

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO SECRETARIA DE EDUCAÇÃO PROFISSIONAL E  
TECNOLÓGICA INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E  
TECNOLOGIA DE SANTA CATARINA CAMPUS JARAGUÁ DO SUL

ALANA GABRIELA ROCHA  
AMANDA CAROLINE DO NASCIMENTO  
ANDRÉ JORDÍ VOLKMANN  
CAROLINE FOSSILE  
JÉSSICA MARA MACHADO

**ESTERIFICAÇÃO VIA ENZIMÁTICA A PARTIR DE LIPASES PRESENTES NO  
LÁTEX PRESENTE NA PLANTA *EUPHORBIA TIRUCALLI***

Relatório de Pesquisa  
Conectando Saberes  
Curso Técnico em Química (modalidade: Integrado): 4ª Fase

JARAGUÁ DO SUL  
2017

ALANA GABRIELA ROCHA  
AMANDA CAROLINE DO NASCIMENTO  
ANDRÉ JORDÍ VOLKMANN  
CAROLINE FOSSILE  
JÉSSICA MARA MACHADO

**ESTERIFICAÇÃO VIA ENZIMÁTICA A PARTIR DE LIPASES PRESENTES NO  
LÁTEX PRESENTE NA PRESENTE NA PLANTA *EUPHORBIA TIRUCALLI***

Relatório de pesquisa desenvolvido no eixo  
formativo “Conectando Saberes” do Curso  
Técnico em Química (Modalidade: Integrado)  
de Instituto federal de Santa Catarina –  
Campus Jaraguá do Sul.  
Orientador: Elder Correa Leopoldino

JARAGUÁ DO SUL  
2017

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradecemos ao nosso orientador. Prof.<sup>o</sup> Elder Correa Leopoldino, que sempre esteve disponível para nos auxiliar, mesmo de longe, pelo tempo dedicado e pelos incentivos. Agradecemos principalmente pela confiança que sempre teve no grupo.

À Dona Rose Mari Correa Leopoldino, mãe do nosso orientador, que nos forneceu inúmeros galhos da planta aveloz para que o projeto pudesse ser executado.

À todos os professores de química que nos auxiliaram nas atividades, sanando dúvidas e nos repassando conhecimentos. Em especial ao Prof.<sup>o</sup> Giovani Pakuszewski, que ajudou com muitas sugestões durante a execução do projeto.

À Prof.<sup>a</sup> Maria da Graça Nascimento e Prof.<sup>a</sup> Julyetty Crystyne da Silva por estarem sempre disponíveis para responder dúvidas geradas durante a execução da pesquisa e pelos conselhos fornecidos.

À coordenadora da fase. Prof. Lenita Splitter, pela organização, desenvolvimento e apoio prestado durante todo o desenvolvimento e execução do projeto e pelo fornecimento da planta quando não conseguíamos com o orientador.

Aos estagiários do laboratório de química pelo apoio e auxílios prestados.

E a todos que ajudaram de forma direta ou indiretamente para a realização do nosso projeto.

E por final, mas não menos importante, gostaríamos de agradecer à banca, pela leitura crítica do trabalho e sugestões que serão de grande importância para o aprimoramento da pesquisa.

## RESUMO

A aveloz pertence à família das *Euphorbiaceae*, é de origem africana e pode ser encontrada em vários países tropicais como o Brasil, a mesma possui um látex muito utilizado em tratamentos para câncer e outros problemas de saúde. Esse látex é composto por uma mistura de vários componentes, incluindo enzimas, mais especificamente a lipase, que tem como função, entre outras, catalisar reações de hidrólise e esterificação. Os ésteres produzidos a partir dessas sínteses são muito utilizados por indústrias farmacêuticas, alimentares, têxtil, etc. Em geral processos de esterificação utilizam lipases comerciais provenientes de origem animal e microbiana. A presente pesquisa teve como objetivo verificar se a lipase contida no látex da planta aveloz possui atividade catalítica para atuar em reações de esterificação. Os métodos escolhidos para tal estudo consiste basicamente em esterificações contendo partes da planta, e esterificações de Fischer e técnicas de CCD para as análises. E a partir das análises pôde-se confirmar que as lipases presentes no látex da *Euphorbia tirucalli* são capazes de catalisar reações de esterificação, tanto que, observou-se a formação do acetato de isoamila, porém existe a necessidade de um longo tempo de reação. Em contraparte, pode-se dizer que não são necessárias grandes quantidades de aveloz e elevadas temperaturas para a reação ocorrer, pois algumas reações com menos de 10 g da planta e temperatura ambiente mostraram a formação de éster. Por conseguinte, a pesquisa contribuirá com informações para futuras pesquisas, visto que, há ausência de estudos sobre esta área.

**Palavras chave:** lipase, éster, esterificação, enzima, catalisador, aveloz

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>6</b>
<b>2 HIPÓTESES</b> .....	<b>7</b>
<b>3 OBJETIVO GERAL</b> .....	<b>7</b>
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	7
<b>4 JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>8</b>
<b>5 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>9</b>
5.1 HISTÓRICO DA PLANTA .....	9
<b>5.1.1 Propriedades da planta</b> .....	<b>10</b>
5.2 BIOCATALISADORES .....	10
<b>5.2.1 Enzimas</b> .....	<b>12</b>
<b>5.2.2 Lipases</b> .....	<b>12</b>
5.3 ÉSTERES .....	14
<b>5.3.1 Métodos de obtenção</b> .....	<b>15</b>
5.3.1.1 <i>Esterificação de Fischer</i> .....	15
5.3.1.2 <i>Esterificação enzimática</i> .....	16
5.4 ÉSTERES E A INDÚSTRIA .....	17
5.5 MÉTODOS ATUAIS DE PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ÉSTERES ....	19
<b>5.5.1 Extração por solvente</b> .....	<b>19</b>
<b>5.5.2 Cromatografia de camada delgada</b> .....	<b>19</b>
<b>6 METODOLOGIA</b> .....	<b>20</b>
6.1 ESTERIFICAÇÕES VIA ENZIMÁTICA .....	20
6.2 ESTERIFICAÇÃO DE FISCHER .....	21
6.3 CROMATOLOGRAFIA DE CAMADA DELGADA (CCD) .....	21
<b>7 RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	<b>22</b>
7.1 ESTERIFICAÇÃO DE FISCHER .....	22
<b>7.1.1 Acetato de isoamila</b> .....	<b>22</b>
<b>7.1.2 Salicilato de etila</b> .....	<b>22</b>
<b>7.1.3 Propanoato de isoamila</b> .....	<b>23</b>
7.2 ESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA .....	23
<b>7.2.1 Acetato de etila</b> .....	<b>23</b>
<b>7.2.2 Salicilato de etila</b> .....	<b>25</b>
<b>7.2.3 Propanoato de isoamila</b> .....	<b>26</b>
<b>7.2.4 Acetato de isoamila</b> .....	<b>28</b>
<b>7.2.5 Benzoato de isoamila</b> .....	<b>30</b>
<b>8 TRATAMENTO DE RESÍDUOS</b> .....	<b>30</b>
<b>9 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>31</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>32</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Segundo Costa (2011), a aveloz, planta pertence à família das *Euphorbiaceae*, é originária do continente africano, de onde foi levado para outros países tropicais, chegando ao Brasil em 1892, podendo ser encontrada na maioria dos estados do Nordeste por conta de seu característico clima quente.

Esta planta possui um látex, considerado tóxico, porém diversos estudos utilizando-o para fins medicinais, como no tratamento de verrugas, asma e reumatismo. O médico brasileiro Lauro Neiva chegou a utilizar por cerca de dez anos o látex do aveloz, diluído em água, para tratar de diversas doenças como o câncer e a doença de chagas. (NEODINI & GASPI, 2015; VARRICCHIO et. al, 2008).

Esse látex é composto por uma complexa mistura de diversos componentes, incluindo macromoléculas, como as lipases, que são enzimas responsáveis por catalisar reações de hidrólise e reações reversas, como a esterificação e a transesterificação. Entretanto, há poucos estudos sobre a utilização da lipase de origem vegetal nessas sínteses, visto que a maioria das lipases utilizadas são obtidas de forma comercial ou produzidas por bactérias.

Devido sua versatilidade no ramo industrial, os ésteres possuem grande importância em diversos setores, como no têxtil, fármaco e polimérico, destacando-se principalmente no alimentício, pois o aroma dos ésteres presentes em determinados alimentos influenciam o consumidor, visto que agregam características atrativas aos mesmos.

Em vista disso, optou-se por esterificação via enzimática a partir de lipases de origem vegetal devido ao grande interesse científico e tecnológico, em razão das inúmeras inconveniências com a catálise ácida, além do elevado custo de produção das lipases microbianas. (BIANCHI et al 2001; SINGHANIA et al, 2009 apud. MESSIAS et al, 2011).

A pesquisa teve como objetivo verificar a atividade catalítica das lipases contidas na planta da espécie *Euphorbia Tirucalli* na produção de ésteres de aroma. Com a finalidade de atingir o mesmo e corroborar ou refutar hipóteses levantadas, estipulou-se uma metodologia para a esterificação enzimática, a qual sofreu diversas alterações durante execução da pesquisa. Consequente, foram realizadas

esterificações de Fischer e a purificação dos produtos obtidos nestas reações através da técnica de extração por solvente, a fim de obter um padrão para comparação dos ésteres obtidos via enzimática, para posteriormente, analisá-los através da técnica de cromatografia de camada delgada (CCD).

