

**UNIVERSIDADE REGIONAL INTEGRADA DO ALTO URUGUAI E DAS
MISSÕES**

PRÓ-REITORIA DE ENSINO, PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
CÂMPUS DE ERECHIM

DEPARTAMENTO DAS ENGENHARIAS E CIÊNCIAS DA COMPUTAÇÃO

CURSO DE ENGENHARIA QUÍMICA

MARIA EDUARDA WLODARKIEWICZ

**PRODUÇÃO E APLICAÇÃO DE OLEATO DE ASCORBILA
EM BIOFILME DE AMIDO**

ERECHIM – RS

2020

MARIA EDUARDA WLODARKIEWICZ

**PRODUÇÃO E APLICAÇÃO DE OLEATO DE ASCORBILA
EM BIOFILME DE AMIDO**

**Trabalho de conclusão de curso
apresentado como requisito
parcial à obtenção do grau de
Engenheiro Químico,
Departamento das Engenharias e
Ciências da Computação, da
Universidade Regional Integrada
do Alto Uruguai e das Missões –
Campus de Erechim.**

Orientador: Prof^a. Dr^a. Natalia Paroul

ERECHIM – RS

2020

MARIA EDUARDA WLODARKIEWICZ

**PRODUÇÃO E APLICAÇÃO DE OLEATO DE ASCORBILA
EM BIOFILME DE AMIDO**

**Trabalho de conclusão de curso
apresentado como requisito parcial
à obtenção do grau de Engenheiro
Químico, Departamento das
Engenharias e Ciências da
Computação da Universidade
Regional Integrada do Alto Uruguai e
das Missões – Campus de Erechim.**

Erechim, ____ de _____ de 2020.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Natalia Paroul
Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões

Prof. Dr. Marcelo Mignoni
Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões

Prof^a. Dr^a Luciana Venquiarutto
Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida e por ter me dado oportunidade e saúde para chegar até aqui.

Aos meus pais, Geni e Gilmar, por toda paciência, dedicação e carinho em todos os momentos nessa caminhada contribuindo diretamente para minha formação sempre me incentivando. Ao meu irmão Eduardo pela parceria em todos os momentos.

A minha orientadora Prof.^a Dr.^a Natalia Paroul por aceitar conduzir o trabalho de pesquisa, por todo carinho e ensinamentos tão grandiosos a que me proporcionou, minha eterna gratidão.

A Karine Dalla Costa, por aceitar dividir sua pesquisa comigo e estar sempre disposta a me ajudar e ensinar sobre tudo que envolveu a pesquisa. Além disso, pela amizade que me proporcionou, muito obrigada.

A minha amiga Giulia, por estar comigo em todos os momentos, por sua amizade, carinho e compreensão.

A universidade por oferecer as ferramentas necessárias para a realização do trabalho e a estrutura dos laboratórios que me permitiram chegar ao final desse ciclo. Por fim, aos meus professores pela qualidade do ensino oferecido, a dedicação, o carinho e a amizade construída, sempre dispostos a contribuir com o melhor aprendizado. Sou muito grata.

“Eu sou um universo de átomos, e ainda assim, um átomo no universo”.

Richard Feynman

RESUMO

Estudos acerca de biofilmes ativos vem ganhando força nos últimos anos, assim como as pesquisas sobre aplicação de conservantes naturais em alimentos processados. O ácido ascórbico (Vitamina C) é um dos conservantes naturais mais usados na indústria de alimentos, porém a sua aplicação em derivados de leite, carne e outros produtos com elevado teor de gordura é bastante limitado em função das suas características hidrofílicas. Uma das formas de modificar sua polaridade é realizar a reação de esterificação com ácido graxo de cadeia longa para posterior aplicação em alimentos lipofílicos. Durante o estudo, foi possível sintetizar oleato de ascorbila via esterificação enzimática e incorporá-lo em filme de amido. O tempo reacional foi determinado através do estudo sintético usando a razão molar ácido ascórbico: ácido oleico 1:9, concentração de enzima [E] 30 % (m/m substratos), temperatura da reação 70 °C, agitação 125 rpm utilizando 2 % (m/m substratos) de peneiras moleculares e solvente *terc*-butanol. O oleato de ascorbila foi isolado por Cromatografia em Coluna (CC) e então incorporado em filmes de amido para posterior determinação da atividade antioxidante. A conversão máxima foi de 50 % em apenas 1 h de reação. O potencial antioxidante de oleato de ascorbila sintetizado isolado e do filme de amido incorporado com o oleato de ascorbila foi de 36µg/mL e 3.558 µg/mL respectivamente. O oleato de ascorbila apresenta boa perspectiva para sua aplicação em alimentos em função da sua propriedade antioxidante, contudo estudos futuros são necessários de modo a melhorar a atividade antioxidante após a incorporação em matrizes poliméricas.

Palavras Chaves: Ácido ascórbico. Antioxidante. Filme de amido.

ABSTRACT

Studies about active biofilms are gaining place in the scientific way in the last years, as the same as researches about the application of natural preservatives in processed food. The ascorbic acid (Vitamin C) is one of the most used natural preservatives in the food industry, but your application on milk products, meat and other products with a high fat content are quite limited due to their hydrophilic characteristics. One way to modify the polarity is realizing the esterification reaction with long-chain fatty acid, and after that, applying on lipophilic food. In this research, was synthesized ascorbyl oleate by enzymatic esterification and incorporated in the starch film. The reactional time was determined by the synthetics study using the molar ratio ascorbic acid: oleic acid 1:9, enzyme concentration [E] 30% (m/m substrates), reaction temperature 70°C, agitation 125 rpm using 2% (m/m substrates) on molecular sieves and tert-butanol solvent. The ascorbyl oleate was isolated by Column Chromatography (CC) and then incorporates to the starch film and so to determine the antioxidant activity. The maximum conversion was 50% in 1 hour of reaction. The antioxidant potential of the ascorbyl oleate synthetize isolated and of the starch film incorporated with the ascorvbyl oleate was 36µg/mL and 3.558 µg/mL, respectively. The ascorbyl oleate shows a good perspective to the use on food by your antioxidant property, by the way, more studies are necessary to improve the antioxidant activity after the incorporation on polymeric matrices.

