

SOLUBILIDADE E PRODUÇÃO DO SISTEMA REACIONAL CONTENDO DIFERENTES SUBSTRATOS EM DIFERENTES SOLVENTES ORGÂNICOS

M. BALEN¹, C. SILVEIRA¹, L. A. LERIN², J. L. NINOW¹, M. DI LUCCIO¹ e D. OLIVEIRA¹

¹ Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos

² Università degli studi di Padova, Departamento de Engenharia Química
E-mail para contato: balenmanuela@gmail.com

RESUMO – A produção enzimática de ascorbil éster utilizando como substratos ácido L-ascórbico, ácido oleico, ácido esteárico, ácido palmítico, óleo de palma e resíduo industrial de ácido graxo de óleo necessita que ocorra a total solubilidade dos substratos a fim de obter maiores rendimentos. Ácido L-ascórbico é hidrofílico dissolve-se em solventes polares, porém os outros substratos são hidrofóbicos, possuindo preferência por solventes apolares. Para obter o melhor solvente reacional, os substratos foram submetidos a ensaios de solubilidade em diferentes solventes orgânicos e diferentes volumes de solventes (5 mL a 20 mL), a 70 °C e em ultrassom. Por conseguinte, a produção enzimática de ascorbil ésteres a partir dos substratos acima citados foi estudada utilizando solvente orgânico e ultrassom. Entre os solventes testados ocorreu solubilidade total com álcool etílico, dimetilsulfóxido e terc-butanol. Em relação à produção de ascorbil ésteres obteve-se 41% de conversão com o ácido palmítico, em concordância com resultados encontrados na literatura.

1. INTRODUÇÃO

O ácido L-ascórbico tem sido amplamente utilizado nas indústrias alimentícia, cosmética e farmacêutica. Para solucionar o problema de baixa lipossolubilidade que limita sua aplicação, por esse motivo os derivados de ácido L-ascórbico são sintetizados (Watanabe et al., 2008). Uma maneira eficaz para alterar a solubilidade é a modificação do ácido L-ascórbico via esterificação (Reyes-Duarte et al., 2011). Recentemente, reações de síntese de ascorbil ésteres utilizando lipase como catalisador em solvente orgânico foram relatadas (Lerin et al., 2011, Chang et al., 2009, Zhang et al., 2012). Para identificar as condições ótimas da esterificação catalisada por lipase, é essencial primeiramente investigar a solubilidade e os mecanismos da reação.

Devido à crescente procura por materiais naturais, a síntese de ésteres catalisada por lipases, tornou-se um processo comercialmente atraente. A otimização da síntese enzimática de ascorbil ésteres com maior produtividade e redução dos custos utilizando condições mais favoráveis, seria atraente para os fabricantes e traria benefícios para o consumidor (Chang et al., 2009).

O uso de lipases nas indústrias permite o desenvolvimento de processos tecnológicos próximos aos processos executados pela natureza. A lipase é amplamente utilizada para catalisar as reações entre os substratos e os produtos (Batistella et al., 2012). Além disso, os mecanismos cinéticos têm sido propostos para proporcionar reações catalisada por lipase. Hoje em dia, muitos ésteres de ascorbil como ascorbil oleato (Reyes-Duarte et al., 2011), ascorbil palmitato (Lerin et al., 2012) e ascorbil linoleato (Watanabe et al., 2008) são sintetizados por esterificação enzimática em solvente orgânico.

Atualmente, o sistema de irradiação ultrassônica é uma técnica promissora de processamento químico. Geralmente, o uso de ultrassom de alta intensidade (baixa frequência) é de grande importância para promoção de mistura, dispersão e emulsão. Quando um líquido está sob a influência do ultrassom de alta intensidade, as ondas sonoras se propagam no meio, alternadamente, resultando em intervalos de alta pressão e baixa pressão. Durante um intervalo de baixa pressão, pequenas bolhas de vácuo são criadas no líquido. Quando estas bolhas atingem um volume que não podem mais absorver energia, elas colapsam violentamente. Este fenômeno é chamado de cavitação (Hielscher, 2005). Em reações enzimáticas o ultrassom contribui para reduzir as limitações de transferência de massa entre o substrato e a enzima aumentando a velocidade da reação.