## 2 HIPÓTESES

- O látex contido em partes da planta será eficiente nas reações propostas.
- Para as reações serão necessárias pequenas quantidades de látex da planta.
- Os ésteres, utilizando como catalisador as enzimas do látex da planta *Euphorbia tirucalli*, serão formados de maneira mais rápida que os catalisadores em meio ácido.
- O rendimento e a pureza do biodiesel com esse catalisador serão melhores.

## 3 OBJETIVO GERAL

Verificar a atividade enzimática das lipases contidas na planta da espécie *Euphorbia tirucalli* na produção de ésteres de aroma e biodiesel.

### 3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Utilizar o látex da planta aveloz através de cortes perpendiculares aos ramos da planta.
- Realizar a esterificação e transesterificação com lipase imobilizada na própria planta aveloz.
- Comparar a atividade catalítica através dos rendimentos das reações na produção de biodiesel e ésteres de aroma.
- Purificar os produtos obtidos na esterificação através de técnicas como destilação e extração líquido-líquido.
- Caracterizar os produtos obtidos por espectroscopia de infravermelho e índice de refração.
- Verificar também a pureza dos ésteres utilizando cromatografia de camada delgada.
- Verificar o produto obtido na transesterificação através da queima do mesmo.

#### 4 JUSTIFICATIVA

A planta da espécie *Euphorbia tirucalli*, também conhecida como aveloz ou pau-pelado, dentre outros nomes, é uma planta pertencente à família *Euphorbiaceae*, que, entre outras características, produz um líquido branco, conhecido por látex, que é altamente tóxico. Essa planta é de origem africana, porém foi levada para outros países tropicais, como o Brasil, onde se adaptou e começou a ser utilizada pela comunidade científica para diversos fins. (CRUZ, 1964 & DANTAS 2007 apud COSTA, 2011)

Apesar de seu látex ser muito utilizado para tratar inúmeras doenças, sua principal aplicação no meio científico se dá em pesquisas relacionadas ao tratamento do câncer. Esse látex contém lipase, uma enzima muito utilizada como catalisador em reações de hidrólise, por exemplo. Porém há pouco estudo sobre a utilização da lipase na forma bruta nessas sínteses, visto que a maioria das enzimas utilizadas são comerciais, sendo em sua maioria produzidas por bactérias (MESSIAS et al. 2011)

No âmbito da indústria, o aroma de um determinado produto é um fator que se destaca, pois, influencia o consumidor na decisão da compra, convencendo-o através do plano sensorial de que o mesmo possui qualidades. Dessa forma, segundo Vanin (2014), a produção de aromatizantes via esterificação enzimática é uma pesquisa de grande interesse científico e tecnológico devido às inúmeras inconveniências relacionadas com a catálise ácida, principalmente pelo fato de não se adequarem à expressão “tecnologia limpa”, ademais, as lipases microbianas apresentam um custo elevado no processo de produção das mesmas, que pode inviabilizar o processo em escala industrial. (BIANCHI et al 2001; SINGHANIA et al, 2009 apud. MESSIAS et al, 2011)

Existe outra vertente relacionada aos ésteres, o óleo diesel, que é amplamente utilizado pelas indústrias petroquímicas que o direcionam à venda e utilização deste como combustível. Porém, a sua fonte, o petróleo, não é renovável, e sua extração pode causar diversos impactos ambientais. Apesar de possuir uma menor energia se comparado ao óleo diesel, este combustível é fabricado a partir de fontes de energia renováveis e não causam tantos danos ao meio ambiente, em

relação ao balanço de carbono na atmosfera. Observado o seu elevado custo de produção, constata-se que a utilização de enzimas como catalisadores para a fabricação do biodiesel altera positivamente este fator. (Fiorese et al, 2011)

Devido ao pouco estudo envolvendo a catálise enzimática com o látex dessa planta, assim como a sua elevada importância no que se refere a sustentabilidade, a presente pesquisa visa estudar a viabilidade da utilização da enzima lipase, oriunda do látex presente na *Euphorbia tirucalli*, em reações de transesterificação, com foco nas reações de esterificação

## 5 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 5.1 HISTÓRICO DA PLANTA

Segundo Costa (2011), o aveloz é originário do continente africano, de onde foi levado para outros países tropicais. Pertencente à família das *Euphorbiaceae*, a planta pode atingir até 7 metros de altura e 15 centímetros de diâmetro, possui galhos duros, cilíndricos e verticilados. Raramente, possui flores com coloração amarelada ou esverdeada, que quando presentes tem um curto período de duração (**Figura 1**).



**Figura 1.** Foto da planta *Euphorbia tirucalli*, também conhecida como Aveloz e pau-pelado.  
**Fonte:** Obtida pelo grupo

O aveloz é utilizada como cerca viva, suas plantações servem como excelente proteção contra invasores. A planta produz um látex que irrita a pele e também os olhos, podendo provocar uma conjuntivite gravíssima. (SCHVARTSMAN, 1979 apud. OLIVEIRA & NEPOMUCEMO, 2003)

A *Euphorbia Tirucalli* também é usada na medicina para tratamento de verrugas, asma, tosse, dor de ouvido, nevralgias, reumatismo e, em alguns países, contra dor de dente. Mais recentemente vêm sendo utilizada como complemento de

tratamento de tumores cancerosos e pré-cancerosos (LYMAN et. al, 1988 apud. OLIVEIRA & NEPOMUCENO,2003; NEODINI & GASPI, 2015).

### 5.1.1 Propriedades da planta

De acordo com Neodini & Gaspi (2015) “É possível extrair de todas as partes da planta um látex cáustico”, esse látex é considerado tóxico por haver registros de acidentes como distúrbios gastrointestinais, conjuntivites, irritação e edemas oculares e até cegueira, além de reações inflamatórias e necrose quando em contato com a epiderme (MATOS, 2000 apud.LORENZI & MATOS, 2008; BATISTA et al., 2014; NEODINI & GASPI, 2015).

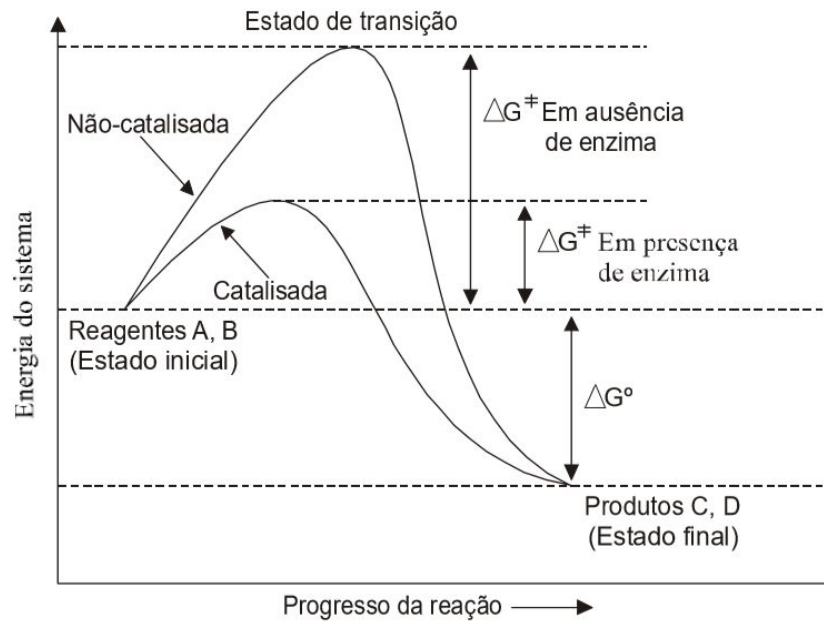
Como já mencionado, alguns herbalistas recomendam o uso do látex, em pequenas doses, para o tratamento do câncer. Contudo, testes farmacológicos já demonstraram que as mesmas partes da planta são responsáveis pela ativação do vírus Epstein-Barr, que está ligado ao desenvolvimento do linfoma de Burkitt (NEODINI & GASPI, 2015 apud LORENZI & MATOS, 2008).

O látex é composto por uma complexa mistura de diferentes componentes, incluindo macromoléculas. Um dos componentes majoritários do látex é o *cis* e/ou *trans* poli-isopreno. Outros constituintes presentes no látex e relatados em estudos fitoquímicos são: polissacarídeos, flavonóides, lipídios, fosfolipídios e proteínas, ficou comprovado também a existência de alcanos, cetonas triterpênicas, triterpenóides, açúcares e ácidos graxos (RIPPEL, 2005 apud AGOSTINI, 2009).

O látex ainda possui lipases de diversos usos, mas que ainda não foram objetos de muitos estudos, mas que podem ser usadas como biocatalisadores.

## 5.2 BIOCATALISADORES

Os biocatalisadores, ou catalisadores biológicos, são proteínas cuja função é acelerar reações no organismo. No âmbito da química, sua utilização deve-se ao fato de serem uma alternativa aos processos químicos, nos quais apresentam vantagens como: a elevada velocidade de reação, pelo fato de diminuir a energia necessária para que as mesmas ocorram, como demonstra a **Figura 2**; e apresentarem determinada seletividade quanto ao tipo de reação que catalisam (PAQUES & MACEDO, 2005).



**Figura 2.** Diagrama energético de reação catalisada e de reação não-catalisada, onde:  $G^\ddagger$  = energia livre de ativação,  $G^0$  = variação de energia livre.  
**Fonte:** MOTTA, 2007.

