido-líquido (c).....	51
Figura 16 - Rendimento de produção de oleato de ascorbila em função da concentração das lipases Novozym 435 e NS 88011.....	53
Figura 17 - Estabilidade operacional das lipases NS 88011 e Novozym 435	54
Figura 18 – Produto oleato de ascorbila encapsulado	57
Figura 19 – Regressão linear para determinação do IC ₅₀ do ácido ascórbico	71
Figura 20 - Regressão linear para determinação do IC ₅₀ do ácido oleico.....	71
Figura 21 - Regressão linear para determinação do IC ₅₀ do oleato de ascorbila na razão molar 1:9 (ácido ascórbico: ácido oleico).....	72
Figura 22 - Regressão linear para determinação do IC ₅₀ do oleato de ascorbila na razão molar 1:4 (ácido ascórbico: ácido oleico).....	72
Figura 23 - Regressão linear para determinação do IC ₅₀ da mistura reacional (branco*).....	72
Figura 24 - Regressão linear para determinação do IC ₅₀ da mistura reacional após extração do ácido ascórbico (branco**).....	73

Figura 25 - Curva de calibração do ácido ascórbico para quantificação do produto.....	73
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dados da literatura referentes a esterificação enzimática de ésteres de ácido ascórbico.....	23
Tabela 2 - Atividade de esterificação para Novozym 435 e NS 88011.....	41
Tabela 3 - Solubilidade do meio reacional com a utilização de diferentes solventes	42
Tabela 4 – Atividade antioxidante expressa em valores de IC ₅₀ dos substratos (ácido ascórbico e ácido oleico), branco* (mistura reacional), branco** (mistura reacional após extração líquido-líquido para remoção do ácido ascórbico) e produto da reação (oleato de ascorbila) com excesso de ácido oleico obtidos utilizando a razão molar 1:4 e 1:9 (ácido ascórbico: ácido oleico)	45
Tabela 5 - Resultados das atividades antioxidantes do oleato de ascorbila livre e imobilizado expressos em termos de IC ₅₀ mg mL ⁻¹	57

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVOS	18
2.1 Objetivo geral.....	18
2.2 Objetivos específicos.....	18
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
3.1 Ácido L-ascórbico	19
3.2 Ácidos graxos	20
3.2.1 Ácido oleico.....	21
3.3 Síntese de ésteres de ácido ascórbico	21
3.4 Síntese de oleato de ascorbila por via enzimática.....	25
3.5 Lipases	25
3.6 Biocatálise em solventes orgânicos.....	27
3.7 Rancidez oxidativa.....	27
3.7.1 Antioxidante.....	29
3.8 Encapsulação.....	30
4 MATERIAIS E MÉTODOS	33
4.1 Determinação da atividade de esterificação das lipases.....	34
4.2 Seleção de solventes orgânicos para síntese de oleato de ascorbila.....	35
4.3 Estudo do efeito do solvente sobre a atividade enzimática	35
4.4 Determinação da razão molar para produção de oleato de ascorbila	35
4.5 Determinação do tempo reacional e da temperatura	36
4.6 Efeito da concentração das lipases	37
4.7 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	37
4.8 Estabilidade operacional das enzimas	38
4.9 Atividade antioxidante	38
4.10 Toxicidade in vitro.....	39
4.11 Encapsulação.....	39
4.12 Extração do encapsulado para análise antioxidante	40
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	41
5.1 Determinação da atividade de esterificação da lipase	41
5.2 Seleção de solventes orgânicos para síntese de oleato de ascorbila.....	41
5.3 Estudo do efeito do solvente sobre a atividade enzimática	43
5.4 Determinação da razão molar para produção de oleato de ascorbila	44
5.5 Determinação do tempo reacional e da temperatura	47

5.6 Efeito da concentração das lipases	52
5.7 Estabilidade operacional da enzima	54
5.8 Toxicidade in vitro.....	55
5.9 Atividade antioxidante do produto final e encapsulado	56
6 CONCLUSÕES.....	59
7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	60
8 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61
APÊNDICES	71

1 INTRODUÇÃO

O uso de antioxidantes na indústria de alimentos tem sido amplamente estudado, pois quando adicionados aos alimentos controlam o processo de oxidação, bem como promovem um aumento da vida útil dos alimentos (TORRES *et al.*, 2007).

Entre eles destaca-se o ácido ascórbico, conhecido como Vitamina C. É um composto orgânico, altamente hidrofílico, muito utilizado em uma gama de produtos alimentares, bebidas, formulações farmacêuticos e cosméticos devido a suas propriedades. Em indústrias de processamento de alimentos é largamente utilizado como antioxidante os quais evitam mudanças de cor, sabor e odor dos produtos (PARDAKHTY *et al.*, 2016).

Contudo, por ser hidrofílico, o emprego do ácido ascórbico em alguns produtos alimentícios é limitado. Uma das formas de alterar sua solubilidade é através da esterificação com ácidos graxos, como o ácido oleico, formando o oleato de ascorbila. Segundo Watanabe *et al.* (2001), os ascorbil ésteres são compostos anfifílicos que mantêm propriedades antioxidantes do ácido ascórbico, ou seja, quando incorporados em alimentos mantem a proteção (similar ao ácido ascórbico) contra os danos oxidativos por radicais livres (ROSS *et al.*, 1999).

O modo comumente utilizado para a obtenção de oleato de ascorbila é mediante a acilação de ácido L-ascórbico via catálise ácida. Porém este método de síntese possui alto gasto de energia, e frequentemente conduz à formação de uma mistura de produtos que demanda de uma etapa de purificação (HUMEAU *et al.*, 1995). Por esse motivo, um método alternativo para síntese de oleato de ascorbila é através da biocatálise. A esterificação é uma reação relativamente simples que consiste na condensação do ácido carboxílico livre e o álcool, formando éster e água, entretanto devido aos ácidos carboxílicos serem ácidos fracos, a reação é extremamente lenta, por isso se recorre à utilização de enzimas como catalisadores (CHAZIN, 2012; BALEN *et al.*, 2015).

O uso de enzimas como catalizadores vem crescendo consideravelmente, devido a sua alta especificidade (que contribui para minimizar as reações indesejáveis), ao aumento da velocidade da reação e nas condições reacionais brandas de pH, temperatura e pressão nas quais a biotransformação é realizada. Todos esses fatores resultam em um processo controlado que pode reduzir o custo energético em relação aos catalizadores não enzimáticos (CASTRO *et al.*, 2004; SERRA *et al.*, 2005; BERGER, 2009).

As enzimas mais utilizadas na síntese orgânica são as lipases, sendo aplicadas em inúmeras preparações comerciais, devido a sua ampla especificidade e maior estabilidade (em comparação com outras enzimas) (KAPOOR; GUPTA, 2012).

A maior dificuldade de aplicação dos antioxidantes naturais e seus derivados em formulações de alimentos industrializados ou de cosméticos é a sensibilidade deles à variação de pH, temperatura e luminosidade. Uma das alternativas para aumentar a estabilidade dos mesmos é a microencapsulação do antioxidante obtido antes de sua utilização (MADENE *et al.*, 2006). A microencapsulação é um processo no qual um determinado material é envolto por uma cobertura ou fica dissolvido em uma matriz. Diferentes métodos têm sido propostos para a microencapsulação de alimentos e ingredientes, sendo a secagem por atomização (*spray-drying*) uma das técnicas mais empregadas, devido à grande disponibilidade de equipamentos, baixo custo do processo, boa retenção dos compostos e estabilidade do produto final (DESAI; PARK, 2005).

Dado o exposto, justifica-se a utilização de catalisadores enzimáticos devido ao baixo impacto ambiental e a possibilidade de reutilização em reações de esterificação envolvendo ácido ascórbico e ácido oleico como substratos para obtenção de oleato de ascorbila, um composto antioxidante lipossolúvel, visando a sua possível aplicação na indústria de alimentos pelo processo de microencapsulação por *spray-drying* a fim de aumentar a estabilidade.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Realizar a síntese enzimática do ácido L-ascórbico e ácido oleico e microencapsular em *spay-dryer* o produto obtido.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Estudar o efeito dos solventes orgânicos sobre a atividade enzimática (Novozym 435);
- ✓ Avaliar a influência de diferentes razões molares (1:4 e 1:9 ácido ascórbico: ácido oleico) na produção de oleato de ascorbila;
- ✓ Determinar o tempo reacional de maior conversão em produto em diferentes temperaturas (40, 55 e 70 °C) e estudar o efeito da concentração das enzimas (10, 15, 20, 30 e 35 m/m substratos) Novozym 435 e NS 8801;
- ✓ Determinar a estabilidade operacional das lipases na condição de maior produção de éster;
- ✓ Avaliar a atividade antioxidante e a toxicidade do produto obtido;
- ✓ Encapsular o produto obtido por atomização (*spray drying*);
- ✓ Avaliar a atividade antioxidante do encapsulado.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

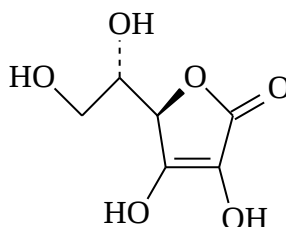
Neste capítulo, apresenta-se o referencial teórico utilizado para dar suporte ao desenvolvimento desta pesquisa. Primeiramente serão expostos conceitos sobre os substratos utilizados (ácido ascórbico e ácido oleico), síntese de ésteres de ácido ascórbico e síntese de oleato de ascorbila via enzimática. Posteriormente, discute-se sobre a aplicação de lipases como catalisadores da reação e solventes orgânicos que possam vir a ser empregados. Por fim, serão descritas algumas considerações e importância de antioxidantes e encapsulação.

3.1 Ácido L-ascórbico

Ácido ascórbico é um sólido cristalino de coloração branca, inodoro, solúvel em poucos solventes orgânicos. É produzido comercialmente por dois métodos: processo de Reichstein e por processo de fermentação em dois passos (LIESE; SEELBACH; WANDREY, 2006; BALEN *et al.*, 2015).

Ácido L-ascórbico, também conhecido como vitamina C (Figura 1) é considerado um poderoso antioxidante natural, sendo indispensável em várias funções fisiológicas. Participa como componente chave no metabolismo biológico, atuando como agente redutor em vias metabólicas, síntese e manutenção do colágeno, vasos sanguíneos, cartilagem, ossos e tendões, reage com espécies reativas de oxigênio ou radicais livres, além de provavelmente reduzir o nível de colesterol (PARDAKHTY *et al.*, 2016).

Figura 1 - Fórmula estrutural do ácido L-ascórbico



Fonte: A autora

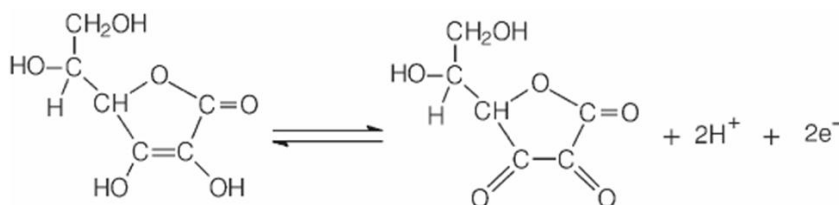
É aplicado em meio aquoso devido a sua natureza hidrofílica. Entretanto o grande desafio é a busca dos meios para sua aplicação em alimentos à base de gordura, sendo um deles através da conversão da vitamina C em éster, formando uma estrutura

anfifílica, que melhora a sua solubilidade em ambientes lipofílicos, bem como, aumenta a capacidade de eliminação de radicais (REYES-DUARTE *et al.*, 2011). Contudo, é importante que esses ésteres de ácidos graxos derivados de ácido L-ascórbico não apresentem gosto, cor e cheiro indesejáveis.

A vitamina C ou ácido ascórbico é uma vitamina hidrossolúvel comum em frutas como goiaba, laranja, maçã, morango, kiwi, e vegetais como couve flor (CHANG; ISMAIL; DAUD, 2016).

Entre os antioxidantes naturais, os tocoferóis e o ácido L-ascórbico são altamente eficientes em retardar a oxidação lipídica em alimentos. No entanto, o ácido L-ascórbico é facilmente oxidado, principalmente em condições aeróbias e exposição à luz, sendo degradado, em primeiro lugar em uma etapa reversível para ácido dehidroascórbico (Figura 2) e, por outro, irreversivelmente ao ácido oxálico (KLESZCZEWSKA, 2000).

Figura 2 – Oxidação do ácido ascórbico ao ácido dehidroascórbico



Fonte: Adaptado de Tavares *et al.* (2003)

3.2 Ácidos graxos

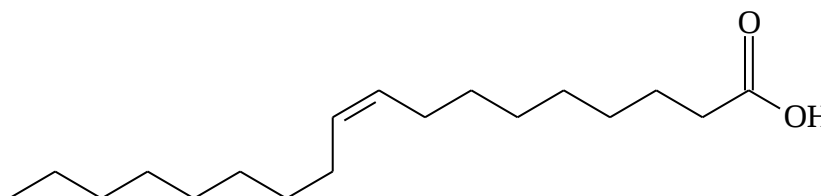
Os ácidos graxos são ácidos carboxílicos, geralmente monocarboxílicos, que possuem uma cadeia apresentando grupo carboxila ($-\text{COOH}$) ligado a uma cadeia alquílica longa, classificados como saturados e insaturados. Os ácidos graxos insaturados podem ser monoinsaturados ou poli-insaturados (CURI *et al.*, 2002).

Os ácidos insaturados são mais comumente encontrados na gordura vegetal, enquanto os saturados são mais encontrados em gordura animal. Entre os ácidos monoinsaturados, que apresentam uma única ligação dupla na cadeia, o ácido oleico possui destaque, estando presente na maioria das gorduras e carnes animais, incluindo aves e bovinos, bem como em azeitonas, sementes e nozes (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

3.2.1 Ácido oleico

O ácido (9Z)-octadec-9-enóico, comercialmente conhecido como ácido oleico, possui uma cadeia insaturada com 18 carbonos na sua estrutura, cuja fórmula estrutural é apresentada na Figura 3 (BOBBIO; BOBBIO, 1992).

Figura 3 - Fórmula estrutural do ácido oleico



Fonte: A autora

Os ácidos graxos podem ser classificados em famílias (ômega). O ácido oleico pertence à família ômega 9 que participa do metabolismo humano, desempenhando um papel fundamental na síntese dos hormônios (CAMPOS SALES *et al.*, 2013). O ácido oleico é também utilizado como aditivo em base de sabonetes e sabões com o intuito de promover lubricidade e emoliência, sendo empregado em cosméticos (protetores solares e cremes antissinais) recompondo a oleosidade da pele.

O ácido oleico pode ser encontrado em alguns alimentos como no azeite de oliva, semente de uva, abacate, castanha de caju, amendoim, óleo de palma, castanha do Pará, óleo de canola, óleo de gergelim, semente de linhaça, nozes e em animais marinhos, como tubarão e bacalhau (IBRAHIM *et al.*, 2012). A literatura aponta que seu consumo está aumentando cada vez mais em função do seu efeito protetor contra alguns tipos do câncer (PAUWELS, 2011).

3.3 Síntese de ésteres de ácido ascórbico

A modificação de ácido ascórbico utilizando ácidos graxos para a formação de ésteres via esterificação enzimática ou transesterificação, é um método interessante para alterar sua solubilidade (REYES-DUARTE *et al.*, 2011). As rotas sintéticas realizadas por meio de catálise ácida ou alcalina possuem algumas limitações relacionadas com o baixo rendimento, necessidade de processos de purificação elaborados e oxidação ou degradação da vitamina C em função de altas temperaturas empregadas durante a

produção (SRINIVAS, 2011). Por esse motivo, a catalise enzimática esta sendo avaliada como método alternativo para síntese de ascorbil ésteres.

A síntese de ésteres de vitamina C via catálise enzimática realizada por lipases tem sido aplicada devido à regiosseletividade apresentada e ao alto rendimento. Para a acilação da vitamina C, geralmente são utilizados ácidos graxos (AGs), ésteres de ácidos graxos (metil, etil, ou vinil) e triglicerídeos (TGs) como doadores de acila, que são obtidos a partir de recursos renováveis (KARMEE, 2008; KARMEE 2009).

Diversos estudos já foram publicados sobre a produção de ascorbil ésteres utilizando diversas lipases (Tabela 1), contudo, até a presente data, não foram encontrados trabalhos com o uso da lipase NS 88011.

Ascorbil ésteres são compostos anfifílicos (WATANABE *et al.*, 2001), portanto, eles formam agregados em sistema aquoso, com um núcleo lipofílico interior e uma superfície hidrofílica exterior (PALMA *et al.*, 2002).