Key Words: Ascorbic acid. Antioxidant. Starch film.

LISTA DE ABREVIATURAS

AA - ácido ascórbico

AA - atividade antioxidante

AO - ácido oleico

BHA - butil-hidroxi-anisol

BHT - butil-hidroxi-tolueno

CCD - cromatografia em camada delgada

DNA - ácido desoxirribonucleico

DPPH - 2,2-difenil-1-picrilhidrazila

IC₅₀ - metade da concentração inibitória máxima

OMS - Organização Mundial da Saúde

UV - ultra-violeta

WWF – fundo mundial para a natureza

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fórmula estrutural do ácido L-ascórbico.....	15
Figura 2: Esquema reacional da síntese oleato de ascorbila por síntese do ácido ascórbico com ácido oleico utilizando a lipase imobilizada NS 88011.....	16
Figura 3: Etapas desenvolvidas no estudo da síntese enzimática e aplicação de oleato de ascorbila em biofilme.....	19
Figura 4: Conversão de oleato de ascorbila (%) em função do tempo.....	23
Figura 5: Cromatografia por camada delgada, apresentando as bandas para ácido ascórbico (1), ácido oleico (2), reação (3) e oleato de ascorbila (4).....	24

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2 OBJETIVOS.....	13
2.1 Objetivo Geral.....	13
2.2 Objetivos Específicos	13
3. REFERENCIAL TEÓRICO.....	13
3.1. Conservantes naturais e artificiais.....	13
3.1.1. Ácido L-ascórbico.....	15
3.2. Biopolímeros.....	16
3.2.1. Amido.....	17
3.2.2. Glicerol.....	18
4. METODOLOGIA.....	19
4.1. Substratos e enzima.....	19
4.2. Determinação do tempo reacional.....	20
4.3. Determinação da conversão da reação.....	20
4.4. Isolamento do oleato de ascorbila.....	21
4.4.1. Cromatografia em camada delgada (CCD)	21
4.5. Desenvolvimento do biofilme comestível a base de amido incorporando oleato de ascorbila.....	21
4.6 Avaliação da atividade antioxidante.....	22
4.7. Avaliação da atividade antioxidante do biofilme depois da incorporação do oleato de ascorbila.....	22
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	23
5.1. Síntese enzimática do ácido L-ascórbico e ácido oleico.....	23
5.2. Cromatografia por camada delgada (CCD).....	24
5.3. Avaliação da atividade antioxidante do filme formulado.....	25
6. CONCLUSÕES.....	27
7. REFERÊNCIAS.....	28

1. INTRODUÇÃO

Um dos maiores problemas atualmente no mundo tem sido a destinação final inadequada dos resíduos sólidos gerados, que vem se agravando através do crescimento da população (SOUZA *et al.*, 2015), pois os polímeros derivados do petróleo são altamente resistentes e permanecem intactos durante muitos anos após serem levados a lixões ou jogados no meio ambiente. Devido a isso, a utilização de polímeros naturais, em sua substituição, tem sido o foco de várias investigações (ZHANG; REMPEL; LIU, 2014). Os principais polímeros biodegradáveis são os derivados do amido e dos poliésteres baseados nos ácidos hidroxí-carbônicos (MAIA, 2016).

Além da característica da biodegradabilidade, os biofilmes podem ser comestíveis e quando adicionados compostos biologicamente ativos, tornam-se filmes bioativos também, assegurando maior proteção aos alimentos, como atividade antioxidante e antimicrobiana (UGALDE, 2013). Entre os antioxidantes mais utilizados na indústria alimentícia, está o ácido ascórbico, que é muito utilizado em uma grande variedade de produtos alimentares, bebidas, formulações farmacêuticas e cosméticos devido a suas propriedades. Em indústrias de processamento de alimentos é utilizado como antioxidante para evitar mudanças de cor, sabor e odor dos produtos.

Como o ácido ascórbico possui característica hidrofílica, uma das formas de aumentar sua solubilidade em meios apolares é através da esterificação com ácidos graxos, como o ácido oleico, formando o oleato de ascorbila (DALLA COSTA, 2018). Devido a isso, o emprego da esterificação enzimática na síntese de ésteres aromáticos, tornam-se atrativos na indústria de alimentos, farmacêutica e cosmética, em virtude de seu poderoso potencial antioxidante (JASPER, 2018).

Face ao exposto, justifica-se a síntese e incorporação de oleato de ascorbila em biofilmes, devido as suas propriedades antioxidantes benéficas a saúde.

2. OBJETIVO

2.1. Objetivo geral

Sintetizar e incorporar oleato de ascorbila, obtido através da síntese enzimática de ácido L-ascórbico e ácido oleico, em biofilmes de amido e avaliar a atividade antioxidante.

2.2. Objetivos específicos

- Sintetizar oleato de ascorbila via reação de esterificação enzimática usando a lipase NS 88011 como biocatalizador;
- Isolar o produto sintetizado por meio da cromatografia em coluna (CC);
- Desenvolver o biofilme comestível a base de amido incorporando oleato de ascorbila;
- Avaliar a atividade antioxidante do éster sintetizado e do filme formulado.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

Neste capítulo, apresenta-se o referencial teórico utilizado para dar suporte ao desenvolvimento desta pesquisa. Primeiramente, serão descritos algumas considerações e importância de antioxidantes. Posteriormente, serão expostos conceitos sobre os substratos utilizados (ácido ascórbico e ácido oleico) e síntese de oleato de ascorbila via rota enzimática. Por fim, discorre-se sobre o desenvolvimento de biofilmes a base de amido.