As reações podem ser catalisadas por enzimas, caracterizadas como proteínas biocatalisadoras, nas quais há a necessidade de determinada quantidade de energia, denominada energia de ativação ( $E_a$ ) ou energia livre de ativação, para que ocorram, permitindo a formação do complexo ativado, ou estado de transição, estabelecendo-se como o ponto de maior energia da reação, na qual os reagentes se encontram de forma intermediária de alta energia em seu estado ativado (MOTTA, 2007).

De acordo com o gráfico expresso na **Figura 2**, constata-se que, quanto maior o valor de  $G$ , menor a velocidade das reações. Destarte, os catalisadores propiciam a diminuição da energia livre de ativação apoiados na escolha de rotas potenciais que assegurem a formação de produtos através da menor energia que viabilize as reações, conseqüentemente aumentando sua velocidade. Cada reação é catalisada por uma enzima específica, sob condições apropriadas. A atividade das mesmas depende de fatores como: o pH; a temperatura; a concentração de substratos e produtos; e da presença de diversos cofatores, substâncias necessárias ao funcionamento das enzimas (MOTTA, 2007).

### 5.2.1 Enzimas

Segundo Silva (2015) as enzimas em geral são proteínas, e tem como principal função catalisar reações. Conforme Neto (2002) são formadas por aminoácidos, que por sua vez são unidos através de ligações polipeptídicas.

Consoante a autora Gris (2010) uma reação que utiliza a enzima como catalisador pode aumentar  $10^{20}$  vezes a velocidade da reação, a partir da diminuição da energia de ativação. Tal catálise dá-se através da quebra ou junção dos substratos, a qual ocorre no sítio ativo da mesma, onde localizam-se os resíduos de aminoácidos.

Esta é, portanto, a região da enzima que contém resíduos de aminoácidos capazes de interagir com o substrato. É nesse sítio, também, que estão os resíduos de aminoácidos que diretamente participam da ruptura e estabelecimento de ligações químicas que resultam na formação do produto. (LUIELE, p.1, sd)

As enzimas são altamente específicas quanto a reação que catalisa e seus substratos, além de só atuarem em pH, e temperatura favorável, os quais ainda variam de acordo com a especificidade de cada uma. (GRIS, 2010). Estas são divididas pela União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (UIBBM) em seis grupos: oxidorreductase, transferases, hidrolases, liases, isomerases e ligases, as quais apresentam ainda subdivisões, segundo VESCOVI (2012).

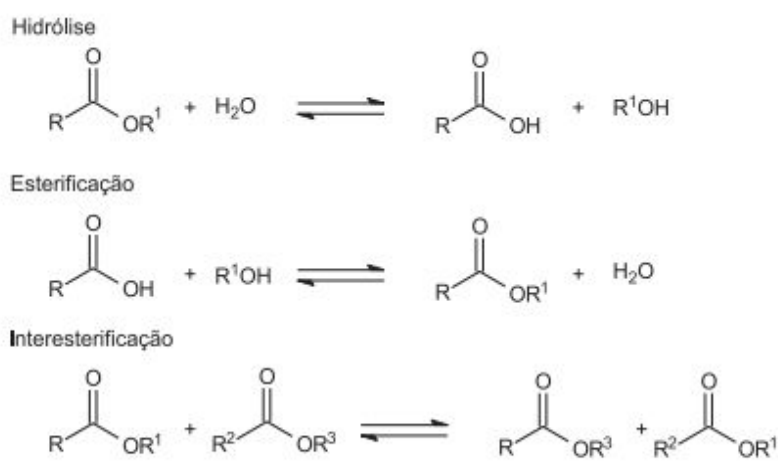
De acordo com o autor Ledra (2009), 5 dos 6 grupos de enzimas são utilizados em química orgânica, e entre eles o grupo das hidrolases se destacam e são as mais utilizadas, um exemplo de sua aplicação nas indústrias se dá as reações de esterificação utilizando lipases.

### 5.2.2 Lipases

As lipases são biocatalisadores classificados como hidrolases, enzimas que promovem cisão em materiais orgânicos através da utilização de água, sendo provenientes de fontes animais (pancreática, hepática e gástrica), microbianas (podendo ser produzidas através da fermentação por diversos fungos e bactérias) e de origem vegetal (grãos, frutas, caule, sementes e plantas que possuem látex),

sofrendo variações em suas propriedades catalíticas (MUKHERJEE & WOOLEY, 1994 apud. PAQUES & MACEDO, 2006).

Estas enzimas são responsáveis por catalisar reações de hidrólise de óleos em ácidos graxos livres, monoacilgliceróis, diacilgliceróis e glicerol. De acordo com a **Figura 3**, além da hidrólise, as lipases catalisam reações reversas, como a esterificação e a transesterificação que, segundo Delgado (2014), atuam em condições controladas de pH, temperatura e pressão (GRIS, 2011; LEDRA, 2009; PAQUES & MACEDO 2006).



**Figura 3.** Exemplos de reações catalisadas por lipases  
**Fonte:** Quimicanova.s bq.org.br

No que se diz respeito à indústria, de acordo com Messias et al 2011, a fonte de lipase mais explorada pelas mesmas têm sido os microrganismos. Dentre os processos bioquímicos presentes na literatura, as lipases representam cerca de 35% das enzimas empregadas (PAQUES & MACEDO 2006), tal que:

Pelo menos 75% de todas as enzimas industrializadas são hidrolases e destas, 90% são produzidas por micro-organismos através de processos fermentativos. Depois das proteases e carboidrases, as lipases constituem o terceiro maior grupo em vendas no mundo (JAEGER et al., 1997, SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001 apud MESSIAS et al., 2011).

Entretanto, apesar da variedade de lipases microbianas, devido ao fato das mesmas apresentarem elevados custos de produção, o uso dessas enzimas em escala industrial é escasso (PAQUES & MACEDO 2006).

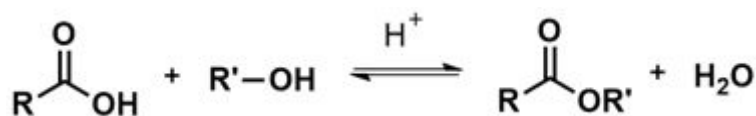
As lipases vegetais não necessitam de um alto grau de purificação, sendo assim, apresentam baixo custo de produção, além de possuírem especificidade e seletividade elevadas - em alguns casos se mostram similares às lipases microbianas - e são acessíveis devido ao fato de estarem disponíveis no mercado como enzimas proteolíticas brutas (GIORDANI & VERGER, 1991 apud PAQUES & MACEDO, 2006).

Segundo Paques e Macedo 2006 as lipases entre si, podem apresentar diferentes preferências por ácidos e álcoois. Lipases presentes no látex vegetal da *E. characias*, mesma família que a *Euphorbia Tirucalli*, apresentaram maior atividade por ácidos carboxílicos de cadeia curta, que variam de quatro a doze carbonos, e álcoois não ramificados. Álcoois ramificados causam uma diminuição no rendimento, tal fenômeno é causado devido a dificuldade de reconhecimento do sítio ativo da enzima, além de uma possível interação das ramificações com a parte polar do surfactante que acaba impedindo a difusão dos substratos no próprio sítio ativo. (JESUS *et al*, 1997; PAQUES & MACEDO, 2006)

Atualmente as lipases são utilizadas na fabricação de detergentes, na área de fármacos, biodiesel, assim como nas indústrias de óleos, alimentos, ésteres de aroma, entre outros.

### 5.3 ÉSTERES

Os ésteres são compostos derivados de ácidos carboxílicos, dados pela substituição das hidroxilas ligadas a uma carbonila por um radical orgânico OR', proveniente de um álcool, durante uma reação conhecida como esterificação, como mostra a **Figura 4**.



**Figura 4.** Esquema geral de uma reação geral de esterificação em meio ácido.

**Fonte:** Elaborada pelo grupo.

Os ésteres de aroma são compostos apolares dos quais a variação da massa molecular determina algumas de suas características físicas, tais como: aroma, solubilidade, ponto de ebulição e estado físico (ROCHA, 1999).

Os ésteres de massa molecular baixas são líquidos, possuem aroma agradável, são incolores e voláteis, sendo comumente utilizados na indústria de perfumes e essências artificiais (ROCHA, 1999).

À proporção que a massa molecular aumenta, os ésteres tornam-se viscosos, como os óleos vegetais e animais. Em outra perspectiva, os que possuem de massa molecular muito elevada são sólidos - gorduras e ceras- (ROCHA, 1999).

### 5.3.1 Métodos de obtenção

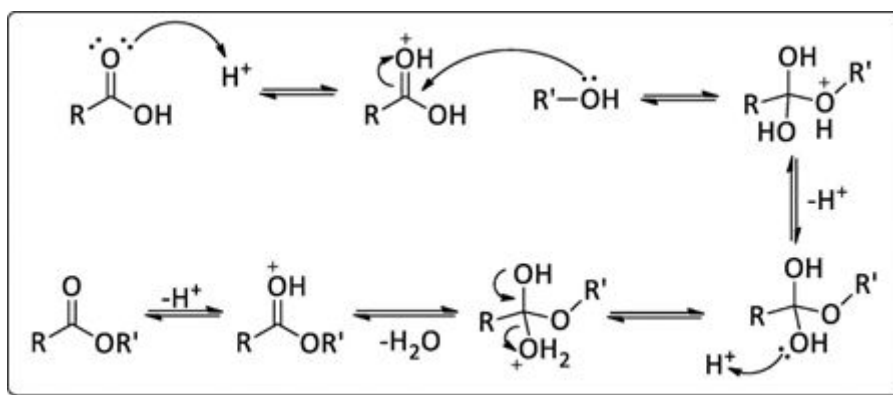
Os ésteres podem ser obtidos a partir de diferentes compostos e reações. Dentre elas destacam-se: as reações envolvendo anidridos; haletos de acila com metóxido ou etóxido de sódio; cetenas e álcoois; ácidos carboxílicos e álcoois; anidridos com éteres e  $AlCl_3$ ,  $FeX_3$  ou  $BX_3$  (sendo X um haleto); e também a reação de Baeyer-Villiger, utilizada para a produção do acetato de fenila (BARBOZA & ALMEIDA, 2004).

