

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**PRODUÇÃO DE BIODIESEL ATRAVÉS DE
CATÁLISE ENZIMÁTICA EM LÍQUIDO IÔNICO**

Muriell Gamba

Dissertação de Mestrado

Porto Alegre, abril de 2009.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

MURIELL GAMBA

Dissertação apresentada como requisito parcial
para a obtenção do grau de Mestre em Química

Prof. Dr. Günter Ebeling

Orientador

Prof. Dr. Alexandre A. M. Lapis

Co-orientador

Porto Alegre, abril de 2009.

A presente dissertação foi realizada inteiramente pelo autor, no Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul sob Orientação do Professor Doutor Günter Ebeling e Co-orientação do Professor Doutor Alexandre A. M. Lapis. A dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de Mestre em Química pela seguinte banca examinadora:

Comissão Examinadora:

Prof. Dr. César Liberato Petzhold
IQ-UFRGS

Prof. Dr. Paulo Henrique Schneider
IQ-UFRGS

Prof. Dr. Augusto José Donato
PUC-RS

Prof. Dr. Günter Ebeling
Orientador

Prof. Dr. Alexandre A. M. Lapis
Co-orientador

Muriell Gamba

*Ao, Rique, que desde o início dessa caminhada
me apoiou, incentivou e sempre esteve ao
meu lado em todos os momentos, sejam estes
de alegrias ou angústias. Dedico a ti esta conquista,
pois sem o teu amor tudo seria mais difícil.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Cléo e Rose pelo carinho e incentivo para que esse momento fosse concretizado.

À minha irmã Sheron pelas risadas e conversas tranquilizantes.

Ao meu “namorado” Luís Henrique pelo amor, compreensão, apoio e incentivo nos momentos de dificuldade.

Às minhas amigas Luciane F. Oliveira e Camila P. Aguiar pela amizade e desabafos durante toda a minha longa caminhada na pesquisa, desde a época de K-202.

À minha amiga Morgana Scariot pela amizade e parceria em todos os momentos, seja no laboratório ou na sala de aula, durante o mestrado.

Ao Prof. Dr. Günter Ebeling e ao Prof. Dr. Jairton Dupont pela orientação e ensinamentos compartilhados durante a minha caminhada no laboratório K-102.

Ao Prof. Dr. Alexandre A. M. Lapis pela orientação e por estar a disposição, sempre que possível, para terminar com as minhas dúvidas.

Ao Prof. Dr. Valentim E. U. Costa pelos ensinamentos e pelo incentivo pela pesquisa desde os tempos de iniciação científica.

A todos os colegas do Laboratório de Catálise Molecular pela amizade e por todos os “galhos quebrados” no laboratório.

Aos colegas do laboratório K-106 pelas risadas e companhia na hora do almoço.

Ao Instituto de Química da UFRGS.

Ao CNPq pela bolsa de mestrado.

Artigos publicados a partir dos resultados da presente dissertação

“Supported Ionic Liquid Enzymatic Catalysis for Biodiesel Production”, Muriell Gamba, Alexandre A.M. Lapis, Jairton Dupont, *Advanced Synthesis & Catalysis*, v.350, p.160 - 164, **2008**.

Trabalho publicado em congresso

“Supported Ionic Liquid Enzymatic Catalysis for Biodiesel Production”, Muriell Gamba, Alexandre A.M. Lapis, Jairton Dupont, *12thBMOS – 12th Brazilian Meeting of Organic Synthesis*, 2007, Itapema, SC, Brasil.

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE GERAL	VI
LISTA DE ABREVIATURAS	VII
ÍNDICE DE FIGURAS	IX
ÍNDICE DE TABELAS	X
RESUMO	XI
ABSTRACT	XII
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. TRIGLICERÍDEOS.....	3
2.2. BIODIESEL.....	8
2.2.1. <i>Produção de Biodiesel</i>	11
2.2.1.1. Catálise Básica.....	13
2.2.1.2. Catálise Ácida.....	15
2.2.1.3. Catálise Enzimática.....	16
3. PARTE EXPERIMENTAL	28
3.1. GERAL.....	28
3.2. SÍNTESE DO BIODIESEL.....	29
3.2.1. <i>Seleção das enzimas</i>	29
3.2.2. <i>Quantidade de Reagentes</i>	29
3.2.3. <i>Influência da temperatura</i>	29
3.2.4. <i>Influência da quantidade de água nos álcoois</i>	30
3.2.5. <i>Melhor resultado em maior escala</i>	30
3.2.6. <i>Enzima mais eficiente</i>	31
3.3.4. <i>Solubilidade do glicerol</i>	31
3.3.5. <i>Influência dos Líquidos Iônicos</i>	31
3.3.6. <i>Reação de Esterificação</i>	32
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
5. CONCLUSÕES	50
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52

LISTA DE ABREVIATURAS

ABIOVE : Associação Brasileira dos Produtores de Óleos vegetais

AGL : ácidos graxos livres

ANP : Agência Nacional do Petróleo

ASTM : American Standard Testing Methods

B2 : diesel com 2 % em volume de biodiesel

B100 : biodiesel puro

BMI·BF₄ : líquido iônico Tetrafluoroborato de Butilmetilimidazólio

BMI·FAP : líquido iônico Tris(perfluoroetil)trifluorofosfato de Butilmetilimidazólio

BMI·NTf₂ : líquido iônico Bis-trifluorometanosulfonimidato de Butilmetilimidazólio

BMI·OTf : líquido iônico Trifluorometanosulfonato de Butilmetilimidazólio

BMI·PF₆ : líquido iônico Hexafluorofosfato de Butilmetilimidazólio

CCD : Cromatografia em Camada Delgada

CPAs : compostos poliaromáticos

DG : diglicerídeos

EA : ésteres alquílicos

EtoMMI·BF₄ : líquido iônico Tetrafluoroborato de 1,3-di-(2-metoxi)etilimidazólio

EtoMMI·FAP : líquido iônico Tris(perfluoroetil)trifluorofosfato de 1,3-di-(2-metoxi)etilimidazólio

EtoMMI·NTf₂ : líquido iônico Bis-trifluorometanosulfonimidato de 1,3-di-(2-metoxi)etilimidazólio

FLUOR : lipase *Pseudomonas fluorescens*

GL : glicerol

HC : hidrocarbonetos

HPLC : High Performance Liquid Chromatography (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)

IUBMB : União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular

LipIM : Lipozyme IM, lipase *Rhizomucor miehei*

MEtMI·BF₄ : líquido iônico Tetrafluoroborato de 1-(2-metoxi)etil-3-metilimidazólio

MEtMI·FAP : líquido iônico Tris(perfluoroetil)trifluorofosfato de 1-(2-metoxi)etil-3-metilimidazólio

MEtMI·NTf₂ : líquido iônico Bis-trifluorometanosulfonimidato de 1-(2-metoxi)etil-3-metilimidazólio

MG : monoglicerídeos

MP : materiais particulados

NOVOZ : Novozyme, lipase *Candida antarctica*

NO_x : óxidos de nitrogênio

PSC-I : lipase *Pseudomonas cepacia* suportada em cerâmica

PSC-II : lipase *Pseudomonas cepacia* suportada em cerâmica modificada

PSD-I : lipase *Pseudomonas cepacia* suportada em terra diatomácea

SO_x : óxidos de enxofre

TAG : triacilglicerol

TG : triglicerídeos

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Reação de transesterificação de óleos vegetais.....	1
Figura 2. Líquidos iônicos do imidazólio.....	2
Figura 3. Fórmulas estruturais - a) Ácido Oléico b) Ácido Linoléico.....	4
Figura 4. Fórmula estrutural - Ácido Esteárico.....	4
Figura 5. Exemplos de triglicerídeo, diglicerídeo, monoglicerídeo e ácidos graxos livres.....	5
Figura 6. Ilustrações do Ciclo Aberto e Fechado do carbono.....	11
Figura 7. Etapas da reação de transesterificação.....	13
Figura 8. (a) Transesterificação de óleos vegetais com ácidos graxos livres catalisada por base para produzir sabão e água, ambos subprodutos indesejáveis. (b) Água promove a formação de ácidos graxos livres. Este, então, pode desativar o catalisador e produzir sabão, como em (a)....	14
Figura 9. Ligações peptídicas.....	17
Figura 10. Placa cromatográfica.....	33
Figura 11. Cromatograma explicativo com as regiões dos compostos identificados.....	35
Figura 12. Cromatograma – Reação EtOH 85%.....	38
Figura 13. Cromatograma – Reação MeOH 90%.....	40
Figura 14. Imagem ilustrativa da conformação das enzimas.....	42
Figura 15. Cromatograma – Reação PSC-I com EtOH 85%.....	43
Figura 16. Reações de hidrólise, transesterificação e esterificação catalisadas por enzimas suspensas em líquidos iônicos.....	45
Figura 17. Transesterificação de óleos vegetais catalisados por enzimas suportadas em líquidos iônicos com captura simultânea do subproduto glicerol.....	46

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Nomenclatura de Ácidos Graxos.....	6
Tabela 2. Composição média do óleo de soja comercial (Tabela extraída da literatura ¹⁹).....	7
Tabela 3. Sistema de classificação funcional das enzimas.....	19
Tabela 4. Valores de Rfs - Biodiesel e óleo de soja.....	33
Tabela 5. Produtos e conversões (por HPLC) obtidos da reação de transesterificação do óleo de soja por <i>Pseudomonas cepacia</i> com álcool etílico em BMI·NTf ₂ à temperatura de 30 °C.	36
Tabela 6. Produtos e conversões (por HPLC) obtidos da reação de transesterificação do óleo de soja por <i>Pseudomonas cepacia</i> com álcool metílico em BMI·NTf ₂ à temperatura de 30 °C.	38
Tabela 7. Produtos e conversões (por HPLC) obtidos da reação de transesterificação do óleo de soja por lipases com álcool etílico e metílico em BMI·NTf ₂ à temperatura de 30 °C.	41
Tabela 8. Produtos e conversões (por HPLC) obtidos da reação de transesterificação do óleo de soja pela <i>Pseudomonas cepacia</i> PSC-I com álcool etílico 85% em Líquidos Iônicos à temperatura de 30 °C.....	48

RESUMO

A lipase *Pseudomonas cepacia* suspensa no líquido iônico bis-trifluorometanosulfonimidato de butilmetilimidazólio é um método “verde” alternativo para a produção de biodiesel da alcoólise do óleo de soja. A reação de transesterificação catalisada pela enzima suspensa em líquido iônico pode ser realizada à temperatura de 30° C, na presença de água e sem o uso de solventes orgânicos.

As melhores condições reacionais para produção de biodiesel foram obtidas pelo uso da lipase *Pseudomonas cepacia* PSC-I (0.6 g) suspensa em BMI.NTf₂ (8.2 mmol), etanol/água (85:15) (41.2 mmol), óleo de soja (3.4 mmol) e temperatura de 30° C. O tempo de reação (8 h) para converter completamente o material de partida (óleo) foi determinado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) com triplicata dos experimentos em que a conversão da reação foi determinada em 90 %. Interessante é que a presença de água melhora a taxa de hidrólise do óleo rendendo ácidos graxos que são convertidos nos respectivos ésteres mais rapidamente do que o caminho de transesterificação. Estas atividades catalíticas são superiores àquelas relatadas anteriormente para processos enzimáticos em água ou outros suportes. Este resultado é relacionado provavelmente à extração do glicerol - formado durante a transesterificação - pela mistura de líquido iônico /álcool que assim desloca o equilíbrio para o produto biodiesel.

O biodiesel é separado por simples decantação e o sistema catalítico líquido iônico/enzima recuperado pode ser reutilizado por pelo menos 4 vezes sem perder atividade catalítica e seletividade. O líquido iônico fornece o meio ideal para a estabilização da enzima e também para a remoção do glicerol, aumentando assim o rendimento de biodiesel.

ABSTRACT

Pseudomonas cepacia lipase suspended in the 1-n-butyl-3-methylimidazolium bis(trifluoromethylsulfonyl)imide ionic liquid is an alternative “green” method for the production of biodiesel from the alcoholysis of soybean oil. The transesterification reaction catalyzed by enzyme suspended in ionic liquid can be performed at room temperature, in the presence of water and without the use of organic solvents.

The best reaction conditions to biodiesel production were obtained by the use of *Pseudomonas cepacia* lipase (0.6 g) suspended in BMI.NTf₂ (8.2 mmol), ethanol/water (85:15) (41.2 mmol) and soybean oil (3.4 mmol) at temperature of 30° C. The reaction time (8 h) for the complete conversion of the starting oil material was determined by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) with triplicate experiments in which the reaction conversion was determined as 90%. Interestingly, the presence of water improves the oil hydrolysis rate yielding the fatty acid that is converted into the respective ester faster than the transesterification pathway. The catalytic activities are superior to those reported in literatures for enzymatic processes in water or other supports. This result is probably related to the extraction of the glycerol - formed during the transesterification - by the ionic liquid thus shifting the equilibrium to the biodiesel product.

The biodiesel is separated by simple decantation and the recovered ionic liquid/enzyme catalytic system can be re-used at least four times without loss of catalytic activity and selectivity. The ionic liquid provides the ideal medium for the stabilization of the enzyme and also for the removal of glycerol by-product, thus increasing the biodiesel yield.

1. INTRODUÇÃO

As fontes renováveis de energia estão no centro de interesse político devido a fatores econômicos e ambientais.¹ A crescente preocupação com problemas ambientais causados pelos combustíveis fósseis, somadas às previsões de que tais recursos devam chegar ao fim, vêm estimulando a busca por novas maneiras sustentáveis de geração de energia.²

O biodiesel que tem atraído considerável atenção como combustível renovável e biodegradável, torna-se uma alternativa muito atrativa para motores a diesel devido ao fato de suas propriedades serem similares às do combustível derivado do petróleo.³

Muitos processos têm sido desenvolvidos para a produção de biodiesel, mas o método mais utilizado é através da reação de transesterificação (Figura 1) entre óleos vegetais e álcoois (metanol e etanol) em presença de catalisadores ácidos ou básicos.



Figura 1. Reação de transesterificação de óleos vegetais.

Na catálise ácida há a necessidade do emprego de grande quantidade de álcool para a obtenção do biodiesel em rendimentos satisfatórios. A catálise básica, por sua vez, não necessita tanto excesso de álcool, mas reações de saponificação são observadas, o que causa dificuldade de purificação dos ésteres formados.

Em ambos os casos podemos observar que há corrosão dos sistemas reacionais provocados pelo meio altamente básico ou ácido e que uma grande quantidade de água é necessária para a purificação dos ésteres. Gera-se, assim, grandes quantidades de rejeitos aquosos com pH inadequados para descarte e o tratamento destes passa por um processo de neutralização

que gera um volume ainda maior de resíduos aquosos. Além disso, ambas reações necessitam ser conduzidas a temperaturas elevadas com gasto de energia.

Enfim, apesar de serem os métodos mais utilizados para a obtenção de biodiesel estas metodologias apresentam várias desvantagens e problemas ao meio ambiente que justificam a busca por novos sistemas catalíticos que sejam mais eficientes e gerem menor quantidade de resíduos. Neste contexto, há enormes esforços científicos e tecnológicos para minimizar estes problemas através do desenvolvimento de catalisadores heterogêneos^{4,5}, bases orgânicas⁶, metanólise sob condições supercríticas⁷ e enzimas^{8,9}.

Apesar da introdução de diversas melhorias na reação de transesterificação como, por exemplo, o advento de novos catalisadores sólidos⁴, problemas principais como o uso de solventes, separação do glicerol (principal subproduto), rendimento e regeneração do catalisador ainda não foram resolvidos.

A transesterificação enzimática é uma alternativa aos métodos anteriormente expostos, visto que enzimas são catalisadores naturais encontrados em seres vivos e biodegradáveis. As enzimas utilizadas são chamadas lipases. Os ganhos ambientais desse processo são evidentes, por exemplo, menor gasto energético (baixas temperaturas), o glicerol é facilmente removido e a purificação de ésteres alquílicos é simples. Entretanto o custo elevado da produção das lipases é uma grande dificuldade na comercialização deste sistema.