A reação de síntese de ascorbil oleato, utilizando como substratos ácido L-ascórbico e o ácido oleico é de difícil solubilidade, devido ao fato de o ácido L-ascórbico ser hidrofílico e possui preferência por solventes polares, já o ácido oleico é hidrofóbico e têm solubilidade favorecida em solventes apolares (Moreno-Perez et al., 2013). Então, a adição de quantidade moderada de solvente orgânico é uma forma direta de aumentar a solubilidade dos substratos e de tornar a reação possível (Aires-Barros, 2002).

O uso de solventes orgânicos apresenta diversas vantagens, tais como: a possibilidade de deslocar o equilíbrio termodinâmico de reações que seriam impossíveis em meio aquoso, fácil recuperação do substrato e produtos com alta proporção; é possível o uso de substratos não-polares e em muitos casos as lipases são termodinamicamente mais ativas (Gotor-Fernández et al., 2006). Desta forma, reações de esterificação e interesterificação tornam-se viáveis industrialmente (Sharma et al., 2002).

Para que a reação de síntese de ascorbil ésteres obtenha bons rendimentos, um dos fatores a ser investigados é a solubilidade dos substratos, pois há indícios de que quanto mais solúvel forem os substratos com o solvente maior será o rendimento.

Tendo em vista a importância do uso de ácido L-ascórbico em diversos segmentos industriais e a busca de desenvolvimento de tecnologias alternativas visando o aumento da solubilidade entre os substratos, este trabalho objetivou verificar a solubilidade dos substratos a em banho de ultrassom, a fim de se obter melhores rendimentos na síntese de ascorbil ésteres. A principal contribuição do trabalho está na busca de aumento da solubilidade entre os substratos, visando aumentar o rendimento posterior da reação. Este importante dado experimental não foi encontrado na literatura.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Enzima

Uma lipase comercial de origem microbiana foi utilizada: Novozym 435, a qual é produzida a partir da lipase de *Candida antarctica*, imobilizada em resina acrílica macroporosa de troca iônica pela Novozymes Brasil/Araucária-PR. A enzima atua randomicamente nas 3 posições do triglicerídeo. O produto é constituído por partículas de formato esferoidal, com diâmetro de partícula entre 0,3 e 0,9 mm, e densidade de aproximadamente 430 kg/m³. Esse produto é fornecido com quantidade de água entre 1 a 2 %. Segundo o fornecedor, a enzima pode ser utilizada em temperaturas na faixa de 40 a 70 °C (Novo Nordisk, 1992).

2.2 Reagentes

Os seguintes reagentes/solventes foram utilizados: terc-butanol, isopropanol, hexano, álcool etílico, ácido acético, DMSO, álcool butílico, ciclo hexano, isooctano, n-heptano, tolueno, xileno, acetona e terc-amil foram adquiridos da Vetec (99 % de pureza).

- Substratos:

Como substratos foram usados: ácido L-ascórbico, ácido oleico, palmítico, esteárico (Vetec, 99 %) e óleo de palma (Agropalma) para reações de esterificação.

2.3 Teste de solubilidade dos reagentes

Os diferentes ácidos graxos (ácido oleico, ácido palmítico, ácido esteárico, óleo de palma e resíduo de ácido graxo) foram submetidos juntamente com o ácido ascórbico a ensaios de solubilidade. A razão molar ácido ascórbico:ácido graxo utilizada nos testes foi de 1:9. Para obter o melhor solvente reacional, os substratos foram submetidos a ensaios de solubilidade em diferentes solventes orgânicos, entre estes: isopropanol, hexano, álcool etílico, ácido acético, dimetilsulfóxido, ciclo hexano, isooctano, n-heptano, tolueno, xileno, acetona, terc-butanol e 2-metil-2-butanol. Os ensaios foram realizados nas condições otimizadas por Lerin et al. (2011), em ultrassom (37 kHz e 132 W) à 70 °C, no qual os diferentes volumes de solventes foram testados (5 mL a 20 mL).

2.4 Síntese enzimática de ascorbil ésteres em ultrassom

Os experimentos de síntese enzimática foram realizados em banho de ultrassom, com frequência de 37 kHz e potência de 132 W, utilizando como solvente o terc-butanol (20 mL), mantendo fixa a temperatura (70 °C), razão molar entre os substratos (1:9), concentração enzimática (5 % m/m). Os experimentos foram conduzidos por 3 horas. Antes do início de cada reação solubilizavam-se os substratos (ácido oleico, resíduo de ácido graxo, óleo de palma, ácido palmítico, ácido esteárico e ácido ascórbico).