As reações no que diz respeito aos haletos de acila com metóxido ou etóxido de sódio promovem a formação de determinados ésteres de aroma, sendo comumente utilizados para a formação de ésteres metílicos e/ou etílicos com alto rendimento. No que se refere às reações de brometo de acila com álcoois, essas promovem a formação de ésteres de aroma na presença de soluções alcalinas (BARBOZA & ALMEIDA, 2004).

As reações de cetenas com álcoois correspondem a formação de ésteres de aroma à temperatura ambiente. Contudo, o processo mais econômico para obter ésteres em laboratórios é através das reações realizadas em meio ácido, que consistem em reações entre ácidos carboxílicos com álcoois (BARBOZA & ALMEIDA, 2004).

#### 5.3.1.1 Esterificação de Fischer

O método comumente empregue para a obtenção de ésteres de aroma é através de reações entre o aquecimento de ácidos carboxílicos e álcoois, nos quais os produtos finais gerados são ésteres e água. Essa reação é conhecida como esterificação de Fischer, sendo catalisada em meio ácido, conforme a **Figura 5**.



**Figura 5.** Mecanismo genérico para a reação de esterificação de Fisher.

**Fonte:** Revista *Educación Química*, p. 322

Esses compostos são utilizados sobretudo na indústria alimentícia como flavorizantes, ou seja, substâncias que proporcionam aos alimentos sabor e aroma característicos. Ademais, são utilizados em outros setores da indústria como o de cosméticos, produtos de limpeza e fármacos.

### 5.3.1.2. Esterificação enzimática

As reações enzimáticas em meio orgânico têm despertado interesse industrial por consequência das vantagens na obtenção de produtos puros devido à especificidade das enzimas utilizadas nas reações, que proporcionam a redução de gastos energéticos e possibilitam práticas menos agressivas no decorrer das reações. Salienta-se ainda que a utilização de biocatalisadores permitem a redução dos custos de separação, purificação e tratamento de resíduos (TSUKAMOTO, 2006).

Acresce-se que, o uso de enzimas em reações de esterificação são uma alternativa viável à síntese orgânica e, por consequência das preocupações sustentáveis e ambientais durante as reações químicas, podem ser relacionadas ao conceito 'biotecnologia industrial'. Esses processos permitem a exploração de materiais renováveis para a obtenção de produtos industriais e, por consequência, diminuem a degradação ambiental (TSUKAMOTO, 2006).

Outrossim, a síntese enzimática envolvendo lipases é um processo alternativo para a produção de ésteres, proporcionando maiores rendimentos nas reações com temperaturas próximas à ambiente, que propiciam a obtenção de produtos com qualidade superior, economia de energia e reduzem a ocorrência de

subprodutos. Essas vantagens variam de acordo com a metodologia e enzimas aplicadas (ROSU et al. 1997).

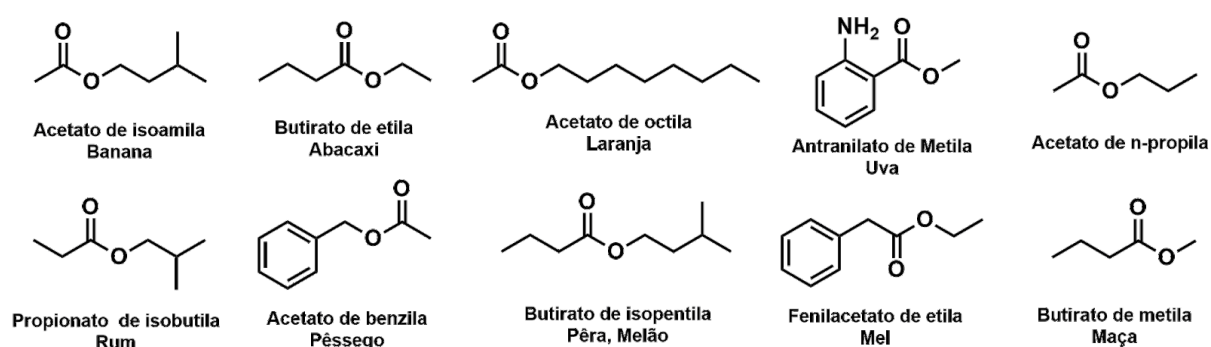
#### 5.4 ÉSTERES E A INDÚSTRIA

Devido ao seu envolvimento com setores industriais, como têxteis, alimentícios, fármacos, poliméricos, cosméticos e combustíveis, os ésteres possuem grande importância e influência sobre os consumidores.

Destaca-se o aroma no alimento, fator que contribui para a aquisição do mesmo. Segundo Chiappin, essa característica também atingiu culturas de outros povos, como exemplos, os gregos e romanos, que optaram pelo aroma agradável em suas bebidas, como o vinho (CHIAPPINI, 2007 apud SIMÕES et al, 2009).

Em bebidas alcoólicas, por exemplo, os compostos voláteis são responsáveis pelo aroma que pode ser rapidamente perceptível. Conforme Garruti “em bebidas alcoólicas alguns desses compostos têm origem no próprio fruto, outros são gerados durante o processo fermentativo e outros são provenientes de reações químicas durante o envelhecimento” ( GARRUTI, 2001 apud SIMÕES et al, 2009).

Os ésteres mais comuns nos produtos consumidos estão listados na **Figura 6**, esses podem ser utilizados em bebidas, bebidas alcoólicas, pudins, gelatinas, chicletes, balas, entre outros.



**Figura 6.** Estrutura química de algumas moléculas responsáveis pelo sabor e fragrância de alimentos.

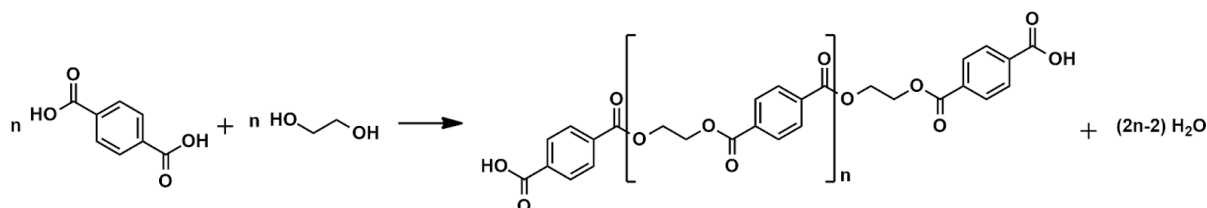
**Fonte:** Elaborada pelos autores baseada em MEDEIROS, 2008.

Sendo assim, nota-se que esse costume de aromatizar os próprios alimentos, os tornam mais agradáveis para o consumo, atribuindo uma maior qualidade para o produto.

No que se refere às influências a partir de um produto, destaca-se a indústria de cosméticos. Especificamente no segmento de perfumes, os ésteres encontram-se em fragrâncias que possuem uma menor concentração, isto é, mais suaves. (PAVIA et al, 2009, PG. 87).

A utilização dos ésteres não se delimita apenas em fragrâncias de determinado produto, mas também em materiais comuns no nosso dia-a-dia, como polímeros, ou seja, garrafas plásticas.

Nos polímeros sintéticos - macromoléculas formadas por unidades monoméricas repetidas, neste caso artificialmente - como os poliésteres, que possuem vários grupos de ésteres. O poliéster mais importante, representado na **Figura 7**, é o poli(tereftalato de etileno), PET, devido ao seu alto índice de reciclagem, esse pode ser usado em fibra têxtil, embalagens, resinas insaturadas, mantas de não tecido, cordas, cerdas de vassouras e escovas, entre outros. No ramo da indústria têxtil, destaca-se o nylon, no qual ocorre a reação de um ácido com uma amina para a formação do mesmo (SPINACÉ, 2005).



**Figura 7.** Reação do ácido tereftálico com o etilenoglicol formando o politereftalato de etileno (PET), um poliéster (polímero).

**Fonte:** Elaborada pelo grupo, adaptada de WAN et al, 2001.

Especificando-se nos fármacos, encontram-se os ésteres no polímero sintético denominado (PAA) – poli(ácido acrílico). Alguns produtos que contém o PPA são: os que possuem a função de prevenir a acne e linhas de expressão. Estão presentes também no revestimento do fármaco, que possui a função de proteger o estômago, alguns deles são: o metacrilato de butila (BMA) e metacrilato de metila (MMA). Além disso, os ésteres encontram-se nos poliésteres alifáticos, um tipo de polímero com cadeias abertas de moléculas, sendo o poli(hidroxibutirato) (PHB), esse é usado em medicamentos, com a função de prolongar o fármaco no organismo (VILLANOVA et al, 2009).

Na indústria de combustíveis, o biodiesel é utilizado como fonte alternativa aos motores ciclo diesel - motores de combustão interna de ignição por compressão - (OLIVEIRA et al, 2007).