A catálise enzimática tem muitas vantagens frente às tecnologias químicas e quando suspensa em líquidos iônicos torna-se um método “verde” alternativo para a produção de biodiesel. Existem relatos de enzimas suspensas em líquidos iônicos e a associação das enzimas com líquidos iônicos do imidazólio (Figura 2) geralmente dá origem a catalisadores mais estáveis e mais ativos.¹⁰⁻¹² A combinação de enzima/líquido iônico geralmente exhibe um efeito sinérgico excelente que realça a atividade e a durabilidade do sistema catalítico.

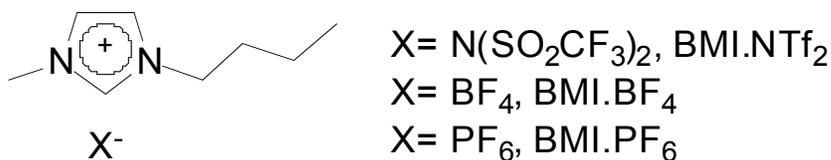


Figura 2. Líquidos iônicos do imidazólio.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. TRIGLICERÍDEOS

Os lipídeos são compostos que ocorrem com bastante frequência na natureza e podem ser encontrados em diversos locais como na gema do ovo e no sistema nervoso humano. São também importantes componentes de plantas, animais e micróbios. A definição de um lipídeo é baseada num conjunto de substâncias químicas que, ao contrário das outras classes de compostos orgânicos, não são caracterizadas por algum grupo funcional comum, e sim pela sua alta solubilidade em solventes orgânicos e baixa solubilidade em água. Em termos químicos, os lipídeos são uma mistura de compostos que partilham algumas propriedades baseadas em similaridades estruturais, principalmente grupos apolares.^{13,14}

Óleos e gorduras são lipídeos, ambos, triacilgliceróis (TAG), também chamados de triglicerídeos.

Os triglicerídeos são definidos como produtos da esterificação de uma molécula de glicerol com três moléculas de ácidos graxos. É importante salientar que os triglicerídeos podem ser formados por ácidos graxos iguais ou diferentes entre si. Os ácidos graxos são ácidos carboxílicos de cadeia longa livres ou esterificados, que constituem os óleos e gorduras. Os ácidos graxos também podem ser classificados como saturados ou insaturados, dependendo da ausência ou presença de ligações duplas carbono-carbono. Quando saturados possuem apenas ligações simples entre os carbonos e possuem pouca reatividade química. Já os ácidos graxos insaturados, contêm uma ou mais ligações duplas na sua cadeia carbônica sendo mais reativos e mais suscetíveis a termo-oxidação. Os ácidos graxos insaturados são, na maioria, líquidos à temperatura ambiente, pois a presença de insaturação nas cadeias de ácido carboxílico dificulta a interação intermolecular, enquanto que os ácidos graxos saturados que têm uma maior facilidade de empacotamento intermolecular, são sólidos.¹⁵

Mais de 80% do óleo de oliva, por exemplo, é constituído por moléculas de ácido oléico. Este ácido graxo, assim como o ácido linoléico, são ácidos insaturados, isto é, possuem duplas ligações na cadeia carbônica, como ilustrado na Figura 3 abaixo:

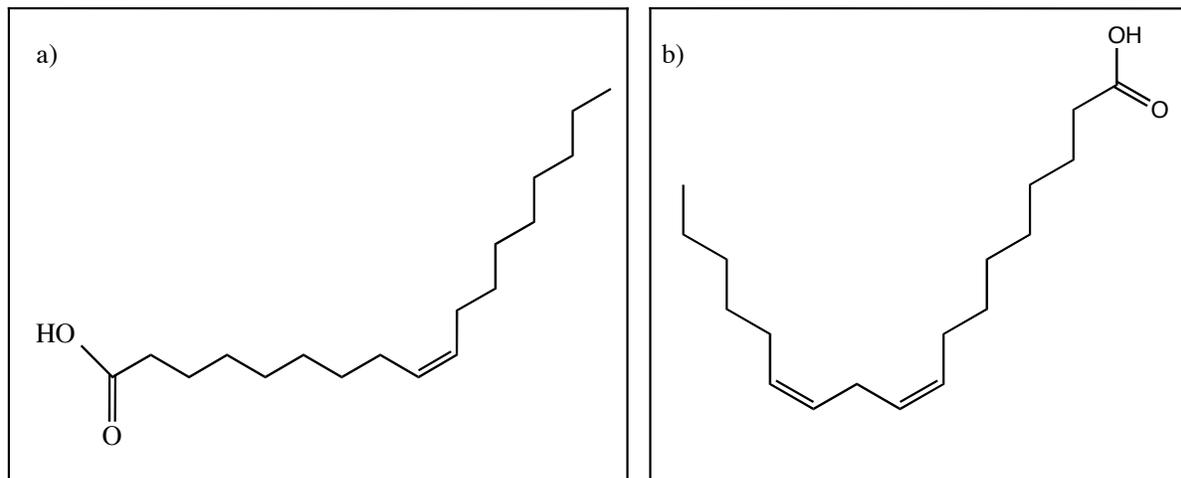


Figura 3. Fórmulas estruturais - a) Ácido Oléico b) Ácido Linoléico.

Existem ácidos graxos saturados, isto é, sem duplas ligações na cadeia carbônica, como é o caso do ácido esteárico(Figura 4).

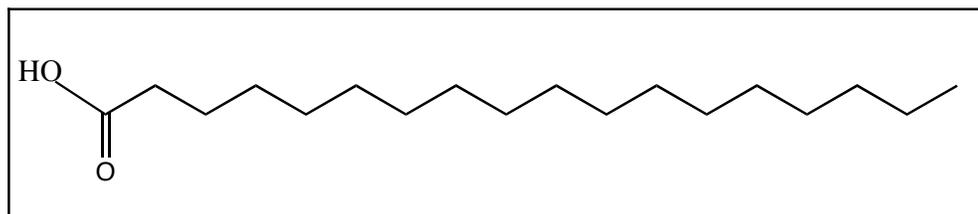


Figura 4. Fórmula estrutural - Ácido Esteárico.

Os óleos vegetais são produtos naturais constituídos principalmente por triglicerídeos (>95%) e, em menor proporção, mono e diglicerídeos.^{13,16} Eles também podem conter ácidos graxos livres.

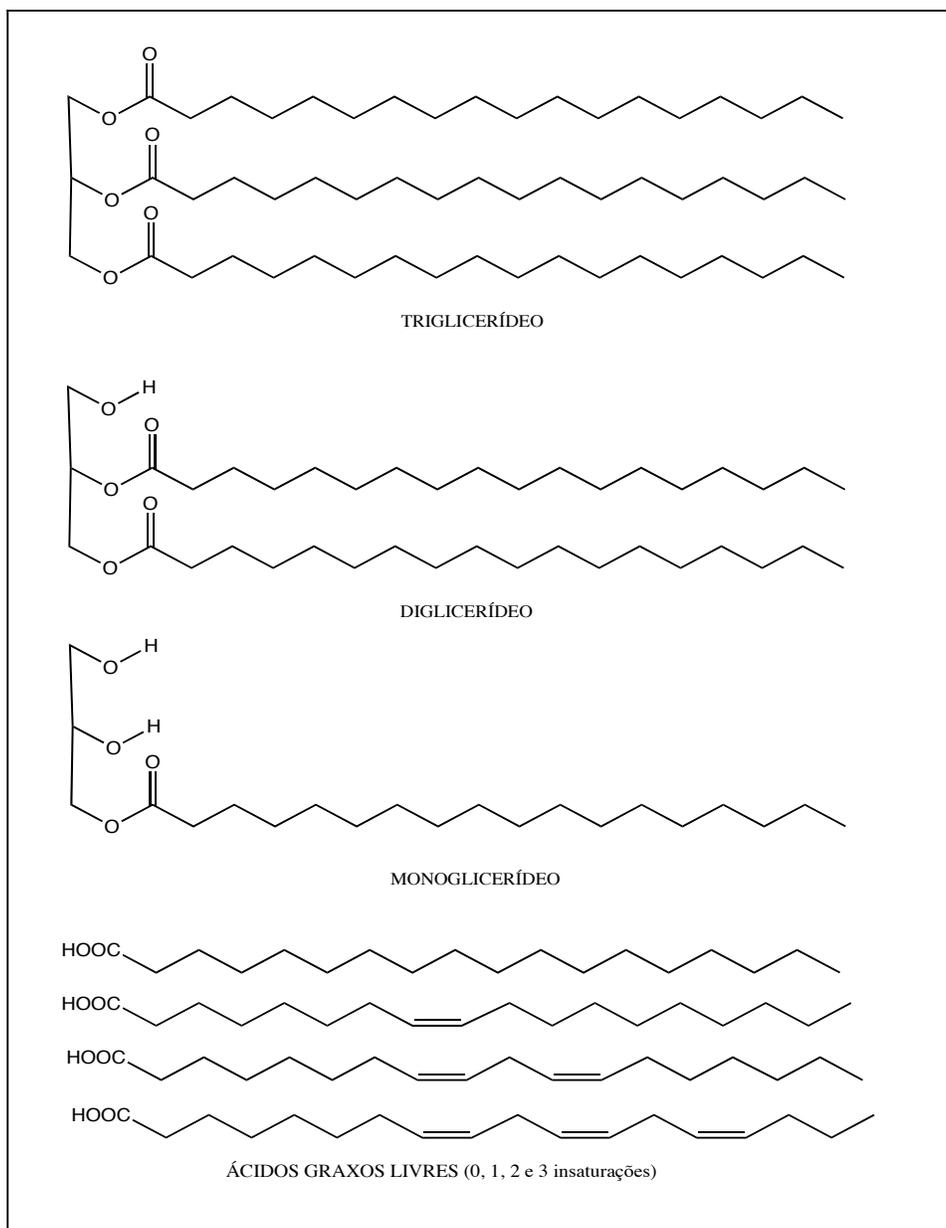


Figura 5. Exemplos de triglicerídeo, diglicerídeo, monoglicerídeo e ácidos graxos livres.

Os ácidos graxos contêm cadeias de 4 a 36 átomos de carbono com diferentes graus de insaturação, geralmente possuem de uma a quatro insaturações na cadeia carbônica.¹⁶ A Tabela 1 abaixo mostra a nomenclatura de alguns ácidos graxos naturais.

Tabela 1. Nomenclatura de Ácidos Graxos.

Nomenclatura dos Ácidos Graxos	Nº de Carbonos/ Insaturações
Láurico (Dodecanóico)	12:0
Mirístico (Tetradecanóico)	14:0
Palmítico (Hexadecanóico)	16:0
Palmitolêico (9(Z)-Hexadecenóico)	16:1
Estearíco (Octadecanóico)	18:0
Olêico (9(Z)-Octadecenóico), (ω -9)	18:1
Linolêico (9(Z),12(Z)-Octadecadienóico, (ω -6)	18:2
Linolênico (9(Z),12(Z),15(Z)-Octadecatrienóico, (ω -3)	18:3
Araquídico (Eicosanóico)	20:0
Araquidônico (5(Z),8(Z), 11(Z),14(Z)-Eicosatetraenóico)	20:4
Lignocérico (tetracosanóico)	24:0

O uso dos óleos vegetais como combustíveis alternativos esteve presente por 100 anos quando o inventor do motor a diesel Rudolph Diesel testou primeiramente o óleo de amendoim em seu motor de ignição por compressão.³ Entre os anos de 1930 e 1940 os óleos vegetais foram usados como combustíveis em motores do ciclo diesel, mas somente nas situações de emergência.¹⁷

Constatou-se que a aplicação direta dos óleos vegetais nos motores é limitada, devido a algumas de suas propriedades. As propriedades que podem provocar sérios problemas ao bom funcionamento do motor são principalmente a alta viscosidade, a baixa volatilidade, o caráter poliinsaturado e a acidez. Dentre os problemas que geralmente aparecem após longos períodos de utilização, destacam-se a formação de depósitos de carbono por combustão incompleta, a diminuição da eficiência de lubrificação do óleo pela ocorrência de polimerização e a atomização ineficiente e/ ou entupimento dos sistemas de injeção. Estes problemas ocorrem devido ao tamanho da molécula de triglicerídeo e a sua elevada massa molecular.³ Então, em meados da década de 70, surgiram as primeiras propostas de modificação de óleos vegetais através da reação de transesterificação, cujos objetivos eram de melhorar a sua qualidade de ignição, reduzir o seu ponto de fluidez e ajustar seus índices de viscosidade e densidade específica.¹⁷

Os óleos vegetais mais comuns, cuja matéria prima é abundante no Brasil, são soja, milho, amendoim, algodão, babaçu e palma.¹⁸

O óleo de soja tem composição média centrada em cinco ácidos graxos principais: palmítico (16:0), estearíco (18:0), olêico (18:1), linolêico (18:2) e linolênico (18:3). Cerca de

99% dos triglicerídeos presentes no óleo de soja são compostos por estes ácidos¹⁷. Esta característica, é relativamente constante para a maioria dos óleos comerciais disponíveis no mercado, mostrada na Tabela 2.

Tabela 2. Composição média do óleo de soja comercial (Tabela extraída da literatura¹⁹).

Nº de Carbonos/ Insaturações	Ácido Graxo	Concentração (%)
C12:0	Láurico	0,1 (máx)
C14:0	Mirístico	0,2 (máx)
C16:0	Palmítico	9,9 - 12,2
C16:1	Palmitolêico	traços - 0,2
C18:0	Estearico	3 - 5,4
C18:1	Olêico	17,7 - 26
C18:2	Linolêico	49,7 - 56,9
C18:3	Linolênico	5,5 - 9,5
C20:0	Araquídico	0,2 - 0,5
C20:1	Gadolêico	0,1 - 0,3
C22:0	Behênico	0,3 - 0,7
C22:1	Erúxico	0,3 (máx)
C24:0	Lignocérico	0,4 (máx)

O óleo de soja surgiu como um subproduto do processamento do farelo e, atualmente, tornou-se um dos líderes mundiais no mercado de óleos vegetais, apesar da competição com outras oleaginosas.¹⁹ Devido a grandeza do agronegócio da soja no mercado brasileiro, é relativamente fácil reconhecer que essa oleaginosa apresenta o maior potencial para servir de modelo ao desenvolvimento de um programa nacional de biodiesel. A produção brasileira de óleo de soja referente ao ano safra 2007/08 (fevereiro a janeiro) foi 6.047 milhões de toneladas, conforme os dados²⁰ divulgados pela ABIOVE (Associação Brasileira dos Produtores de Óleos vegetais).

2.2. BIODIESEL

Combustíveis derivados do petróleo são de vital importância no setor econômico de um país em desenvolvimento, mas sabemos que o consumo de combustíveis fósseis apresenta um impacto significativo na qualidade do meio ambiente. A poluição do ar, as mudanças climáticas, os derramamentos de óleo e a geração de resíduos tóxicos são resultados do vasto uso e da produção desses combustíveis.³

Então, devido a iminência do esgotamento das reservas mundiais de petróleo, o constante aumento na demanda por fontes de energia e a ampliação da consciência ecológica, têm-se incentivado pesquisas no sentido de desenvolver novas fontes de energias renováveis para diversas áreas industriais, visando reduzir ou substituir os combustíveis de origem petrolífera.

Assim, surge o biodiesel como uma alternativa para a substituição de combustíveis à base de petróleo, contribuindo para minimizar a dependência externa de importação de diesel consumido no país, como também para a redução da poluição ambiental, através da diminuição das emissões de gases poluentes. O biodiesel apresenta propriedades similares ou melhores às do combustível derivado do petróleo, como densidade, viscosidade, número de cetano, ponto de fulgor, entre outras.²¹ Portanto a grande compatibilidade do biodiesel com o diesel mineral, o caracteriza como o possível substituto deste combustível sem qualquer necessidade de investimentos tecnológicos no desenvolvimento dos motores.²²

A utilização de biodiesel como combustível vem apresentando um potencial promissor no mundo inteiro e o Brasil, devido a sua imensa extensão territorial, associada a condições climáticas favoráveis, é considerado um país ideal para a exploração da biomassa para fins energéticos.

O biodiesel é composto de alquilésteres de ácidos graxos de cadeia longa, derivado de óleos vegetais ou de gorduras animais, conforme a especificação contida na Resolução ANP nº 7 (Agência Nacional do Petróleo, 2008) e ASTM D6751-08 (American Standard Testing Methods, 2008).^{23,24} Por ser biodegradável, não-tóxico e essencialmente livre de enxofre e aromáticos²⁵, é considerado um combustível ecológico.