Os ésteres de ácidos graxos e de ácido ascórbico ocupam um lugar importante como compostos com 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, torna-os atraentes para os fabricantes e benefícios para o consumidor (CHANG *et al.*, 2009).

Tabela 1 - Dados da literatura referentes a esterificação enzimática de ésteres de ácido ascórbico

Razão molar	Solvente	T (°C)	Lipases	Tempo (hrs)	Rendimento (%)	Referência
ácido L-ascórbico: ácido palmítico (1:9)	terc-butanol	*	CAL-B	5	40	HUMEAU <i>et al.</i> , 1998
ácido láurico: ácido L-ascórbico (1:5)	álcool terc- amil, acetonitrila e terc-butanol	60	Novozym 435	50	4, 20 e 11	WATANABE <i>et al.</i> , 1999
ácido ascórbico: ácido oleico (2:1)	terc-pentanol	65	Novozym 435	100	87	VIKLUND, ALANDER, HULT, 2003
ácido ascórbico: ácido oleico (1:1)	terc-pentanol	*	Novozym 435	12	35	SONG <i>et al.</i> , 2004
ácido ascórbico: ácido oleico (1:25)	acetona	45	CAL B	48	57	ADAMCZAK, BORNSCHEUER, BEDNARSKI, 2005
ácido ascórbico: ácido oleico	líquido iônico	60	Lipase B	14	72	ADAMCZAK e BORNSCHEUER, 2009
ácido ascórbico: ácido palmítico	terc-butanol	*	Novozym 435	3	25	LERIN <i>et al.</i> , 2011
ácido ascórbico: ácido oleico (1:1)	terc-pentanol	40	Lipozyme TL IM	168	33	REYES-DUARTE <i>et al.</i> , 2011

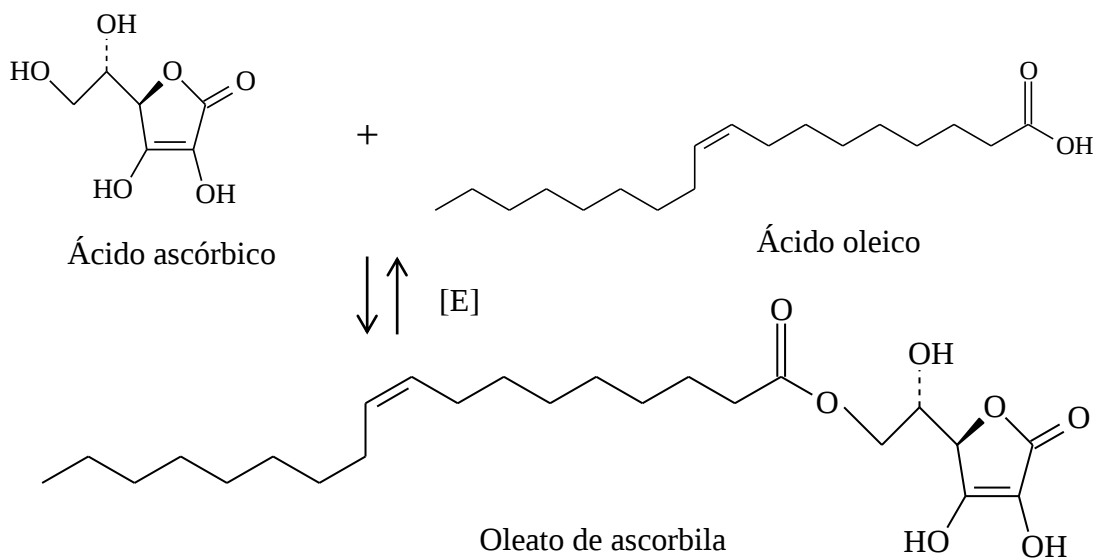
ácido ascórbico: ácido palmítico (11:1)	terc-pentanol: dimetilsulfóxido (DMSO) (9:1 v/v)	50	Novozym 435	6	66	JIANG <i>et al.</i> , 2013
ácido ascórbico: ácido oleico (1:1)	terc-butanol	45	Novozym 435	48	70	MORENO-PEREZ <i>et al.</i> , 2013
ácido ascórbico: ácido oleico (1:12)	acetona	55	Novozym 435	72	57	STOJANOVIĆ <i>et al.</i> , 2013
ácido ascórbico: ácido láurico (1:3)	DMSO: acetona	40	Lipozyme TLIM	9,5	94	ZHANG <i>et al.</i> , 2013
ácido ascórbico: ácido palmítico (1:5)	terc-amil	70	Novozym 435	1	71	COSTA <i>et al.</i> , 2014
ácido ascórbico: ácido palmítico (1:10) e (1:5)	terc-butanol	70	Novozym 435 TL	50	51 e 57	SANTIBÁÑEZ <i>et al.</i> , 2014
ácido ascórbico: ácido oleico (1:9)	terc-butanol	70	Novozym 435	3	66	BALEN <i>et al.</i> , 2015
ácido ascórbico: ácido oleico (1:10)	acetona	55	Novozym 435	70	60,5	STOJANOVIC <i>et al.</i> , 2015
ácido ascórbico: ácido linoleico (1:9)	terc-butanol	70	Novozym 435	1	90	BALEN <i>et al.</i> , 2017

Fonte: A autora

3.4 Síntese de oleato de ascorbila por via enzimática

A síntese de oleato de ascorbila (Figura 4) é realizada entre ácido L-ascórbico e ácido oleico, dando origem a um éster de vitamina C lipossolúvel com propriedades antioxidantes. O oleato de ascorbila possui uma extremidade hidrofílica e outra hidrofóbica.

Figura 4 - Esquema reacional da síntese oleato de ascorbila



Fonte: A autora

A esterificação enzimática é uma reação relativamente simples, que se fundamenta na condensação do ácido carboxílico livre e o álcool, formando éster e água (RAJENDRAN; PALANISAMY; THANGAVELU, 2009).

3.5 Lipases

As enzimas são proteínas com propriedades catalíticas específicas, seletivas e atuam eficientemente em condições brandas (temperatura e pressão ambiente) transformando moléculas complexas. Entre o grande grupo das enzimas, destacam-se as lipases.

As lipases (triacilglicerol acil-hidrolases), fisiologicamente, são um grupo especial das esterases, pertencem à subclasse 1 das enzimas hidrolíticas de classe 3 sendo designadas como uma sub-subclasse 3.1.1 devido a sua especificidade pelas ligações dos ésteres de ácidos carboxílicos (STERGIOU *et al.*, 2013).

As lipases particularmente atuam na interfase água-óleo ou óleo-água, ocorrendo uma ativação interfacial da enzima, fazendo com que sua atividade catalítica dependa do estado de agregação e estrutura do substrato, das propriedades moleculares da enzima e dos fatores que

afetam as ligações enzima-substrato. Esta ativação envolve um rearranjo da estrutura, deixando livre o sítio ativo da enzima para que aconteça uma mudança conformacional na presença de gotas de óleo em água (AKANBI; BARROW, 2015).

Lipases apresentam inúmeras aplicações nos setores de alimentos, combustíveis e farmacêuticos como biocatalisadores, possuindo a capacidade de catalisar diversas reações, incluindo esterificação, interesterificação, transesterificação, alcoolisia, acidólise e aminólise (STERGIOU *et al.*, 2013).

Elas são produzidas por praticamente todos os organismos vivos, incluindo animais, plantas, fungos e bactérias (OLIVEIRA, 2007). As principais fontes de obtenção desta enzima são as plantas (sementes oleaginosas grãos), os animais (pancreática, hepática e gástrica) e alguns microrganismos (leveduras, fungos e bactérias) (TREICHEL *et al.*, 2010).

A estabilidade das lipases depende de sua origem, sendo que as de procedência microbiana possuem maior estabilidade térmica (CASTRO *et al.*, 2004). As lipases apresentam características versáteis como disponibilidade comercial, seletividade e a possibilidade de utilizar em uma ampla faixa de pH e temperaturas entre 20 a 70°C (CRESPO *et al.*, 2005).

Os processos biocatalíticos são mais seguros do que os processos químicos devido às condições ambientais e purificação do produto (WAGHMARE; VETAL; RATHOD, 2015). Contudo, as lipases, como toda enzima, estão sujeitas à inativação por fatores químicos, físicos ou biológicos, podendo ocorrer quando estocadas ou durante o uso, resultando em dificuldades técnicas, sendo praticamente impossível a recuperação e reuso das mesmas, o que incrementa os custos econômicos do processo, além de promover a contaminação do produto com atividade enzimática residual. Essas dificuldades podem ser superadas para que a catálise seja eficiente em um determinado processo, pelo uso de enzimas na sua forma imobilizada. A técnica da imobilização é utilizada para fornecer estabilidade às enzimas e facilitar sua recuperação e reutilização, reduzindo custos e ainda melhorando a qualidade do produto obtido (VILLENEUVE *et al.*, 2000; DABDOUB; BRONZEL; RAMPIN, 2009; CIPOLATTI *et al.*, 2014).

O uso de lipases nas indústrias permite o desenvolvimento de processos tecnológicos muito próximos aos eficientes processos executados na natureza. Constituem o mais importante grupo de enzimas com valor biotecnológico, devido à versatilidade de aplicações possíveis e facilidade de produção em larga escala. A economia de energia e minimização da degradação térmica são provavelmente as maiores vantagens na substituição de tecnologias químicas atuais pelas biológicas (HASAN; SHAN; HAMEED, 2006).

Devido a sua versatilidade de aplicações, essas enzimas são usadas para diversos propósitos biotecnológicos, como catalisadores na produção de biodiesel (FAN; NIEHUS; SANDOVAL, 2012), na indústria de alimentos, na indústria de papel, ou seja, em diversas sínteses químicas (SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001) como materiais biopoliméricos (YU *et al.*, 2012).

A descoberta de que as lipases e outras enzimas podem ser utilizadas em meio orgânico (OLIVEIRA *et al.*, 2004; VIDINHA *et al.*, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2005; QUIROGA *et al.*, 2005) e, também, em catálise em fase sólida (TODD *et al.*, 2009) abriu uma gama enorme de novas aplicações para estes biocatalisadores.

3.6 Biocatálise em solventes orgânicos

A catálise enzimática inicialmente restringia-se ao emprego de reações em meio aquoso. Entretanto, devido a baixa solubilização dos substratos em água, introduziu-se o uso de solventes orgânicos em reações enzimáticas com o intuito de aumentar a solubilidade dos substratos hidrofóbicos (MAY *et al.*, 2002).

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 (KUMAR; MADRAS; MODAK, 2004).

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-FERNÁNDES; BRIEVAS; GOTOR, 2006).

Diferentes solventes orgânicos têm sido usados como meio de reação para a síntese de ésteres de diferentes ácidos graxos, dentre eles podem ser citados a acetona, terc-butanol, terc-pentanol, DMSO, álcool t-amílico, hexano entre outros (LERIN *et al.*, 2011; LIU *et al.*, 2011; JIANG *et al.*, 2013; MORENO-PEREZ *et al.*, 2013; BALEN *et al.*, 2015; STOJANOVIC *et al.*, 2015; BALEN *et al.*, 2017).

3.7 Rancidez oxidativa

A oxidação lipídica é responsável pelo aparecimento de sabores e odores desagradáveis tornando os alimentos impróprios para consumo, além de também provocar outras alterações que irão afetar não só a qualidade nutricional, devido à degradação de

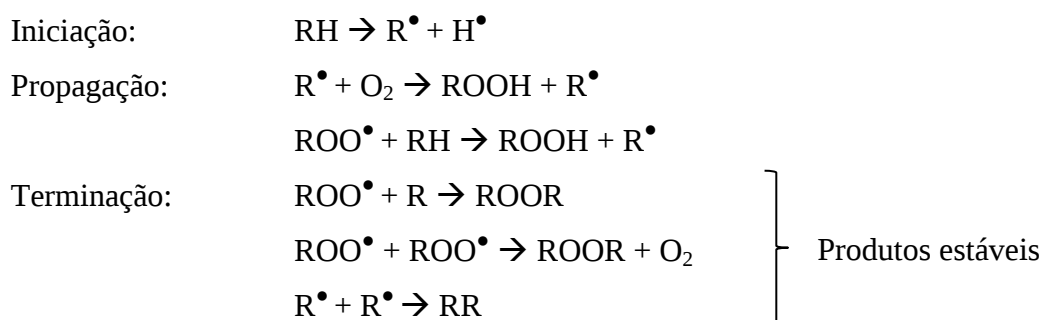
vitaminas lipossolúveis e de ácidos graxos essenciais, mas também a integridade e segurança dos alimentos, através da formação de compostos tóxicos (SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999).

Os lipídios podem ser oxidados através de diferentes caminhos: (a) Reações hidrolíticas, catalisadas pela enzima lipase ou pela ação de altas temperaturas e umidade, formando ácidos graxos livres; (b) Oxidação enzimática, em que as enzimas lipoxigenases levam à formação de peróxidos e hidroperóxidos; (c) Foto-oxidação, promovida pela radiação ultravioleta na presença de fotossensibilizadores e (d) Auto-oxidação, reação com o oxigênio molecular via um mecanismo autocatalítico (RAMALHO; JORGE, 2006).

A rancificação auto-oxidativa é o principal mecanismo de oxidação dos óleos e gorduras (ORDÓÑEZ, 2005). Esta envolve uma série extremamente complexa de reações químicas, que ocorre entre o oxigênio atmosférico e os ácidos graxos insaturados dos lipídeos (RIBEIRO; SERAVALLI, 2007).

A auto-oxidação lipídica ocorre em três estágios: (1) Iniciação, (2) Propagação e (3) Terminação (Figura 5). A fase de iniciação ocorre quando um átomo de hidrogênio é retirado do grupo metileno de um ácido graxo insaturado, levando à formação de um radical livre, em condições favorecidas de calor e luz. A etapa de propagação caracteriza-se pela reação em cadeia de radicais livres, pelo alto consumo de oxigênio, pelo alto teor de peróxidos e pelo início de alterações de aroma e sabor. Cada radical peróxido pode retirar H de uma molécula não oxidada formando hidroperóxidos (podem ser decompostos em radicais livres). A terminação ocorre quando dois radicais livres interagem entre si, para formar diversas substâncias, terminando assim a propagação da reação. Nesta fase ocorre diminuição do consumo de oxigênio e a redução da concentração de peróxidos, apresentando alterações de aroma, sabor, cor e consistência (TOLEDO; ESTEVES; HARTMANN, 1985; RIBEIRO; SERAVALLI, 2007).

Figura 5 – Esquema geral do mecanismo de auto-oxidação lipídica



Onde: RH: Ácido graxo insaturado; R[•]: Radical livre; ROO[•]: Radical peróxido e ROOH: Hidroperóxido.

Fonte: Ramalho e Jorge, 2006

O efeito nocivo das reações de oxidação dos lipídeos pode ser minimizado basicamente com refrigeração, acondicionamento e armazenamento corretos (evitando ao máximo o contato com oxigênio e a incidência de temperatura e luz). Ainda pode-se bloquear a formação de radicais livres por meio da utilização de pequenas quantidades de antioxidantes (JORGE; GONÇALVES, 1998; ORDÓÑEZ, 2005).

3.7.1 Antioxidante

Dá-se o nome de antioxidante a uma substância que quando presente em baixa concentração, comparada à do substrato oxidável, diminui ou inibe significativamente a oxidação daquele substrato (ABDALLA; FAINE; LOUREIRO, 2014).

Os antioxidantes que se adicionam aos alimentos devem cumprir uma série de requisitos: não causar efeitos fisiológicos negativos; não produzir cores, odores nem sabores anômalos; ser eficazes em baixas temperaturas, lipossolúveis e resistentes aos tratamentos a que seja submetido o alimento; além disso, devem ser de fácil obtenção, ativos em baixas concentrações e econômicos (ORDÓÑEZ, 2005).

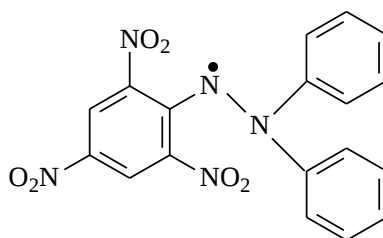
Pode-se citar como os principais antioxidantes provenientes dos alimentos as vitaminas E e C, os minerais cobre, estanho, zinco, manganês e ferro, substâncias fenólicas e carotenoides (PEREIRA, 2011).