2.5 Quantificação de ésteres pelo método de Lowry-Tinsley

O método Lowry-Tinsley modificado (Lowry e Tinsley, 1976) foi utilizado para quantificar indiretamente o percentual de conversão de ésteres formados nas condições estudadas, a partir do

teor residual de ácido oléico produzido durante a síntese de ésteres catalisada pela lipase. Trata-se de um método colorimétrico que mede a coloração do complexo-azul esverdeado (715 nm) formado entre os íons cobre II e os ácidos graxos livres solúveis em fase orgânica.

- Inicialmente, 2,5 mL do meio reacional foram diluídos em hexano;
- Adicionou-se 0,5 μ L na solução de acetato de cobre II a 5 % m/v e previamente ajustado com piridina em pH 6;
- As misturas finais foram vigorosamente agitadas em vórtex por 30 segundos. O complexo verde formado entre o ácido residual e o acetato de cobre II (Figura 1), residente na fase superior, foi analisado em espectrofotômetro UV/ visível a 715 nm.
- Utilizou-se como branco os solventes reacionais e cada reação foi investigada em triplicata.

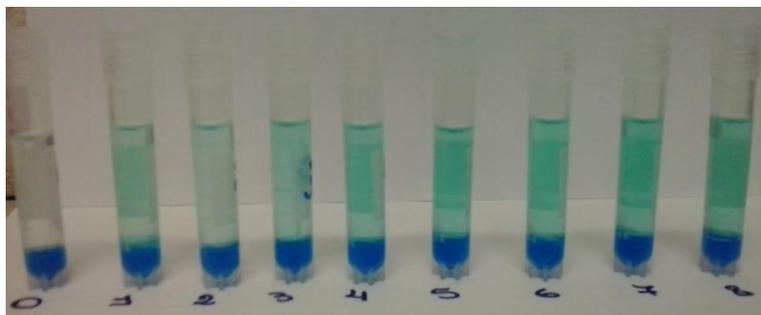


Figura 1- Ensaio de Lowry-Tinsley. 0 – Amostra em branco. 1 a 8 – Amostras com quantidades diferentes de ácidos graxos.

A concentração residual de ácidos graxos presentes na amostra foi calculada com base na equação gerada pela curva padrão realizada de acordo com o procedimento descrito acima, comparando-se com a concentração inicial demonstrada pela solução-estoque. Cada reação foi analisada em triplicata, e a conversão foi calculada pela diferença da absorbância da solução antes e após a reação.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Resultados do teste de solubilidade dos reagentes

Como observado na Tabela 1, os substratos, ácido ascórbico e ácido oleico, apresentaram dificuldade de solubilização na grande maioria dos solventes testados, sendo solúveis apenas com os solventes terc-butanol, terc-amil, álcool etílico e DMSO. Os ácidos graxos insolúveis no meio reacional levariam a formação de precipitados, o que dificultaria na determinação da conversão em éster pelo método de Lowry-Tinsley. Pelo fato de o solvente terc-butanol apresentar temperatura normal de ebulição de 82,2 °C, facilitando, desta forma, a execução de experimentos a temperaturas mais elevadas, o mesmo foi escolhido para ser utilizado nos experimentos na presença de solventes orgânicos, além de já serem descritas na literatura algumas reações de esterificação tendo o terc-butanol como solvente (Lerin et al., 2012).

Tabela 1. Teste de solubilidade do ácido ascórbico em volumes variados de 5 e 10 mL em diferentes solventes

Solvente	Constante dielétrica	Ácido Ascórbico	
		5 mL	10 mL
terc-butanol *	17,1	-	-
isopropanol	18	-	-
hexano	1,88	-	-
álcool etílico	30	-	+
ácido acético	6,2	-	-
DMSO	46,7	+	+
álcool butílico	18	-	-
ciclo hexano	2,02	-	-
isooctano	1,94	-	-
n-heptano	1,92	-	-
tolueno	2,38	-	-
xileno	2,4	-	-
acetona	21	-	-
terc-amil	-	-	-

+ solúvel

- insolúvel

* Solubilizou com 15 mL ainda presente ácido ascórbico, já quando adicionado 20 mL solubilizou todo o ácido ascórbico.