Sendo o biodiesel um combustível líquido derivado de biomassa renovável, que substitui total ou parcialmente o óleo diesel de petróleo em motores de ignição por compressão, cujas

matérias-primas são abundantes no Brasil, certamente promoverá a geração de novos empregos pois a obtenção deste produto em escala agroindustrial irá ocasionar uma maior distribuição de renda, inclusão social e apoio à agricultura familiar.

Como combustível, o biodiesel tem as seguintes características^{3,22,25}:

- alto número de cetano;
- teor médio de oxigênio em torno de 11%;
- maior ponto de fulgor;
- maior viscosidade;
- menor emissão de partículas, HC, CPAs e CO;
- essencialmente livre de enxofre e aromáticos;
- caráter não tóxico e biodegradável;
- proveniente de fontes renováveis;
- pode ser usado diretamente nos motores diesel;
- tem fácil transporte e fácil armazenamento, devido ao seu menor risco de explosão,
- preço de mercado relativamente superior ao diesel comercial.

Conforme as literaturas²⁵⁻²⁸, as emissões de gases poluentes, tais como monóxido de carbono (CO), hidrocarbonetos (HC), compostos poliaromáticos (CPAs) de alto potencial carcinogênico, materiais particulados (MP), óxidos de enxofre (SOx), são inferiores para o biodiesel em comparação ao diesel convencional, demonstrando que o uso deste em substituição ao combustível fóssil traz grandes benefícios para o meio ambiente.

No entanto, há diversos resultados publicados sobre o ligeiro aumento nas emissões de gases nitrogenados para o biodiesel. É completamente óbvio, que com o biodiesel, devido à combustão melhorada, a temperatura esperada na câmara de combustão possa ser mais elevada e uma quantidade maior de oxigênio está igualmente presente, conduzindo então, à formação de uma quantidade mais elevada de NOx nos motores abastecidos com biodiesel.²⁵ As emissões de NOx causam problemas graves para a saúde pública e o meio ambiente. O NOx é o principal contribuinte ao ozônio troposférico. Enquanto o ozônio atmosférico é benéfico ao reduzir a radiação solar prejudicial, ironicamente, o ozônio troposférico pode causar irritação respiratória, redução da função pulmonar, ataques de asma, e dano permanente ao pulmão. Sendo assim, para resolver o aumento na emissão de NOx do biodiesel, há dois métodos eficazes para reduzir a

temperatura na câmara de combustão. O primeiro, é usando a injeção de água ou uma emulsão de biodiesel e água e o segundo método, é através de ajustes na regulação do ponto de injeção no motor.²⁹

Cientistas acreditam que o dióxido de carbono é o principal contribuinte para o aquecimento global.³⁰ O efeito da maior concentração de CO₂ na atmosfera é um agravamento do originalmente benéfico efeito estufa, que vem acarretando alguns problemas e tem alterado o clima no mundo. Efeitos como o aumento da temperatura média global, as alterações no perfil das precipitações pluviométricas e a elevação do nível dos oceanos poderão ser catastróficos frente à contínua tendência de aumento da população mundial.²⁷

O setor de transportes mostrou altas taxas de crescimento nas emissões de gases do efeito estufa, durante os últimos dez anos. A realidade, é que essa situação provavelmente se tornará mais complicada nos próximos anos.³¹

A combustão de cada litro de biodiesel libera de 1,1 a 1,2 vezes a quantidade de CO₂ liberada na atmosfera por um litro de diesel convencional.²⁷ Entretanto, diferentemente do combustível fóssil, o CO₂ liberado na queima do biodiesel é reciclado por absorção durante o crescimento das oleaginosas, isto é, na fotossíntese.³² Em razão disso, o biodiesel não aumenta a emissão de dióxido de carbono e considera-se que este é constituído de carbono neutro.³³ Assim, a produção de biodiesel está inserida em um processo cíclico que auxilia na minimização do efeito estufa, pois há um certo equilíbrio entre a massa de carbono fixada e aquela liberada ou dispersa na atmosfera.²⁷ Ao ser queimado, o petróleo libera carbono, que durante milhões de anos ficou no subsolo, diretamente na atmosfera. Também são liberadas e emitidas na atmosfera grandes quantidades de enxofre, que estavam no subsolo, na composição do petróleo. No caso dos biocombustíveis, é devolvido à atmosfera aquilo que a planta retirou no momento do seu crescimento, ou seja, é estabelecido um ciclo fechado de carbono²⁵, pois a planta absorve o CO₂ enquanto cresce, e este é liberado quando ocorre a queima do biodiesel no motor, como mostra a Figura 6.

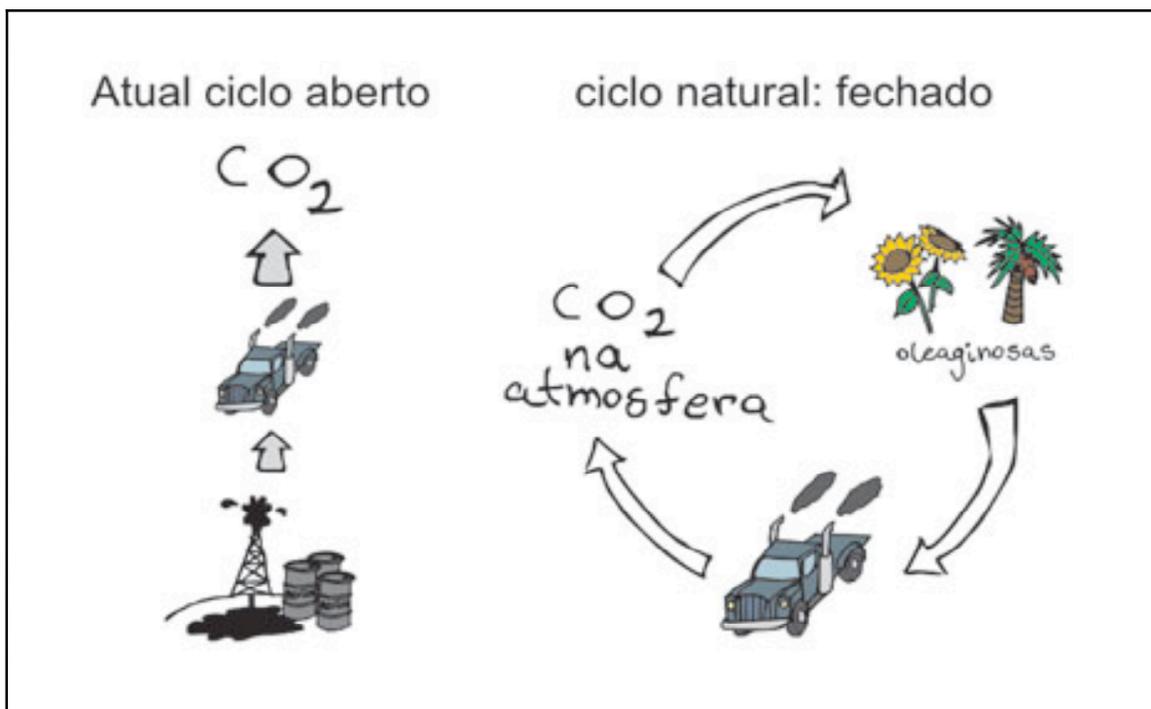


Figura 6. Ilustrações do Ciclo Aberto e Fechado do carbono.

O biodiesel pode ser usado puro ou misturado ao diesel em diversas proporções. A mistura de 2% em volume de biodiesel ao diesel de petróleo é chamada de B2 e assim sucessivamente, até o biodiesel puro, denominado B100. Para cada quilograma de diesel não usado, um equivalente a 3,11 kg de CO_2 deixará de ser produzido e mais um adicional de 15 a 20% referente à sua energia de produção.²⁷

2.2.1. Produção de Biodiesel

O uso direto de óleos vegetais são considerados insatisfatórios para motores de injeção direta ou indireta movidos a diesel, pois causam um série de problemas, já citados anteriormente. Visando reduzir os danos provocados pelos óleos vegetais, metodologias diferentes têm sido estudadas a fim de desenvolver derivados de óleos vegetais, cujas propriedades e desempenho se aproximem do óleo diesel, tais como diluição, microemulsão, craqueamento catalítico e reação de

transesterificação.¹⁷ Entre essas alternativas, a transesterificação tem se apresentado como a melhor opção, visto que o processo é relativamente simples e assim, um combustível renovável, denominado biodiesel, pode ser produzido com propriedades similares às do petrodiesel.

O processo mais utilizado industrialmente para a produção de biodiesel é o de transesterificação, no qual ocorre a transformação de triglicerídeos em moléculas menores de ésteres de ácidos graxos.

A reação de transesterificação pode ser descrita, de maneira geral, como uma reação em que um éster é transformado em outro pela mudança na porção alcóxi. Esta transformação ocorre em três etapas seqüenciais (Figura 7): inicialmente, as moléculas de triglicerídeos são convertidas em diglicerídeos, depois em monoglicerídeos e, finalmente em glicerol, produzindo um mol de éster alquílico a cada etapa reacional.^{8,34} Quando um éster alquílico reage com um álcool, o processo de transesterificação é denominado alcoólise.

Os álcoois, que são considerados agentes de transesterificação, usados nos processos são os álcoois metílico (metanol), etílico (etanol), propílico, butílico e amílico. O metanol e o etanol são mais frequentemente empregados. Metanol é o mais utilizado devido ao seu baixo custo na maioria dos países e às suas propriedades físico-químicas (polaridade e menor cadeia carbônica).¹⁷ O etanol, no Brasil apresenta um grande potencial devido a sua baixa toxicidade e fácil disponibilidade.²⁶

A transesterificação de óleos vegetais corresponde a uma reação reversível. Portanto, o rendimento da reação dependerá do deslocamento do equilíbrio químico em favor dos ésteres, e para obtermos um rendimento elevado, o álcool tem que ser usado em excesso juntamente com a otimização de outros fatores como a concentração do catalisador, a temperatura e a agitação do meio reacional.¹⁷ Deve-se considerar cada processo individualmente, estabelecendo a relação ideal de álcool/óleo, pois uma quantidade muito excessiva de álcool dificulta a recuperação do glicerol.^{6,35} Devido esse excesso, há um aumento na solubilidade, e quando a glicerina permanece na solução ocorre deslocamento do equilíbrio no sentido dos reagentes, diminuindo o rendimento dos ésteres.³

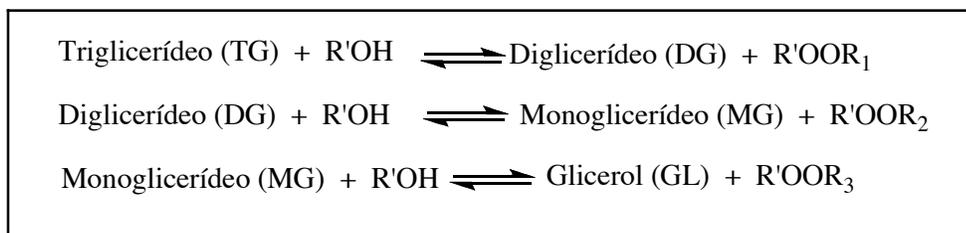


Figura 7. Etapas da reação de transesterificação.

A alcoólise de óleos vegetais ou de gordura animal pode ser conduzida por uma variedade de rotas tecnológicas em que diferentes tipos de catalisadores podem ser empregados, como bases inorgânicas³⁶, ácidos^{13,37}, catalisadores heterogêneos^{4,5,38,39}, bases orgânicas⁶ e enzimas^{22,40-42}. A transesterificação também pode ocorrer sem qualquer catalisador, utilizando metanol sob condições supercríticas⁷.

Atualmente, a catálise homogênea tem sido a rota tecnológica preferida para a produção de biodiesel onde as reações são catalisadas frequentemente por bases ou ácidos. Porém, a catálise enzimática tem mostrado muitas vantagens frente às metodologias químicas.

2.2.1.1. Catálise Básica

As bases utilizadas na reação de transesterificação, que são mais eficazes, incluem hidróxido de sódio (NaOH), metóxido de sódio (MeONa), hidróxido de potássio (KOH) e metóxido de potássio (MeOK).³

O processo de transesterificação via catálise alcalina é aproximadamente 4000 vezes mais rápido do que aquele catalisado por uma mesma quantidade do catalisador ácido⁸ e os catalisadores alcalinos são menos corrosivos⁶, sendo menos agressivos aos equipamentos. Além disso, o catalisador alcalino exige menores razões molares entre o álcool e o óleo vegetal e altas conversões são facilmente alcançadas.⁸ Por esses motivos, é que os catalisadores básicos tradicionais são largamente utilizados na indústria para obtenção de biodiesel.

Os tempos das reações catalisadas por bases, utilizando a relação molar de 6:1 álcool/óleo, relatada pelas literaturas^{8,26,43} como a razão molar que apresentou o melhor rendimento, variaram de 30 minutos a 8 horas.⁴⁴

A faixa de temperatura em que as reações de transesterificação via álcali geralmente ocorrem é de 25 a 120°C.

O emprego de catalisadores alcalinos exige que a matéria-prima (óleo) apresente baixa acidez (<0,5%) e ambos o óleo e o álcool devem ser isentos de água pois constatou-se que o não cumprimento destas exigências acarreta problemas operacionais ao processo.

O óleo vegetal, quando apresenta altos teores de ácido graxo livre, conduz ao consumo improdutivo de álcali e a subsequente formação de sabões. Esta saponificação indesejável consome parte do catalisador durante sua formação, reduzindo a eficiência catalítica e aumentando a viscosidade. Como consequência, constata-se a formação de gel e emulsões, dificultando a separação dos produtos (ésteres e glicerol) ao final da reação. Tais resultados inconvenientes aumentam de maneira considerável o custo de separação do produto, assim como a redução de rendimento no processo.⁶

A presença considerável de água no meio reacional também favorece, inevitavelmente, a saponificação dos triglicerídeos. Este contaminante leva à formação de ácidos graxos pela hidrólise dos ésteres presentes o que resulta na formação de sabões. Isto ocorre paralelamente à conversão dos triglicerídeos em ésteres, gerando dificuldades de purificação, formação de emulsões e perdas de rendimento.

É importante ressaltar, que a reação dos hidróxidos com o álcool leva à formação de água e, na presença do catalisador básico, obviamente poderá levar à hidrólise de algum éster produzido, com consequente formação de sabão e os mesmos problemas relatados anteriormente.⁶

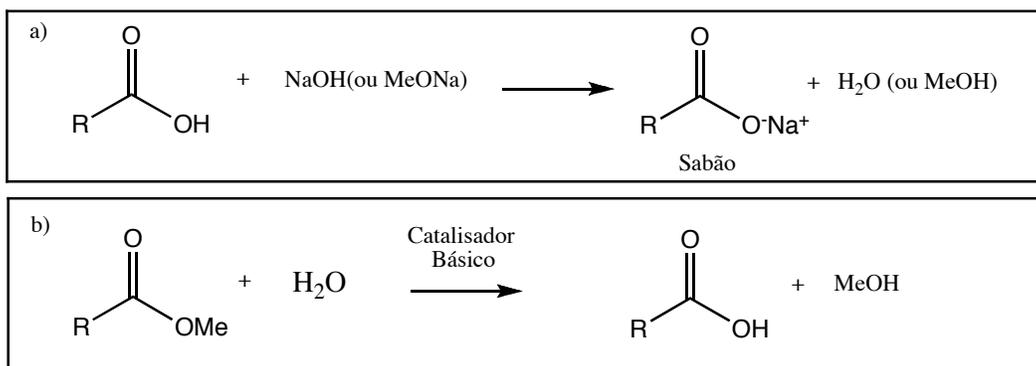


Figura 8. (a) Saponificação de óleos vegetais com ácidos graxos livres catalisada por base para produzir sabão e água, ambos subprodutos indesejáveis. (b) Água promove a formação de ácidos graxos livres. Este, então, pode desativar o catalisador e produzir sabão, como em (a).