3.1. Conservantes naturais e artificiais

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2012), 20% dos alimentos produzidos são perdidos por deterioração, já que o maior problema enfrentado pelas indústrias de alimentos é manter a preservação dos seus produtos. Para evitar esse desperdício, os alimentos são submetidos a processos físicos, químicos ou biológicos, como congelamento, refrigeração,

aquecimento e irradiação. Quando os produtos não podem ser sujeitos a esses tratamentos, são aplicados conservantes.

A função dos conservantes é basicamente a prevenção e inibição do crescimento microbiológico e aumentar sua atividade antioxidante evitando alterações químicas nos alimentos, mantendo sua vida útil. Geralmente, na indústria são usados conservantes artificiais, como BHA (butil-hidroxianizol) e o BHT (butil-hidroxitolueno), porém, seu uso pode trazer riscos para a saúde dos consumidores. Pesquisas tem salientado a importância da alimentação para o risco do aparecimento do câncer, sendo que, algumas substâncias, dentre elas aditivos sintéticos, encontradas em alimentos podem possuir efeito mutagênico e carcinogênico, ou seja, podem promover mutações no ácido desoxirribonucleico (DNA) e formação de tumores (BISSACOTTI *et al.*, 2015).

Outro efeito colateral é a hipersensibilidade alimentar, dividida em alergias e intolerâncias alimentares, sendo considerado o efeito maléfico e mais comum promovido pelos aditivos. A alergia alimentar é uma reação adversa do sistema imunológico quando exposto a um alimento agressor ao organismo (PÁDUA *et al.*, 2016).

O crescente interesse dos consumidores por alimentos minimamente processados preservando suas características próximas ao natural, porém com baixo nível de aditivos fez com que pesquisadores buscassem novas tecnologias de conservação. (KLUGE *et al.*, 2014).

Um antioxidante é uma molécula capaz de inibir a oxidação de outras moléculas. A oxidação é uma reação química de transferência de elétrons para um agente oxidante, podendo gerar radicais livres. Entretanto, esses radicais podem dar início a uma reação em cadeia que, quando ocorrem em células, podem danificá-las ou causar sua morte. Os antioxidantes agem inibindo essas e outras reações de oxidação. Isso é, tem capacidade de transformar e/ou diminuir a ação de oxidação dos radicais livres, impedindo seus efeitos danosos ao organismo como as doenças de Alzheimer, Parkinson, câncer e outras (VASCONCELOS, 2014; JASKI; LOTÉRIO; SILVA, 2014).

Diversos estudos mostram que para a manutenção da saúde é indispensável o consumo de substâncias ricas em antioxidantes na dieta diária, capazes de produzir uma ação protetora efetiva contra os processos oxidativos

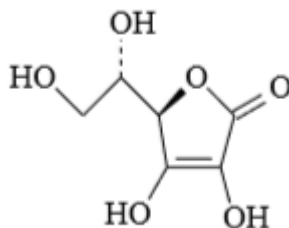
que naturalmente ocorrem no organismo (OLIVEIRA, 2013; JASKI, LOTÉRIO, SILVA, 2014; SANTOS *et al.*, 2016).

Entre os principais antioxidantes provenientes dos alimentos estão os minerais cobre, manganês e ferro, substâncias fenólicas, carotenoides e vitaminas E e C, além da vitamina A e dos flavonoides (PEREIRA, 2011; RIBEIRO, 2010).

3.1.1. Ácido L-ascórbico

O ácido L-ascórbico (Figura 1), também conhecido como vitamina C, é produzido sinteticamente e extensivamente usado na indústria de alimentos devido sua ação antioxidante (CHAMBERS *et al.*, 1996). É um sólido cristalino de coloração branca, inodoro, solúvel em poucos solventes orgânicos. Considerado um poderoso antioxidante natural, sendo indispensável em várias funções fisiológicas (DALLA COSTA, 2018).

Figura 1 – Fórmula estrutural do ácido L-ascórbico.



Fonte: Autor, 2020.

A vitamina C é considerada essencial à saúde do ser humano, sendo de grande importância no crescimento e reparação do tecido conectivo e na síntese de colágeno, os quais são fundamentais para a firmeza cutânea (MACIEL; OLIVEIRA, 2011). De acordo com Higuchi e Andrade (2014), o ácido ascórbico é capaz de estimular a proliferação celular e a síntese de colágeno pelos fibroblastos.

Porém, a aplicação do ácido ascórbico nos alimentos é limitada devido a sua característica hidrofílica, portanto, uma das formas de alterar sua solubilidade é através da esterificação com ácidos graxos, como o ácido oleico, formando o oleato de ascorbila (DALLA COSTA, 2018). O esquema da reação de esterificação para oleato de ascorbila está apresentado na Figura 2.

produção quanto por seu descarte, já que seu tempo de decomposição é da ordem de séculos (DIAS, 2016).

Com o avanço das novas políticas de desenvolvimento sustentável em decorrência da diminuição da reserva de combustível fóssil, houve um crescimento no interesse por produtos biodegradáveis. Esses polímeros são de grande contribuição para o desenvolvimento sustentável, pois através do avanço em pesquisas é possível obter uma vasta gama de produtos com menor impacto ambiental (AZEVEDO, ALMEIDA, SANTOS, 2017).

Os filmes são películas utilizadas para envolver produtos a fim de garantir sua qualidade. Quando se tornam completamente degradados por micro-organismos, são considerados biodegradáveis, sendo chamados de biofilmes. Os biofilmes são materiais de fina espessura, preparados a partir de macromoléculas biológicas, que agem como barreira a elementos externos (umidade, gases, óleos), protegendo os produtos e aumentando sua vida de prateleira (UGALDE, 2013). Os filmes podem ser compostos por substâncias biodegradáveis ou mistura de outros compostos (COSTA *et al.*, 2009).