OBS: Experimentos realizados em ultrassom à 37 kHz e temperatura de 70 °C.

Geralmente a constante dielétrica fornece uma medida aproximada de polaridade do solvente. Os solventes com uma constante dielétrica menor que 15 são considerados apolares enquanto que solventes polares possuem constantes maiores que 15 (Reichard, 1990). Partindo do princípio que semelhante dissolve semelhante, ou seja, solvente polar dissolve substâncias polares, podemos observar que o ácido ascórbico foi solúvel em solventes polares como o DMSO, álcool etílico e terc-butanol.

3.2 Quantificação de ésteres pelo método de Lowry-Tinsley

Na escolha do solvente para a síntese enzimática deve-se levar em consideração as propriedades do mesmo e a sua compatibilidade com o catalisador e os substratos (Gotor-Fernández et al., 2006). Desta forma, um dos primeiros passos para a realização da reação enzimática em solvente orgânico é a escolha do melhor solvente. A partir dos testes realizados neste trabalho, podem ser destacados os seguintes solventes orgânicos: DMSO, álcool etílico e terc-butanol. Experimentos foram realizados apenas com terc-butanol, esta escolha foi devido a fatores como a purificação da enzima, no caso do DMSO que forma um gel na estrutura da enzima dificultando o seu reuso, e no caso do álcool etílico após a síntese a grande possibilidade de formação de acetato de etila o que não é o objetivo deste estudo. Diferentes solventes

orgânicos têm capacidade diferente de distorcer a camada de água em torno da lipase imobilizada.

O ácido L-ascórbico é hidrofílico e fácil de dissolver em solventes polares, mas o ácido palmítico, o ácido oleico, ácido esteárico, ascorbil palmitato, ascorbil esteárico e ascorbil oleato são hidrofóbicos e possuem preferência por solventes apolares. Desta forma verificou-se na prática, para este sistema reacional, que solventes orgânicos com polaridade adequada são importantes para o substrato e a solubilidade do produto e para a transferência de massa no sistema reacional (Lv et al., 2007).

Tabela 2 – Teores de ácidos graxos obtidos nas sínteses enzimáticas.

Condições experimentais				Conversão (%)
Substratos		Tempo reacional (h)	Razão molar dos substratos	
Ácido ascórbico	Ácido oleico	3	1:9	0,00
Ácido ascórbico	Ácido oleico	6	1:9	0,00
Ácido ascórbico	Ácido oleico	3	1:1	0,00
Ácido ascórbico	Ácido palmítico	3	1:9	40,96
Ácido ascórbico	Ácido esteárico	3	1:9	3,40
Ácido ascórbico	Ácido graxo de óleo (AGO)	3	1:9	16,35
Ácido ascórbico	Óleo de palma	3	1:9	68,35

Pode-se observar (Tabela 2) que o óleo de palma obteve 68 % de conversão de ascorbil éster e o ácido palmítico 41 % (99 % de pureza) este resultado pode ser comparado a Lerin et al. (2011) que com as mesmas condições obteve 26 % de conversão em ascorbil palmitato. Também pode-se citar o trabalho de Humeau et al. (1995), os autores testaram lipase de *C. Antarctica* (Novozym 435) para sintetizar ascorbil palmitato em solvente (2-metil-2-butanol) e obtiveram um rendimento em éster de 68 % em 8 horas a 55 °C e razão molar de 1:5 (ácido L-ascórbico e ácido palmitato).

Os estudos da síntese enzimática de ascorbil palmitato em álcool terc-amil ou terc-butanol relataram rendimentos de apenas 6 (Humeau et al., 1998) ou 14 % (Song et al., 2006), utilizando uma razão molar de 1:1 (ascórbico ácido e doador de acila).

4. CONCLUSÃO

Entre os solventes orgânicos testados apenas álcool etílico, dimetilsulfóxido e terc-butanol, foram capazes de solubilizar os substratos estudados, demonstrando que a capacidade de solubilizar os substratos no sistema é dependente da constante dielétrica do solvente. Para o estudo da produção de ascorbil ésteres a metodologia de Lowry-Tinsley mostrou-se eficaz na quantificação de ésteres produzidos pela reação de esterificação enzimática. O substrato, óleo de palma, apresentou maior conversão em ascorbil ésteres.