## 5.5 MÉTODOS ATUAIS DE PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ÉSTERES

Dentre os diversos métodos de purificação e caracterização de ésteres, optou-se pela utilização de cromatografia em camada delgada (CCD) para a caracterização dos ésteres e a técnica de extração por solvente para purificação dos ésteres produzidos através do método de Fischer.

### 5.5.1 Extração por solvente

A extração por solvente é uma técnica de purificação, que se dá pela transferência de um soluto de um solvente para outro. Os dois solventes devem ser imiscíveis, de forma que o soluto passa de um solvente para o outro por ter maior solubilidade no segundo, formando um sistema de duas fases (PAVIA et al, 2009). Normalmente, adiciona-se no sistema água e um solvente orgânico. Devido ao fato da maioria dos ésteres serem apolares, terão maior afinidade com a fase orgânica e, por sua vez, os subprodutos com a fase aquosa.

### 5.5.2 Cromatografia de camada delgada

A cromatografia de camada delgada é uma técnica que consiste na separação de misturas. A mesma, está relacionada com a polaridade dos compostos, que decorrerá em interações diferentes dos compostos de uma mistura com a fase estacionária e fase móvel, presentes em uma cuba cromatográfica. De acordo com as autoras Marques e Borges (2012), um composto adicionado a um sistema de duas fases terá maior afinidade por uma, logo, o percurso total percorrido pelo mesmo será diferente do percurso percorrido pela fase móvel.

Para substâncias incolores, as amostras são submetidas a lâmpadas de UV ou vapor de iodo para que seja possível a visualização das manchas. Para os ésteres, opta-se por utilizar vapor de iodo, por exemplo. (BRAIBANTE, 2015)

A identificação das substâncias é feita através do cálculo do  $R_f$ , fator de retenção, que é a razão da distância percorrida pelo composto e a distância percorrida pelo solvente.

$$R_f = \frac{\text{Distância percorrida pelo composto}}{\text{Distância percorrida pelo solvente}}$$

Cada substância possui um valor de  $R_f$ , sendo possível identificar compostos desconhecidos a partir do mesmo. Através desta técnica, pode-se comparar os reagentes utilizados na reação com o produto final obtido, identificando se houve término da reação pela ausência das manchas dos reagentes e formação de outras manchas.

## 6 METODOLOGIA

Foram feitas esterificações enzimáticas e de Fisher, sendo a última para que houvesse padrões para análises de CCD. Todas as reações fizeram o uso de seus respectivos álcoois e ácidos carboxílicos, além da utilização de solventes, variando o catalisador, a enzima para as esterificações enzimáticas e ácido sulfúrico para as esterificações de Fischer. O acompanhamento e análise das esterificações deu-se através de CCD, utilizando diferentes proporções de acetato de etila e hexano como solvente, e iodo como revelador.

### 6.1 ESTERIFICAÇÕES VIA ENZIMÁTICA

Para realizar as reações de esterificação via enzimática foi utilizada uma metodologia inicial, instituída como padrão e sujeita a alterações. Tal metodologia consistiu em realizar a reação no agitador orbital (Dist, D 950) na intensidade de 1,5 (medida do aparelho), na qual foram utilizados 30 mL de hexano como solvente auxiliar. Outrossim, as quantidades padrões de planta foram de 10, 20 e 30 g, as quais sofreram variações no decorrer das sínteses.

Ademais, as reações foram realizadas no período de 2h à temperatura ambiente (25 °C), sem realização da cinética química e em ausência de água, optando-se pela utilização da Aveloz bruta, com cortes na horizontal e vertical, visando obter uma maior superfície de contato entre a enzima e os demais reagentes.

## 6.2 ESTERIFICAÇÃO DE FISCHER

A fim de verificar a atividade catalítica da lipase utilizada na esterificação via enzimática, realizou-se esterificação de Fischer, para obter um produto puro que pudesse ser utilizado como padrão nas análises de cromatografia. Para este método utilizaram-se os álcoois e ácido carboxílicos correspondentes, ácido sulfúrico como catalisador e água como solvente. As quantidades dos reagentes foi variada de acordo com cada reação.

A purificação desses ésteres se deu pela extração por solvente, a qual fez-se o uso de 3x15 mL de clorofórmio, sempre agitando em forma de 8 e liberando a pressão conforme necessário. A fase aquosa foi separada da fase orgânica e descartada corretamente, enquanto na fase orgânica realizou-se uma secagem, com o agente dessecante sulfato de sódio ( $\text{NaSO}_4$ ), que posteriormente foi filtrado e descartado. Os ésteres foram submetidos à destilação à vácuo utilizando um evaporador rotativo e posteriormente armazenados para que pudessem ser analisados. O clorofórmio recuperado foi utilizado novamente em outras extrações.

Após a purificação as amostras foram submetidas a técnica de CCD, passando pelos mesmos processos que as demais. Para todas foram calculadas os *R<sub>f</sub>*s para assim poder identificar quais as substâncias contidas nas manchas.

## 6.3 CROMATOGRAFIA DE CAMADA DELGADA (CCD)

Para análise das sínteses optou-se pela técnica de cromatografia de camada delgada (CCD), onde foram aplicadas pequenas quantidades das amostras sobre a placa de sílica, devidamente preparada. As placas foram cortadas em dimensões de 2x5 cm, na qual foram traçadas duas linhas à 0,5 cm das extremidades superiores e inferiores. Após a aplicação da amostra as placas foram submetidas a cuba cromatográfica contendo hexano e acetato de etila, com proporções variadas de acordo com cada amostra, e em seguida levada ao vapor de iodo para revelação das respectivas manchas.

Para comparação e identificação dos produtos das sínteses foram feitas placas com um padrão para tal comparação, tanto dos reagentes quanto dos produtos.

## 7 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 7.1 ESTERIFICAÇÃO DE FISCHER

#### 7.1.1 Acetato de isoamila

Para esterificação do acetato de isoamila foram utilizados 10 mL do álcool isoamílico, 6,25 mL do ácido acético, 50 mL de água destilada e, como catalisador da reação, 0,5 mL de ácido sulfúrico.

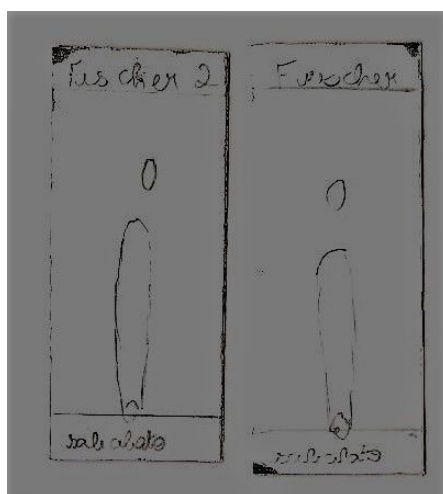
Após isso, purificou-se o éster formado através do método de Fischer com base na metodologia padrão, na qual, utilizou-se 3x15 mL de clorofórmio. Essa reação durou cerca de 2 h, com isso, desenvolveu-se a técnica de CCD com a utilização de 7 mL de hexano e 5 mL de acetato de etila para o respectivo éster, e, posteriormente, foi utilizado como padrão para as esterificações enzimáticas, onde apresentou, na placa cromatográfica, apenas uma mancha.

#### 7.1.2 Salicilato de etila

De maneira inicial, utilizou-se as quantidades de 10 mL e 4,7 g , respectivas ao álcool etílico e ao ácido salicílico, bem como 0,5 mL de ácido sulfúrico como agente catalítico e 110 mL de água.

Contudo, o ácido salicílico é insolúvel à temperatura ambiente, dessa forma, com o aumento da temperatura, tornou-se possível a sua solubilidade. Porém, ao final da esterificação, formaram-se cristais provenientes do ácido salicílico que não reagiu e precipitou no interior do balão utilizado. Salienta-se ainda que a purificação foi realizada apoiada na metodologia padrão, apresentando a formação de corpo de fundo em virtude da solubilidade do ácido salicílico.

Posteriormente, realizou-se outra reação na qual as quantidades utilizadas de ácido salicílico, álcool etílico e água alteraram-se para 3 g, 40 mL e 10 mL respectivamente, mantendo-se apenas a quantidade de 0,5 mL de ácido sulfúrico, utilizado como catalisador. Nessa, conseguiu-se observar a completa solubilidade do ácido salicílico e, conforme a **Figura 8**, obter o padrão para as esterificações enzimáticas, através da técnica de CCD. Outrossim, executou-se a purificação do produto obtido através da metodologia padrão, alterando apenas a quantidade de clorofórmio para 20 mL.



**Figura 8.** Placas cromatográficas do salicilato de etila realizadas através do método de Fischer.  
**Fonte:** Elaborada pelo grupo.

### 7.1.3 Propanoato de isoamila

Para preparo do padrão do propanoato de isoamila utilizou-se seus reagentes específicos além dos dois solventes, as quantidades de ácido propiônico, álcool isoamílico, ácido sulfúrico e água foram respectivamente 8 mL, 10 mL, 0,5 mL, 35 mL.

Seguidamente, o éster foi purificado para obtenção do padrão. A purificação seguiu a metodologia padrão de utilização de 3x15 mL de clorofórmio. Prontamente a amostra foi submetida a técnica de CCD utilizando 7 mL de hexano e 3 mL de acetato de etila, já que essas proporções seriam usadas para os outros padrões e para a própria esterificação enzimática, por fim, a placa cromatográfica apresentou apenas uma mancha.