Além de proteger, pode ser feito a incorporação de substâncias funcionais em sua matriz melhorando suas características, atuando como uma embalagem ativa (MESQUITA, 2015). A liberação gradual dessas substâncias durante o armazenamento do produto, possibilita o aumento na sua qualidade, estabilidade e segurança, diminuindo o uso de conservantes sintéticos, atuando através do aumento das atividades antioxidantes e/ou antimicrobianas.

Os polímeros naturais biodegradáveis normalmente são produzidos na natureza por todos os organismos vivos, sem interferência humana, como os polissacarídeos, celulose, amido e proteínas (COSTA, 2017). Os filmes produzidos a partir desses materiais, além de serem degradados naturalmente, possuem baixo custo e podem ser consumidos em conjunto com o produto.

3.2.1. Amido

O amido é um carboidrato constituído principalmente de glicose e encontrado em diversos vegetais como milho, trigo, batata e mandioca. Esse polissacarídeo é uma mistura de amilose, que confere à molécula sua aparência helicoidal, e amilopectina, que constitui 80% dos polissacarídeos

existentes no amido. A extração do amido é realizada através da moagem úmida, que consiste em várias etapas simples de separação física, como hidratação, moagem e separação do gémem, fibras e proteína, e por fim secagem, obtendo um pó fino e branco amarelado (UGALDE, 2013).

Devido a sua abundância, o amido é muito utilizado em pesquisas para a elaboração de biofilmes (PELISSARI, 2009). As moléculas de amilose em solução, devido a sua linearidade, se aproximam, formando ligações de hidrogênio entre hidroxilas dos polímeros adjacentes. Com isso, há a formação de pastas opacas e filmes resistentes quando o amido é submetido ao aquecimento em solução aquosa, onde as ligações amorfas são rompidas causando mudanças irreversíveis, como a cristalização (UGALDE, 2013).

Os filmes de amido, apresentam várias propriedades quando atribuídas diferentes concentrações de amilose a depender da fonte de amido estudada, devido a isso, possuem características físico-químicas diferentes e utilizações comerciais distintas que estão diretamente ligadas à concentração de amilose, como, grau de cristalinidade, resistência do filme, propriedades mecânicas, forma física e tipos de processamento (MOREIRA *et al.*, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2016).

3.2.2. Glicerol

O segundo principal componente de um filme à base de amido é o plastificante. Os plastificantes possuem a capacidade de reduzir forças intermoleculares na cadeia polimérica, aumentando a flexibilidade e funcionalidade dos filmes. Esse aumento da maleabilidade e da mobilidade da cadeia polimérica promove, por consequência, o aumento dos coeficientes de difusão de gases e água. A incorporação do plastificante aos filmes pode modificar as propriedades de adesão, permeabilidade ao vapor da água, ao oxigênio e também as propriedades mecânicas e térmicas (ALVES *et al.*, 2007).

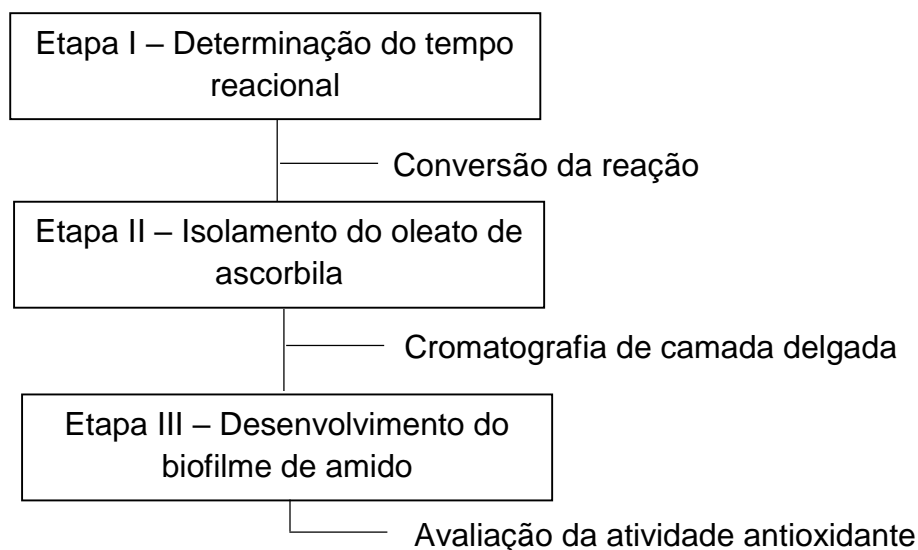
Entre os diversos tipos de plastificantes, o glicerol se destaca, sendo usado em diversas composições de soluções filmogênicas (SOUZA *et al.*, 2010; FARIAS, 2016). É um composto orgânico, pertencente a função álcool, líquido a temperatura ambiente, higroscópico, inodoro e de sabor adocicado. O

glicerol está presente em todos os óleos e gorduras de origem animal e vegetal quando ligado a ácidos graxos como ácido palmítico, oleico e láurico, formando uma molécula de triacilglicerol (BOBBIO e BOBBIO, 2003).

4. METODOLOGIA

Neste capítulo serão descritos os materiais e métodos utilizados para a realização da esterificação enzimática de oleato de ascorbila e aplicação através da formulação de biofilme. O fluxograma da Figura 3 apresenta a sequência dos ensaios realizados.

Figura 3 – Etapas desenvolvidas no estudo da síntese enzimática e aplicação de oleato de ascorbila em biofilme.



Fonte: Autor, 2020

4.1 Substratos e enzima

Os produtos químicos utilizados foram ácido ascórbico (99 % Sigma-Aldrich), ácido oleico (97 % Sigma-Aldrich) e terc-butanol (P.A. Merk), sendo todos de grau analítico e utilizados sem purificação adicional. A lipase comercial utilizada foi *Candida antarctica* (NS 88011) imobilizada em uma resina polimérica hidrofóbica, adquirida da Novozymes Brasil (Araucária, PR, Brasil).