A eliminação de sabões, catalisador residual e glicerol somente é possível através de etapas eficientes de lavagem, que demandam grande quantidade de água para a purificação dos ésteres. A adição de ácido faz-se preciso para a neutralização do catalisador residual.⁴⁵ A neutralização antes da etapa de lavagem reduz a água exigida e minimiza a formação de emulsões quando a água de lavagem é adicionada ao biodiesel.⁴⁶ O biodiesel precisa de repetitivas lavagens para atingir a pureza padrão necessária.²²

A alcoólise com metanol é tecnicamente mais viável do que com etanol. O metanol reage rapidamente com o triglicerídeo, dissolve facilmente o catalisador básico.⁴⁴ A mesma reação usando etanol é mais complicada, pois requer o uso de álcool anidro para minimizar a formação de ácidos graxos livres e a conseqüente formação de sabões.

2.2.1.2. Catálise Ácida

Os ácidos mais utilizados na reação de transesterificação incluem ácido sulfúrico (H_2SO_4), ácido fosfórico (H_3PO_4), ácido clorídrico (HCl) e ácidos sulfônicos orgânicos.³

Estes catalisadores fornecem altos rendimentos em ésteres alquílicos, mas a reação é lenta, normalmente requerendo altas temperaturas ($>100^\circ C$) e mais de 3 horas para atingir uma boa conversão.⁶ Os tempos de conversão variam de 3 a 50 horas.^{3,6,13,34,43} A temperatura tem um papel importante na síntese de biodiesel via catálise ácida, quanto maior a temperatura da reação menor é o tempo de conversão.¹³

As razões molares entre o álcool e o óleo vegetal, utilizadas na catálise ácida são maiores que as da catálise básica. Para se conseguir o mesmo rendimento em um certo tempo de reação, foi necessária uma relação 30:1 de álcool /óleo vegetal para a catálise ácida contra 6:1 para a básica.¹⁷ Essa razão de 30:1 é usualmente utilizada nas reações em meio ácido.

Embora as reações de transesterificação catalisadas por ácidos necessitem de um longo tempo de reação e temperaturas altas, os catalisadores ácidos possuem uma importante vantagem com respeito aos catalisadores básicos: o desempenho dos catalisadores ácidos não é fortemente afetado pela presença de ácidos graxos livres no óleo, sendo mais eficientes que os catalisadores alcalinos, quando a quantidade de ácidos graxos livres no óleo excede 1%.³⁷ Lotero e colaboradores¹³ afirmam que ocorrem simultaneamente as reações de esterificação e

transesterificação.

Um estudo de análise econômica mostrou que o procedimento da catálise ácida, sendo em uma etapa, é mais econômico que o da catálise básica, o qual requer uma etapa extra para converter ácidos graxos livres a ésteres alquílicos, evitando assim a formação de sabão.³⁷

No processo de catálise ácida, os resíduos de catalisador devem ser eliminados completamente do produto final, pois um sério problema é causado aos equipamentos. A contaminação do biodiesel com catalisadores ácidos residuais pode atacar as partes metálicas do motor, causando a corrosão.²² A eliminação deste problema implica muitas etapas de purificação, fazendo-se necessária a utilização de grande quantidade de água.

2.2.1.3. Catálise Enzimática

O interesse industrial por tecnologias enzimáticas vem aumentando gradativamente. As enzimas são catalisadores biológicos de altíssima eficiência catalítica, em geral muito maior que a dos catalisadores sintéticos, pois têm alto grau de especificidade por seus substratos, aceleram reações químicas específicas e, em alguns casos, podem funcionar tanto em soluções aquosas quanto em solventes orgânicos.¹⁶

O principal componente de todas as enzimas conhecidas, com exceção das ribozimas, é a proteína, que são macromoléculas polares, com massa variando de 10^4 a 10^6 Da, formadas pela condensação de amino-ácidos através de ligações peptídicas. A interação das cadeias laterais presentes, força a enzima a adotar uma estrutura tridimensional (estrutura terciária), que é responsável pela atividade química (sítio catalítico).⁴⁷

As proteínas possuem quatro níveis de estrutura, denominados estrutura primária, estrutura secundária, estrutura terciária e estrutura quaternária. A estrutura primária é a ordem na qual os aminoácidos estão ligados. A estrutura secundária é o arranjo dos átomos no esqueleto da cadeia polipeptídica no espaço. A estrutura terciária inclui o arranjo tridimensional de todos os átomos da proteína, incluindo os das cadeias laterais ou de quaisquer grupos de átomos não-pertencentes aos aminoácidos. A estrutura quaternária é o arranjo das múltiplas cadeias polipeptídicas umas em relação às outras.¹⁶

As reações catalisadas por enzimas ocorrem de forma variada, mas todas as reações requerem alguns grupamentos reativos para a interação da enzima com o substrato. Nas proteínas, os grupamentos α -carboxila e os α -aminos dos aminoácidos não estão livres, uma vez que eles estão formando as ligações peptídicas. Portanto, os grupamentos reativos das cadeias laterais são aqueles que estão envolvidos nas reações da enzima. As cadeias de hidrocarbonetos não contêm grupamentos reativos e não estão envolvidas no processo. Os grupamentos funcionais que podem ter um papel na catálise incluem o grupamento imidazol da histidina, o grupamento hidroxila da serina, o grupamento carboxila da cadeia lateral do aspartato e do glutamato, o grupamento sulfidrila da cisteína, o grupamento amino da cadeia lateral da lisina e o grupamento fenólico da tirosina.¹⁶ Na Figura 9 podemos visualizar as ligações peptídicas e os grupos funcionais:

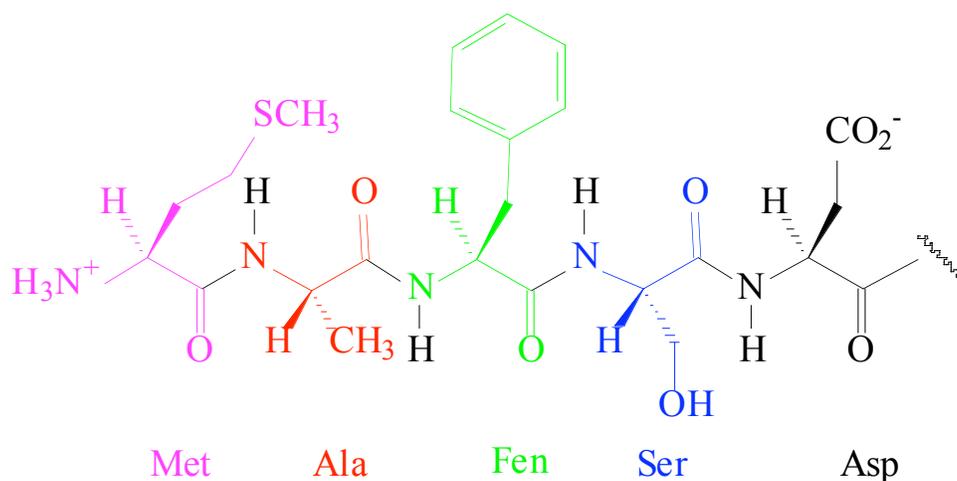


Figura 9. Ligações peptídicas.

Devido ao ambiente aquoso natural, os grupos hidrofílicos polares das cadeias laterais, como $-\text{COOH}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{OH}$, $-\text{SH}$ e $-\text{CONH}_2$, ficam preferencialmente localizados na superfície externa das enzimas, enquanto que os constituintes lipofílicos, como cadeias arílicas e alílicas, ficam situados na região interna. As cadeias laterais dobram-se sobre si mesma neste tipo de ambiente. A variedade de grupos na cadeia lateral permite que as proteínas atuem eventualmente como catalisadores ácidos, básicos, nucleofílicos ou eletrofílicos. A conformação tridimensional de uma proteína é o resultado da interação de todas as forças estabilizadoras não-covalentes.⁴⁷

As ligações não covalentes fundamentais são as interações eletrostáticas, as ligações de hidrogênio e as interações de van der Waals. O caráter direcional das ligações de hidrogênio entre a enzima e o substrato reforça um alto grau de especificidade.^{47,48}

O substrato liga-se, geralmente por ligações não-covalentes, a uma pequena porção da enzima conhecida como sítio ativo, frequentemente situada em uma fenda ou bolso da superfície da proteína e que é constituída por certos aminoácidos essenciais para a atividade enzimática. Assim forma-se um complexo, que conduz à formação das espécies do estado de transição, as quais podem, então, formar o produto. A reação catalisada ocorre no sítio ativo e, usualmente, em várias etapas. A primeira etapa é a ligação do substrato à enzima, a qual ocorre devido a interações altamente específicas entre o substrato e as cadeias laterais dos aminoácidos que constituem o sítio ativo. Dois modelos importantes foram desenvolvidos para descrever o processo de ligação. O primeiro deles, o modelo chave-fechadura, assume um alto grau de similaridade entre a forma do substrato e a geometria do sítio de ligação na enzima. O substrato liga-se a um sítio cuja forma complementa sua própria forma, como uma chave na fechadura. Esse modelo, é nos dias de hoje, de interesse principalmente histórico, uma vez que não leva em conta uma propriedade importante das proteínas, ou seja, sua flexibilidade conformacional. O segundo modelo leva em conta o fato de as proteínas terem uma flexibilidade tridimensional. De acordo com o modelo do encaixe induzido, a ligação do substrato induz uma mudança conformacional na enzima, o que resulta em um encaixe complementar ao substrato, uma vez que ele está ligado. O sítio de ligação tem uma forma tridimensional diferente antes da ligação ao substrato.^{14,49}

Após a ligação do substrato e a formação subsequente do estado de transição, as ligações são rearranjadas. No estado de transição, o substrato está ligado próximo aos átomos com os quais irá reagir. Além disso, o substrato é direcionado para a orientação correta em relação a tais átomos. Ambos os efeitos, a proximidade e a orientação, aceleram a reação. Enquanto algumas ligações são quebradas e novas ligações são formadas, o substrato é transformado em produto. O produto é, então, liberado da enzima, e ela pode catalisar a reação de mais um substrato para formar mais produto. Cada enzima tem seu próprio e único mecanismo de catálise – o que não é surpreendente, visto a grande especificidade das enzimas.^{14,16}

O mecanismo completo de uma reação pode ser razoavelmente complexo, mas as partes individuais de um mecanismo global podem ser razoavelmente simples. Conceitos como ataque

nucleofílico e catálise ácida geralmente permeiam as discussões sobre as reações enzimáticas. O conceito geral de catálise ácido-base depende da doação e da captação de prótons por grupamentos da cadeia lateral de aminoácidos como o imidazol, a hidroxila, a carboxila, a sulfidril, o amino e o fenol; todos esses grupos funcionais podem agir como ácidos ou bases. A doação e a captação de prótons permite a quebra e a reformação de ligações que constituem a reação enzimática.^{14,16}

A União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB) reconhece a existência e/ou descoberta de 3.000 diferentes enzimas.⁴⁸

A IUBMB adotou um sistema de classificação funcional, no qual as enzimas são classificadas com base no tipo de reação que catalisam.^{48,49} Elas foram divididas em seis classes principais e várias subclasses: as Oxirredutases realizam oxidações e reduções; as Transferases fazem a transferência de um grupo entre substratos; as Hidrolases catalisam hidrólises; as Liases realizam a eliminação de moléculas pequenas; as Isomerases promovem isomerizações; e as Ligases produzem a ligação de duas ou mais moléculas (Tabela 3).

Tabela 3. Sistema de classificação funcional das enzimas.

Classe de Enzimas	Algumas Subclasses	Tipos de Reações Catalisadas
Oxidoreduções	Desidrogenases Oxidases Redutases	Formação de ligação dupla por eliminação de H ₂ Oxidação Redução
Transferases	Quinase Transaminase	Transferência de um grupo fosfato Transferência de um grupo amino
Hidrolases	Lipases Nucleases Proteases	Hidrólise de um grupo éster Hidrólise de um grupo fosfato Hidrólise de um grupo amido
Liases	Descarboxilases Desidrases	Eliminação de CO ₂ Eliminação de H ₂ O
Isomerases	Epimerases	Isomerização de um centro estereogênico
Ligases	Carboxilases Sintetases	Adição de CO ₂ Formação e clivagem de ligações C-O, C-S, C-N, C-C.

As hidrolases (proteases, carbohidrases e lipases) respondem por mais de 95% da produção total de enzimas técnicas. Enquanto as proteases correspondem a 60-70% do mercado técnico, as carbohidrases respondem por 25% e as lipases por um escasso 5-10%.⁵⁰

Comparada com as outras hidrolases, as lipases apresentam uma versatilidade extremamente elevada, no que diz respeito à vasta especificidade de substratos e às diversas reações que catalisam, e esta situação surpreendente precisa ser enaltecida.⁵⁰

As lipases estão presentes em diversos organismos, onde se incluem animais, plantas, fungos e bactérias. Em seu ambiente natural, as enzimas possuem a função de catalisar a hidrólise de triglicerídeos aos ácidos graxos correspondentes e ao glicerol. Conforme a procedência, as lipases podem ter massa molecular variando entre 20 a 75 kDa. Possuem atividade em temperaturas que variam desde a ambiente até os 70 °C e em pH na faixa entre 4 a 9. Estas enzimas não requerem a presença de co-fatores.⁵¹

As semelhanças entre as seqüências de aminoácidos das lipases, geralmente, estão limitadas a curtas extensões localizadas ao redor do sítio ativo. O sítio ativo destas enzimas é caracterizado geralmente por uma tríade catalítica constituída pelos resíduos de aminoácidos SERINA, HISTIDINA e ASPARTATO, crucial para a realização de todas as reações catalisadas por lipases, sendo portanto, classificadas como serino hidrolases.⁵¹ Apesar das enzimas possuírem centenas de aminoácidos, apenas alguns deles são diretamente responsáveis pela catálise. Porém, resíduos vizinhos podem contribuir para a estabilização de estados intermediários e desta forma auxiliar na catálise.¹⁹

As lipases são responsáveis primeiramente pela hidrólise de glicerídeos. Entretanto, outros ésteres de elevado e baixa massa molecular, tiol ésteres, amidas, etc. são aceitos como substrato por este grupo de enzimas.⁵⁰

As principais reações catalisadas por lipases podem ser classificadas como:

- Hidrólise: $\text{RCOOR}' + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{RCOOH} + \text{R}'\text{OH}$
- Esterificação: $\text{RCOOH} + \text{R}'\text{OH} \rightleftharpoons \text{RCOOR}' + \text{H}_2\text{O}$
- Interesterificação: $\text{RCOOR}' + \text{R}''\text{COOR}^* \rightleftharpoons \text{RCOOR}^* + \text{R}''\text{COOR}'$
- Alcoólise: $\text{RCOOR}' + \text{R}''\text{OH} \rightleftharpoons \text{RCOOR}'' + \text{R}'\text{OH}$
- Acidólise: $\text{RCOOR}' + \text{R}''\text{COOH} \rightleftharpoons \text{R}''\text{COOR}' + \text{RCOOH}$

As três últimas reações são agrupadas frequentemente em um único termo, chamado, transesterificação.

Muitos processos de importância industrial são realizados através de metodologias químicas. A maioria dos processos, nos quais as lipases tem potencial aplicação, envolvem a modificação e/ou a derivatização de gorduras, óleos e substâncias relacionadas, usando procedimentos químicos clássicos.⁵⁰

Por exemplo, a produção de triglicerídeos de cadeia média pela esterificação de ácido com glicerol em altas temperaturas e pressões na presença ou não de um catalisador inorgânico. Um outro processo importante é a hidrólise dos óleos vegetais, tais como o óleo oliva ou de coco, para produzir ácidos graxos e glicerol. Nesses processos, assim como na produção de biodiesel via química, são utilizadas temperaturas extremas, meios reacionais corrosivos e muitas vezes pressões altíssimas.⁵⁰ Já na catálise enzimática não há corrosão dos equipamentos e grande parte dos processos são realizados em pressão e temperaturas baixas, permitindo que os gastos de energia sejam menores.

Então o processo enzimático é uma ótima metodologia para a produção de biodiesel pois não há corrosão dos equipamentos, o gasto de energia é reduzido, o custo no tratamento de resíduos é mais baixo e além disso, raramente ocorrem reações colaterais que levam ao desperdício (devido a formação de produtos secundários).

Atualmente, o processo de produção comercial de biodiesel é fundamentalmente realizado por via química, mas o processo enzimático tem despertado grande interesse da comunidade científica visto que uma grande quantidade de trabalhos foram publicados nos últimos 20 anos.