## 7.2 ESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA

### 7.2.1 Acetato de etila



**Figura 9.** Esquema geral de uma reação de esterificação enzimática do acetato de etila.  
**Fonte:** Elaborada pelo grupo.

A síntese do acetato de etila se deu em 6 ensaios, com 2 h de reação no agitador orbital utilizando a intensidade de 1,5. Para tais, foram utilizados 15 mL de

ácido acético, 10 mL de etanol e variações da planta em 2, 5 e 7 g. Ademais, foram utilizados dois solventes para a reação, com o objetivo de testá-los, sendo estes água e hexano, 25 mL de cada. Entretanto, a água quando utilizada como solvente auxiliar, faz com que a solução fique altamente ácida, o que leva à desnaturação da enzima utilizada como catalisador, visto que a mesma atua melhor sob condições favoráveis de pH ( $\approx 7$ ).

Posteriormente, realizou-se a cromatografia de camada delgada (CCD) para análise dos resultados obtidos. Para tal técnica, utilizou-se a placa cromatográfica de sílica gel e como solventes, hexano/acetato de etila 7:3.

Nas amostras que continha água como solvente auxiliar, as respectivas placas apresentaram apenas a mancha contida na base, identificada como sendo o ácido acético. Diferentemente das amostras em que o solvente auxiliar era o hexano, onde as placas apresentaram diversas manchas, pois o hexano acaba extraíndo compostos da planta, como a clorofila. É possível observar estas manchas na **Figura 10**.



**Figura 10:** Placas cromatográficas contendo respectivamente: a) reação com 2 e 5 g de aveloz e água como solvente; b) reação com 5 g e 7g de aveloz e hexano como solvente; c) álcool isoamílico e ácido acético como padrões.

**Fonte:** Dados obtidos pelo grupo.

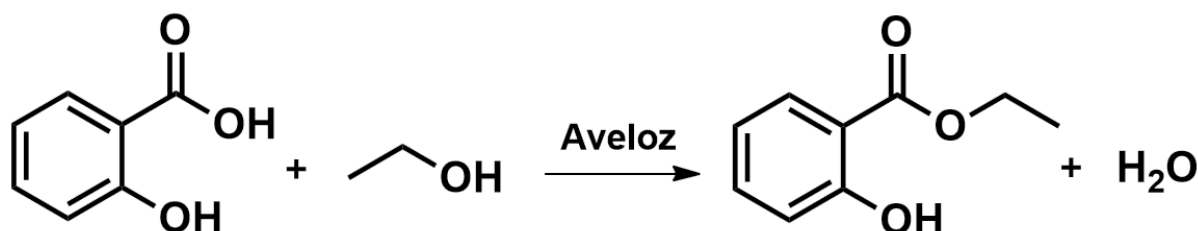
A partir do cálculo do Rf das placas, só foi possível identificar a presença do ácido acético, sendo este a mancha contida na base e com o Rf respectivo de 0,65, também presente na amostra 5, placa b). Como o álcool etílico e o éster proveniente desta síntese são solventes, dificultaram o aparecimento dos mesmos na placa. As

demais manchas presentes não foram identificadas, podendo ser impurezas, devido a utilização da planta bruta na reação.

A placa cromatográfica utilizada nesta técnica é de sílica, que é polar. O ácido acético possui uma parte polar, o grupo hidroxila, que quando em contato com a sílica da placa, o mesmo reage e fica contido na base da placa, na forma de sal. Enquanto o ácido em sua forma neutra, correu com o solvente, assim, apresentando duas manchas na placa.

Deste modo, não foi possível analisar se houve formação do éster desejado através da cromatografia de camada delgada (CCD) e não foi possível a realização de outras técnicas devido a falta de pureza do produto formado na síntese.

### 7.2.2 Salicilato de etila



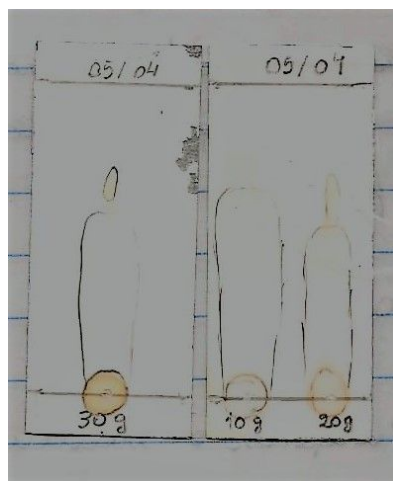
**Figura 11.** Esquema geral de uma reação de esterificação enzimática do salicilato de etila.  
**Fonte:** Elaborada pelo grupo.

A esterificação do salicilato de etila foi executada através dos reagentes: ácido salicílico e álcool etílico; com o escopo de produzir o éster salicilato de etila através da catálise enzimática. Utilizando dados relativos ao ácido acético e o etanol como referência, estipulou-se 5 g de ácido salicílico e 2,68 mL de álcool etílico. Todavia, seguiu-se a metodologia padrão para as quantidades de catalisador, hexano e demais parâmetros da reação.

Entretanto, o ácido salicílico apresenta solubilidade em poucos compostos orgânicos e em água. Devido a esse fator, o ácido salicílico se deposita nas paredes dos erlenmeyers, por situar-se em estado sólido, quando à temperatura ambiente. Para que essa condição se reverta, adicionou-se 50 mL de hexano para as diferentes quantidades de catalisador.

Mediante o exposto, as quantidades dos reagentes foram alteradas por consequência dos resultados não satisfatórios obtidos na primeira reação. Em decorrência de tais fatos, utilizou-se 2 g de ácido salicílico e 50 mL de álcool etílico,

mantendo as demais condições da metodologia padrão, empregando a técnica da cromatografia de camada delgada, representada na **Figura 12**. Ademais, foram realizadas reações com a ausência do catalisador com o objetivo de comparar a atividade catalítica da planta.



**Figura 12.** Placas cromatográficas referentes à catálise enzimática do salicilato de etila em um período de 8 horas de reação.

**Fonte:** Elaborada pelo grupo.

Destarte, as placas cromatográficas representam um indicativo de separação dos componentes das amostras observadas pela eluição, ou seja, a “corrida cromatográfica”, sendo possível estabelecer parâmetros comparativos, através do cálculo do fator de retenção ( $R_f$ ), entre a esterificação de Fischer e os produtos obtidos na esterificação enzimática. Entretanto, nessa reação não é possível realizar o cálculo do fator de retenção, pois as manchas apresentam-se muito alongadas. Ademais, o etanol não pode ser identificado por ser solvente, assim como o ácido salicílico não pode ser estabelecido pelo fato de ser sólido à temperatura ambiente, sendo assim, ele não corre e fica retido. Possivelmente há a formação do éster, devido à similaridade dos padrões das manchas, porém, é necessário maiores investigações para a sua constatação.

### 7.2.3 Propanoato de isoamila



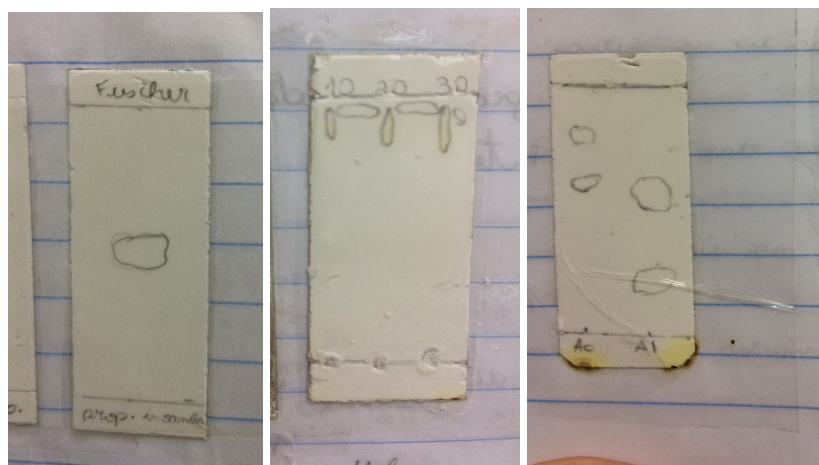
**Figura 13.** Esquema geral de uma reação de esterificação enzimática do propanoato de isoamila.

**Fonte:** Elaborada pelo grupo.

A esterificação do propanoato de isoamila foi realizada apenas uma vez em razão da indisponibilidade do ácido propiônico, o qual foi obtido em pequena quantidade pelo professor orientador em outro laboratório. As quantidades dos reagentes foram calculadas para que o ácido propiônico fosse o agente limitante e o álcool o agente em excesso (20%) para que houvesse a deslocação do equilíbrio a fim de formar o produto. No que se diz respeito as quantidades de reagentes utilizados nas sínteses, as da planta e de solvente mantiveram-se conforme a metodologia padrão, enquanto a quantidade de ácido propiônico foi de 2 mL e do álcool isoamílico foi de 3,5 mL.

Diferentemente das outras esterificações, esta teve duração de 8h, pois viu-se a necessidade de uma reação com maior duração devido as manchas de álcool e ácido ainda estarem presentes nas placas. Todavia a temperatura ambiente foi mantida.

Após a execução da reação, a amostra do éster, do ácido e álcool foram submetidos a técnica de CCD, como na **Figura 14**. Utilizou-se 7 mL de hexano e 3 mL de acetato de etila, pois por ser um éster grande o propanoato de etila acaba sendo pouco polar, logo ao utilizar um solvente com características mais apolares ele arrastaria mais a amostra, já que esta não teria tanta interação com a placa.