4.2 Determinação do tempo reacional

Nesta etapa, foram avaliados os tempos reacionais na produção de oleato de ascorbila. Seguindo as condições utilizadas por Dalla Costa (2018), a reação da síntese de oleato de ascorbila foi realizada empregando substratos com razão molar de 1:9 (ácido ascórbico: ácido oleico), solvente terc-butanol até completar 50 mL, através da biocatálise, aplicando a lipase NS 88011 (30% m/m substratos), a temperatura de 70 °C e 125 rpm no agitador orbital (New Brunswick, modelo Excella E25R). Para reter a água formada durante o processo, foi utilizado 2 % (m/m) de peneira molecular (4A Sigma-Aldrich) previamente ativada em estufa a 150 °C por 1 h. Alíquotas de 1 mL foram removidas do meio reacional nos tempos de 0, 0,5, 1, 1,5, 2, 3, 4, 5 e 6 h (amostra destrutiva) e submetidas a extração líquido-líquido com água destilada.

Após o término da execução experimental foi realizada a separação do biocatalisador e da peneira através da filtração com papel filme (filtro qualitativo 80x80 prolab).

4.3 Determinação da conversão da reação

O rendimento da reação foi determinado de modo indireto, pelo consumo do reagente limitante (ácido ascórbico) mediante titulação com solução de iodo 0,01 N até aparecimento de coloração azulada, persistente por quinze segundos (metodologia adaptada de Instituto Adolfo Lutz, 2008) de acordo com a Equação 1.

$$\text{Vitamina C (mg/100 mL)} = \frac{A \cdot V \cdot 0,8806 \cdot 100}{V_1 \cdot V_2} \quad (1)$$

Onde: A = mL de solução de iodo 0,01 N gastos na titulação da amostra, V = volume de balão volumétrico em que foi dissolvido a amostra, V1 = volume da amostra, e V2 = volume da solução de amostra usado na titulação.

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.

4.4 Isolamento de oleato de ascorbila

Após a determinação do tempo reacional, foi realizada a síntese em maior escala de oleato de ascorbila para então a realização do isolamento em coluna com sílica gel 60 flash, utilizando uma solução eluente 1:1 v/v (hexano:acetato de etila). A mistura reacional foi diluída em 5 mL de acetato de etila:hexano (1:1 (v/v)) e aplicada no topo da coluna. As frações coletadas foram acompanhadas por cromatografia de camada delgada (CCD).

4.4.1 Cromatografia em camada delgada (CCD)

A fase estacionária da cromatografia em camada delgada foi constituída por cromatofolhas de sílica e a fase móvel utilizada foi uma mistura de solventes formada por clorofórmio: metanol: ácido acético: água (81: 9: 8: 2 v/v).

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 é calculada a constante física R_f (fator de retenção) de cada composto (substratos e produto), conforme Equação 2:

$$R_f = \frac{a}{v} \quad (2)$$

Onde: R_f = Fator de retenção, a = distância percorrida pelo composto, v = distância percorrida pelo solvente.

4.5 Desenvolvimento do biofilme comestível a base de amido incorporando oleato de ascorbila

Os filmes de amido foram obtidos a partir de uma solução contendo 3,5% de amido (p/v), 30% de glicerol (p/p) como agente plastificante, suspensos em água destilada. Os componentes foram misturados e aquecidos gradualmente sob agitação em banho-maria, até atingir a temperatura de 80 °C e mantida por 10 minutos. Após, foi resfriada a 40 °C (Ugalde, *et al.*, 2016) e aplicada 10 % de produto purificado. A mistura é homogeneizada através de

agitação magnética e despejada em placas de plástico e deixadas em estufa a 40 °C até a secagem completa.

4.6 Avaliação da atividade antioxidante

A determinação da atividade antioxidante, consiste na medida da absorção do radical 2,2 difenil-1-picril hidrazil (DPPH) em 515 nm utilizando o espectrofotômetro (UV-Visível marca Agilent Technologies, modelo 8453E), as amostras contendo concentrações crescentes (0,0025; 0,005; 0,0075; 0,01; 0,025; 0,05; 0,075; 0,1; 0,25; 0,5; 0,75; 1; 2,5; 5; 7,5; 10 mg mL⁻¹) anteriormente deixadas ao abrigo de luz por 30 minutos preparadas com etanol e 500 µL de DPPH. 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):

$$AA \% = \frac{100 - (Abs amostra - Abs do branco)}{Abs controle} \times 100 \quad (3)$$

Onde: Abs é a absorbância dada em nanômetros e AA é a atividade antioxidante.

Após, calcula-se a concentração necessária para capturar 50 % do radical livre DPPH (IC₅₀) por análise de regressão linear. A atividade antioxidante foi determinada para oleato de ascorbila e para o meio polimérico.

4.7 Avaliação da atividade antioxidante do biofilme depois da incorporação do oleato de ascorbila

O meio polimérico foi primeiramente submetido a trituração e então despejado junto com o solvente etanol em tubos para extração de oleato de ascorbila presente. Os tubos serão homogeneizados em shaker por 24 h para então avaliação antioxidante descritas no item 4.6.

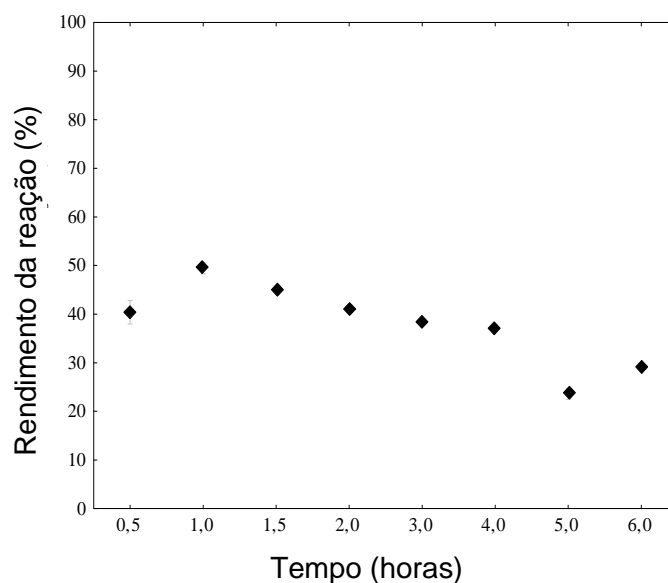
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Neste item, serão apresentados os resultados e discussões referentes a produção do oleato de ascorbila, desenvolvimento do biofilme de amido com incorporação de oleato de ascorbila e avaliação da atividade antioxidante.