A catálise alcalina é preferencialmente empregada, pois estes catalisadores dão uma alta conversão em um curto tempo de reação. Entretanto estes processos possuem muitas desvantagens que incluem a intensa energia envolvida, os ácidos graxos e a água interferem na reação, a necessidade de eliminar o catalisador e a dificuldade de recuperar o glicerol. Estes inconvenientes podem ser superados através da utilização do processo enzimático, o qual tem atraído considerável atenção por produzir produtos altamente puros, permitir a fácil separação do glicerol, possuir a opção de ser realizado em meio aquoso ou não e operar em condições brandas de temperatura e pressão.^{22,52} Porém o alto custo da enzima permanece sendo uma barreira para a implementação do processo enzimático na indústria.^{22,53}

A produção de biodiesel ocorre através da reação de transesterificação catalisada por lipases. As lipases mais utilizadas em trabalhos científicos são *Pseudomonas cepacia*^{52,54,55}, *Pseudomonas fluorescens*^{41,54}, *Candida antarctica*^{42,56-58} e *Rhizopus oryzae*⁵⁹⁻⁶¹.

Algumas enzimas são extremamente sensíveis quando em contato com alguns álcoois, ocorrendo desativação ou até mesmo desnaturação da enzima. Shimada e colaboradores⁶² verificaram a desativação da enzima pelo metanol e eliminaram o problema com a adição do metanol em 3 etapas. A adição do metanol foi conduzida em etapas para manter o teor do metanol a um nível desejado para que não afetasse a enzima. Entretanto Ban e colaboradores⁶⁰ acreditam que ocorre uma desativação irreversível, que pode ser devido a desnaturação da enzima por metanol. Chen e Wu⁶³ sugeriram o uso de *t*-butanol e 2-butanol para regenerar a atividade dessas enzimas. A enzima desativada foi lavada com estes solventes e sua atividade enzimática aumentou em 10 vezes quando comparada com a enzima não tratada. Conforme Kaieda e colaboradores⁵⁴ a tolerância das enzimas com relação ao metanol é diferenciada. A lipase *Pseudomonas cepacia* tem uma resistência ao metanol muito mais elevada do que a *Rhizopus oryzae* e a *Candida antarctica*, sendo de grande atrativo para a reação de metanolise.

Foi indicado nos artigos pesquisados^{41,64}, que a enzima suportada é sempre mais ativa que a livre em condições reacionais comparáveis. A imobilização de enzimas, que consiste no confinamento das mesmas em um determinado material, tornam o sítio ativo das enzimas mais efetivo devido à maior disponibilidade destes, pois cada molécula de enzima está dispersa na superfície do suporte. Goma-Doncescu e Legoy⁶⁴ relataram que o uso de enzimas imobilizadas reduz o número de etapas de purificação requeridas e que o processo de imobilização das enzimas é conhecido por aumentar a estabilidade térmica.

A atividade enzimática é também influenciada pelo glicerol. O problema é causado pela baixa solubilidade do glicerol no biodiesel. Um depósito de glicerol formado durante o processo reveste o catalisador imobilizado e com isso a atividade das enzimas é reduzida. Royon e colaboradores⁵⁸ descobriram que quando utilizaram o *t*-butanol como solvente houve uma progressão do processo enzimático, pois este álcool solubiliza o glicerol.

Diversos estudos^{8,62} relatam alcoólises de óleos vegetais e gorduras animais com álcoois primários, secundários e de cadeia linear e ramificada usando lipases como catalisadores. Contudo, o álcool mais utilizado para a produção de ésteres alquílicos é o metanol (MeOH).

Nelson e colaboradores⁴⁰, um dos primeiros a realizarem a alcoólise enzimática de triglicerídeos com o objetivo de produzir biodiesel, investigaram a habilidade de várias lipases na transesterificação de óleos vegetais e gorduras com diferentes álcoois usando *n*-hexano como solvente. A lipase *Mucor miehei* foi a mais eficiente para converter triglicerídeos em seus ésteres

alquílicos com álcoois primários e a *Candida antarctica* foi a mais eficiente para transesterificar triglicerídeos com álcoois secundários originando ésteres alquílicos ramificados. Utilizando em seus estudos a lipase *Pseudomonas cepacia*, Abigor e colaboradores⁶⁵ descobriram que a conversão do óleo de palma à ésteres alquílicos empregando o etanol, dá origem a 72% de ésteres etílicos, enquanto que com o metanol, somente 15% de ésteres metílicos foram obtidos.

Shimada e colaboradores⁶² sintetizaram ésteres metílicos em um sistema livre de solvente usando a lipase imobilizada *Candida antarctica* como catalisador, entretanto a velocidade de reação diminuiu significativamente com o aumento do volume de água. Os resultados de Samukawa e colaboradores⁵⁷ mostraram que a impregnação de oleato de metila e óleo de soja no suporte da enzima por pré-incubação foi efetivo no aumento da velocidade da reação de metanólise. No entanto, com ambas as lipases a não tratada e a pré-incubada, a velocidade da reação diminuiu com o aumento no volume de água. O efeito da porcentagem de água no meio reacional na produção de biodiesel, foi analisado por Shah e colaboradores⁶⁶. A descrição geral da situação é que menos do que uma monocamada de água é necessária para a enzima mostrar atividade biológica. Quando a quantidade de água aumenta, aumenta a flexibilidade da enzima e a atividade. Porém, depois de uma quantidade ótima de água as reações hidrolíticas tornam-se significativas, sendo esperada então, uma redução no rendimento da reação de transesterificação.

Kaieda e colaboradores⁵⁹ estudaram a produção de biodiesel através da metanólise do óleo de soja, catalisada pela lipase *Rhizopus oryzae* em sistemas contendo água e livres de solvente orgânico. Este procedimento atingiu uma conversão de 80-90% de ésteres metílicos depois de 70 horas de reação quando o metanol foi adicionado em etapas e 4-30% de água estava presente. No mecanismo desta reação, os triglicerídeos e glicerídeos parciais são primeiro hidrolisados pela lipase a glicerídeos parciais e ácidos graxos, respectivamente, e então os ácidos graxos produzidos são esterificados com metanol dando origem aos ésteres metílicos (biodiesel). Em trabalho posterior⁵⁴, analisaram a metanólise do óleo de soja com diversas lipases, nos mesmos sistemas. Foram comparadas as reações de transesterificação, esterificação e hidrólise. As velocidades de reação catalisadas pelas lipases *Pseudomonas cepacia* e *Candida rugosa* foram semelhantes, onde a velocidade inicial de cada reação foi alta. Porém, inicialmente a reação de hidrólise foi mais rápida do que as outras duas reações. Estas características de reação são similares àquelas da lipase *Rhizopus oryzae* relatadas anteriormente, concordando com o mecanismo proposto.

Na produção de biodiesel por esterificação do ácido butírico com metanol, Al-Zuhair e colaboradores⁶⁷ realizaram testes com a lipase *Mucor miehei* em sistemas com diferentes quantidades de água e os resultados mostraram que a enzima foi mais eficiente em altas concentrações de água.

Os rendimentos e os tempos de conversão das reações de transesterificação vêm sendo aperfeiçoados. Hama e colaboradores⁶¹ encontraram um rendimento de 75,5% em 29 horas usando a lipase imobilizada *Rhizopus oryzae* em um sistema pré-emulsionado por ultrassom. Já Iso e colaboradores⁴¹ usaram a lipase imobilizada *Pseudomonas fluorescens* e o álcool 1-propanol como agente de transesterificação obtendo a conversão dos ésteres alquílicos próximas de 100% depois de 10 horas de reação. No estudo de produção de biodiesel, Shieh e colaboradores⁶⁸ obtiveram as melhores condições de síntese com um tempo reacional de 6,3 horas e conversão de 92,2% do óleo de soja em ésteres metílicos utilizando a lipase *Rhizomucor miehei* num sistema com *n*-hexano.

Recentemente, uma nova classe de compostos, os líquidos iônicos, vêm sendo empregados, com grande sucesso, como solventes em reações e processos de extração.

Biocatálise em líquidos iônicos foi primeiramente relatado em 2000.⁶⁹ As reações biocatalíticas em líquidos iônicos, quando comparadas com as reações em solventes orgânicos comuns, mostram uma seletividade mais elevada, velocidades mais rápidas e maior estabilidade da enzima. As enzimas cataliticamente ativas não se dissolvem no líquido iônico, mas mantêm-se suspensas como um pó. Quando elas são dissolvidas, tornam-se inativas. As enzimas são geralmente ativas nos líquidos iônicos que contêm os ânions BF_4^- , PF_6^- , e NTf_2^- , mas não nos que contêm os ânions Cl^- , NO_3^- , CF_3SO_3^- , trifluoroacetato ou acetato.⁷⁰

Líquidos iônicos são usualmente definidos como uma classe especial de sais fundidos que apresentam ponto de fusão inferior a 100°C ¹⁰ e permanecem líquidos dentro de uma janela ampla de temperatura ($< 300^\circ\text{C}$).⁷¹

Sais derivados do cátion 1,3-dialquilimidazólio são uma das mais populares e investigadas classes de líquidos iônicos à temperatura ambiente. O cátion 1 *n*-butil-3-metilimidazólio (BMI) associado com ânions de relativa coordenação fraca como tetrafluoroborato (BF_4^-), hexafluorofosfato (PF_6^-), e bis-trifluorometanosulfonimidato (NTf_2^-) apresenta propriedades físicas-químicas únicas e de grande atrativo⁷², como:

- densidade elevada;
- viscosidade relativamente baixa,
- baixa pressão de vapor;
- não são inflamáveis;
- possuem alta estabilidade térmica e química,
- são líquidos sobre uma ampla escala de temperaturas (abaixo de - 80 °C).

Estes líquidos iônicos podem ser considerados como fases polares. As suas propriedades de solventes são determinadas em grande parte pela habilidade do sal em atuar como doador e/ou receptor em ligações de hidrogênio e também pelo grau de localização das cargas nos ânions. Geralmente, os líquidos iônicos baseados no cátion 1,3-dialquilimidazólio são solventes extremamente ordenados através de ligações de hidrogênio.⁷³

As características estruturais apresentadas pelos líquidos iônicos imidazólio são únicas. Estudos de raio-x, revelaram que os sais de 1,3-dialquilimidazólio têm uma típica tendência para formar redes prolongadas de cátions e de ânions, conectadas através de ligações de hidrogênio. A unidade monomérica é sempre constituída por um cátion imidazólio rodeado por pelo menos três ânions e por sua vez, cada ânion é rodeado por pelo menos três cátions imidazólio. O arranjo tridimensional desses líquidos iônicos é geralmente formado através de cadeias de anéis imidazólio. Estes sistemas altamente estruturados, são descritos como estruturas poliméricas do tipo $\{[(DAI)_x(X)_{x-n}]_n + [(DAI)_{x-n}(X)_x]_n\}_n$ onde DAI representa o cátion 1,3-dialquilimidazólio e X o ânion. Este padrão estrutural apresenta uma notável auto-organização na fase sólida, líquida e até mesmo na fase gasosa. Estas estruturas também são mantidas quando estes compostos são dissolvidos em solventes com moderada ou baixa polaridade. Este comportamento caracteriza estes sais como estruturas supramoleculares.^{10,74}

Devido à ampla quantidade de combinações cátion-ânion possíveis, estes possuem a habilidade de dissolver uma variedade de substâncias diferentes incluindo compostos orgânicos polares e apolares, inorgânicos e poliméricos.⁷¹

A solubilidade da água em líquidos iônicos varia imprevisivelmente. Por exemplo, embora BMI·BF₄, BMI·PF₆, e BMI·NTf₂ sejam similares na escala da polaridade, o primeiro é completamente solúvel em água enquanto os dois últimos são ligeiramente solúveis na água (0.13% v/v e 1.4% v/v, respectivamente).⁷¹ Em alguns casos a água, mesmo em poucas quantidades, pode hidrolisar ânions de líquidos iônicos derivados do cátion 1,3-

dialquilimidazólio, como PF_6 e formar ácido fluorídrico (HF) o qual apesar de ser um ácido fraco é extremamente tóxico e corrosivo.^{75,76}

As características diferenciadas dos líquidos iônicos os tornam uma excelente alternativa aos solventes tradicionais.

Uma característica especial é a grande variação de suas propriedades físico-químicas tanto em função da natureza do ânion presente quanto dos substituintes alquila do anel imidazólio. Sendo assim uma vantagem óbvia de se usar líquidos iônicos ao invés de solventes orgânicos normais é que as propriedades como, polaridade, hidrofobicidade, viscosidade, miscibilidade do solvente, entre outras características, podem ser moduladas com a combinação adequada do ânion e dos substituintes alquila sobre o cátion. Isto é importante, porque manipulando-se as propriedades, pode-se sintetizar um líquido iônico para condições específicas de reação.⁷⁷

O enorme sucesso dos líquidos iônicos deve-se a sua grande versatilidade e por isso estes têm sido utilizados em vários domínios científicos, tais como a síntese orgânica, catálise enzimática, alquilações e acilações de Friedel-Crafts, cicloadições de Diels-Alder, substituições aromáticas nucleofílicas, espectroscopia, electroquímica, nanomateriais, polimerizações, em extrações e em processos da separação.⁷⁸

Os líquidos iônicos têm muitas vantagens sobre os solventes comuns, no entanto, são mais caros, e a chave para seu uso industrial será sua eficiente recuperação, isolamento do produto e reutilização.⁷⁰

Os líquidos iônicos vêm emergindo como uma nova classe de solventes “verdes”, que tem como principal objetivo a redução do impacto ambiental dos processos químicos.⁷⁷ Devido suas muitas propriedades fascinantes, são de interesse fundamental a todos os químicos.⁷⁹

A produção química gera inúmeros inconvenientes, como a formação de subprodutos tóxicos e a contaminação do ambiente. A preocupação com estes inconvenientes pode ser claramente observada pois, nos últimos anos, cresce continuamente a pressão sobre as indústrias químicas, tanto através da sociedade civil, como das autoridades governamentais, no sentido de aprimorar o desenvolvimento de processos, que sejam cada vez menos prejudiciais ao meio ambiente. O questionamento global sobre os danos gerados no planeta nos revela a necessidade de adotarmos uma nova conduta química. A química verde tem a preocupação do desenvolvimento de tecnologias e processos incapazes de causar poluição.^{80,81} A filosofia da Química Verde está baseada em 12 princípios que foram formulados por Anastas e Warner em

1998. Alguns dos princípios formulados merecem destaque dentre os quais incluem: prevenção, economia de átomos, sínteses com compostos de menor toxicidade, eficiência energética, uso de substâncias renováveis e química segura para a prevenção de acidentes.⁸²

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. GERAL

Os álcoois, as enzimas e todos os produtos químicos restantes foram comprados de fontes comerciais (Amano, Acros ou Aldrich) e usados sem purificação adicional. Os líquidos iônicos foram preparados de acordo com procedimento descrito na literatura⁸³.

As análises dos experimentos foram feitas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) e Cromatografia em Camada Delgada (CCD). Para as análises realizadas em CCD utilizou-se placas cromatográficas em sílica gel (Sigma-Aldrich). Os experimentos também foram executados em um cromatógrafo líquido Shimadzu LC-20A Prominence equipado com um detector de rede de fotodiodo SPD-M20A e um sistema de propulsão de quatro solventes. Os solventes foram filtrados com uso prévio de um filtro de 0.45 µm Millipore e desgasificados. Os volumes de injeção de 10 µL e de taxa de fluxo de 1 mL/min foram usados em todos os experimentos. Todas as amostras foram dissolvidas em 2-propanol-hexano (5:4, v/v). Todos os solventes eram de classe HPLC e foram usados como obtidos, sem purificação adicional. As análises podem ser realizadas utilizando-se uma coluna Shim-pack VP-ODS (tamanho da partícula 4.60µm, 250 x 4.6 mm I.D.), que foi obtida da Shimadzu ou uma coluna Ascentis C18 (tamanho da partícula 5µm, 15 cm x 4.6 mm I.D.), obtida da Sulpelco. A metodologia empregada para os cálculos das conversões seguiram conforme os relatos do artigo de Holcapek e colaboradores.⁸⁴ Método do HPLC para coluna Sulpelco: o reservatório A continha água, o reservatório B continha acetonitrila e o reservatório C continha 2-propanol-hexano (5:4, v/v). Um gradiente ternário de 35 minutos com duas etapas lineares do gradiente foi empregado: 30 % de A + 70 % de B em 0 minutos, 100 % de B em 10 minutos, 50 % de B + 50 % de C em 20 minutos, seguido pela eluição isocrática com os 50 % de B + 50 % de C para os últimos 15 min⁸⁴. Método do HPLC para coluna Shimadzu: o reservatório A continha água, o reservatório B continha acetonitrila e o reservatório C continha 2-propanol-hexano (5:4, v/v). Um gradiente ternário de 35 minutos com duas etapas lineares do gradiente foi empregado: 30 % de A + 70 % de B em 0 minutos, 100 % de B em 10 minutos, 50 % de B + 50 % de C em 20 minutos, seguido pela eluição isocrática com os 50 % de B + 50 % de C para os últimos 15 min⁸⁴.