**Figura 14:** Placas cromatográficas contendo respectivamente: a) padrão do éster obtido pelo método de Fischer; b) reações com 10, 20 e 30 g de Aveloz; c) ácido propiônico e álcool isoamílico.  
**Fonte:** Dados obtidos pelo grupo.

As placas apresentaram manchas das quais não se pode identificar nenhum dos Rfs padrões, a reprodução das mesmas foi irrealizável devido a indisponibilidade do éster correspondente.

Contudo, é possível que uma das manchas presentes na placa seja o éster, mas em virtude das dificuldades e possíveis erros de análise não pode-se alegar a formação do produto pretendido.

#### 7.2.4 Acetato de isoamila



**Figura 15.** Esquema geral de uma reação de esterificação enzimática do acetato de isoamila.

**Fonte:** Elaborada pelo grupo.

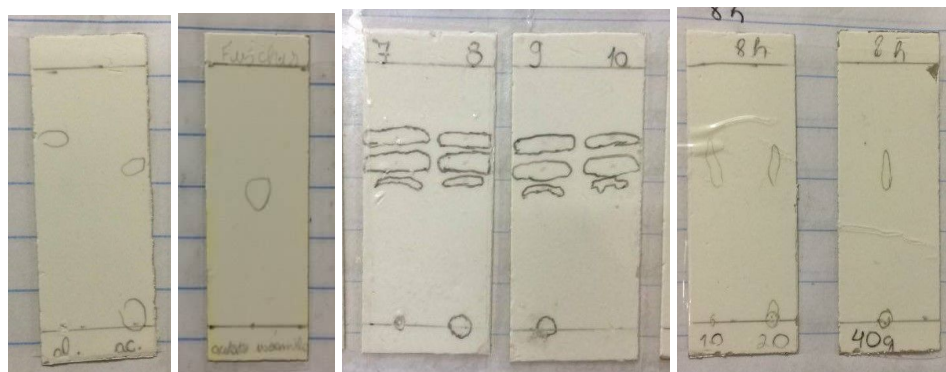
Realizou-se o total de 7 esterificações de acetato de isoamila, das quais, desenvolveu-se apenas uma utilizando dois solventes, hexano e ciclohexano, em razão da insuficiência do hexano, além disso, optou-se pelo ciclohexano devido suas características como a facilidade de recuperar o solvente e por não afetar na reação devido sua ausência de resíduos. Além disso, utilizou-se nessa reação, no tempo de 2 h o agitador orbital e temperatura ambiente de 25 °C .

Para as demais esterificações de acetato de isoamila, optou-se pelo uso de água destilada, pois a enzima utilizada precisa desse reagente em pequenas quantidades. Com isso, utilizou-se 2,5 mL e 1,5 mL, minimizou-se a quantidade com a finalidade de verificar a possível formação de fase e, assim, testar a solubilidade da reação. Em relação ao catalisador, dessemelhou-se da metodologia padrão, usando as quantidades de 0, 10 20, 30 e 40 g de Aveloz, além do mais, para certas reações, optou-se pela ausência do catalisador com a finalidade de comparar a atividade catalítica da planta.

Em vista disso, para essas reações, decidiu-se variar a temperatura, utilizando 25, 35 e 45 °C, sendo desenvolvidas com o agitador orbital com a velocidade padrão de 1,5 e determinou-se o tempo de 8 h para a realização da reação no aparelho, retirando as amostras a cada 2 h com a finalidade de analisar a atividade catalítica em distintos intervalos de tempo.

Em relação a influência das distintas temperaturas, não demonstrou aspectos positivos para a formação do éster, onde, um possível motivo foi a desnaturalização da enzima nessas temperaturas. Além disso, as respectivas temperaturas utilizadas

poderiam ter influenciado em outras composições da planta, dificultando a formação do éster.



**Figura 16.** Placas cromatográficas contendo respectivamente: a) Álcool isoamílico e ácido acético. b) Acetato de isoamila. c) Reações com 7, 9, 10 e 11 g de Aveloz. d) Reações com 10, 20 e 40 g de Aveloz.

**Fonte:** Dados obtidos pelo grupo.

Para a análise dos resultados obtidos realizou-se a cromatografia de camada delgada, nas quais foram calculados os fatores de retenção ( $R_f$ ) baseados em padrões, a partir dos  $R_f$ 's do álcool isoamílico de 0,725; do ácido acético de 0,6; e do éster de 0,525, desenvolvido a partir do método de Fischer.

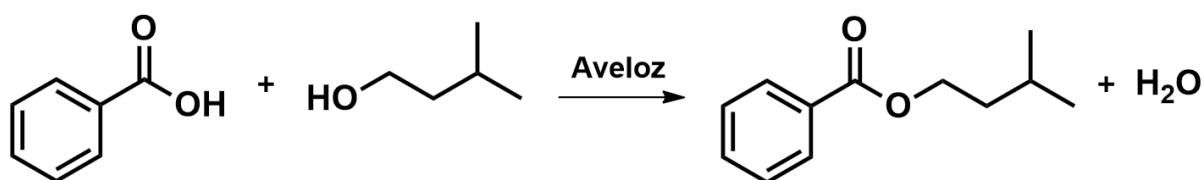
Observou-se uma igualdade em relação ao posicionamento de manchas das amostras sete à dez, da **Figura 16**, de modo que: a superior, a partir dos cálculos, foi determinada como o álcool, com o ( $R_f$ ) de 0,73; a inferior, o éster com o ( $R_f$ ) de 0,55; e o ácido entre ambas, com o respectivo fator de retenção 0,63. Ou seja, comparando aos padrões, nota-se a presença do éster em ambas as placas cromatográficas.

No que se refere a **Figura 16**, onde diferencia-se das amostras anteriores, pois, essa reação apresentou o tempo de 8 h. Obteve-se o aparecimento de apenas uma mancha em cada placa cromatográfica, essas possuem seus fatores de retenção parecidos, no qual, resultou em 0,6. Com isso, analisando os padrões obtidos, observou-se que as manchas são ácido acético, logo, nessa esterificação, não ocorreu o aparecimento do respectivo éster.

Em relação a técnica CCD, essa divide-se em uma parte estacionária e uma parte móvel, referente respectivamente a placa cromatográfica e aos solventes, do quais foram utilizados o hexano/acetato de isoamila 5:5. A placa deriva-se de uma parte polar e os solventes estão divididos em parte apolar, pertencente ao

hidrocarboneto hexano e a parte polar ao acetato de isoamila. No que diz respeito na **Figura 16**, onde obteve-se a presença do éster, nota-se a diferença na distribuição das manchas devido a afinidade de cada substância, onde o álcool correu mais devido a interação com o solvente, onde ambos possuem as características apolares e o éster foi a substância mais retida, ou seja, mancha que menos correu, pois interagiu mais com a placa por ser mais polar.

### 7.2.5 Benzoato de isoamila



**Figura 17.** Esquema geral de uma reação de esterificação enzimática do benzoato de isoamila.

**Fonte:** Elaborada pelo grupo.

A realização da esterificação do benzoato de isoamila se deu em 3 ensaios, em temperatura ambiente e com 2 h de reação no agitador orbital. Para tais, foram utilizados 2,5 g de ácido benzóico, 0,9 g de álcool isoamílico e variações da planta em 10, 20 e 30 g. Foi utilizado como solvente para a reação o hexano, com quantidade de 25 mL.

Porém, por conta do ácido benzóico não ser solúvel em hexano, a reação não aconteceu e o ácido ficou depositado nas paredes do erlenmeyer, devido a dificuldade desse sistema o mesmo foi abandonado e não houve a necessidade de realizar a cromatografia de camada delgada (CCD).

## 8 TRATAMENTO DE RESÍDUOS

Em um primeiro momento as amostras contendo os mesmos solventes foram submetidas à destilação a vácuo com evaporador rotativo, posteriormente o solvente recuperado foi novamente armazenado. O processo foi feito com todos os solventes. Os resíduos aquosos foram descartados nos recipientes apropriados no próprio laboratório.

Os resíduos da planta utilizados nas sínteses foram descartados nos resíduos orgânicos.

O tratamento do resíduo gerado a partir da utilização do iodo será feito por sublimação, onde ele irá ser recristalizado e armazenado em um frasco apropriado.

## **9 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Com a execução do trabalho foi possível atingir o principal objetivo do projeto, assim como responder a questão problema. Algumas das hipóteses foram corroboradas ou refutadas, até mesmo por insuficiência de tempo. Não foi possível realizar a síntese do biodiesel com maior aprofundamento devido a este mesmo motivo.

Deste modo, a primeira hipótese, na qual consta que o látex contido em partes da planta é eficiente nas reações propostas, pode ser corroborada, pois foi possível a identificação do ésteres, mesmo que em pequenas quantidades, em placas feitas com amostras que possuíam variadas quantidades de planta, enquanto as placas feitas com amostras sem o catalisador não se pode observar os ésteres.

Relacionado a segunda hipótese, que alegava que pequenas quantidades do látex presente na planta eram necessárias para a formação do éster pode ser corroborada, pois, apesar das variações catalíticas, desenvolveram-se reações com quantidades inferiores a de 10 g, onde apresentaram a formação dos respectivos ésteres.

No que se refere a terceira hipótese, pronunciou-se que os ésteres com a catálise enzimática serão formados de maneira mais rápida em relação aos catalisadores em meio ácido. Essa hipótese pode ser refutada, pois as reações através do método de Fischer foram realizadas em cerca de duas horas, resultando em rendimentos maiores do que na catálise enzimática. Esse fato está diretamente relacionado às reações envolvendo a catálise enzimática, visto que, a enzima imobilizada contida no látex possui sua atividade catalítica reduzida durante as reações. Dessa forma, as catálises enzimáticas precisam de um período de reação superior à oito horas para obter maiores rendimentos, chegando até mesmo a 72 h ou mais.