5.1 Síntese enzimática do ácido L-ascórbico e ácido oleico

Para verificar o tempo necessário para a melhor produção de oleato de ascorbila, foi realizado um teste sob as condições utilizadas por Dalla Costa (2018) onde foram retiradas alíquotas de 1 mL em 0, 0,5, 1, 1,5, 2, 3, 4, 5 e 6 h. Na Figura 4, podemos observar o rendimento da reação que é apresentado em função do tempo, onde, em apenas 1 h de reação, foi obtido conversão maior de 50 %.

Figura 4 - Conversão de oleato de ascorbila (%) em função do tempo.



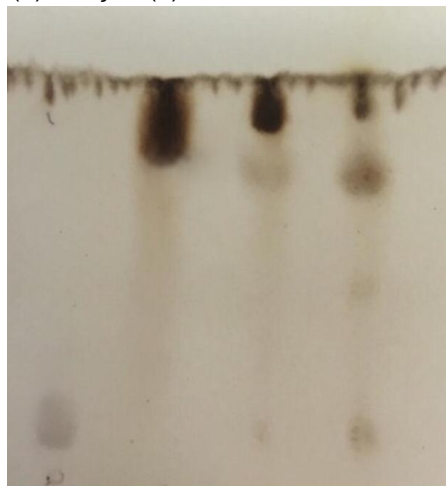
Há um decréscimo na conversão do oleato de ascorbila e isso pode ocorrer devido a hidrólise. Segundo Bansode, Hardikar e Rathod (2017) a presença de água pode afetar o suporte enzimático e o pH, com isso, a atividade enzimática acaba prejudicada, levando a uma diminuição da conversão, além disso, pode causar o deslocamento do equilíbrio da reação para o sentido de formação dos substratos. Segundo as condições de Dalla Costa, foi utilizado 2 % (m/m) de peneiras moleculares no processo de

esterificação para a retenção de água, podendo esta quantidade ser insuficiente, necessitando de maiores estudos futuramente.

5.2 Cromatografia em camada delgada (CCD)

Para visualizar a formação do produto, a reação de esterificação e isolamento de oleato de ascorbila foi acompanhada por Cromatografia em Camada Delgada (CCD), conforme resultados apresentados na Figura 5. A CCD é uma técnica de adsorção líquido-sólido, onde há separação dos compostos através da diferença de afinidade dos componentes de uma mistura pela fase estacionária (DALLA COSTA, 2018). O fator de retenção (R_f) é a razão entre a distância percorrida pela substância em análise e a distância percorrida pela fase móvel. É considerado um dos parâmetros mais importantes dessa técnica e é utilizado tanto para identificar uma substância quanto para confirmar a formação de um produto (DEGANI; CASS; VIEIRIA, 1998).

Figura 5 - Cromatografia por camada delgada, apresentando as bandas para ácido ascórbico (1), ácido oleico (2), reação (3) e oleato de ascorbila (4).



(1) (2) (3) (4)

Através do cromatograma (Figura 5) pode-se observar que o ácido ascórbico (1), devido a sua alta polaridade e baixa afinidade com os solventes, não apresenta banda eluída já que interage com a fase estacionária. O ácido oleico (2) é apolar, portanto possui afinidade pela fase móvel e elui juntamente com ela, onde apresenta sua banda na linha do solvente.

Tanto o ácido ascórbico (1) quanto o ácido oleico (2) apresentam apenas uma banda cada um. O ponto (3) apresenta três bandas, na banda mais abaixo é correspondido ao ácido ascórbico (Rf: 0,078), a da linha do solvente corresponde ao ácido oleico (Rf: 0,89) e a banda intermediária corresponde ao oleato de ascorbila (Rf: 0,71) produzido. O oleato de ascorbila apresenta uma polaridade intermediária do ácido ascórbico e do ácido oleico, portanto, sua banda é revelada em um Rf diferente, demonstrando a formação do produto (DALLA COSTA, 2018). No ponto (4) é possível perceber que após a cromatografia em coluna, houve diminuição da banda do reagente e intensificação da banda do produto.

Com isso, pode-se perceber que a técnica foi útil para demonstrar a formação do produto indicando que ela ocorreu e que sua conversão não foi de 100% pois ainda há ácido ascórbico e ácido oleico residual.

5.3 Avaliação da atividade antioxidante do filme formulado

Na Tabela 1, estão apresentados os resultados das atividades antioxidantes expressas em termos de IC₅₀ de oleato de ascorbila e após a incorporação no filme de amido (10% em filme de amido).

Tabela 1 - Atividade antioxidante do produto oleato de ascorbila e após incorporação em filme de amido.

Amostra	IC ₅₀ (µg/mL)
Ácido ascórbico	0,448
Oleato de ascorbila	36,0
Filme de amido com oleato de ascorbila	3558,0

De acordo com os resultados obtidos, o oleato de ascorbila apresentou potencial antioxidante de 36 µg/mL sendo inferior em relação com o ácido ascórbico (0,448 µg/mL), porém, demonstrou que manteve parte de suas propriedades sugerindo eficiente capacidade de eliminação de radicais DPPH (DALLA COSTA, 2018). Se comparado com antioxidantes sintéticos, como butilhidroxianiso – BHA (4,13 µg/mL) e butilhidroxitolueno – BHT (17,67 µg/mL), o oleato de ascorbila ainda possui atividade antioxidante menor, contudo,

antioxidantes sintéticos possuem efeitos prejudiciais à saúde, como comprometimento da coagulação e tumores no sangue (TAGHVAEI e JAFARI, 2015).