3.2. SÍNTESE DO BIODIESEL

3.2.1. Seleção das enzimas

Em frascos com capacidade para 10 mL foi adicionado 0,2 g de lipase em 0,4 mL (1.36 mmol) de líquido iônico. Após a enzima ser suspensa no líquido iônico, adicionou-se ao meio reacional 0,250 g (0.28 mmol) de óleo de soja e 6.8 mmol de álcool (0,4 mL de etanol e 0,27 mL de metanol). A reação foi mantida sob agitação à temperatura ambiente durante 120 horas. Muitas lipases foram testadas com os líquidos iônicos; BMI·BF₄, BMI·PF₆ e BMI·NTf₂; e com os álcoois metílico e etílico comercial. As enzimas foram selecionadas a partir da análise dos experimentos por cromatografia em camada delgada.

3.2.2. Quantidade de Reagentes

Foram realizados testes para identificar a proporção de reagentes que gerasse o melhor resultado. Os experimentos foram realizados variando-se as quantidades de reagentes utilizando a lipase *Pseudomonas cepacia*, o líquido iônico BMI·NTf₂, álcool (etanol e metanol) e óleo de soja. O procedimento reacional com melhor desempenho está descrito a seguir. Em um balão de 50 mL foi adicionado 0,6 g de lipase em 8.2 mmol (2,4 mL) de líquido iônico. Após a enzima ser suspensa no líquido iônico, adicionou-se ao meio reacional 3.4 mmol (3g) de óleo de soja e 41.2 mmol de álcool (2,4 mL de etanol ou 1,67 mL de metanol) e manteve-se o sistema sob agitação à temperatura ambiente. O monitoramento foi realizado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC).

3.2.3. Influência da temperatura

Foram realizados testes para verificar o comportamento do melhor resultado encontrado por cromatografia em camada delgada, a lipase *Pseudomonas cepacia*, o líquido iônico BMI·NTf₂ e etanol em óleo de soja, frente a mudanças de temperatura. Os experimentos foram

realizados variando a temperatura da reação em 20, 30, 40, 50 e 60 °C. O procedimento reacional foi realizado exatamente como o descrito no item 3.2.2. O monitoramento foi realizado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) através da retirada de alíquotas com 2, 4, 6, 8, 24, 48 e 72 horas de reação. Verificou-se o melhor resultado com um sistema reacional à temperatura de 30°C.

3.2.4. Influência da quantidade de água nos álcoois

Foram realizados testes para verificar a melhor concentração de água em Metanol e Etanol. Os experimentos foram realizados com o melhor resultado encontrado por cromatografia em camada delgada: a lipase *Pseudomonas cepacia* e o líquido iônico BMI·NTf₂ em óleo de soja. As concentrações de etanol e metanol utilizadas foram: 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% e absoluto. O procedimento reacional foi realizado exatamente como o descrito no item 3.2.2. O monitoramento foi realizado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) através da retirada de alíquotas com 2, 4, 6, 8, 24, 48 e 72 horas de reação. As concentrações de etanol 85% e metanol 90% foram as que obtiveram os melhores resultados.

3.2.5. Melhor resultado em maior escala

Em um balão de 250 mL foi adicionado 6 g da lipase *Pseudomonas cepacia* PS em 24 mL (82 mmol) do líquido iônico BMI·NTf₂. Após a enzima ser suspensa no líquido iônico, adicionou-se ao meio reacional 30g (34 mmol) de óleo de soja e 350 mmol (24 mL) de álcool etílico 85% ou 370 mmol (16,7 mL) de álcool metílico 90%, e um sistema bifásico foi observado. A reação foi mantida sob agitação à temperatura de 30°C e monitorada com a retirada de alíquotas que foram analisadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC). Depois de transcorridas as 24 horas de reação, o sistema foi deixado em repouso para separar as fases, no qual a fase inferior continha a lipase suspensa no líquido iônico e a fase superior continha o biodiesel. Após a decantação, a fase superior foi removida e filtrada para a retirada de algumas partículas de enzimas. O biodiesel foi obtido com rendimento de 95 % (96 % de conversão por HPLC) para a reação com álcool etílico 85% e com rendimento de 95 % (95% de conversão por

HPLC) para a reação com álcool metílico 90%. O sistema líquido iônico/enzima foi reutilizado por pelo menos 4 vezes sem nenhuma perda significativa de atividade e seletividade catalítica. Depois deste período foi necessário remover a enzima do líquido iônico por filtração e lavar com água para recuperar o catalisador que foi reincorporado em um novo meio reacional. O líquido iônico que ainda contém o glicerol foi lavado com água para separar o glicerol que foi isolado com pureza elevada. O líquido iônico recuperado foi reutilizado depois de secar sob pressão reduzida.

3.2.6. Enzima mais eficiente

As enzimas selecionadas anteriormente foram testadas com a melhor concentração de água para cada álcool. O procedimento reacional foi realizado exatamente como o descrito no item 3.2.2. O monitoramento foi realizado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) através da retirada de alíquotas com 2, 4, 6, 8, 24, 48 e 72 horas de reação. A enzima mais eficaz foi a lipase *Pseudomonas cepacia* (PSC-I).

3.3.4. Solubilidade do glicerol

A fim de verificar a solubilidade do glicerol no líquido iônico (BMI·NTf₂), em um balão de 50 mL com 2,4 mL (3,43 g - 8.2 mmol) de líquido iônico foi adicionado glicerol gota a gota. A mistura foi submetida à agitação magnética vigorosa à temperatura de 30°C, até resultar na separação de fases. A solubilidade do glicerol no sistema líquido iônico/álcool foi medida da mesma forma, sendo adicionado ao líquido iônico 35 mmol de etanol ou 37 mmol de metanol. O resultado da solubilidade do glicerol no líquido iônico puro foi < 1% em massa, entretanto na mistura do líquido iônico com álcool (relação 1/5 mol %) alcançou 15% em massa.

3.3.5. Influência dos Líquidos Iônicos

Foram realizados testes com o sistema reacional de melhor desempenho (lipase *Pseudomonas cepacia* PSC-I, etanol 85 % e óleo de soja) com outros líquidos iônicos. Os

experimentos foram realizados variando-se os líquidos iônicos a fim de verificar a influência dos mesmos no processo. Em um balão de 50 mL foi adicionado 0,6 g de lipase em 8.2 mmol de líquido iônico. Após a enzima ser suspensa no líquido iônico, adicionou-se ao meio reacional 3g (3.4 mmol) de óleo de soja e 2,4 mL (35 mmol) de etanol 85% e manteve-se a agitação. O monitoramento foi realizado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC).

3.3.6. Reação de Esterificação

Foi realizado um experimento para verificar a ocorrência da reação de esterificação no sistema de melhor desempenho. Em um balão de 50 mL foi adicionado 0,6 g da lipase *Pseudomonas cepacia* PSC-I em 2,4 mL do líquido iônico BMI·NTf₂. Após a enzima ser suspensa no líquido iônico, adicionou-se ao meio reacional 3g de ácidos graxos do óleo de soja (palmítico, esteárico, oléico, linolêico e linolênico) e 2,4 mL de etanol 85% e manteve-se o sistema sob agitação à temperatura de 30°C. Após 8 horas de reação verificamos, através de análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), uma conversão de 87% de ácidos graxos em ésteres etílicos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com o objetivo de desenvolver um sistema catalítico enzimático suspenso em líquidos iônicos para a produção de biodiesel através da reação de transesterificação de óleos vegetais com álcoois, realizou-se primeiramente experimentos para verificar o potencial catalítico das lipases disponíveis. As lipases foram selecionadas através da análise dos experimentos por Cromatografia em Camada Delgada (CCD)⁸. No monitoramento das reações de transesterificação por CCD utilizou-se como fase móvel hexano, acetato de etila e ácido acético nas proporções 90:10:1 (v/v).⁵⁷ Esta mistura de solventes permitiu evidenciar a formação dos ésteres alquílicos. A placa cromatográfica foi revelada com vapor de iodo, onde a mancha dos ésteres foi visivelmente detectada. Abaixo, a Tabela 4 mostra os valores dos Rfs e na Figura 10 pode-se visualizar as manchas dos compostos.

Tabela 4. Valores de Rfs - Biodiesel e óleo de soja.

<i>Composto</i>	<i>Rfs</i>
Ésteres Alquílicos	0.72
Triglicerídeos	0.55

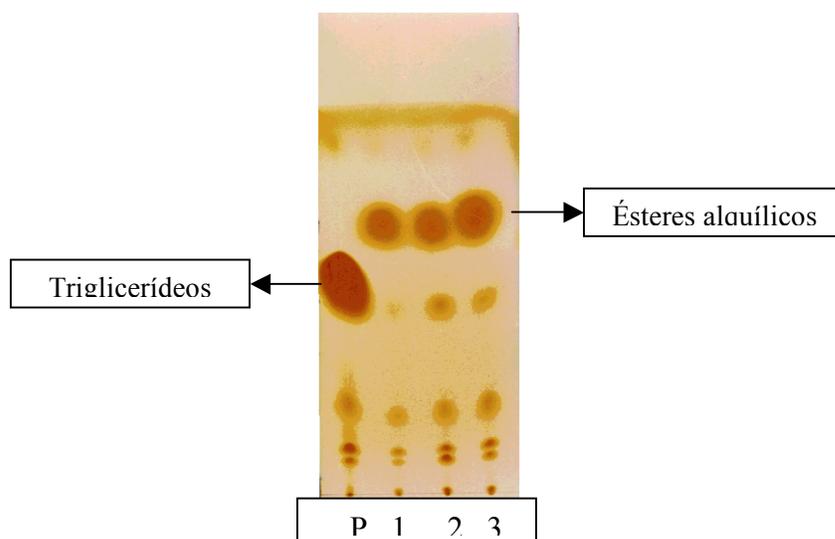


Figura 10. Placa cromatográfica de reações com etanol onde P (óleo de soja), 1 (Enzima PS), 2 (Enzima PSD-I) e 3 (Enzima PSC-II).

Esta técnica, mostrou-se útil, rápida e eficiente para comprovar a ocorrência da alcoólise do óleo de soja. As lipases que obtiveram um mínimo de conversão nas reações avaliadas foram escolhidas para posteriores testes: *Candida rugosa*, *Pseudomonas cepacia* PS, *Pseudomonas cepacia* PSC-I, *Pseudomonas cepacia* PSC-II, *Pseudomonas cepacia* PSD-I, *Rhizopus niveus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Penicillium camembertii*, *Aspergillus niger*, *Penicillium roqueforti*, *Candida antarctica*, lipase do pâncreas do porco, *Rhizomucor miehei* e lipase de vitelo (língua e glândulas salivárias).

Nos testes iniciais, a lipase *Pseudomonas cepacia* foi a enzima mais eficaz e o uso de BMI·NTf₂ em metanol comercial deu as melhores conversões do óleo vegetal em ésteres metílicos nos resultados analisados por CCD.

As reações executadas usando os líquidos iônicos BMI·BF₄ e BMI·PF₆ deram conversões similares àquelas obtidas em BMI·NTf₂. Entretanto, BMI·NTf₂ é a melhor escolha pois BMI·BF₄ é hidrofílico⁸⁵ e assim a separação do glicerol seria mais difícil e BMI·PF₆, que na presença de uma mínima quantidade de água pode hidrolisar o ânion e gerar ácido fluorídrico (HF), um ácido fraco mas extremamente tóxico e corrosivo^{75,86}.

Depois de utilizarmos o método de Cromatografia em Camada Delgada (CCD), passamos a analisar os experimentos a partir de outra técnica cromatográfica, a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC). Esta técnica tem a capacidade de realizar análises quantitativas de uma grande quantidade de compostos presentes em vários tipos de amostras, em escala de tempo de poucos minutos, com alta resolução, eficiência e sensibilidade. Examinou-se então, a transesterificação do óleo de soja variando a quantidade de reagentes e obteve-se a melhor conversão com uma fração molar álcool/óleo de 12:1, numa relação de 5/1 de álcool/líquido iônico com 20 % (p/p) de enzima. Após identificação do melhor procedimento reacional, foram realizados experimentos variando a temperatura da reação (20 - 60 °C). A melhor condição de temperatura foi à 30°C.

Os testes realizados em HPLC, nos mostram claramente a região contendo os ácidos graxos livres (AGL), os monoglicerídeos (MG), os diglicerídeos (DG), os triglicerídeos (TG) e os ésteres alquílicos (EA). Na Figura 11 abaixo, contendo um cromatograma, é possível visualizar a região específica de cada um dos compostos citados anteriormente. Evidentemente, alterando-se o álcool (agente de transesterificação) utilizado na produção de biodiesel, a região onde aparecem os ésteres poderá sofrer um leve deslocamento.

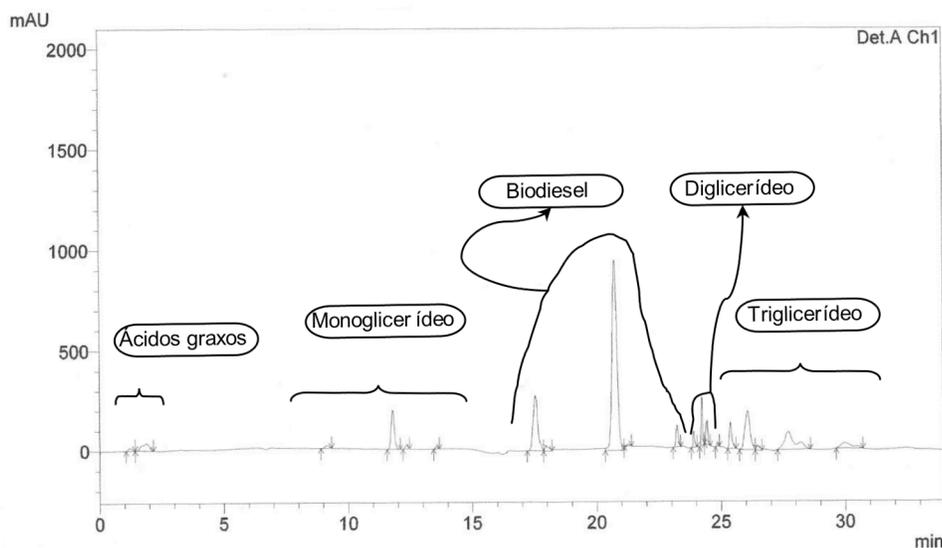


Figura 11. Cromatograma explicativo com as regiões dos compostos identificados.

Dados da literatura relatam que a quantidade de água presente no meio reacional enzimático influencia fortemente a velocidade da reação. Biocatálises em líquidos iônicos mostraram que a hidratação da enzima parece ter papel fundamental na estrutura e função da enzima nesse ambiente, então experimentos com diferentes concentrações de água nos álcoois foram realizados, pois a utilização de álcoois hidratados, como o etanol, tem um valor econômico importante para o processo de produção. Os experimentos foram analisados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)⁸⁴ e acompanhados através da retirada de alíquotas com 2, 4, 6, 8, 24, 48 e 72 horas de reação. As reações executadas na ausência de água forneceram velocidades mais baixas de reação do que aquelas executadas com os álcoois hidratados. A literatura^{41,57,62}, relata que a velocidade da reação diminui com o aumento no volume de água, mas de acordo com os dados coletados, a adição da água se fez necessária para melhorar a velocidade da reação. A adição de 10 v% de água deu os melhores resultados para o metanol (95 % da conversão, 48 h) e a adição de 15 v% de água para o etanol (96 % conversão, 30 h), conforme mostram as Tabelas 5 e 6.