Não foi possível refutar ou corroborar a quarta hipótese devido a carência de tempo, a qual não permitiu a realização de tal transesterificação assim como a análise do rendimento e pureza do biodiesel.

A partir dos resultados obtidos pode-se afirmar que a enzima contida no látex da Aveloz é capaz de catalisar reações de esterificação, porém vê-se que a síntese demanda maior tempo de reação.

Durante a realização da pesquisa, com mais de 192 h de laboratório, foram adquiridos diversos conhecimentos como: o entendimento de polaridade de compostos orgânicos; propriedades físico-químicas; reações ácido-base; técnica de cromatografia de camada delgada, através de 73 placas cromatográficas realizadas; e autonomia de laboratório.

Ademais, obtivemos resultados promissores que abrem um novo caminho para a exploração de enzimas em síntese orgânica, mas com necessidade de reações com maior tempo que podem ser feitas em futuras pesquisas.

## REFERÊNCIAS

AGOSTINI, Deuber Lincon da Silva. **Caracterização dos constituintes do látex e da borracha natural que estimulam a angiogênese**. 2009. 87 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências de Bauru, 2009. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/94503>. Acesso em: 10/11/16

BATISTA, E. K. F.; COSTA, K. K. S.; SÁ, E.; VIANA, G.; SOUSA, J. M.; BATISTA, M. C. S. **Avaliação do efeito de formulações com o látex da Euphorbia tirucalli na terapêutica tópica de feridas cutâneas: aspectos clínicos e histopatológicos**. 2004. Disponível em: <http://www.ead.codai.ufrpe.br/index.php/medicinaveterinaria/article/view/575/454>. Acesso em 10/11/16

BRAIBANTE, Hugo Tubal Schmitz. **Química Orgânica: Um curso experimental**. Campinas: Editora Átomo, 2015. 223 p.

COSTA, Luciana Sobrinha. **ESTUDO DO USO DO AVELOZ (Euphorbia tirucalli) NO TRATAMENTO DE DOENÇAS HUMANAS: UMA REVISÃO**. 2011. Disponível em: <http://dspace.bc.uepb.edu.br/jspui/bitstream/123456789/194/1/PDF%20-%20Luciana%20Sobrinha%20Costa.pdf>. Acesso em: 10/11/2016.

COSTA, Thiago Santangelo. et al. **CONFIRMANDO A ESTERIFICAÇÃO DE FISCHER POR MEIO DE AROMAS**. 2004. Disponível em: <http://qnesc.sbq.org.br/online/qnesc19/a11.pdf>. Acesso em: 02/11/2016.

DEGANI, Ana Luiza G.; CASS, Quezia B.; VIEIRA, Paulo C. Cromatografia um breve ensaio. Química nova na escola, v. 7, p. 21-25, 1998.

DELGADO, Clarissa Hamaio Okino. **OBTENÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE LIPASES VEGETAIS**. 2014. Disponível em: <http://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/108799/000770999.pdf?sequence=1>. Acesso em: 09/11/2016.

**ENZIMAS**. sd. Disponível em: [http://www2.dracena.unesp.br/graduacao/arquivos/bioquimica\\_animal/enzimas.pdf](http://www2.dracena.unesp.br/graduacao/arquivos/bioquimica_animal/enzimas.pdf); Acesso em: 24/11/2016.

GRIS, Daiane. **PREPARAÇÃO DE ÉSTERES DE AROMA CATALISADA POR LIPASES IMOBILIZADAS EM FILMES DE AMIDO/PVA.** 2010. Disponível em: <[https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/96662/Daiane\\_Gris.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/96662/Daiane_Gris.pdf?sequence=1&isAllowed=y)> . Acesso em: 15/10/2016.

JESUS, Paulo Cesar de. et al. **Organo-gel: um novo sistema para a imobilização de lipases e sua aplicação em síntese orgânica.** 1997 Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-40421997000600016](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40421997000600016)> Acesso em: 28/05/2017

LEDRA, Carlos Geovanni Alves. **PREPARAÇÃO DE ÉSTERES DE AROMA CATALISADA POR LIPASES IMOBILIZADAS EM FILME DE AMIDO DE BATATA.** 2009. Relatório - Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. Disponível em: <<https://repositorio.ufsc.br/xmlui/bitstream/handle/123456789/99779/Carlos.pdf?sequence=1&isAllowed=y>> . Acesso em: 10/10/2016.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas.** 2. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008.

LUIELE, Maurílio Luciano. **Relação Estrutura-Função das Enzimas.** sd. Disponível em: <<http://www2.bioqmed.ufjf.br/enzimas/funcao.htm>> Acesso em: 24/11/2016.

MARQUES, Jaqueline Aparecida; BORGES, Christiane Philippini Ferreira. **Práticas de Química Orgânica.** 2. ed. Campinas: Editora Átomo, 2012.

MEDEIROS, Camila Rigoni. **OTIMIZAÇÃO DA SÍNTESE DE ÉSTERES USADOS NA INDÚSTRIA DE SABORES E AROMAS.** 2008. Disponível em: <[https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/105208/Camilla\\_Rigoni\\_Medeiros.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/105208/Camilla_Rigoni_Medeiros.pdf?sequence=1&isAllowed=y)> . Acesso em: 15/11/2016.

MESSIAS, Josana Maria. et al. **LIPASES MICROBIANAS: PRODUÇÃO, PROPRIEDADES E APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS.** 2011. Disponível em: <<http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/semexatas/article/viewFile/8297/8759>> . Acesso em: 10/11/2016.

NEODINI, Daniella Nunes Rollo; GASPI, Fernanda Oliveira de Gaspari. **ANÁLISE DOS EFEITOS TÓXICOS DA AVELÓZ (*Euphorbia tirucalli* L.).** 2015. Disponível em: <[http://www.uniararas.br/revistacientifica/\\_documentos/art.051-2015.pdf](http://www.uniararas.br/revistacientifica/_documentos/art.051-2015.pdf)>. Acesso em: 09 nov. 2016.

NETO, Pedro Ramos da Costa. **OBTENÇÃO DE ÉSTERES ALQUÍLICOS (Biodiesel) POR VIA ENZIMÁTICA A PARTIR DO ÓLEO DE SOJA.** 2002. Disponível em: <<https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/83189/191338.pdf?sequence=1>>. Acesso em: 10/10/2016.

OLIVEIRA, Ângela Pfeifer de; NEPOMUCENO, Júlio César. **AVALIAÇÃO DOS EFEITOS GENOTÓXICOS E ANTIGENOTÓXICOS DO AVELÓS (*Euphorbia Tirucalli*) EM *Drosophila melanogaster*.** 2003. Disponível em: <<http://www.seer.ufu.br/index.php/biosciencejournal/article/view/6530/4264>> Acesso em: 01/11/2016.

OLIVEIRA, Flavia C.C. et al. **BIODIESEL: POSSIBILIDADES E DESAFIOS.** 2007. Disponível em: <<http://zeus.qui.ufmg.br/~qgeral/downloads/material/biodiesel.pdf>>. Acesso: 19/11/2016.

PAQUES, Fernanda Wiermann. et al. **LIPASES DE LÁTEX VEGETAIS: PROPRIEDADES E APLICAÇÕES INDUSTRIAIS.** 2006. Disponível

em:<[http://quimicanova.sbq.org.br/imagebank/pdf/Vol29No1\\_93\\_17-RV04329.pdf](http://quimicanova.sbq.org.br/imagebank/pdf/Vol29No1_93_17-RV04329.pdf)>. Acesso em: 09 nov. 2016.

PAVIA, Donald L. et al. **Química Orgânica Experimental: Técnicas de escala pequena**. 2. ed. Porto Alegre: Bookman, 2009. 880 p.

SILVA, Julyetty Crystyne da. **REAÇÕES DE ACILAÇÃO ENANTIOSELETIVA DE AMINAS E ÁLCOOL ALIFÁTICOS CATALISADAS POR LIPASES**. 2015. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/xmlui/bitstream/handle/123456789/134965/334385.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 10/10/2016.

SIMÕES, Deise Rosana Silva. et al. **AROMAS EM MAÇÃS, SUCO E SIDRA: REVISÃO**. 2009. <Disponível em: <http://revistas.ufpr.br/alimentos/article/viewFile/15011/10061>>. Acesso em: 10/11/2016.

SPINACÉ, Márcia Aparecida da Silva. et al. **A TECNOLOGIA DA RECICLAGEM DE POLÍMEROS**. 2005. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/qn/v28n1/23041>> . Acesso em: 10/11/2016.

VESCOVI, Vinicius. **EXTRAÇÃO, PURIFICAÇÃO E IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES VEGETAIS DESTINADAS À SÍNTESE DE BIODIESEL E ÉSTERES**. 2012. Disponível em: <https://repositorio.ufscar.br/bitstream/handle/ufscar/4099/4556.pdf?sequence=1&isAllowed=y> Acesso em: 10/10/2016.

VILLANOVA, Janaina C. O. et al. **APLICAÇÕES FARMACÊUTICAS DE POLÍMEROS**. 2009. Disponível em:<<file:///C:/Users/Usu%C3%A1rio/Downloads/farmacia.pdf>>. Acesso em: 10/11/2016.