O filme de amido apresentou potencial antioxidante de 3.558 $\mu\text{g/mL}$, indicando considerável diminuição antioxidante quando comparado ao oleato de ascorbila. Campos *et al.*, (2018) encontraram 2.290,69 $\mu\text{g/mL}$ de potencial antioxidante em um filme de amido termoplástico com incorporação de curcumina. Entretanto, podemos observar que Briceño (2017), aplicando óleo de melancia em biofilmes de amido, não obtiveram atividade antioxidante após a incorporação. Se comparado com aplicações de antioxidantes naturais, como o tocoferol, Campos (2017) encontrou 2.500 $\mu\text{g/mL}$ de potencial antioxidante quando utilizado etanol 50 % para sua extração, porém, ao usar etanol 95 % seu potencial antioxidante aumenta consideravelmente.

6 CONCLUSÃO

No presente estudo, a síntese enzimática do ácido L-ascórbico e ácido oleico foi realizada para a produção do oleato de ascorbila dando destaque ao tempo reacional de 1 h havendo maior produção do composto de interesse do que nos outros tempos investigados.

O produto oleato de ascorbila apresentou satisfatória atividade antioxidante, contudo o filme, demonstrou uma considerável diminuição. Ao mesmo tempo, possíveis aprofundamentos no estudo de aplicações em biofilmes com diferentes solventes e concentrações, assim como diferentes composições podem ser realizados em trabalhos futuros.

Em resumo, a síntese de oleato de ascorbila apresenta boa perspectiva para sua aplicação em alimentos em função da sua performance antioxidante, sendo necessário melhores estudos para sua incorporação em matrizes poliméricas a fim de manter grande parte de suas propriedades e desta maneira poder auxiliar eficientemente na indústria alimentícia.

REFERÊNCIAS

- ALVES, V. D.; MALI, S.; BELÉIA, A.; GROSSMANN, M. V. E. Effect of glycerol and amylose enrichment on cassava starch film properties. **Journal of Food Engineering**, v. 78, p. 941-946, 2007.
- AZEVEDO, A. R.; ALMEIDA, V. M.; SANTOS, S. A. S. Síntese de bioplásticos feitos com polímeros naturais: Uma alternativa para a gestão ambiental. **Conhecimento e Diversidade**, Niterói, v. 9, n. 19, p. 59-70, 2017.
- BALEN, M. **Síntese enzimática de ascorbil oleato utilizando metodologias alternativas**. 2016. 155 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.
- BANSODE, S. R.; HARDIKAR, M. A.; RATHOD, V. K. Evaluation of reaction parameters and kinetic modelling for Novozym 435 catalysed synthesis of isoamyl butyrate. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 92, n. 6, p. 1306–1314, 2017. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/jctb.5125>. Acesso: jun. 2020.
- BISSACOTTI A. P.; ANGST C. A.; SACCOL A. L de F. Implicações dos aditivos químicos na saúde do consumidor. **Disciplinarum Scientia**. Série: Ciências da Saúde, Santa Maria, v. 16, n. 1, p. 43-59, 2015.
- BOBBIO, F. O.; BOBBIO, P. A. **Introdução à química dos alimentos**. 3. Ed. São Paulo: Varela,. 2003.
- BRICEÑO, J. C. C. **Desenvolvimento e caracterização de filmes biodegradáveis a base de amido modificado de mandioca e óleo de melancia (*Citrullus lanatus*)**. 2017. 146 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos), Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2017.
- 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, N. D. L. **Produção e caracterização de filmes biodegradáveis ativos de amido de semente de jaca**. 2017. 94 f. Dissertação

- (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais). Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2017.
- CAMPOS, S. S. de; OLIVEIRA, A. de; MOREIRA, T. F. M.; SILVA, T. B. da; FERNANDES, I. P.; BARREIRO, M. F.; LEIMANN, F. V. Solubilidade em água, cor, atividade antioxidante e propriedades térmicas de filmes ativos de TPS/PBAT adicionados de curcumina. In: SIMTEA, 8.; SIMPÓSIO DE TECNOLOGIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS, 8.; 2018, Campo Mourão. **Resumos**. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, p. 5, 2018. Disponível em: < <http://hdl.handle.net/10198/18850>. Acesso em: abr. 2020.
- CHAMBERS, S. J.; LAMBERT, N.; PLUMB, G. W.; WILLIAMSON, G. Evaluation of the antioxidant properties of a methanolic extract from juice plus fruit and juice plus vegetable (dietary supplements). **Food Chem.**, v. 57, p. 271-274, 1996.
- COSTA C. S. da; SCHENATO, M. T.; SILVA, J. A.; ANTONIOLLI, L. R. **Coberturas comestíveis a base de quitosana, cálcio e ácidos graxos na qualidade pós-colheita de morangos**. 2009. 107 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia Industrial). Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2009.
- COSTA, M. S. **Produção e caracterização estrutural, molecular, e morfológica de nanocristais a partir de diferentes amidos e sua aplicação em biofilmes**. 2017. 166 f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, São José do Rio Preto, 2017.
- DEGANI, A. L.; CASS, Q. B.; VIEIRA, P. C. Cromatografia um breve ensaio. **Química Nova na Escola**, n. 7, p. 21-25, 1998.
- DIAS, J. de C. **Rotas de destinação dos resíduos plásticos e seus aspectos ambientais: Uma análise da potencialidade da biodegradação**. 2016. 88 f. Dissertação (Mestrado em Planejamento Energético). Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.
- DALLA COSTA, K. A. **Síntese enzimática e encapsulamento de oleato de ascorbila**. 2018. 73 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de