São exemplos de antioxidantes sintéticos mais utilizados na indústria de alimentos: BHA (butil-hidroxi-anisol), BHT (butil-hidroxi-tolueno), PG (propilgalato) e TBHQ (terciobutilhidroxinona) (BARREIROS; DAVID, 2006).

3.7.1.1 Sequestro do radical DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazila)

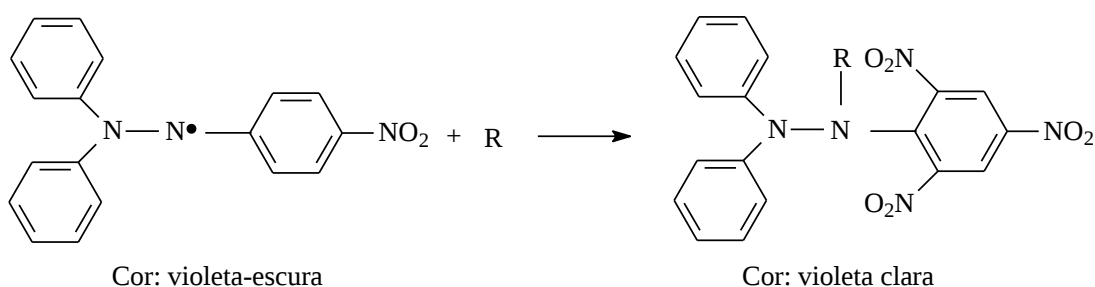
O método DPPH consiste na redução do radical DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) de coloração púrpura que absorve a 515 nm, relativamente estável em solução alcoólica na presença de antioxidantes doadores de hidrogênio. O DPPH (Figura 6), ao receber um elétron ou um radical hidrogênio, modifica sua coloração de violeta para violeta-claro com traços de amarelo (Figura 7), ficando estável e com o desaparecimento da absorção que pode ser avaliada pelo decréscimo da absorbância. A ação antioxidante é expressa em % e pela quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50 %, chamada de IC₅₀. Quanto maior o consumo de DPPH por uma amostra, menor será a sua IC₅₀ e maior a sua atividade antioxidante (BRAND-WILLIAMS; CURVELIER; BERSET, 1995; LIU, 2010; MOLYNEUX, 2004; SOUSA *et al.*, 2007).

Figura 6 - Estrutura do radical DPPH



Fonte: Liu (2010)

Figura 7 - Estabilização do radical DPPH



Fonte: Rufino *et al.* (2007)

3.8 Encapsulação

A microencapsulação é um processo em que pequenas partículas sólidas, gotículas líquidas ou moléculas de gás são revestidas por um material de parede atuando como filme protetor, com o intuito de isolar a substância ativa que se encontra no núcleo formando uma barreira física que as protege das condições adversas do meio externo, estabilizando o produto e aumentando sua vida útil (ROCHA, 2009; SERVAT *et al.*, 2010; CARMO; FERNANDES; BORGES, 2015) e que possam vir a liberar o material sob condições específicas (MATTÉ; ROSA, 2013). O composto a ser encapsulado é designado por núcleo, recheio, material ativo ou fase interna (CARNEIRO *et al.*, 2013).

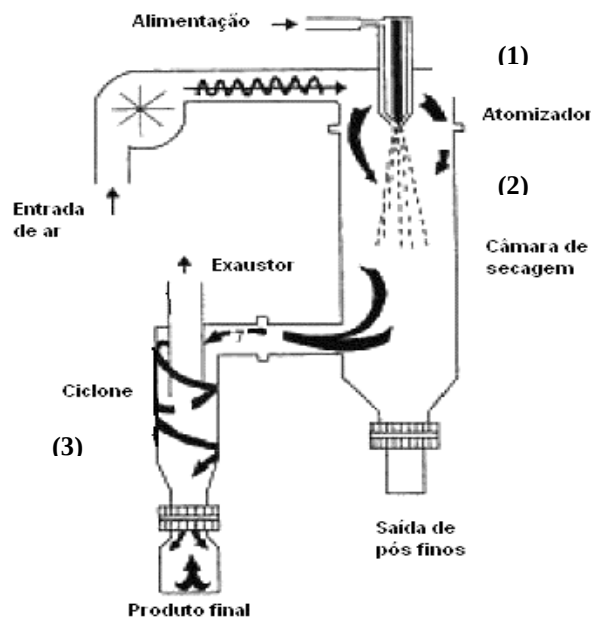
Esta técnica apresenta várias vantagens dentre as quais se destacam a proteção ao oxigênio, luz e à umidade, resultando em maior estabilidade, aumento da biodisponibilidade e liberação controlada do recheio (ABBAS *et al.*, 2012). O controle sobre a liberação das substâncias ativas das micropartículas está associado às características do agente encapsulante, tais como: espessura, porosidade, estrutura química, tamanho e solubilidade, sendo estes determinantes para a difusividade e permeabilidade do núcleo através do material de parede (GAMBOA; GONÇALVES; GROSSO, 2011).

A escolha do material encapsulante é uma etapa importantíssima, e que corresponde a um conjunto de fatores (SARTORI, 2014). Dentre os materiais comumente utilizados como material de parede encontram-se as classes de goma, carboidratos, lipídios, proteínas, celuloses, poliésteres naturais e poliésteres sintéticos (OLIVEIRA; PETROVICK, 2010).

Embora muitas técnicas tenham sido desenvolvidas para microencapsular ingredientes alimentares, a tecnologia *spray drying* é a mais utilizada na indústria de alimentos devido ao baixo custo e a disponibilidade de equipamentos (GHARSALLAOUI *et al.*, 2007).

O processo basicamente envolve quatro etapas: preparação da suspensão ou emulsão, homogeneização, atomização e desidratação das gotículas. Nesta técnica, conforme mostrado na Figura 8, o líquido (solução, emulsão ou dispersão) é atomizado e pulverizado por um bico atomizador em um meio quente e seco (1). Ao entrar em contato com o ar quente circulando na câmara de secagem, a água das gotas é evaporada (2) e então pequenas partículas sólidas, com características específicas, são formadas e recolhidas (3) (AMERI; MAA, 2006; FERNANDES *et al.*, 2008).

Figura 8 - Modelo de *spray-dryer* de bancada



Fonte: AMERI e MAA, 2006

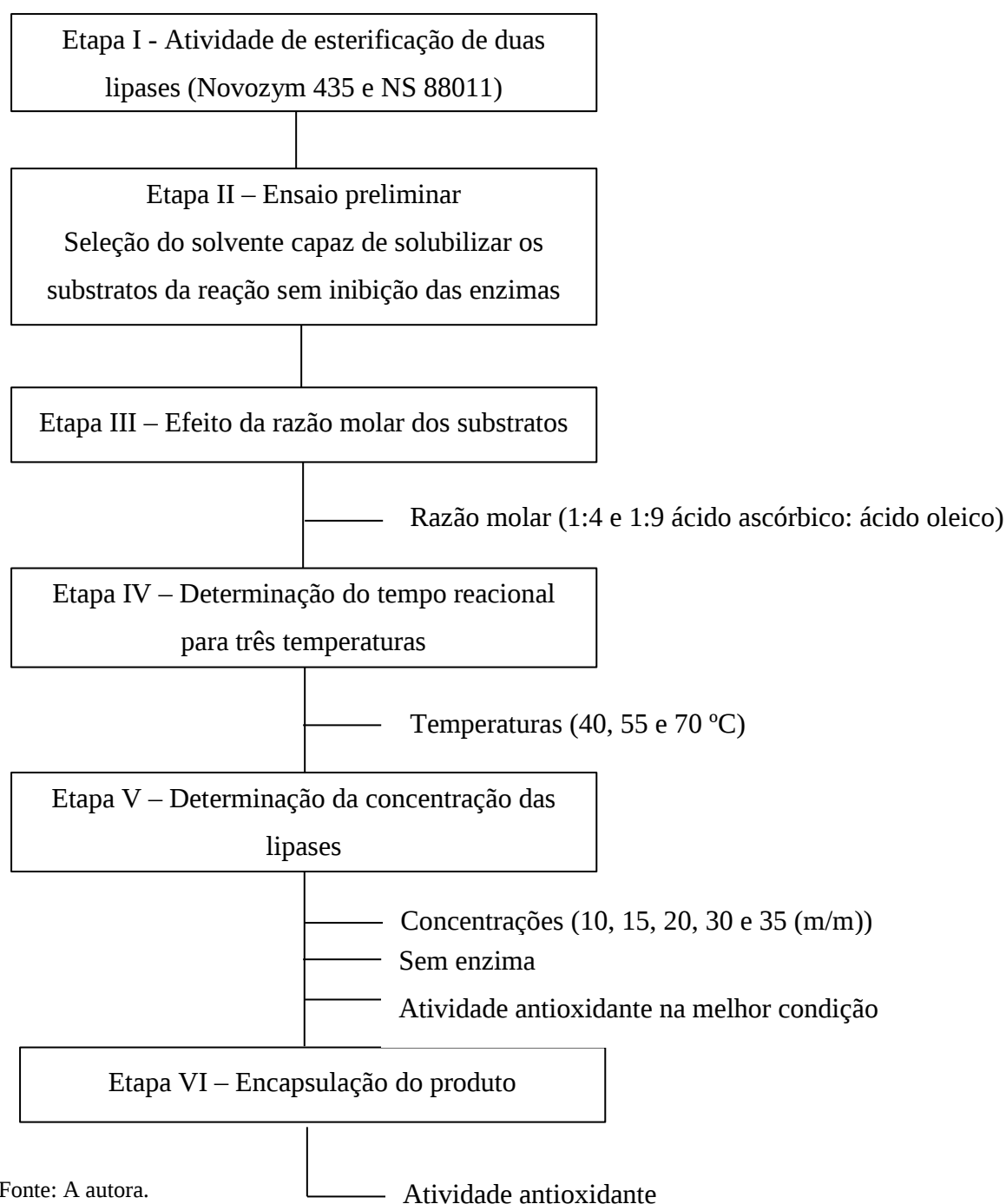
O processo de encapsulamento é visto como uma tecnologia largamente empregada em diferentes setores industriais como: cosmético, agroindustrial na fabricação de pesticidas e farmacêutico, com grande aplicação na produção de vacinas e medicamentos, mas é na indústria de alimentos que ocorre um crescimento gradual em virtude da sua grande aplicabilidade, podendo ser empregada nos mais variados tipos de materiais, como ácidos,

bases, óleos, vitaminas, sais, gases, aminoácidos, óleos essenciais, corantes, enzimas e micro-organismos, pois além de proteger o componente ativo de reações adversas do meio ambiente, aumenta sua estabilidade e viabilidade, além de preservar sua funcionalidade (FAVARO-TRINDADE; PINHO; ROCHA, 2008; SARTORI, 2014). Entretanto, sua aplicação para encapsulação de ésteres de vitamina C é ainda pouco explorada e até o momento não foram encontrados na literatura os relatos sobre imobilização de derivados de ácido ascórbico via tecnologia *spray drying*.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo serão descritos os materiais e métodos utilizados para a realização da esterificação enzimática de oleato de ascorbila e aplicação através da encapsulação por *spray-drier*. O fluxograma da Figura 9 apresenta a sequência dos ensaios realizados.

Figura 9 - Etapas desenvolvidas no estudo da síntese enzimática e encapsulação de oleato de ascorbila



Enzimas

Foram utilizadas duas lipases comerciais de *Candida antarctica*, a Novozym 435 e a NS 88011 as quais são imobilizadas em resina acrílica macroporosa e resina polimérica hidrofóbica, respectivamente.

4.1 Determinação da atividade de esterificação das lipases

A atividade de esterificação das lipases foi determinada através da reação de síntese do oleato de etila (ácido oleico: etanol (1:1) (v/v)). A metodologia apresentada é uma modificação da descrita por Ferraz *et al.* (2012). Realizou-se o ensaio em branco (sem enzima), para determinar a acidez do meio reacional, em seguida foi realizada a adição da enzima (aproximadamente 0,1 g) no meio reacional. A reação foi conduzida em frascos de vidro fechados e mantidos em agitador orbital (New Brunswick, modelo Excella E25R) a 160 rpm, 40 °C e 40 min. Após, alíquotas de 500 µL foram retiradas do meio reacional e adicionados 15 mL de uma solução de acetona-etanol (1:1) (v/v), para paralisar a reação. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

A quantidade de ácido consumida foi determinada por titulação com hidróxido de sódio (NaOH) 0,05 M. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de ácido oleico (em µmol) convertido para grama de enzima por minuto, nas condições do ensaio. A atividade enzimática foi calculada de acordo com a Equação 1.

$$AE = \frac{(Vb - Va) * M * 1000 * Vf}{t * Mel * Vc}$$

Equação (1)

Onde:

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

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

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

M: molaridade da solução de NaOH;

Vf: volume final de meio reacional (mL);

t: tempo (min);

Mel: massa da preparação enzimática utilizada na reação (g);

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

A lipase que apresentou a melhor atividade de esterificação foi utilizada nas próximas etapas deste estudo.

4.2 Seleção de solventes orgânicos para síntese de oleato de ascorbila

A avaliação da solubilidade dos substratos ácido L-ascórbico e ácido oleico foi realizada em condições descritas por Balen *et al.* (2017). Utilizou-se temperatura de 70 °C, razão molar 1:4 (ácido ascórbico: ácido oleico), acrescidos de diferentes volumes do solvente orgânico (5, 10 e 20 mL). Através da análise visual, a solubilidade foi avaliada pela dissolução dos substratos em cada solvente, por um tempo médio de 20 min sob agitação magnética. Os solventes utilizados, com base na literatura (BALEN *et al.*, 2014), foram dimetilsulfóxido (química moderna, 99,5 % de pureza), etanol (êxodo científica, 96 % de pureza), terc-butanol (neon, 99,8 % de pureza), acetonitrila (panreac, 99,9 % de pureza), acetona (êxodo científica, 99,5 % de pureza) e hexano (Merck, 99,5 % de pureza). Os resultados foram classificados em Totalmente solúvel (solução límpida), Parcialmente solúvel (solução turva) e Insolúvel (solução turva e corpo de fundo).

4.3 Estudo do efeito do solvente sobre a atividade enzimática

Para os solventes que apresentaram maior solubilidade realizou-se um estudo sobre a atividade enzimática. A reação de esterificação foi conduzida em razão molar de 1:4 (ácido ascórbico: ácido oleico), com 2 % de enzima, temperatura de 50 °C, 125 rpm e 10 mL de solvente, condições essas descritas por Balen *et al.* (2014). Alíquotas para quantificação da atividade de esterificação foram retiradas nos tempos 2, 8, 24 e 48 h.

O solvente que menos interferiu na atividade enzimática foi utilizado para os próximos ensaios.

4.4 Determinação da razão molar para produção de oleato de ascorbila

Nesta etapa, foram avaliados os efeitos da razão molar na produção de oleato de ascorbila. A escolha das condições reacionais foi baseada em dados descritos na literatura por Chang *et al.* (2009), Zhao *et al.* (2011) e Burham *et al.* (2009). Realizaram-se ensaios variando a razão molar dos substratos (1:4 e 1:9 de ácido ascórbico: ácido oleico). As reações (5 g) foram preparadas com concentração da enzima fixa em 35 % (m/m substratos), temperatura de 70 °C, tempo da reação de 24 h,

agitação de 125 rpm. Foi adicionado ao meio reacional o solvente terc-butanol (selecionado na etapa anterior) até completar o volume de 50 mL. Para retenção de água formada durante o processo de esterificação foram usadas 2 % (m/m) de peneira molecular (4Å Sigma-Aldrich) previamente ativada em estufa a 150 °C por 1 h.

Ao término da reação foi realizada a separação do biocatalizador e da peneira por meio da filtração com papel filtro (filtro qualitativo 80x80 prolab). Posteriormente foi realizada a eliminação do ácido ascórbico e do solvente (terc-butanol) através da extração líquido-líquido com água destilada (3 vezes de 20 mL).

A confirmação de formação do produto foi realizada por Cromatografia em Camada Delgada (CCD), aplicando uma mistura de solventes formada por clorofórmio: metanol: ácido acético: água (81:9:8:2 v/v) como fase móvel. O produto foi visualizado borrifando uma solução 5 % de ácido sulfúrico em etanol, sendo a placa aquecida a 110 °C por 30 min para a revelação das bandas dos componentes (BURHAM *et al*, 2009). Para visualizar a formação de produto foi calculada a constante física R_f (fator de retenção) de cada composto (substratos e produto), conforme Equação 2:

$$R_f = \frac{a}{v}$$

Equação (2)

Onde:

R_f : Fator de retenção;

a: distância percorrida pelo composto;

v: distância percorrida pelo solvente.