Tabela 5. Produtos e conversões (por HPLC) obtidos da reação de transesterificação do óleo de soja por *Pseudomonas cepacia* com álcool etílico em BMI-NTf₂ à temperatura de 30 °C.

Reação	EtOH:H ₂ O	t (h)	Ácidos (%) ^a	Mono (%) ^b	Di (%) ^b	Tri (%) ^b	Biodiesel (%)
1	70:30	30	10.5	0	0	0	89.5
2	75:25	30	9.7	0	0	0	90.3
3	80:20	30	11.0	0	0	0	89.0
4	85:15	30	2.4	0.7	0.9	0	96.0
5	90:10	30	7.4	2.9	4.0	0	85.7
6	95:5	30	5.8	15.5	4.4	0	74.3
7	100:0	30	0.9	15.9	14.1	33.3	35.8

a) ácidos graxos b) mono, di e triglicerídeos.

Quando avaliamos os cromatogramas das reações com etanol 70 %, 75 % e 80 %, verificamos que as quantidades de biodiesel e de ácidos graxos formadas durante o processo mantêm-se estáveis nas entradas 1 e 2 (Tabela 5) a partir de 24 horas reacionais, isto é, não há mudanças significativas nas conversões da reação. Já na entrada 3 isto só é verificado a partir de 30 horas de reação. Nota-se que há uma alta quantidade ácidos graxos nestas reações. O alto volume de água contido nestas reações pode provavelmente ser o responsável por este comportamento. Shah e colaboradores⁶⁶ descobriram que a quantidade de água presente no meio reacional influencia na biocatálise. Foi constatado que a partir de uma quantidade ótima de água (entrada 4) as reações de hidrólise tornam-se mais efetivas, levando a uma leve redução na velocidade das reações de transesterificação.

Na Tabela 5 verificamos que ao diminuirmos a concentração de água nos álcoois há um decréscimo na conversão do óleo de soja em biodiesel, exatamente o inverso é apresentado na literatura, onde a catálise enzimática é realizada sem a presença de líquidos iônicos. O aumento na quantidade de água no meio reacional, reflete num aumento na velocidade de transesterificação e hidrólise dos triglicerídeos, sendo esta situação confirmada pelas entradas 1,

2 e 3 da Tabela 5, onde não é verificada a formação de monoglicerídeos, diglicerídeos e nem de triglicerídeos. Além disso, podemos verificar através de nossos resultados que a atividade da enzima é maximizada num nível específico de hidratação (entrada 4 da Tabela 5), um ponto de significativa importância que também foi relatado por Micaêlo e colaboradores⁸⁷. Este comportamento enzimático foi observado por outros autores, tanto em líquidos iônicos como em solventes orgânicos convencionais, deixando claro que assim como em solventes orgânicos convencionais, a hidratação da enzima parece ter um papel fundamental na estrutura e função das enzimas em líquidos iônicos.^{87,88} A relação da água em ambientes contendo enzimas e líquidos iônicos pode ser explicada pela manutenção da conformação enzimática. Existe uma tendência dos líquidos iônicos em retirar a água essencial das enzimas, que está acompanhada com o aumento de sua hidrofília. Sendo assim, quanto mais hidrofílico for o líquido iônico, maior a quantidade de água necessária para manter a conformação ativa da enzima⁸⁹. Os líquidos iônicos hidrofílicos podem dissociar as ligações de hidrogênio que mantêm a integridade estrutural das enzimas causando uma desnaturação total ou parcial da enzima⁹⁰. O meio reacional sendo mais hidrofóbico, permite a preservação das moléculas de água essencial que cercam a estrutura das enzimas, desse modo reduzem o contato direto íon-enzima e aumentam a estabilidade destas com respeito a desnaturação⁷¹.

Em sistemas reacionais utilizando o etanol como agente transesterificante Nelson e colaboradores⁴⁰ encontraram uma conversão de 13,7 % utilizando a lipase *Pseudomonas cepacia* após 8h de reação, já em nossos experimentos, onde utilizamos como meio reacional os líquidos iônicos, todas as entradas, com exceção da entrada 7 (0% de água), possuem conversões maiores que 13,7% a partir de 6 horas de reação. O melhor resultado encontrado na Tabela 5, a entrada 4, pode ser visualizado no cromatograma mostrado na Figura 12.

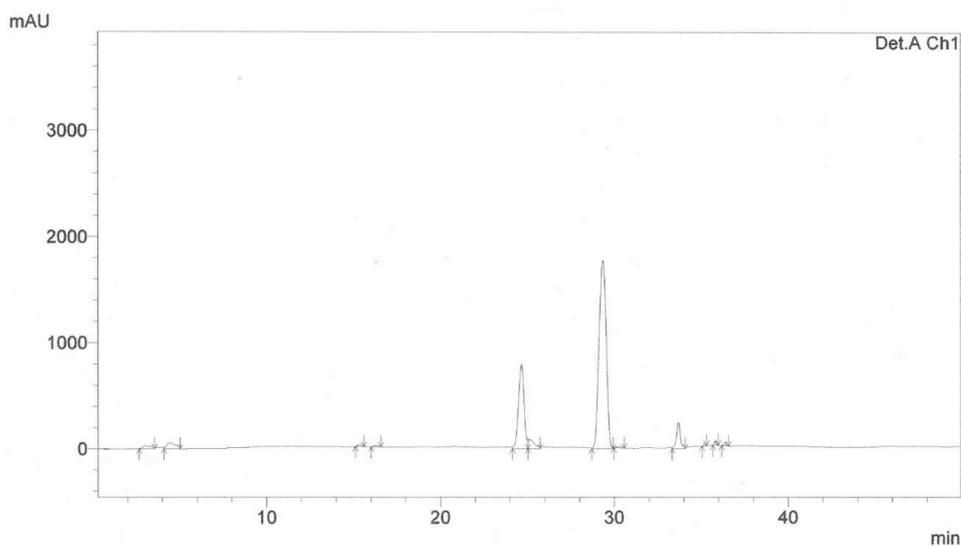


Figura 12. Cromatograma – Reação EtOH 85%

Tabela 6. Produtos e conversões (por HPLC) obtidos da reação de transesterificação do óleo de soja por *Pseudomonas cepacia* com álcool metílico em BMI·NTf₂ à temperatura de 30 °C.

Reação	MeOH:H ₂ O	t (h)	Ácidos (%) ^a	Mono (%) ^b	Di (%) ^b	Tri (%) ^b	Biodiesel (%)
1	70:30	48	6.1	0	0	0	93.9
2	75:25	48	4.0	7.5	9.5	0	79.0
3	80:20	48	4.7	2.4	3.8	0	89.1
4	85:15	48	4.2	2.0	3.0	0	90.8
5	90:10	48	2.8	0.5	1.7	0	95.0
6	95:5	48	1.1	8.1	3.2	0	87.6
7	100:0	48	0.5	5.8	6.1	48.4	39.1

a) ácidos graxos b) mono, di e triglicerídeos.

Samukawa e colaboradores⁵⁷, assim como Shimada e colaboradores⁶², observaram que o aumento da quantidade de água no meio reacional, reflete num decréscimo na velocidade da metanólise do óleo de soja em sistemas sem a presença de líquidos iônicos. Ao aumentar a quantidade de água, as reações hidrolíticas aumentam significativamente, reduzindo a velocidade da reação de transesterificação. Porém, lipases também catalisam reações de esterificação e o que evidenciamos na Tabela 6 é que as reações de hidrólise, esterificação e transesterificação ocorrem paralelamente, pois ocorre justamente o contrário do que é analisado pelos pesquisadores.

Uma insignificante quantidade de água pode provavelmente ser responsável por uma desativação da lipase pelo etanol e metanol^{42,66}. A lipase *Pseudomonas cepacia* tem uma forte resistência a estes álcoois, no entanto a presença de água ajuda na prevenção da desnaturação enzimática. Nas entradas 5 e 6 (Tabelas 5), assim como na entrada 6 (Tabela 6) verifica-se um decréscimo na conversão de ésteres alquílicos, isto é uma diminuição da atividade enzimática pela redução do volume de água. Mas verificamos na entrada 7 (Tabelas 5 e 6), que mesmo sem a presença de água na reação há uma baixa conversão de ésteres etílicos e metílicos. Este comportamento pode estar provavelmente ligado ao fato das enzimas serem mais estáveis em líquidos iônicos. A alta estabilidade das enzimas está relacionada possivelmente com as interações iônicas formadas entre esta e os ânions ou cátions dos líquidos iônicos.

Kaieda e colaboradores⁵⁴ encontraram uma conversão de 80% do óleo de soja em ésteres metílicos com 90 horas de reação, utilizando como catalisador a lipase *Pseudomonas cepacia*. Na Tabela 6, com exceção da entrada 7, todos os outros resultados são melhores ou próximos ao resultado alcançado por Kaieda, sendo que as reações são realizadas em um pouco mais da metade do tempo reacional racionalizado pelo pesquisador, isto é, 48 horas. Quando comparamos nossos resultados com Kaieda, fica claro que a utilização de líquido iônico no meio reacional melhora a atividade enzimática.

O melhor resultado para a metanólise do óleo de soja (entrada 5, Tabela 6) pode ser visualizado no cromatograma mostrado na Figura 13.

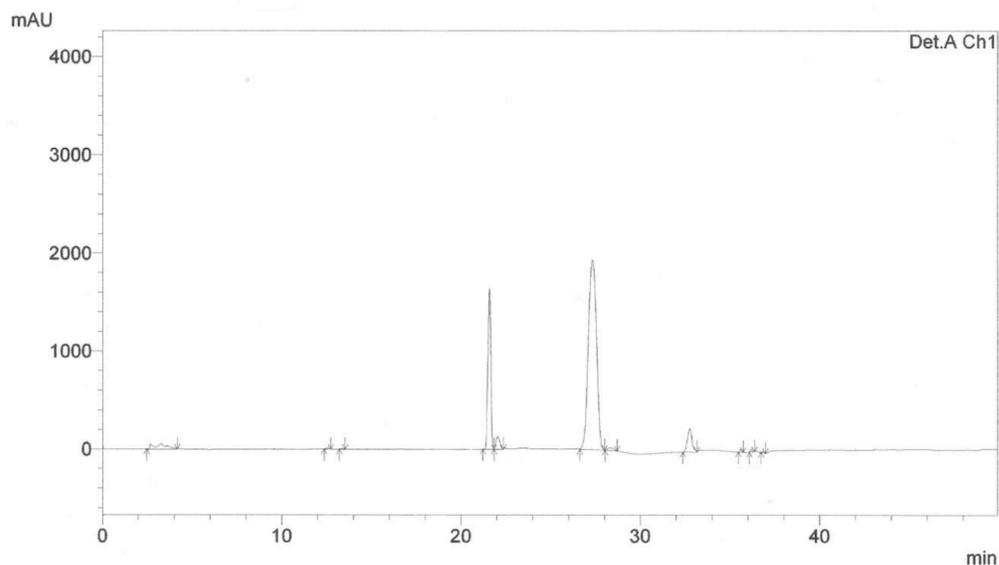


Figura 13. Cromatograma – Reação MeOH 90%.

Com os ótimos resultados obtidos utilizando-se álcoois hidratados num processo bastante simplificado, o próximo passo seria testar os sistemas em escalas industriais. Porém não obtivemos êxito com relação a aquisição de equipamentos com dimensões excessivas para serem usados nesses experimentos. Então, os sistemas catalíticos foram testados em escalas de 30 - 50 gramas e constatou-se ser possível sua utilização pois os sistemas produziram um biodiesel com 92 % de rendimento após 35 horas para o etanol (com 15 % de água) e com 90 % de rendimento para o metanol (com 10 % de água) após 50 horas reacionais.

Após encontrarmos a concentração de água ideal para sistemas contendo diferentes álcoois (metanol e etanol), realizou-se experimentos para a verificação da enzima mais eficiente (Tabela 7) frente a estes sistemas, dos quais coletou-se amostras com 2, 4, 6, 8, 24, 48 e 72 horas de reação. Agora, contando com um método mais eficiente, o HPLC, as análises mostrarão com maior precisão qual a enzima obterá as melhores conversões.

Tabela 7. Produtos e conversões (por HPLC) obtidos da reação de transesterificação do óleo de soja por lipases com álcool etílico e metílico em BMI·NTf₂ à temperatura de 30 °C.

Reação	Lipase	Álcool	t (h)	Ácidos (%) ^c	Mono (%) ^d	Di (%) ^d	Tri (%) ^d	Biodiesel (%)
1	PSC-I	EtOH^a	8	8.5	0.3	1.2	0	90.0
2	PSC-I	EtOH ^a	24	0	0	1.2	0	98.8
3	PSC-I	MeOH ^b	8	0.2	23.5	4.8	0	71.5
4	PSC-I	MeOH ^b	24	1.4	20.5	2.0	0	76.1
5	PSC-II	EtOH ^a	8	49.8	14.9	3.9	0	31.4
6	PSC-II	EtOH ^a	24	0	10.1	7.9	0	82.0
7	PSC-II	MeOH ^b	8	0.3	1.0	9.6	84.7	4.4
8	PSC-II	MeOH ^b	24	0	0.8	9.2	78.2	11.8
9	PSD-I	EtOH ^a	8	18.2	29	7.2	0	45.6
10	PSD-I	EtOH ^a	24	8.6	10.2	7.1	0	74.1
11	PSD-I	MeOH ^b	8	0.3	9.8	4.9	59.6	25.4
12	PSD-I	MeOH ^b	24	2.0	29.4	6.1	0	62.5
13	FLUOR	EtOH ^a	8	0.1	0	9.9	88.7	1.3
14	FLUOR	EtOH ^a	24	0	0.6	13.5	81	4.9
15	FLUOR	MeOH ^b	8	0	0.4	9.7	88.1	1.8
16	FLUOR	MeOH ^b	24	1.2	3.0	13.5	75.3	7.0
17	NOVOZ	EtOH ^a	8	0	0.7	7.5	86.7	5.1
18	NOVOZ	EtOH ^a	24	0.2	0.8	6.5	79.3	13.2
19	NOVOZ	MeOH ^b	8	0.2	2.2	6.6	81.6	9.4
20	NOVOZ	MeOH ^b	24	0.2	1.0	5.0	68.4	25.4
21	LipIM	EtOH ^a	8	0	0.9	7.0	85.3	6.8
22	LipIM	EtOH ^a	24	0.4	0.9	6.8	74.1	17.8
23	LipIM	MeOH ^b	8	0.5	0	7.8	90.5	1.2
24	LipIM	MeOH ^b	24	0	0.7	7.2	90.6	1.5

a) EtOH 85%, b) MeOH 90%, c) ácidos graxos, d) mono, di e tri-glicerídeos.

As enzimas testadas são todas lipases, portanto possuem no seu sítio ativo a mesma tríade catalítica (Serina-Histidina-Aspartato). No entanto, o comportamento destas no mesmo meio reacional é diferente. Devido ao ambiente aquoso natural, os grupos hidrofílicos polares das cadeias laterais, como $-\text{COOH}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{OH}$, $-\text{SH}$ e $-\text{CONH}_2$, ficam preferencialmente localizados na superfície externa das enzimas, enquanto que os constituintes lipofílicos, como cadeias arílicas e alílicas, ficam situados na região interna. As cadeias laterais dobram-se sobre si mesma neste tipo de ambiente e a conformação tridimensional da enzima é o resultado das interações não-covalentes entre essas cadeias. As ligações não covalentes fundamentais são as interações eletrostáticas, as ligações de hidrogênio e as interações de van der Waals. O caráter direcional das ligações de hidrogênio entre a enzima e o substrato reforça um alto grau de especificidade. Então, as enzimas mesmo possuindo a mesma tríade catalítica, possuirão conformação enzimática diferente e assim se envolverão com o meio reacional de modo distinto.