5. REFERÊNCIAS

- AIRES-BARROS, M.R. Biocatálise em solventes orgânicos. *Boletim de Biotecnologia*, Lisboa, n.72, p. 2-13, 2002.
- BATISTELLA L.; LERIN L.A.; BRUGNEROTTO P.; DANIELLI A.J.; TRENTIN C.M.; POPIOLSKI A.; TREICHEL H.; OLIVEIRA J.V.; DE OLIVEIRA D. Ultrasound-assisted lipase-catalyzed transesterification of soybean oil in organic solvent system. *Ultrasonics Sonochemistry*, v.19, p. 452–458, 2012.
- CHANG, S.-W.; YANG C.-J.; CHEN F.-Y.; AKOH C.C.; SHIEH C.-J. Optimized synthesis of lipase-catalyzed L-ascorbyl laurate by Novozym® 435. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 56, p. 7-12, 2009.
- 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.
- HIELSCHER, T. Ultrasonic Production of Nano-Size Dispersions and Emulsions. *Dans European Nano Systems Workshop - ENS*, Paris-France, 2005.
- HUMEAU, C.; GIRARDIN, M.; COULON, D.; MICLO, A. Synthesis of 6-O-palmitoyl Lascorbic 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.
- LERIN, L.A.; FEITEN M.C.; RICHETTI A.; TONIAZZO G.; TREICHEL H.; MAZUTTI M.A.; OLIVEIRA J.V.; OESTREICHER E.G.; DE OLIVEIRA D. Enzymatic synthesis of ascorbyl palmitate in ultrasound-assisted system: Process optimization and kinetic evaluation. *Ultrasonics Sonochemistry* v. 18, p. 988-996, 2011.
- LERIN, L. A.; RICHETTI, A.; DALLAGO, R.; TREICHEL H.; MAZUTTI M.A.; OLIVEIRA J.V.; ANTUNES O.A.C.; OESTREICHER E.G.; DE OLIVEIRA D. Enzymatic Synthesis of Ascorbyl Palmitate in Organic Solvents: Process Optimization and Kinetic Evaluation. *Food and Bioprocess Technology*, v.5, p. 1068-1076, 2012.
- LOWRY R.R.; TINSLEY I. J., Rapid Colorimetric Determination of Free Fatty Acids Department of Agricultural Chemistry, Oregon State University, Corvallis, Oregon, 1976.
- LV, L.-X.; PAN, Y.; LI, Y.-Q. Biosynthesis of ascorbyl benzoate in organic solvents and study of its antioxygenic and antimicrobial properties. *Food Chemistry*, v. 101, p. 1626-1632, 2007.
- MORENO-PEREZ, S.; FILICE, M.; GUISAN J.M.; FERNANDEZ-LORENTE G. Synthesis of ascorbyl oleate by transesterification of olive oil with ascorbic acid in polar organic media catalyzed by immobilized lipases. *Chemistry and Physics of Lipids*, v. 174, p. 48-54, 2013.
- NOVO NORDISK. Characteristics of immobilized lipase in ester synthesis and effects of water and temperature in various reactions. Technical Report A-05948, 1992.
- 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 lipozyme TL IM using triglycerides as acyl donors. *J. Am Oil Chem Soc*, v.88, p.57-64, 2011.

- SHARMA, R.; SONI, S.; VOHRA, R.; GUPTA, L.; GUPTA, J. Purification and characterization of a thermostable alkaline lipase from a new thermophilic *Bacillus* sp. RSJ-1. *Process Biochemistry*, v. 37, p. 1075-1084, 2002.
- SONG, Q.X.; ZHAO, Y.; XU, W.; ZHOU, W.; WEI, D. Enzymatic synthesis of L-ascorbyl linoleate in organic media. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v. 28, p. 211-215, 2006.
- WATANABE, Y.; SAWAHARA, Y.; NOSAKA, H.; YAMANAKA, K.; ADACHI, S. Enzymatic synthesis of conjugated linoleoyl ascorbate in acetone. *Biochemical Engineering Journal*, v. 40, p. 368-372, 2008.
- ZHANG, D.-O.; LI, Y.-Q.; LI C.; LV, Y.-Q.; LI, Y. Kinetics of Enzymatic synthesis of L-ascorbyl acetate by Lipozyme TL IM and Novozym 435. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, v. 17, p.60-66, 2012.