O rendimento da reação, nesta etapa, foi avaliado indiretamente medindo-se atividade antioxidante dos substratos e do produto formado.

4.5 Determinação do tempo reacional e da temperatura

Com o solvente, a lipase e razão molar selecionados realizaram-se novos ensaios para determinar o tempo reacional de maior conversão de produto. Como teste inicial, o tempo reacional foi avaliado até 24 h a temperatura de 70 °C, por meio da remoção de alíquotas de 0,5 mL nos tempos 0, 0,5, 1, 2, 6, 12 e 24 h.

Baseando-se nos resultados obtidos nessa etapa e levando em consideração os dados da literatura (KRISTENSEN; XU; UM, 2005; MORENO-PEREZ *et al.*, 2013; SANTIBÁÑEZ; WILSON; ILLANES, 2014; STOJANOVIC *et al.*, 2015 e BALEN, 2017), assim como o fato de que a faixa ótima da atuação para a lipase selecionada ser entre 40 e 70 °C, foi realizada uma nova série de ensaio até o tempo reacional de 90 min avaliando temperaturas reacional de 40, 55 e 70 °C.

A reação de esterificação foi conduzida utilizando a razão molar 1:9 (ácido ascórbico: ácido oleico), com 2 % (m/m) de peneira molecular, agitação constante de 125 rpm (shaker - Servilab SE 1208) e solvente terc-butanol. Alíquotas de 0,5 mL foram removidas do meio reacional nos tempos de 10, 20, 30, 40, 50, 60 e 90 min (amostra destrutiva). A produção de oleato de ascorbila em função do tempo foi avaliada por Cromatografia Líquida de Alta eficiência (CLAE).

4.6 Efeito da concentração das lipases

Após seleção do solvente, razão molar, temperatura e do tempo reacional foram realizados ensaios alterando a concentração da lipase Novozym 435. Visando a redução da concentração da enzima, foram testadas diferentes concentrações da lipase 10, 15, 20, 30 e 35 % (m/m substratos). Contudo, devido ao custo da Novozym 435 foram realizadas nas mesmas condições ensaios para a NS 88011 que possui melhor viabilidade econômica.

A reação de esterificação foi conduzida utilizando razão molar de 1:9 (ácido ascórbico: ácido oleico), com 2 % (m/m) de peneira molecular, temperatura de 70 °C, agitação constante de 125 rpm (shaker - Servilab SE 1208) e solvente terc-butanol.

A quantificação do produto foi realizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. Também foi determinada a atividade antioxidante do produto obtido na melhor condição para ambas as lipases (ensaios realizados em duplicata). Esses resultados foram submetidos a análise de Variância (ANOVA), Teste de Tukey ao nível de 5 % de significância para a comparação entre as médias. Essa análise estatística foi realizada no programa estatístico Statistica Six Sigma, Release 5.

4.7 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A quantificação do produto da reação foi realizada em triplicata em um cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE-Agilent 1100 series), equipado com

detector UV-vis. Os seguintes acessórios e condições foram usados: coluna de fase reversa (C18, 250 × 4,6 mm, 0,5 µm), vazão de 1,0 mL min⁻¹, fase móvel metanol/água/ácido acético (95:5:0,1 v/v/v), o volume de injeção de 1,0 µL e detecção de UV no comprimento de onda de 254 nm. A curva de calibração foi construída com as concentrações de ácido ascórbico de 20 a 200 µg L⁻¹ (Apêndice B). A conversão da reação foi calculada com base na diminuição da área do substrato limitante (ácido ascórbico) e uma reação estequiométrica.

4.8 Estabilidade operacional das enzimas

Os experimentos, realizados para determinar a estabilidade operacional das enzimas na reação de produção de oleato de ascorbila, foram conduzidos a agitação constante de 125 rpm em shaker (Servilab SE 1208), razão molar de 1:9 (ácido ascórbico: ácido oleico), 2 % (m/m) de peneira molecular, temperatura de 70 °C, solvente terc-butanol, 30 e 35 % de enzima (NS 88011 e Novozym 435, respectivamente).

Após o término da reação, as enzimas foram separadas por filtração convencional (filtro qualitativo 80x80 prolab), lavadas duas vezes com 10 mL de n-hexano e filtradas à vácuo (Ls loger, modelo 1314). Este procedimento é uma variação do método descrito por Castro e Anderson (1995). Para a retirada total do solvente as enzimas foram mantidas por 30 min em estufa a 50 °C e 24 h em dessecador. Após, as enzimas foram reutilizadas em uma nova batelada. Esse processo foi realizado até a enzima perder 50 % da sua atividade inicial de esterificação (atividade residual). A atividade de esterificação das lipases foi determinada através da reação de esterificação do ácido oleico e etanol conforme descrito no item 4.1.

4.9 Atividade antioxidante

A técnica para determinação da atividade antioxidante consiste na medida da absorção do radical 2,2 difenil-1-picril hidrazil (DPPH) em 515 nm utilizando espectrofotômetro (UV-Visível marca Agilent Technologies, modelo 8453E), através da incubação por 30 min de 500 µL de soluto contendo concentrações crescentes da amostra (0,1; 0,25; 0,5; 0,75; 1; 1,25; 5; 7,5; 10 mg mL⁻¹) em etanol (êxodo científica 96 % de pureza). Para o controle, utiliza-se 500 µL de DPPH com 500 µL de etanol. O

percentual de captação do radical DPPH é calculado em termos de porcentagem da atividade antioxidante (AA %) conforme a Equação 3 (MIRANDA; FRAGA, 2006):

$$AA \% = \frac{100 - (Abs amostra - Abs do branco)}{Abs controle} \times 100$$

Equação (3)

Onde:

Abs é a absorbância dada em nanômetros;

AA: Atividade antioxidante.

Após a avaliação da faixa de concentração ideal, calcula-se a concentração necessária para capturar 50 % do radical livre DPPH (IC₅₀) por análise de regressão linear.

4.10 Toxicidade in vitro

Para o teste da toxicidade *in vitro*, utilizou-se náuplios de *Artemia salina* de acordo com a metodologia descrita por Vanahecke *et al.* (1981). Os ovos de *A. salina* (30 mg) foram eclodidos entre 22-29 °C em uma solução salina artificial (23 g L⁻¹ de sal marinho e 0,7 g L⁻¹ de bicarbonato de sódio em água destilada). Foi preparada uma solução-mãe na concentração de 50 mg mL⁻¹, e dessa solução, foram preparadas outras nas concentrações de 5, 10, 25, 50, 100, 500, 1000 mg mL⁻¹, diluídas em solução salina. Após 24 h, os ovos eclodiram, e transferiu-se 10 náuplios de *A. salina* para tubos de ensaio contendo 2 mL de cada solução a ser testada e o branco (solução salina com DMSO), em triplicata. A contagem de náuplios mortos e vivos foi realizada após 24 h com o auxílio de um contador de colônias.

4.11 Encapsulação

Para aplicação do produto oleato de ascorbila obtido nas melhores condições reacionais foi realizada a encapsulação do mesmo segundo a metodologia adaptada de Alves, Viell e Plata-Oviedo (2015). A encapsulação foi realizada para o produto obtido por ambas as lipases. O meio encapsulante utilizado foi o amido solúvel (Synth), sendo utilizada 20 g em 400 mL de água destilada e aquecidos por 5 min. Em seguida 10 g do produto foram adicionadas e a amostra foi homogeneizada com auxílio de agitador mecânico (Fisato modelo 752A) por 5 min. Após a homogeneização a emulsão foi seca

por sistema de aspersão em *Spray Drier* (Servilab SE 1208, ilustrado na Figura 10) 180 °C, vazão do ar de pulverização 4,5 kgf cm⁻² e vazão 0,19 L h⁻¹.

Figura 10 – Sistema de aspersão: *Spray Drier*



Fonte: A autora.

O encapsulado foi submetido a avaliação da atividade antioxidante, conforme descrito no item 4.9.

4.12 Extração do encapsulado para análise antioxidante

O pó resultante da encapsulação foi submetido a extração pelo solvente n-hexano. Sendo que, 1 g da amostra foi homogeneizada em agitador de tubos (Quimis) com 10 mL de solvente. Após agitação, a mistura foi mantida em repouso por 1 hora para decantação do amido. O sobrenadante foi retirado com uma pipeta automática e transferido para um Becker para eliminação do solvente por meio do contato com nitrogênio comprimido (White Martins). O peso do produto (oleato de ascorbila e ácido oleico em excesso) recolhido após extração foi tomado como teor do produto total presente em 1 g das microcápsulas.

Foi realizada a avaliação da atividade antioxidante do material recolhido conforme metodologia descrita no item 4.9.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Neste item serão apresentados os resultados e discussões referentes a síntese enzimática e encapsulação de oleato de ascorbila.

5.1 Determinação da atividade de esterificação da lipase

Para um bom rendimento da reação, é necessário a presença de um biocatalisador, como por exemplo, uma enzima. Desta maneira, foram determinadas as atividades de esterificação de duas lipases comerciais (Novozym 435 e NS 88011). A seleção da enzima deve ser realizada de modo a aplicar a que possuir uma maior atividade de esterificação. A Tabela 2 apresenta os resultados da atividade de esterificação das duas lipases, onde se observa que a enzima Novozym 435 apresentou atividade de esterificação superior à encontrada para NS 88011. Quanto maior for o valor de U.g^{-1} , maior é a capacidade de esterificação da enzima, e com isso mais produto será formado ao término da reação. Por isso, a enzima escolhida para a síntese de oleato de ascorbila foi a Novozym 435.

Tabela 2 - Atividade de esterificação para Novozym 435 e NS 88011

Enzima	Atividade de esterificação (U.g^{-1})
Novozym 435	2512,13
NS 88011	1524,17

Erig *et al.* (2014) realizaram uma comparação entre a atividade de esterificação de diferentes lipases comerciais e, dentre elas, a Novozym 435, a qual apresentou uma atividade de esterificação $2889,41 \text{ U.g}^{-1}$ semelhante a encontrada neste estudo ($2512,13 \text{ U.g}^{-1}$), o que demonstra a aplicabilidade da mesma em diversos processos como catalisador.

5.2 Seleção de solventes orgânicos para síntese de oleato de ascorbila

A reação de síntese de oleato de ascorbila utilizando como substratos ácido L-ascórbico e o ácido oleico é de difícil execução, 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 maior 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 (AYRES-BARROS, 2002). Na Tabela 3 estão apresentados os resultados obtidos para a avaliação da solubilidade dos substratos ácido L-ascórbico e ácido oleico em diferentes solventes orgânicos e volumes.

Tabela 3 - Solubilidade do meio reacional com a utilização de diferentes solventes

Solvente	Log P	5 mL	10 mL	20 mL
DMSO	-1,30	++	++	++
Etanol	-0,30	+	++	++
Tec-butanol	0,58	-	+	++
Acetonitrila	0,33	-	-	-
Acetona	-0,23	-	-	-
Hexano	3,5	-	-	-

Legenda: ++: Solúvel; +: Parcialmente solúvel; -: Insolúvel.

Os resultados obtidos nesta etapa demonstraram uma relativa dificuldade de solubilização dos substratos para a maioria dos solventes testados, sendo que apenas DMSO, etanol e terc-butanol apresentaram uma boa capacidade de diluição. O DMSO apresentou solubilidade em todos os volumes de solvente testados, seguido do etanol (solúvel em 10 e 20 mL) e terc-butanol (somente em 20 mL).

O uso de solventes orgânicos apresenta algumas vantagens, como: fácil recuperação do substrato, possibilidade de utilizar substratos com polaridades diferentes, em muitos casos aumenta atividade da lipase, proporciona o deslocamento do equilíbrio químico favorecendo produção de ésteres em vez da hidrólise (GOTOR-FERNÁNDES; BRIEVAS; GOTOR, 2006).

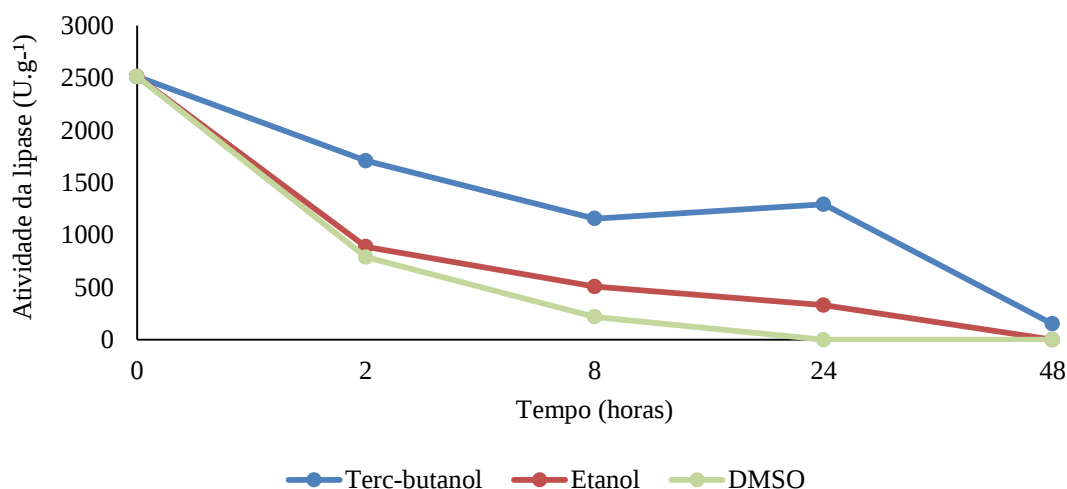
Na literatura existem vários relatos sobre a influência do solvente sobre biocatalizador, tais como, a mudança na rigidez da lipase causada por solventes com alta constante dielétrica e interações iônicas com proteínas. O parâmetro mais frequentemente utilizado para descrever quantitativamente o efeito do solvente em reações catalisadas por enzimas é o log P, definido como o logaritmo do coeficiente de partição do solvente no sistema octanol/água (log P) (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004).

Os solventes que possuem $\log P \leq 2$ são denominados hidrofílicos e não são considerados adequados para a biocatálise, porque perturbam fortemente a interação água-biocatalisador, inativando-o ou desnaturando-o. Os solventes que possuem $\log P \geq 4$ são denominados hidrofóbicos e não perturbam a camada de água, mantendo a enzima no seu estado ativo (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004). Desta maneira, como os solventes que apresentaram solubilidade para os substratos (Tabela 3) possuem $\log$ inferior a 2 deve-se avaliar o efeito destes solventes sobre a atividade enzimática.

5.3 Estudo do efeito do solvente sobre a atividade enzimática

Além da compatibilidade com os substratos da reação, o solvente orgânico não deve afetar fortemente a camada de hidratação da enzima (KUMAR; MADRAS; MODAK, 2004). A Figura 11 apresenta os efeitos dos solventes (terc-butanol, etanol e DMSO) na atividade de esterificação da lipase Novozym 435, onde se observa que ocorreu diminuição da atividade de esterificação durante as 48 h de reação com os três solventes testados.

Figura 11 – Efeito dos solventes (terc-butanol, etanol e DMSO) na atividade de esterificação da lipase Novozym 435



Pode-se perceber que embora o DMSO e o etanol apresentaram maior capacidade de solubilizar substratos ocorreu uma rápida inativação da enzima já nas primeiras duas horas de reação, o que está coerente com o parâmetro $\log P$ definido por Dalla-Vecchia, Nascimento e Soldi (2004) onde ressalta-se que os solventes com $\log P \leq 2$ perturbam fortemente a camada água-biocatalisador. Este mesmo comportamento

também foi observado em estudos de Plou *et al.* (2002) e Balen *et al.* (2014). Outras desvantagens com o uso do DMSO em reações de síntese são a dificuldade de separação do produto do solvente em função da elevada temperatura de ebulição (189 °C) e alta hidrofiliabilidade do mesmo, que leva a um aumento da quantidade de água no sistema, não desejável para a síntese de ésteres (BALEN *et al.*, 2015). Já o etanol possui dois pontos negativos para sua utilização na síntese de oleato de ascorbila. O primeiro é o fato dele implicar na perda de atividade da enzima gradativamente com o tempo, até que ela seja inativada e o segundo é que o etanol pode competir com o substrato (ácido ascórbico), ocasionando a produção oleato de etila (SUTILI *et al.*, 2013).