- Alimentos). Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, 2018.
- FARIAS, M. G. **Elaboração e caracterização de filmes de amido e polpa de acerola por casting, extrusão termoplástica e termoprensagem**. 2016. 188 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2016.
- HIGUCHI, C. T.; ANDRADE, D. M. S. Análises crítica e comparativa de uma marca cosmética com apelo antienvhecimento. **Interfac EFS**, v. 9, p. 43- 63, 2014.
- JASKI, M.; LOTÉRIO, N.; SILVA, D. **A ação de alguns antioxidantes no processo de envelhecimento cutâneo**. Curso de Cosmetologia e Estética da Universidade do Vale do Itajaí – UNIVALI. Balneário Camboriú: UNIVALE, 2014.
- JASPER, E. A. **Síntese do éster aromático benzoato de benzila via esterificação enzimática**. 2018. 53 f. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2018.
- KLUGE, R. A.; GEERDINK, G. M.; TEZOTTOULIANA, J. V.; GUASSI, S. A. D.; ZORZETO, T. Q.; SASAKI, F. F. C.; MELLO, S. da C. Qualidade de pimentões amarelos minimamente processados tratados com antioxidantes. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 35, n. 2, p. 801-812, 2014. Disponível em: <http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias/article/view/14919>. Acesso em: jul. 2020.
- LAWTON, J. W. Effect of starch type on the properties of starch containing filmes. **Carbohydrate Polymers**, v. 29, p. 203-208, 1996.
- MACIEL, D; OLIVEIRA, G. G. Prevenção do envelhecimento cutâneo e atenuação de linhas de expressão pelo aumento da síntese de colágeno. **V Congresso Multiprofissional em Saúde: Atenção ao Idoso**. Londrina, p. 131-133, 2011.
- MAIA, N. V. L. P. **Produção e caracterização de blendas poliméricas com poli (3-hidroxitirato)) (PHB) e amido de milho para produção de plástico biodegradável**. 2016. 128 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.

- MESQUITA, R. A. **Desenvolvimento de biofilme comestível a base de gelatina e própolis para conservação de frutas**. 2015. 49 f. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, 2015.
- MIRANDA, A. L. P.; FRAGA, C. A. M. Atividade sequestradora de radical livre determinação do potencial antioxidante de substâncias bioativas. In: MONGE, A.; GANELLIN, C. R. **Practical Studies for Medicinal Chemistry IUPAC**, 2006.
- MOREIRA, G. L. P.; VIANA, A. E. S.; ANDRADE, A. C. B.; CARDOSO, A. D.; SANTOS, V. S.; LOPES, S. C. Teores de amilose e amilopectina em genótipos de mandioca (*manihot esculenta crantz*). **XV Congresso Brasileiro de Mandioca**, Salvador, 2013.
- OLIVEIRA, A. A.; REIS, R. C.; VIANA, E. S.; SANTOS, B. J. R.; JESUS, J. L. Determinação dos teores de amilose e amilopectina do amido de bananas e plátanos. **X Jornada Científica Embrapa Mandioca e Fruticultura**, Cruz das Almas, 2016.
- OMS-ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Conservação de alimentos por aditivos químicos. **Food ingredients Brasil**. Disponível em: <https://revista-fi.com.br/>. Acesso em jun. 2020.
- PÁDUA, I.; BARROS, R.; MOREIRA P.; MOREIRA, A. Alergia alimentar na restauração. **Programa Nacional para a Promoção da Alimentação Saudável**. Lisboa. 2016. Disponível em: <https://nutrimento.pt/activeapp/wp-content/uploads/2016/05/Alergia-Alimentar-na-Restaura%C3%A7%C3%A3o.pdf>. Acesso em: Jun 2020.
- PELLISSARI, F. M.; GROSSMANN, M. V. E.; YAMASHITA, F.; PINEDA, E. A. G. Antimicrobial, mechanical, and barrier properties of cassava starch-chitosan films incorporated with orégano essential oil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 7499-7504, 2009.
- 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.
- RIBEIRO, C. J. **Cosmetologia aplicada à dermoestética**. 2. ed. São Paulo: Pharmabooks, 2010.

- ROCHA, E. C.; SARTORI, C. A.; NAVARRO, F. F. A aplicação de alimentos antioxidantes na prevenção do envelhecimento cutâneo. **Revista Científica da FHO**, Uniararas, v. 4, n. 1, p. 22-24, 2016.
- SANTOS, M. P.; OLIVEIRA, N. R. F. Ação das vitaminas antioxidantes na prevenção do envelhecimento cutâneo. **Ciências da Saúde**, Santa Maria, v. 15, n. 1, p. 75-89, 2013.
- SOUZA, A. C., DITCHFIELD, C., TADINI, C. C. Biodegradable films based on biopolymers for food industries. In M. L. Passos, & C. P. Ribeiro (Eds.), **Innovation in Food Engineering: New techniques and products**. Boca Raton, FL: CRC Press, p. 511-537, 2010.
- SOUZA, J. A. R. de. *et al.* Caracterização e influência da sazonalidade na geração de resíduos sólidos em Urutaí-GO. **Multi Science Journal**, [S.l.], n. 1, p. 79-83, 2015.
- UGALDE, M. L. **Biofilmes ativos com incorporação de óleos essenciais**. 2013. 184 f Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos). Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, 2013.
- VASCONCELOS, T. B. Radicais livres e antioxidantes: proteção ou perigo? **Unopar Cient. Ciênc. Biol. Saúde**, v.16, n. 3, p. 213- 219, 2014.
- WWF - FUNDO MUNDIAL PARA A NATUREZA. **Solucionar a Poluição Plástica: Transparência e Responsabilização**. Gland, Suíça, 2019. Disponível em: <http://promo.wwf.org.br/solucionar-a-poluicao-plastica-transparencia-e-responsabilizacao>. Acesso em: jun. 2020.
- ZHANG, Y.; REMPEL, C.; LIU, Q. "Thermoplastic Starch Processing and Characteristics"- A Review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 54, n. 10, p. 1353-1370, 2014.