O terc-butanol apesar de necessitar de maior quantidade para solubilizar os substratos, é o solvente que menos interferiu na atividade enzimática nas primeiras horas de reação e, mesmo após 48 h, a enzima não perdeu totalmente a atividade, demonstrando que este solvente pode ser aplicado na síntese de oleato de ascorbila. Além disso, o terc-butanol, por ser um álcool terciário, é menos provável a competição com o substrato (RUFINO *et al.*, 2010; MORENO-PEREZ *et al.*, 2013; BALEN *et al.*, 2015). Lerin *et al.* (2011) analisou a conversão de ascorbil palmitato com diferentes solventes nas condições de 50 °C, razão molar 1:5 (ácido L-ascórbico e ácido palmítico), 5 % m/m de enzima (Novozym 435 e Lipozyme RM IM), em 20 mL de solvente e agitação de 150 rpm para 24 h de reação e constatou que houve conversão do produto apenas com a utilização de terc-butanol.

Desta maneira, o terc-butanol foi escolhido para ser utilizado como solvente em reações de esterificação enzimática para produção de oleato de ascorbila.

5.4 Determinação da razão molar para produção de oleato de ascorbila

Foram medidas atividades antioxidantes e calculados IC₅₀ dos substratos, da mistura reacional antes da reação (branco*) e do oleato de ascorbila obtido em razão molar de 1:4 e 1:9 (ácido ascórbico: ácido oleico). Também foi determinada a atividade antioxidante da mistura reacional após remoção do ácido ascórbico (branco**), para avaliar a eficiência da extração líquido-líquido ao final da reação de esterificação. Os resultados seguem apresentados na Tabela 4 (no Apêndice A estão expostos os gráficos de regressão linear para cálculos do IC₅₀).

Tabela 4 – Atividade antioxidante expressa em valores de IC₅₀ dos substratos (ácido ascórbico e ácido oleico), branco* (mistura reacional), branco** (mistura reacional após extração líquido-líquido para remoção do ácido ascórbico) e produto da reação (oleato de ascorbila) com excesso de ácido oleico obtidos utilizando a razão molar 1:4 e 1:9 (ácido ascórbico: ácido oleico)

Amostra	Equação da reta	IC ₅₀ (µg mL ⁻¹)
Ácido ascórbico	$y = 97992x + 6,50$ ($R^2 = 0,97$)	0,448
Ácido oleico	$y = 0,942x + 2,19$ ($R^2 = 0,99$)	-
Branco (1:9)*	$y = 0,096x + 9,97$ ($R^2 = 0,90$)	413,96
Branco (1:9)**	$y = 0,001x - 0,061$ ($R^2 = 0,96$)	-
Oleato de ascorbila (1:4, 70°C)	$y = 0,121x + 6,83$ ($R^2 = 0,98$)	356,12
Oleato de ascorbila (1:9, 70°C)	$y = 0,185x + 1,38$ ($R^2 = 0,99$)	262,22

* mistura dos substratos ácido oleico e ácido ascórbico

** mistura dos substratos após extração do ácido ascórbico

- não apresentou atividade antioxidante acima de 50 %

Ao analisar os resultados da Tabela 4 observa-se que a reação com maior proporção de ácido oleico (razão molar 1:9), apresentou um IC₅₀ menor, caracterizando uma maior atividade antioxidante, mesmo que na razão molar 1:9 (ácido ascórbico: ácido oleico) há menor proporção de ácido ascórbico do que na 1:4 (ácido ascórbico: ácido oleico) já que a massa reacional foi fixada em 5 g. Vale salientar, que IC₅₀ é a quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50 % (BRAND-WILLIAMS; CURVELIER; BERSSET, 1995) o que significa que quanto menor o valor de IC₅₀ maior será a atividade antioxidante. 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 a velocidade da reação tende a aumentar e o equilíbrio da reação se deslocará para formação do produto (BALEN *et al.*, 2017).

Devido aos resultados obtidos observamos indiretamente que houve diferenças na conversão de produto usando maior proporção de agente acilante (ácido oleico). Balen *et al.* (2015) também verificou que dentre as razões molares testadas a razão

molar 1:9 (ácido ascórbico: ácido oleico) levou a conversão mais expressiva, de 66,4 %, no tempo de reação de 3 h a 70 °C em micro-ondas. Lerin *et al.* (2011) também observou maior conversão de produto usando razão molar 1:9 (ácido L-ascórbico: ácido palmítico) e temperatura de 70 °C para a formação de ascorbil palmitato.

Observando IC₅₀ dos substratos (ácido ascórbico e ácido oleico), verificou-se que o ácido ascórbico apresenta potencial antioxidante com IC₅₀ de 0,45 µg mL⁻¹, valor próximo encontrado por Verruck (2012) e Negri, Possamai e Nakashima (2009) (0,25 e 0,44 µg mL⁻¹), respectivamente. Já o ácido oleico não apresentou concentração capaz de inibir 50 % da atividade do DPPH (IC₅₀) demonstrando não possuir propriedades antioxidantes. Observando as atividades antioxidantes (IC₅₀) obtidas do oleato de ascorbila, verificamos que houve uma grande diminuição quando comparado ao ácido ascórbico, podendo esta diminuição estar atribuída a um efeito inibidor do ácido oleico.

A confirmação da produção do éster pode ser observada comparando o IC₅₀ do oleato de ascorbila (obtido tanto na razão molar 1:9 e 1:4 (ácido ascórbico: ácido oleico)) com a atividade observada pelo branco**. Nesta comparação verifica-se que o produto após extração líquido-líquido para remoção do ácido ascórbico apresentou atividade antioxidante satisfatória enquanto o branco** apresentou resultado similar ao ácido oleico puro, demonstrando eficiência e confiança na extração líquido-líquido com água para retirada o ácido ascórbico, e confirmando a produção do éster.

Para visualizar a formação do produto, as reações de esterificação foram acompanhadas por Cromatografia em Camada Delgada (CCD), conforme resultados apresentados na Figura 12. CCD é uma técnica de adsorção líquido-sólido, onde há a separação dos compostos pela diferença de afinidade dos componentes de uma mistura pela fase estacionária. O parâmetro mais importante para essa técnica é o fator de retenção (Rf), que é a razão entre a distância percorrida pela substância em questão e a distância percorrida pela fase móvel. Cada composto apresenta um diferente Rf, que pode ser utilizado para identificar a substância ou confirmar a formação de um produto (DEGANI; CASS; VIEIRIA, 1998).

Figura 12 - Cromatografia em camada delgada, apresentando as bandas para ácido ascórbico (1), ácido oleico (2) e reação (3)



(1) (2) (3)

Pode-se observar (Figura 12) que o ácido ascórbico (1), não apresenta banda eluída, pois em função da sua alta polaridade e baixa afinidade com solventes não sai da linha de aplicação, interagindo com a fase estacionária. Já o ácido oleico (2), por ser apolar, possui grande afinidade pela fase móvel e elui juntamente com ela, apresentando a sua banda na linha do solvente.

Nota-se que tanto o ácido ascórbico (1), quanto o ácido oleico (2) apresentam apenas uma banda cada um. O ponto (3) apresenta três bandas. A banda mais abaixo é correspondente ao ácido ascórbico (R_f : 0,14), a da linha do solvente corresponde ao ácido oleico (R_f : 0,76), e a intermediária corresponde ao oleato de ascorbila (R_f : 0,54) formado. O oleato de ascorbila apresenta polaridade intermediária do ácido ascórbico e do ácido oleico e, por isso, sua banda é revelada em um R_f diferente, demonstrando a formação do produto visto que houve a presença de uma banda com valor de R_f diferente quando comparado com os reagentes.

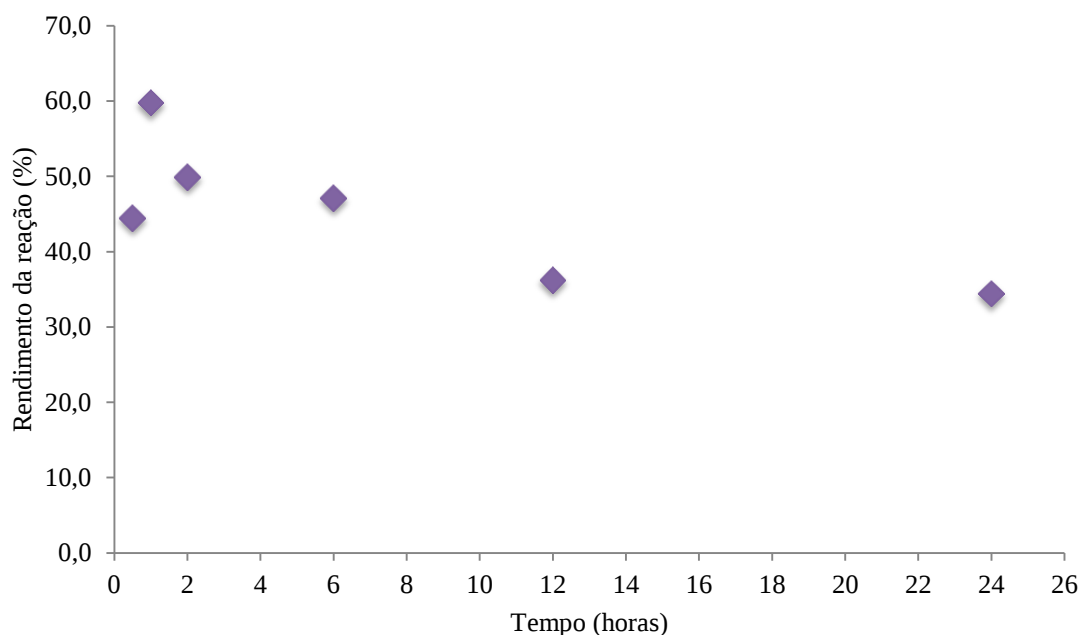
Essa técnica é útil para demonstrar a formação do produto após a reação, indicando que ela ocorreu e que sua conversão não foi de 100 %, pois ainda há ácido oleico e ácido ascórbico residual.

5.5 Determinação do tempo reacional e da temperatura

A fim de verificar o tempo de reação necessário para maior produção de oleato de ascorbila manteve-se a razão molar ácido ascórbico: ácido oleico (1:9), a concentração da enzima em 35 % (v/v), 2 % para peneira molecular, 50 mL de terc-

butanol, temperatura de 70 °C, agitação constante em shaker de 125 rpm em tempo total de até 24 h, sendo que alíquotas de 0,5 mL foram retiradas em 0,5, 1, 2, 6, 12 e 24 h. O rendimento da reação foi avaliado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Na Figura 13 o rendimento da reação é apresentado em função do tempo, onde se verifica que a maior conversão obtida foi de 60 % em apenas 1 h de reação.

Figura 13 - Conversão de oleato de ascorbila (%) em função do tempo



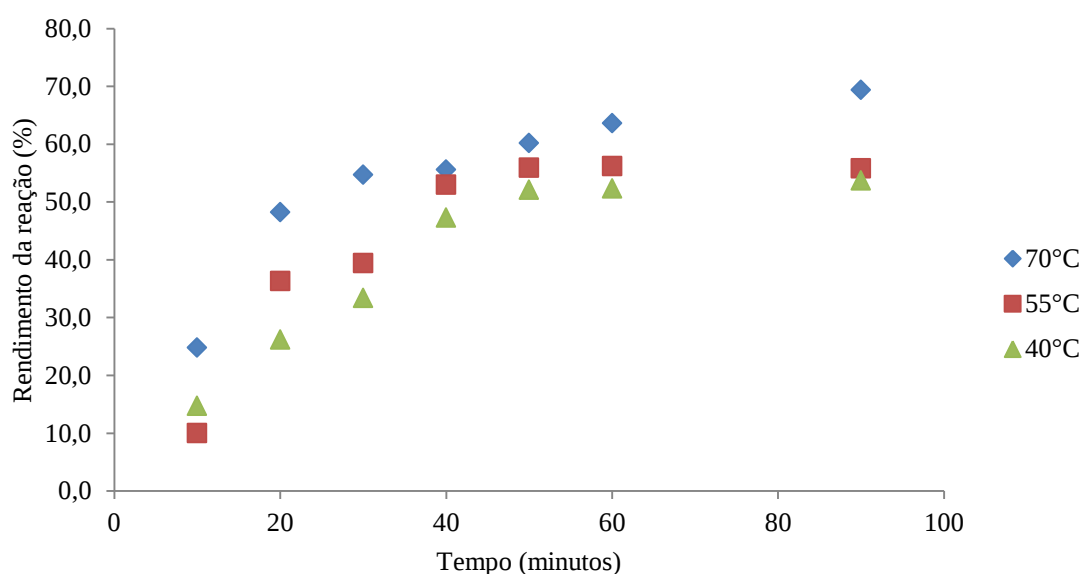
O decréscimo da conversão do oleato de ascorbila pode ser explicado por meio do estudo de Irimescu, Sato e Kato (2004), sendo este associado à presença do subproduto formado, que no caso é a água. Esta água gerada durante a reação de esterificação é considerada o mais importante parâmetro a ser controlado, pois durante a reação, um mol de água é formado para cada mol de éster sintetizado. A remoção da água por diversos métodos pode prevenir a hidrólise e ajudar na direção da reação para um produto com altas conversões. No caso deste estudo, para retenção de água formada durante o processo de esterificação foram utilizadas 2 % (m/m) de peneiras moleculares, podendo esta quantidade ser insuficiente para remoção da água total gerada.

Em um estudo realizado por Humeau *et al.* (1998), utilizando o ácido L-ascórbico e o ácido palmítico na razão de 1:9, respectivamente, verificou-se uma conversão de aproximadamente 40 % de ascorbil palmitato após 5 h de reação, em terc-

butanol. Porém, não foi observado um aumento significativo na conversão após maior tempo de reação.

Analizando este comportamento e sabendo que a faixa ótima de temperaturas para Novozym 435 situa-se entre 40 e 70 °C, novas reações foram realizadas. O tempo reacional foi fixado em 1h30min e as temperaturas testadas foram: 70, 55 e 40 °C. O rendimento da reação foi avaliado por CLAE e os resultados estão apresentados na Figura 14.

Figura 14 – Produção de oleato de ascorbila à 70, 55 e 40 °C em função do tempo



A partir dos resultados apresentados na Figura 14 pode-se verificar que o comportamento nas três temperaturas (40, 55 e 70 °C) foi semelhante, observando maior rendimento de reação para a maior temperatura (70 °C) com conversão de 70 % em 1h30min de reação.

A temperatura apresenta dois importantes papéis no sistema reacional. Primeiramente, altas temperaturas podem melhorar a difusão dos substratos, solubilidade e aumento da velocidade das reações. Em segundo lugar, as enzimas possuem uma temperatura ótima de atuação, no caso a Novozym 435 está na faixa de 40 a 70 °C, sendo o seu controle fundamental para não ocasionar a desnaturação da mesma (KRISTENSEN; XU; MU, 2005).

Os rendimentos reportados para a síntese enzimática de ésteres pela enzima Novozym 435 variam muito em função do sistema estudado (BALEN *et al.*, 2015). 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).

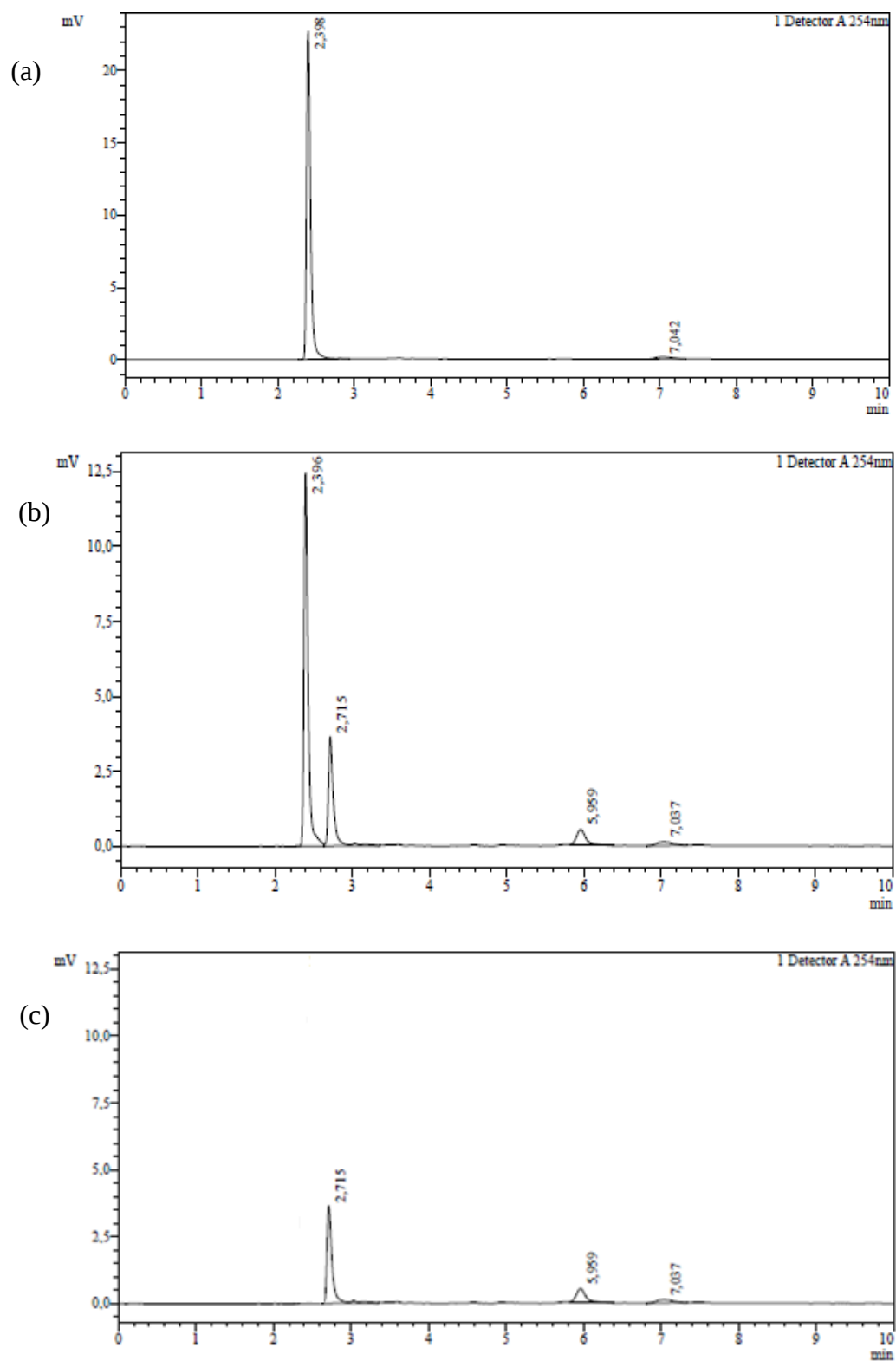
Silveira (2015) estudou três temperaturas (50, 60 e 70 °C) para produção de oleato de ascorbila utilizando Novozym 435 e também verificou maior conversão (66 %) na temperatura maior em 3 h de reação. Richetti (2009) analisou o efeito da temperatura (30 a 70 °C) no sistema reacional de produção de palmitato de 2-etilexila, verificando que a temperatura de 70 °C destacou-se, apresentando conversões de 96 % para a Novozym 435 em 30 min e 95 % para a Lipozyme RM IM em 1 h de reação. Santibanez, Wilson e Illanes (2014) dentre as temperaturas estudadas (45, 55 e 70 °C) também verificou maior conversão (51 %) a 70 °C para produção de ascorbil palmitato utilizando Novozym 435.

Para a realização da quantificação do produto, as reações foram submetidas ao CLAE. Além da formação de produto, pode-se visualizar a eficiência da extração líquido-líquido para remoção do ácido ascórbico. Os cromatogramas analíticos são exibidos na Figura 15, sendo apresentado o branco (mistura dos reagentes sem reagir (a)), reação final (b) e reação final após a extração líquido-líquido (c).

Na Figura 15b, percebe-se a diminuição da área do substrato limitante (ácido ascórbico) no tempo de 2,39 quando comparado a Figura 15a, indicando o consumo de ácido ascórbico, sendo por meio deste a quantificação de formação de produto. Além disso, observa-se a formação de um novo pico após a reação em 2,715, sendo este pico o possível produto.

A eficiência da extração líquido-líquido realizada neste estudo pode ser observada também (Figura 15c), pelo pico no tempo de retenção 2,39 não estar presente no cromatograma, indicando que houve a remoção total do ácido ascórbico presente no final da reação, não influenciando desta maneira na atividade antioxidante.

Figura 15 - Cromatograma da mistura reacional (branco* (a)), reação final (b) e reação final após extração líquido-líquido (c)



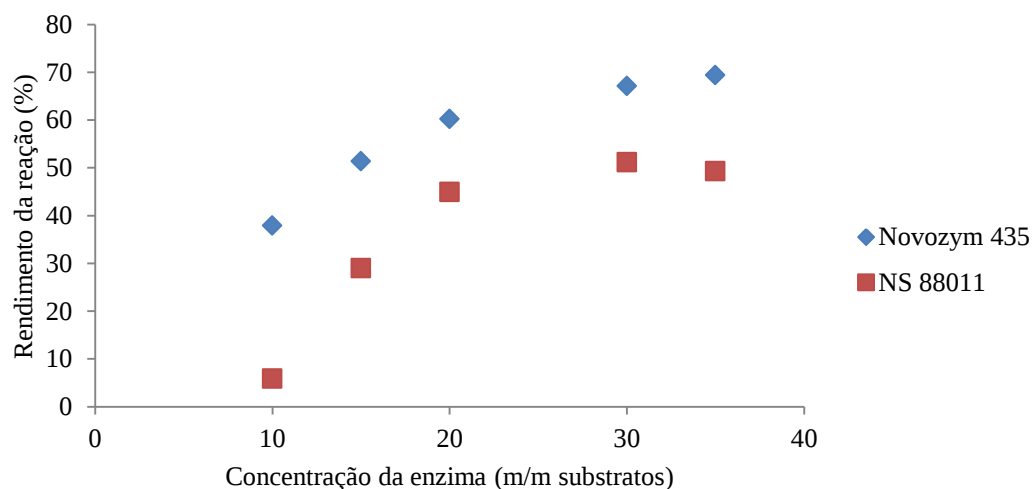
5.6 Efeito da concentração das lipases

Até à presente data, os únicos trabalhos relatados na literatura com o uso da lipase NS 88011 são de síntese de ésteres aromáticos para a indústria alimentar (ZANETTI *et al.*, 2017; SÁ *et al.*, 2018). Zanetti *et al.*, (2017) estudaram a produção enzimática de cinamato de geranil e atingiram uma conversão de 97 % em ésteres a 70 °C usando 20 % em peso de lipase. Sá *et al.*, (2018) realizaram a biocatálise de éster benzil-propionato aromático com diferentes lipases imobilizadas, sendo uma delas a NS 88011, contudo obtiveram uma baixa conversão (14,3 %) utilizando solvente terc-butanol, razão molar de 1:5 (ácido propiônico álcool benzílico), 10 % em peso de lipase a 50 °C em agitação mecânica por 24 h.

Em vista disso, é importante investigar a possível aplicação de NS 88011 em outros sistemas reacionais já que sua utilização como biocatalisador para produção de ésteres de ácido ascórbico ainda não foi relatada na literatura.

A Figura 16 apresenta os resultados de conversão em oleato de ascorbila obtidos em diferentes concentrações das lipases Novozym 435 e NS 88011, usando razão molar ácido ascórbico: ácido oleico 1:9, temperatura 70 °C, 2 % de peneira molecular, solvente terc-butanol e agitação constante em shaker a 125 rpm por 1h30min. Observa-se que a Novozym 435 apresentou rendimentos superiores em todas as concentrações testadas quando comparada a NS 88011, atingindo conversão máxima para Novozym 435 com 35 % (m/m substratos) e NS 88011 com 30 % (m/m substratos) de enzima, apresentando rendimentos de 69 % e 51 %, respectivamente. Para confirmar a ação catalítica das lipases foi realizada uma reação de esterificação nas mesmas condições, mas sem uso de biocatalizador. Neste teste, nenhum consumo de substrato foi observado, indicando que não houve conversão em produto.

Figura 16 - Rendimento de produção de oleato de ascorbila em função da concentração das lipases Novozym 435 e NS 88011



Nota-se na Figura 16 que houve um aumento do rendimento da reação proporcional ao aumento da concentração da enzima, isso é possível, pois o aumento da quantidade de enzima favorece o aumento da velocidade da reação (RODRIGUES, 2009). Entretanto, foi observada uma diminuição no rendimento da reação da concentração de 35 % quando comparado a 30 %, utilizando a NS 88011, isto pode ser devido a uma concentração muito elevada de enzima que dificulta a suspensão uniforme dos biocatalisadores, conduzindo à inativação da enzima (WEI *et al.*, 2003), além disso, o excesso da enzima no meio pode provocar uma agregação das partículas das enzimas imobilizadas, diminuindo a exposição do sítio ativo aos substratos, e isto conduz a diminuição do rendimento.

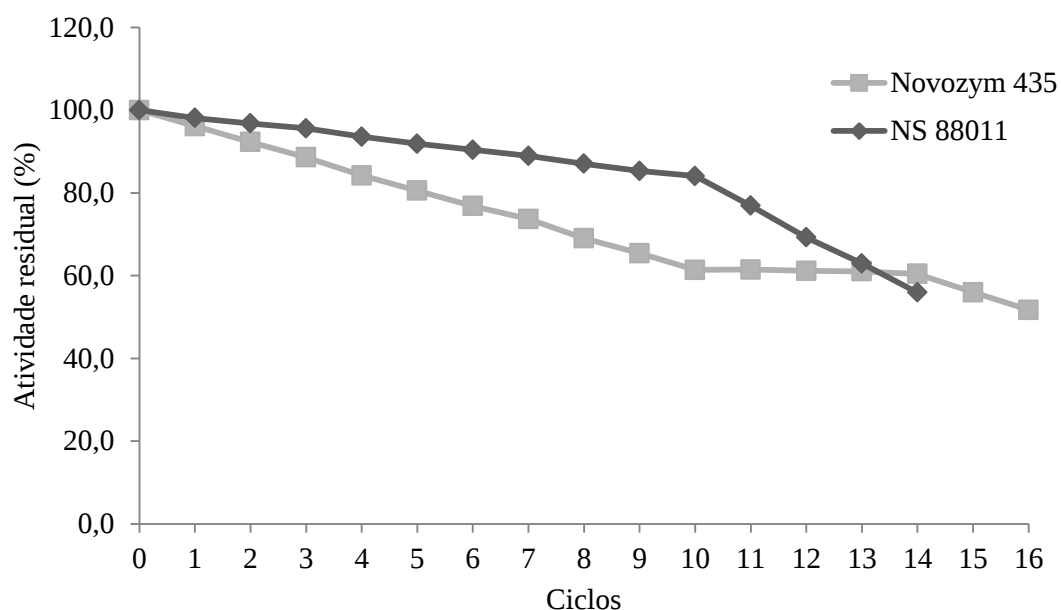
Chang *et al.* (2009) em seus estudos de otimização para a produção de ascorbil laureato observaram rendimento máximo de 93,2 % com tempo de reação de 6,7 h, temperatura 30,6 °C, razão molar 1:4,3, com 34,5 % de Novozym 435, quantidade de enzima semelhante a reportada neste estudo.

Em reações enzimáticas um dos maiores problemas é o custo da enzima, por este motivo é importante obter taxas de conversão altas utilizando a menor quantidade de enzima possível, além disso, é importante também avaliar as possibilidades do reuso das lipases.

5.7 Estabilidade operacional da enzima

A utilização de catalisadores imobilizados possuem vantagens devido a facilidade de separação do meio reacional, possibilitando a reutilização em uma nova reação podendo vir a redução de custos. Por este motivo é importante investigar a possibilidade de reuso da enzima. Deste modo, foram realizadas reações para cada lipase nas melhores condições obtidas neste estudo. A temperatura reacional utilizada foi de 70 °C, razão molar 1:9 (ácido ascórbico: ácido oleico), solvente terc-butanol, 1h30min de reação em shaker a 125 rpm, sendo utilizado 30 e 35 % de enzima (NS 88011 e Novozym 435, respectivamente). Após a reação, a enzima foi filtrada e lavada com n-hexano para remoção de qualquer substância residual, para então ser reutilizada na próxima reação (ciclo). Os resultados estão apresentados na Figura 17.

Figura 17 - Estabilidade operacional das lipases NS 88011 e Novozym 435



*Cada ciclo corresponde a 1h30min de reação.

Os resultados demonstram que a atividade de esterificação das enzimas é reduzida aproximadamente pela metade nos 14º e 16º ciclos para NS 88011 e Novozym 435, respectivamente, indicando que as mesmas podem ser reutilizadas muitas vezes, sendo este um fator importante. Deste modo, pode-se ressaltar que as lipases utilizadas possuem boa estabilidade operacional nas condições reacionais deste estudo para a síntese de oleato de ascorbila.

Em ensaios realizados anteriormente, em estudo do efeito do solvente sobre a atividade enzimática, verificamos que a Novozym 435 demonstrou redução da atividade em 50 % em 24 h de reação, o que coincide aproximadamente com os resultados obtidos neste item, devido ao 16º ciclo corresponder a 22h10min de reação, indicando a influência direta do terc-butanol na atividade enzimática.

Yadav e seus colaboradores (2017) desenvolveram a síntese de palmitato de L-ascorbilo e ao realizar ensaios verificando a estabilidade operacional da PyCal (lipase imobilizada de *Candida antarctica*) para 10 ciclos, em mistura reacional de 0,72 g de ácido ascórbico, 5,22 g de ácido palmítico, 20 mL de terc- butanol, e temperatura de 60 °C observaram conversões consistentes, não havendo redução durante os ciclos testados, indicando boa estabilidade operacional.

Contudo, Balen *et al.* (2015) em reações testadas a 60 e 70 °C, razão molar 1:9 (ácido ascórbico:ácido oleico); 5 % de Novozym 435; 2 mL de terc-butanol, 2 h com irradiação de micro-ondas observaram que, no terceiro ciclo de uso a enzima Novozym 435 diminuiu drasticamente o valor da conversão do oleato de ascorbila (redução em aproximadamente 5 vezes no primeiro ciclo).

Além disso, vale ressaltar que a lipase NS 88011 apresentou maior estabilidade nos primeiros ciclos de reuso devido a redução da atividade de esterificação dela ser menor, quando comparado a Novozym 435, ou seja, a NS 88011 demonstrou ser menos afetada nas primeiras horas pelas condições reacionais usadas em nosso trabalho, indicando seu potencial de aplicação em reações de esterificação.

Ao mesmo tempo, é importante analisar a viabilidade econômica da aplicação de ambas as enzimas lipolíticas. A principal desvantagem no uso industrial da Novozym 435 (Novozymes) está associada ao alto custo de aquisição. Em vista disso, o desenvolvimento de suportes economicamente viáveis abrem novas possibilidades de aplicações principalmente em escala industrial, que é a vantagem da NS 88011, imobilizada com material de baixo custo, formulada pela Novozymes (CIPOLATTI *et al.*, 2014; POLLONI *et al.*, 2018).

5.8 Toxicidade *in vitro*

A avaliação da toxicidade é realizada com o objetivo de determinar o potencial de novas substâncias e produtos em causar danos à saúde humana (FORBES; FORBES, 1994).

O teste de toxicidade *in vitro* utilizando o crustáceo *Artemia salina* foi realizado para os substratos (ácido ascórbico e ácido oleico) e para o produto sintetizado (oleato de ascorbila). Os resultados demonstraram que não houve morte do organismo teste (*Artemia salina*) tanto para os substratos, quanto o produto obtido, em concentrações menores de 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Na área da toxicologia, a dose letal mediana (DL50) é a dose necessária de uma dada substância ou tipo de radiação capaz de matar 50 % de uma população em teste. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), são consideradas tóxicas substâncias que apresentam DL50 abaixo de 1000 ppm (1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$) em *Artemia salina* (MEYER *et al.*, 1982).

Portanto, podemos inferir que o composto oleato de ascorbila não é tóxico, já que não houve morte do organismo teste.

5.9 Atividade antioxidante do produto final e encapsulado

Ao final das etapas de produção de oleato de ascorbila foi escolhido o melhor resultado de conversão obtido para ambas as lipases. A condição reacional utilizada para a análise foi de 70 °C, 1h30min de reação, terc-butanol, ácido ascórbico: ácido oleico (1:9), 2 % peneira molecular, agitação constante de 125 rpm, 35 e 30 % (m/m substratos) de enzima para Novozym 435 e NS 88011, respectivamente. Ao final da reação foi realizada a remoção da enzima e peneira molecular e posterior extração do ácido ascórbico residual e terc-butanol. Desta maneira, a atividade antioxidante foi avaliada para o produto (oleato de ascorbila) na presença residual de ácido oleico, bem como do produto encapsulado. Na Figura 18, está ilustrado o produto após a encapsulação.

Figura 18 – Produto oleato de ascorbila encapsulado



Fonte: A autora.

Para ser possível determinar a atividade antioxidante do produto encapsulado foi realizada uma extração com n-hexano, sendo que, foi obtido 11 % de produto em cada 1 grama de encapsulado. Na Tabela 5, estão apresentados os resultados antioxidantes em IC_{50} do produto nas melhores condições de rendimento e do encapsulado para ambas as lipases.

Tabela 5 - Resultados das atividades antioxidantes do oleato de ascorbila livre e imobilizado expressos em termos de IC_{50} $mg\ mL^{-1}$

Enzima utilizada	Produto oleato de ascorbila	
	Livre	Imobilizado
NS 88011	$0,304^a \pm 0,0197$	$1,493^b \pm 0,226$
Novozym 435	$0,423^a \pm 0,0795$	$1,464^b \pm 0,299$

Médias acompanhadas de mesma letra não diferem entre si a nível de 5 % de significância.

Analisando os resultados demonstrados na Tabela 5 verificamos que o produto formado tanto para Novozym 435 quanto a NS 88011 apresentaram semelhança no IC_{50} , não havendo diferença significativa a nível de 5 %, bem como entre o encapsulado. Verifica-se também que os encapsulados apresentou IC_{50} de aproximadamente 3,5 vezes superior ao produto, indicando diminuição na atividade antioxidante provavelmente devido as perdas ocorridas durante a encapsulação e posterior extração do oleato de ascorbila do suporte para realização da análise. No entanto, o encapsulado ainda apresenta eficiência antioxidante.

Considerando que o oleato de ascorbila encontra-se encapsulado junto com excesso do ácido oléico, faz-se necessário desenvolver um processo de purificação para obter o produto puro e consequentemente com maior capacidade antioxidante.

Contudo, vale destacar que o IC_{50} obtido é um bom resultado, visto que em estudos de Balen *et al.* (2015) observou-se IC_{50} de $11,7 \pm 1,75 \text{ mg mL}^{-1}$ para oleato de ascorbila, indicando menor potencial antioxidante quando comparado ao presente estudo ($0,30$ e $0,42 \text{ mg mL}^{-1}$ para NS 88011 e Novozym 435, respectivamente).

6 CONCLUSÕES

No presente estudo foi realizada a síntese enzimática do ácido L-ascórbico e ácido oleico com o intuito de produzir um antioxidante lipossolúvel e posterior microencapsulação em *spray-dryer* do composto obtido para aumentar a estabilidade do mesmo.

Entre os solventes orgânicos testados, o solvente terc-butanol mostrou-se apropriado para a síntese, pois interferiu menos na atividade enzimática nas primeiras horas de reação. A razão molar que se destacou com maior atividade antioxidante foi a 1:9 (ácido ascórbico: ácido oleico) e o tempo reacional que demonstrou maior produção de oleato de ascorbila foi em 1h30min, nos tempos investigados.

Em condições avaliadas, Novozym 435 mostrou melhor eficiência catalítica quando comparado a NS 88011 e dentre as temperaturas reacionais testadas, 70 °C apresentou maior formação de produto quando comparado a 55 e 40 °C. Ambas as lipases demonstraram ter ótima estabilidade operacional, já que apresentaram em torno de 15 ciclos de reuso para atingir atividade residual de 50 %, destacando a lipase NS 88011 devido ser menos afetada nas primeiras horas pelas condições reacionais utilizadas.

Ao mesmo tempo, é importante analisar a viabilidade econômica da aplicação de ambas as enzimas. Os biocatalisadores usados neste estudo possuem diferença no custo, sendo a NS 88011 uma preparação enzimática imobilizada em custo inferior. Devido a este fator e seu potencial observado nesta reação de esterificação, o emprego da NS 88011 pode ser interessante em escala industrial.

O produto oleato de ascorbila apresentou satisfatória atividade antioxidante, bem como o encapsulado, demonstrando potencialidade e inovação à técnica de encapsulação utilizada, visto que não foram encontrados relatos na literatura a seu respeito. Oleato de ascorbila não apresentou toxicidade de acordo com a OMS, podendo ser aplicado como aditivo alimentar sem causar danos à saúde dos consumidores.

Deste modo, conforme os dados apresentados observa-se que este estudo demonstrou ser promissor e eficiente, tendo em vista principalmente a possível tendência na utilização da lipase (NS 88011) com custo de aquisição inferior, indicando desta maneira grande potencial nas condições apresentadas para obtenção de oleato de ascorbila.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

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

- Otimização do processo de produção de oleato de ascorbila usando a lipase NS 88011;
- Purificação do produto oleato de ascorbila e confirmação da estrutura por RMN;
- Encapsulação do oleato de ascorbila por outros métodos a fim obter melhor atividade antioxidante;
- Avaliar a cinética de liberação do oleato de ascorbila encapsulado;
- Aplicar produto encapsulado em alimentos.

8 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, S.; WEI, C.; HAYAT, K.; XIAOMING, Z. Ascorbic acid: microencapsulation techniques and trends - a review. **Food Reviews International**, v. 28, n. 4, p. 343-374, 2012.

ABDALLA, D. S. P.; FAINE, L. A. LOUREIRO, A. P. M. Radicais livres e antioxidantes. In: OGA, S; CAMARGO, M. M. A.; BATISTUZZO, J. A. O. **Fundamentos de Toxicologia**. 4. ed. São Paulo: Atheneu Editora, 2014. p. 37-58.

ADAMCZAK, M.; 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.

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

AKANBI, T. O.; BARROW, C. J. Incorporação catalisada por Lipase de EPA em óleo de emu: formação e caracterização de novos lipídios estruturados. **Journal of Functional Foods**, v. 19, p. 801-809, 2015.

ALVES, C. Q.; BRANDÃO, H. N; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; LIMA, L. S. Avaliação da atividade antioxidante de flavonóides. **Revista da rede ensino FTC**, v. 5, n. 12, p. 7- 8, 2007.

ALVES, F. C. G. B. S.; VIELL, F. L.G.; PLATA-OVIEDO, M. S.V. Amido de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) esterificado com ácido esteárico. **Brazilian Journal of Food Research**, v. 6, n. 2, p. 57-66, 2015.

AMERI, M., MAA, Y. Spray-drying of biopharmaceuticals: stability and process considerations. **Drying Technology**, v. 24, n.6, p. 763-768, 2006.

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.

BALEN, M.; GOMES, G. R.; KRATZ, J. M. SIMÕES, C. M. O.; VALÉRIO, A.; OLIVEIRA, D. Enzymatic synthesis of ascorbyl ester derived from linoleic acid. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 40, p. 265-270, 2017.

BALEN, M.; SILVEIRA, C.; KRATZ, J. M.; SIMÕES, C. M.; VALÉRIO, A.; NINOW, J.; NANDI, L. G.; DILUCCIO, M.; DE OLIVEIRA, D. Novozym 435 catalyzed production of ascorbyl oleate in organic solvent ultrasound-assisted system. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, p. 514–520, 2015.

BALEN, M.; SILVEIRA, C.; LERIN, L. A.; NINOW, J. L.; LUCCIO, M. D.; OLIVEIRA, D. **Solubilidade do sistema reacional contendo ácido ascórbico/ácido**

oleico em diferentes solventes orgânicos. In: XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química, p. 1-8, 2014.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, M. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, p. 113-123, 2006.

BERGER, R.G. Biotechnology of flavours – the next generation. **Biotechnology letters**, v.31, p.1751-1659, 2009.

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

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**, v. 28, n.1, p. 25-30, 1995.

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 Reviews in Medicinal Chemistry**, v.13, p. 201–210, 2013.

CARMO, E. L.; FERNANDES, R. V. B.; BORGES, S. V. Microencapsulação por *spray drying*, novos biopolímeros e aplicações na tecnologia de alimentos. **Journal of Chemical Engineering and Chemistry**, v. 1, n. 2, p. 30-44, 2015.

CARNEIRO, H. C. F.; TONON, R. V.; GROSSO, C. R. F.; HUBINGER, M. D. Encapsulation efficiency and oxidative stability of flaxseed oil microencapsulated by spray drying using different combinations of wall materials. **Journal of Food Engineering**, v.115, n. 4, p. 443-451, 2013.

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

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

CHANG, K.; ISMAIL, A.; DAUD, Z. Properties, Determination and Uses In: CABALLERO, B., FINGLAS, P.M., TOLDRÁ, F. **Encyclopedia of food and health**, v.1, p.275-284, 2016.

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, n.1, p.7-12, 2009.

CHAZIN, E. de L. Métodos de Preparação Industrial de Solventes e Reagentes Químicos. **Revista Virtual de Química**, v. 4, n. 6, p. 872-883, 2012.

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

COSTA, I. C.R.; SUTILL, 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.

CRESPO, J. DA S.; QUEIROZ, N. NASCIMENTO, M. G.; SOLDI, V. The use of lipases immobilized on poly (ethylene oxide) for the preparation of alkyl esters. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 1, p.401-409, 2005.

CURI, R.; POMPEIA, C.; MYASAKA, C. K.; PROCOPIO, J. **Entendendo as gorduras: os ácidos graxos**. Barueri: Manole, 583 p., 2002.

DABDOUB, M.J.; BRONZEL, J.L.; RAMPIN, M.A. Biodiesel: visão crítica do status atual e perspectivas na academia e na indústria. **Química Nova**, v. 32, 776-792, 2009.

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

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de Alimentos de Fennema**. Porto Alegre: Artmed, 900 p., 2010.

DEGANI, A.L.; CASS, Q.B.; VIEIRA, P.C. Cromatografia um breve ensaio. **Química Nova na Escola**, n.7, 1998.

DESAI, K. G. H.; PARK, H. J. Recent developments in microencapsulation of food ingredients. **Drying Technology**, v.23, p.1361-1394, 2005.

DESAI, K. G.; LIU, C.; PARK, H. J. Characteristics of vitamin C encapsulated tripolyphosphate-chitosan microspheres as affected by chitosan molecular weight. **Journal of Microencapsulation**, v. 23, n. 1, p. 79-90, 2006.

ERIG, C.L. BONISSONI, C., GUZZO, M.E., SOLIGO, A., DALLA ROSA, A., DORS, G.C., FELTES, M.M.C. **Comparação da atividade de esterificação de diferentes lipases comerciais**. In: Mostra nacional de iniciação científica e tecnologia interdisciplinar, Araquari, Instituto Federal Catarinense, 2014, p. 1-5.

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

FAVARO-TRINDADE, C. S.; PINHO, S. C. D.; ROCHA, G. A. Revisão: Microencapsulação de ingredientes alimentícios. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 11, n. 2, p. 103-112, 2008.

FERNANDES, L.P.; TURATTI, I.C.C.; LOPES, N.P.; FERREIRA, J.C.; CANDIDO, R.C.; OLIVEIRA, W.P. Volatile retention and antifungal properties of spray-dried

microparticles of *Lippia sidoides* essential Oil. **Drying Technology**, v.26, n.12, p.1534-1542, 2008.

FERRAZ, L. R, SANTOS, D. O.; SILVA, M. F.; RIGO, E.; LUCCIO, M. D.; OLIVEIRA, J. V.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H. Production and partial characterization of multifunctional lipases by *Sporobolomyces ruberrimus* using soybean meal, rice meal and sugarcane bagasse as substrates. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 1, p. 243-252, 2012.

FORBES, V. E.; FORBES, T. L. Ecotoxicology in Theory and Practice. **Chapman and Hall**, p. 247, 1994.

GAMBOA, O. D.; GONÇALVES, L. G.; GROSSO, C. F. Microencapsulation of tocopherols in lipid matrix by spray chilling method. **Procedia Food Science**, v. 1, p. 1732-1739, 2011.

GHARSALLAOUI, A.; ROUDAUT, G.; CHAMBIN, O.; VOILLEY, A.; SAUREL, R. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: an overview. **Food Research International**, v. 40, p. 1107-1121, 2007.

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.

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

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

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

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

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.

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.

JORGE, N.; GONÇALVES, L. A. G. Aditivos utilizados em óleos e gorduras de frituras. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 32, n. 1, p. 40-47, 1998.

KAPOOR, M.; GUPTA, M. N. Lipase promiscuity and its biochemical applications. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 1-15, 2012.

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

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

KLESZCZEWSKA, E. Ascorbic acid—clinical use, toxicity, properties, methods of determination and application in chemical analysis. **Pharmazie**, v. 55, p. 640-644, 2000.

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. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v.43, p.1568-1573, 2004.

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

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

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.

LIU, Z. Chemical methods to evaluate antioxidant ability. **Chemical Reviews**, v. 110, p. 5675–5691, 2010.

MADENE, A.; JACQUOT, M.; SCHER, J.; DESOBRY, S. Flavour encapsulation and controlled release – a review. **International Journal of Food Science and Technology**, v.41, n.1, p.1-21, 2006.

MATTÉ, G. M.; ROSA, S. A tecnologia da microencapsulação através das microesferas de quitosana. **Revista Iberoamericana de Polímeros**, v. 14, n. 5, p. 206-218, 2013.

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

MEYER, B.N. FERRIGNI, N. R.; PUTNAM, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E.; MCLAUGHLIN, J. L. A convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Medica**, v.45, p.31-34, 1982.

MIRANDA, A. L. P.; FRAGA, C. A. M. Atividade seqüestradora de radical livre determinação do potencial antioxidante de substâncias bioativas. In: MONGE, A.; GANELLIN, C. R. **Practical Studies for Medicinal Chemistry**, p.79-82, 2006.

MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, v. 26, n. 2, p. 211-219, 2004.

MORENO-PEREZ, S.; FILICE, M.; GUISAN, J.M.; LORENTE, G. F. 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.

NEGRI, M. R. S.; POSSAMAI, J. C.; NAKASHIMA, T. Atividade antioxidante das folhas de espinheira-santa - *Maytenus ilicifolia* Mart. secas em diferentes temperaturas. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, p. 553-556, 2009.

OLIVEIRA, M. A. **Resolução enzimática de álcoois secundários**. 2007. 105 f. Dissertação (Mestrado em química) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

OLIVEIRA, O. W.; PETROVICK, P. R. Secagem por aspersão (*spray drying*) de extratos vegetais: bases e aplicações. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 4, p. 641-650, 2010.

OLIVEIRA, D.; NASCIMENTO FILHO, I.; DI LUCCIO, M.; FACCIO, C.; ROSA, C. D.; BENDER, J. P.; LIPKE, N.; AMROGINSKI, C.; DARIVA, C.; OLIVEIRA, J. V. Kinetics of enzyme-catalyzed alcoholysis of soybean oil in n-hexane. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.124, p. 231-242, 2005.

OLIVEIRA, D.; DI DUCCIO, M.; FACCIO, C.; ROSA, C. D.; BENDER, J. P.; LIPKE, N.; AMROGINSKI, C.; MENONCIN, S.; OLIVEIRA, J. V. Optimization of enzymatic production of biodiesel from castor oil in organic solvent medium. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.115, p. 771-780, 2004.

ORDÓÑEZ PEREDA, Juan Antonio (Org.). **Tecnologia de alimentos**. Porto Alegre: Artmed, 2005. 294 p.

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.

PARDAKHTY, A; AHMADZADEH, S.; AVAZPOUR, S.; GUPTA, V. K. Highly sensitive and efficient voltammetric determination of ascorbic acid in food and pharmaceutical samples from aqueous solutions based on nanostructure carbon paste electrode as a sensor. **Journal of Molecular Liquids**, v. 216, p. 387–391, 2016.

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

PEREIRA, M. C. **Avaliação de compostos bioativos em frutos nativos do Rio Grande do Sul**. 2011. 131 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e tecnologia de alimentos). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

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

POLLONI, A. E.; CHIARADIA, V.; FIGURA, E. M.; PAOLI, J. P. DE; OLIVEIRA, D. DE; OLIVEIRA, J. V. DE; ARAUJO, P. H. H. DE; SAYER, C. Poliésteres de Macrolactonas Usando Lipase Comercial NS 88011 e Novozym 435 como Biocatalisantes. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 184, p. 659-672, 2018.

QUIROGA, E.; PRIOLO, N.; MARCHESE, J; BARBERIS, S. Stability of Araujiain, a novel plant protease, in different organic systems. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v. 24, n. 2, p. 204-208, 2005.

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

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

REYES-DUARTE, D.; LOPEZ-CORTES, N.; TORRES, P.; COMELLES, F.; PARRA, J. L; PEN, S.; UGIDOS, A. V.; BALLESTEROS, A.; PLOU, F. J. Synthesis and properties of ascorbyl esters catalyzed by lipase TL IM using triglycerides as acyl donors. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 88, p.57-64, 2011.

RIBEIRO, E.P.; SERAVALLI, E.A.G. **Química de alimentos**. 2 ed. SP: Edgard Bllucher, 2007.

RICHETTI, A. **Esterificação enzimática de palmitato de 2-etilexila em sistema livre de solvente**. 2009. 101 f. Dissertação (mestrado em Tecnologia de processos químicos e bioquímicos) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

ROCHA, G. A. **Produção, caracterização, estabilidade e aplicação de microcápsulas de licopeno**. 2009. 93f. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.

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

RODRIGUES, R. C. **Síntese de biodiesel através de transesterificação enzimática dos óleos vegetais catalisada por lipase imobilizada por ligação covalente multipontual**. 2009. 183 f. Tese (Doutorado em engenharia química) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

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.

RUFINO, M. S. M. ALVES, R. E.; BRITO, E. S. de; MORAIS, S. M. de; SAMPAIO, C. de G.; PÉREZ - JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre DPPH. **Comunicado Técnico Embrapa**. ISSN 1679-6535 Julho, Fortaleza, CE, 2007.

SÁ, A. G. A.; MENESES, A. C. DE; LERIN, L. A.; ARAÚJO, P. H. H. DE; Sayer, C.; Oliveira, D. Biocatalysis of aromatic benzyl-propionate ester by different immobilized lipases. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, p. 1-7, 2018.

SANTIBÁÑEZ, L.; WILSON, L.; ILLANES, A. Synthesis of Ascorbyl Palmitate with Immobilized Lipase from *Pseudomonas stutzeri*. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 91, p. 405-410, 2014.

SANTIBANEZ, L.; WILSON, L.; ILLANES, A. Synthesis of Ascorbyl Palmitate with Immobilized Lipase from *Pseudomonas stutzeri*. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 95, p. 405-410, 2014.

SARTORI, T. **Incorporação de antioxidante microencapsulado em filme de amido de banana verde**. 2014. p. 159. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2014.

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

SERVAT, L.; SPINDOLA, H. M.; RODRIGUES, R. A. F.; FOGLIO, M. A. Microencapsulação: uma alternativa promissora para preservação de produtos naturais. **Revista Fitos**, v. 5, n. 2, p. 52-57, 2010.

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

SILVA, F.A.M.; BORGES, M.F.M.; FERREIRA, M.A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Química Nova**, São Paulo, v. 22, n. 1, p. 94-103, 1999.

SILVEIRA, C. **Síntese enzimática de ascorbil oleato em sistema assistido por ultrassom**. 2015. 113 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina, 2015.

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.

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

STERGIOU, P.Y.; FOUKIS, A.; FILIPPOU, M.; KOUKOURITAKI, M.; PARAPOULI, M.; THEODOROU, L.G.; HATZILOUKAS, E.; AFENDRA, A.; PANDEY, A.; PAPAMICHAEL, E.M. Advances in lipase-catalyzed esterification reactions. **Biotechnology Advances**, v.31, p. 1846-1859, 2013.

STOJANOVIC, M.; CAREVIC, M.; MIHAILOVIC, M.; VELICKOVIC, D.; DIMITRIJEVIC, A.; MILOSAVIC, N.; BEZBRADICA, D. Influence of fatty acid on lipase-catalyzed synthesis of ascorbyl esters and their free radical scavenging capacity. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 62, n. 2, p. 458-466, 2015.

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

TAVARES, J.; SANTOS, C. M. G.; TEIXEIRA, L. J.; SANTANA, R. S.; PORTUGAL, A. M. Estabilidade do ácido ascórbico em polpa de acerola submetida a diferentes tratamentos. **Magistra online**, v.15, n. 2, 2003.

TODD, S.; SCURR, D. J.; GOUGH, J. E.; ALEXANDER, M. R.; ULIJN, R.V. Enzyme-activated RGD ligands on functionalized poly(ethylene glycol) monolayers: surface analysis and cellular response. **Langmuir**. v. 25, n. 13, p. 7533-7539, 2009.

TOLEDO, M. C. F.; ESTEVES, W.; HARTMANN, E. M., Eficiência de antioxidantes em óleo de soja. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 5, n. 1, p. 1-11, 1985.

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

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

VANHAECKE, P.; PERSOONE, G.; CLAUS, C.; SORGELOOS, P. Proposal for a short-term toxicity test with *Artemia nauplii*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 5, p. 382-387, 1981.

VERRUCK, S. **Caracterização química, atividade antioxidante e antimicrobiana de três espécies de frutos do gênero *Campomanesia* sp. 2012.** 75 f. Trabalho de conclusão de curso Tecnologia de alimentos, Concórdia, 2012.

VIDINHA, P.; HARPER, N.; MICAEL, N. M.; LOURENÇO, N. M.; GOMES, M. D. R. S.; CABRAL, J. M. S.; AFONSO, C. A. M.; SOARES, C. M.; BARREIROS, S. Effect of immobilization support, water activity, and enzyme ionization state on cutinase activity and enantioselectivity in organic media. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 85, p. 442-449, 2004.

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

VILLENEUVE, P.; 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.

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, n. 2, p. 73-75, 2001.

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

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

YADAV, M. G.; KAVADIA, M. R.; VADGAMA, R. N.; ODANETH, A. A.; LALI, A. M. Produção de palmitato de 6- O - l- Ascorbyl por Candida antarctica lipase B imobilizada. **Bioquímica Aplicada e Biotecnologia**, p. 1-19, 2017.

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.

ZANETTI, M.; CARNIEL, T. K.; VALÉRIO, A.; OLIVEIRA, J. V.; OLIVEIRA, D.; ARAÚJO, P.; ARAÚJO, H. H.; RIELLA, H. G. E.; FIORI, M. A.; Synthesis of geranyl cinnamate by lipase-catalyzed reaction and its evaluation as an antimicrobial agent. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 92, n. 1, p. 115-121, 2017.

ZHANG, D. H.; LI, C.; XIE, L. L.; YUWEN, L. X. Enzymatic Synthesis of L-Ascorbyl Laurate in DMSO–Acetone Mixed Solvent. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 52, p. 11875-11879, 2013.

ZHAO, H.; ZHANG, Y.; LU, F.; BIE, X.; LU, Z.; NING, H. Optimized enzymatic synthesis of ascorbyl esters from lard using Novozym 435 in co-solvent mixtures. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 69, p. 107–111, 2011.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Atividade antioxidante – IC₅₀

Para determinação do IC₅₀ é necessário ajustar os dados por meio da regressão linear para a obtenção da equação da reta. Nas Figuras 19 a 24 seguem os valores obtidos para os substratos, brancos e produto nas razões molares 1:4 e 1:9.

Figura 19 – Regressão linear para determinação do IC₅₀ do ácido ascórbico

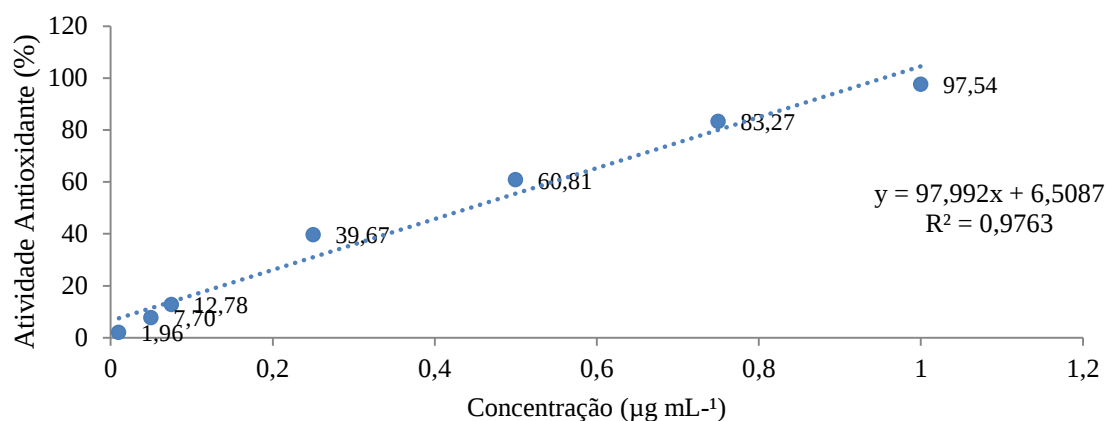


Figura 20 - Regressão linear para determinação do IC₅₀ do ácido oleico

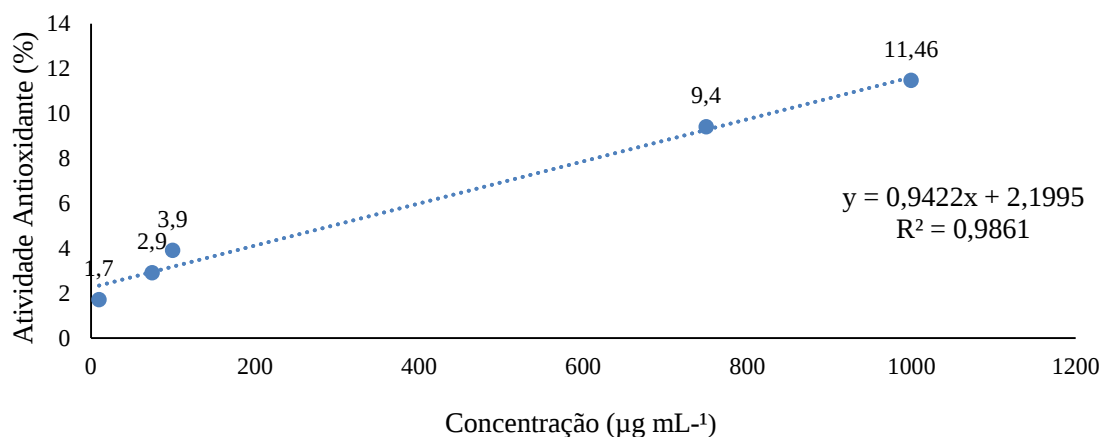


Figura 21 - Regressão linear para determinação do IC₅₀ do oleato de ascorbila na razão molar 1:9 (ácido ascórbico: ácido oleico)

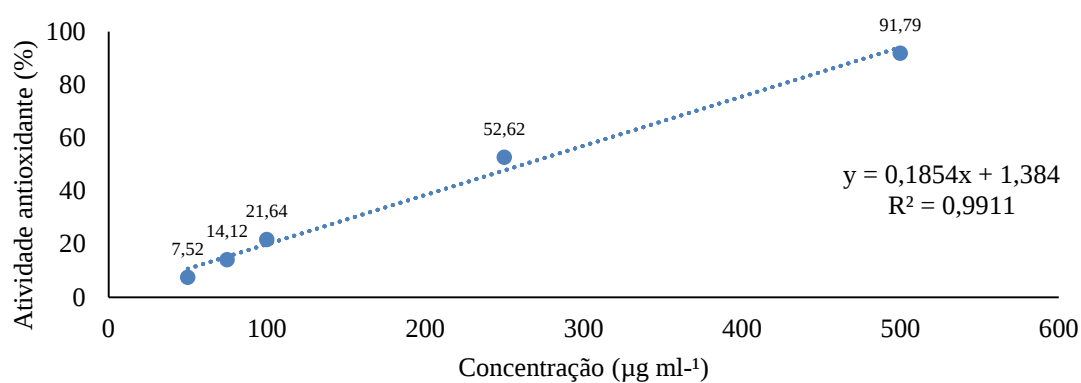


Figura 22 - Regressão linear para determinação do IC₅₀ do oleato de ascorbila na razão molar 1:4 (ácido ascórbico: ácido oleico)

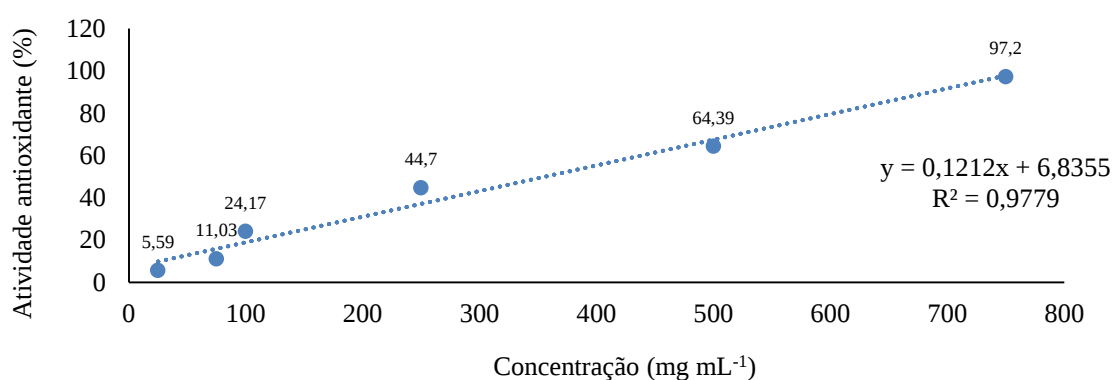


Figura 23 - Regressão linear para determinação do IC₅₀ da mistura reacional (branco*)

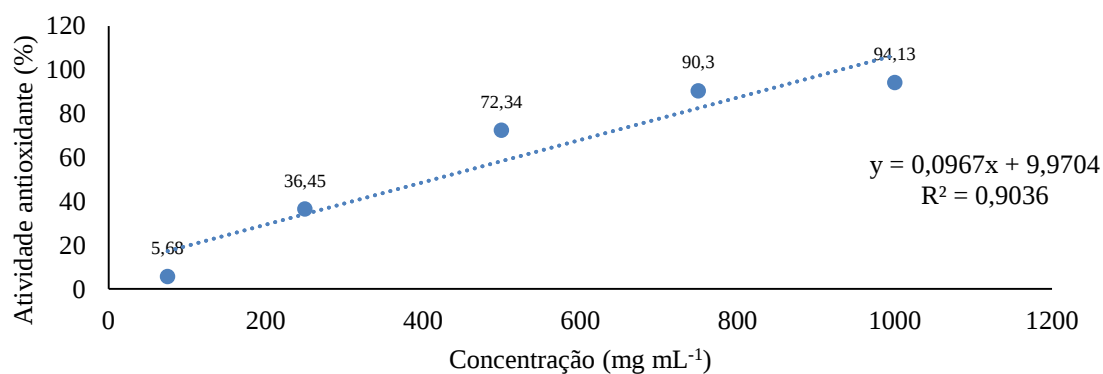
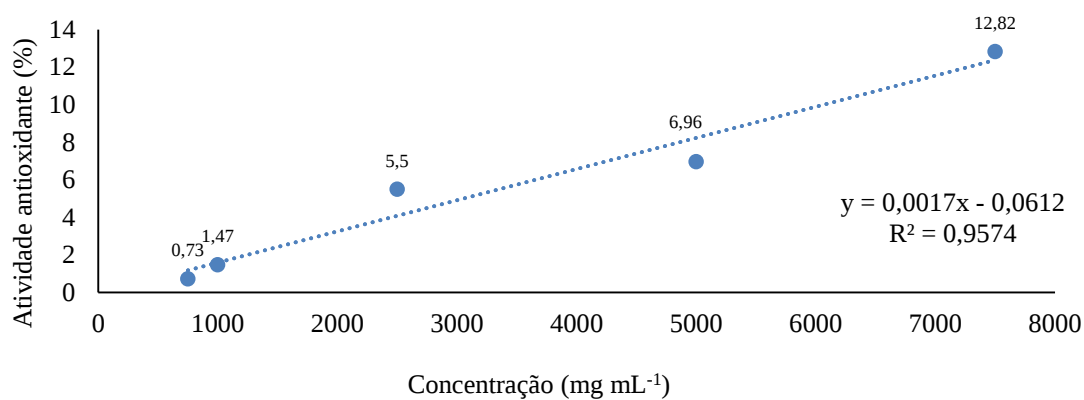


Figura 24 - Regressão linear para determinação do IC₅₀ da mistura reacional após extração do ácido ascórbico (branco**)



APÊNDICE B - Quantificação CLAE

Para a quantificação do produto por CLAE com detector de UV foi construída curvas padrão para o ácido ascórbico, pois o ácido oleico não é detectado em UV. A Figura 25 apresenta a equação obtida na curva de calibração para ácido ascórbico que foram utilizados para os cálculos de conversão.

Figura 25 - Curva de calibração do ácido ascórbico para quantificação do produto