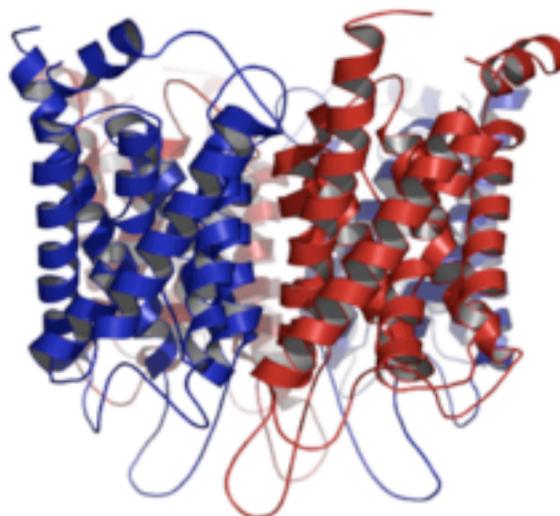


Figura 14. Imagem ilustrativa da conformação das enzimas.

Algumas das lipases utilizadas nos experimentos são imobilizadas e outras não possuem nenhum tipo de suporte, foram apenas isoladas. As lipases podem ser suportadas em diferentes materiais, como cerâmica, terra diatomácea, sílica, entre outros. A imobilização de enzimas, que consiste no confinamento das mesmas em um determinado material, tornam o sítio ativo das enzimas mais efetivo devido à maior disponibilidade destes, pois cada molécula de enzima está dispersa na superfície do suporte.⁴¹

O melhor resultado foi alcançado pela enzima imobilizada em cerâmica, a lipase *Pseudomonas cepacia* PSC-I. Essa enzima foi a mais eficiente, confirmando o que é encontrado na literatura^{22,41,64}, que a enzima suportada é sempre mais ativa que a livre em condições reacionais comparáveis.

As melhores condições de reação para a produção do biodiesel foram obtidas pelo uso da lipase *pseudomonas cepacia* PSC-I (0.6 g) suspensa em BMI·NTf₂ (8.2 mmol), etanol/água (85:15) (41.2 mmol), óleo de soja (3.4 mmol) e temperatura de 30 °C. O tempo de reação (8 h) para converter completamente o material de partida (óleo) foi determinado por HPLC com triplicata dos experimentos em que a conversão da reação foi determinada em 90 %. Na figura 15 podemos visualizar o cromatograma que mostra os ésteres etílicos formados durante o processo enzimático de melhor desempenho.

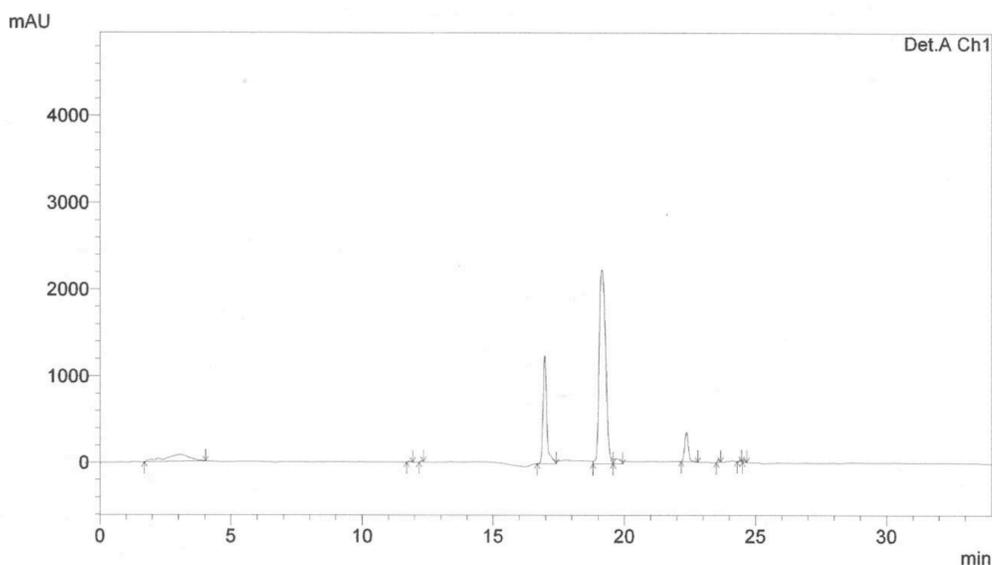


Figura 15. Cromatograma – Reação PSC-I com EtOH 85%.

Os ésteres metílicos e etílicos são purificados facilmente por um decantação simples do sistema bifásico e a fase de líquido iônico/enzima pode ser reutilizada por pelo menos 4 vezes sem nenhuma perda significativa de atividade e seletividade catalítica. Após a reutilização do sistema pode-se reciclá-lo de maneira simplificada. Para a remoção da enzima do líquido iônico é necessário filtrar e lavar com água o sistema para recuperar o catalisador que pode ser reincorporado em um novo meio reacional. O líquido iônico que ainda contém o glicerol deve ser lavado com água para separar o glicerol que é isolado com pureza elevada. Note que na catálise clássica ácida ou na básica para o glicerol ser isolado há a necessidade de várias etapas de purificação para conseguir uma pureza desejável, tornando o método enzimático mais viável. O líquido iônico recuperado após secar sob pressão reduzida, também pode ser reutilizado. Comparando o processo enzimático com os processos químicos verifica-se que as etapas de purificação foram reduzidas, pois está provado que a utilização de enzimas imobilizadas diminuem o número de etapas requeridas⁶⁴ e não há a necessidade de tratamento especial (neutralização) para o catalisador.

Quando a quantidade de água presente no etanol foi de 15 v%, obteve-se o melhor desempenho do sistema reacional. Conforme Shah e colaboradores⁶⁶, menos do que uma monocamada de água é necessária para a enzima mostrar atividade biológica, mas quando a quantidade de água aumenta, aumenta a flexibilidade e a atividade da enzima. Assim, depois que uma quantidade ótima de água é ultrapassada, as reações hidrolíticas tornam-se significativas.

Conforme Shimada e colaboradores⁴² a reação de hidrólise ocorre paralelamente com a transesterificação. Kaieda e colaboradores⁵⁹ estudaram a produção de biodiesel através da metanólise do óleo de soja, catalisada pela lipase *Rhizopus oryzae* em sistemas contendo água e livres de solvente orgânico. Este procedimento atingiu uma conversão de 80-90% de ésteres metílicos depois de 70 horas de reação quando o metanol foi adicionado em etapas e 4-30% de água estava presente. No mecanismo desta reação, os triglicerídeos e glicerídeos parciais são primeiro hidrolisados pela lipase a glicerídeos parciais e ácidos graxos, respectivamente, e então os ácidos graxos produzidos são esterificados com metanol dando origem aos ésteres metílicos (biodiesel). Em trabalho posterior⁵⁴, analisaram a metanólise do óleo de soja com diversas lipases, nos mesmos sistemas. Foram comparadas as reações de transesterificação, esterificação e hidrólise. As velocidades de reação catalisadas pelas lipases *Pseudomonas cepacia* e *Candida rugosa* foram semelhantes, onde a velocidade inicial de cada reação foi alta. Porém, inicialmente

a reação de hidrólise foi mais rápida do que as outras duas reações. Estas características de reação são similares àquelas da lipase *Rhizopus oryzae* relatadas anteriormente, concordando com o mecanismo proposto.

Na esterificação do ácido butírico com metanol, Al-Zuhair e colaboradores⁶⁷ realizaram testes com a lipase *Mucor miehei* em sistemas com diferentes quantidades de água e os resultados mostraram que a enzima foi mais eficiente em altas concentrações de água. Com o intuito de verificar a ocorrência da reação de esterificação no sistema reacional de melhor desempenho, realizou-se um experimento com 8 horas duração (melhor tempo reacional do sistema) utilizando-se os ácidos graxos do óleo de soja como substrato. Obteve-se uma conversão de 87%, o que comprova a efetividade da lipase *Pseudomonas cepacia* PSC-I na esterificação de ácidos graxos. Em razão disso, esta lipase pode catalisar a esterificação de óleos contendo qualquer concentração de ácidos graxos livres.

Diante de vários relatos, fica evidente que a presença de água melhora a velocidade de hidrólise do óleo. Acreditamos que os ácidos graxos formados pela hidrólise dos triglicerídeos são convertidos mais rapidamente nos respectivos ésteres do que o caminho de transesterificação (Figura 16). Em virtude da lipase *Pseudomonas cepacia* PSC-I catalisar as reações de hidrólise em um tempo menor que as de esterificação e transesterificação, esta possível hipótese é levantada^{54,59}.

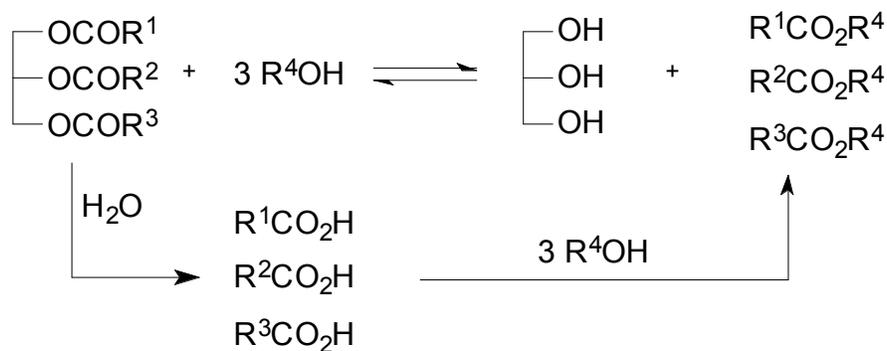


Figura 16. Reações de hidrólise, transesterificação e esterificação catalisadas por enzimas suspensas em líquidos iônicos.

Estas atividades catalíticas são superiores àquelas relatadas anteriormente para processos enzimáticos em água ou outros suportes^{8,42,91}. Este resultado é relacionado provavelmente à extração do glicerol - formado durante a transesterificação - pela mistura de líquido iônico /álcool⁹² que assim desloca o equilíbrio para o produto biodiesel (Figura 17).

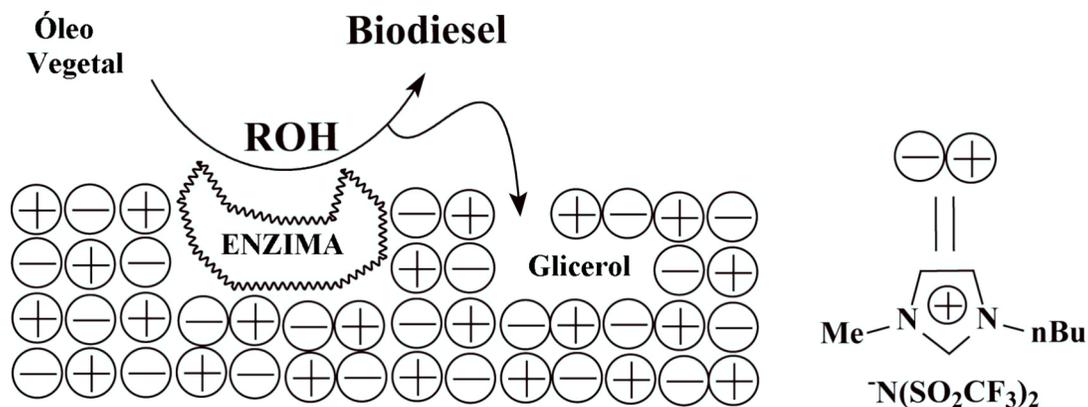


Figura 17. Transesterificação de óleos vegetais catalisados por enzimas suportadas em líquidos iônicos com captura simultânea do subproduto glicerol.

A baixa solubilidade do glicerol no biodiesel é um problema no processo enzimático, pois um depósito de glicerol formado durante o processo reveste o catalisador imobilizado e com isso reduz a atividade das enzimas. Royon e colaboradores⁵⁸ utilizaram o *t*-butanol para solubilizar o glicerol, já neste trabalho o deslocamento do glicerol pela mistura líquido iônico/álcool impede que este se deposite no suporte das enzimas. A solubilidade do glicerol no líquido iônico puro é muito baixa (< 1% em massa), entretanto pode alcançar 15% em massa na mistura do líquido iônico com álcool (relação 1/5 mol %) possibilitando a reutilização do sistema líquido iônico/enzima por pelo menos 4 vezes.

A interação líquido iônico/enzima também é responsável pelo ótimo resultado obtido nestes experimentos, pois há uma maior estabilidade das enzimas nesse ambiente que é possivelmente estabelecida por algum tipo de interação iônica. O cátion ou o ânion do líquido iônico podem interagir com grupos carregados da enzima, no sítio ativo ou na periferia, causando mudanças na estrutura da enzima⁷¹.

A fim de melhor identificar o comportamento dos líquidos iônicos na biocatálise, decidimos testar o sistema reacional de melhor resultado com outros líquidos iônicos como Tetrafluoroborato de Butilmetilimidazólio ($\text{BMI}\cdot\text{BF}_4$), Hexafluorofosfato de Butilmetilimidazólio ($\text{BMI}\cdot\text{PF}_6$), Tris(perfluoroetil)trifluorofosfato de Butilmetilimidazólio ($\text{BMI}\cdot\text{FAP}$), Trifluorometanosulfonato de Butilmetilimidazólio ($\text{BMI}\cdot\text{OTf}$), Bis-trifluorometanosulfonimidato de 1,3-di-(2-metoxi)etilimidazólio ($\text{EtoMMI}\cdot\text{NTf}_2$), Tetrafluoroborato de 1,3-di-(2-metoxi)etilimidazólio ($\text{EtoMMI}\cdot\text{BF}_4$), Tris(perfluoroetil)trifluorofosfato de 1,3-di-(2-metoxi)etilimidazólio ($\text{EtoMMI}\cdot\text{FAP}$), Tetrafluoroborato de 1-(2-metoxi)etil-3-metilimidazólio ($\text{MEtMI}\cdot\text{BF}_4$), Tris(perfluoroetil)trifluorofosfato de 1-(2-metoxi)etil-3-metilimidazólio ($\text{MEtMI}\cdot\text{FAP}$) e Bis-trifluorometanosulfonimidato de 1-(2-metoxi)etil-3-metilimidazólio ($\text{MEtMI}\cdot\text{NTf}_2$) (Tabela 8).

As enzimas são geralmente ativas nos líquidos iônicos que contêm os ânions BF_4^- , PF_6^- , e NTf_2^- , mas não nos que contêm os ânions Cl^- , NO_3^- , CF_3SO_3^- , trifluoroacetato ou lactato.⁷⁰ As enzimas inativadas provavelmente são solvatadas por esses ânions.⁹⁰ Por exemplo, o $\text{BMI}\cdot\text{NO}_3$ substitui quase a totalidade da água superficial da enzima, fato que pode ser identificado como a razão da desestabilização da enzima. Quando há presença de água no meio reacional, a maioria da superfície da enzima é primeiramente solvatada pelos líquidos iônicos e uma fração muito pequena é solvatada pela água. Esta evidência nos mostra que o líquido iônico tem uma importância significativa na solvatação da enzima.⁸⁷ Conforme Micaêlo e colaboradores⁸⁷, uma análise mais detalhada da solvatação da enzima pelos líquidos iônicos mostra que o ânion domina as interações com a enzima, pois são observadas um maior número de ligações de hidrogênio entre a enzima e o ânion. O ânion NO_3^- interage fortemente com a cadeia principal da enzima através de ligações de hidrogênio com o grupo amido. Parece que o ânion NO_3^- interage com a enzima fortemente sendo capaz de penetrar no interior da enzima e destruir ligações de hidrogênio essenciais da molécula. O ânion lactato também pode facilmente formar ligações de hidrogênio estáveis com a enzima desativando-a. Muitas referências^{71,87,89} tem indicado que os cátions tem menor influência na atividade da enzima do que os ânions. Porém, na presença de água, os cátions impõem um considerável efeito na atividade das enzimas e exibem maior atividade e estabilidade em ambientes com líquidos iônicos que possuem um cátion menor.⁸⁹

A partir da análise dos dados coletados constatou-se que o líquido iônico Bis-trifluorometanosulfonimidato de Butilmetilimidazólio ($\text{BMI}\cdot\text{NTf}_2$) continua sendo o melhor meio reacional para produção de biodiesel. Avaliou-se a influência dos mesmos no processo através do monitoramento por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), cujos resultados estão na Tabela 8.

Tabela 8. Produtos e conversões (por HPLC) obtidos da reação de transesterificação do óleo de soja pela *Pseudomonas cepacia* PSC-I com álcool etílico 85% em Líquidos Iônicos à temperatura de 30 °C.

Reação	Líquido Iônico	t (h)	Ácidos (%) ^a	Mono (%) ^b	Di (%) ^b	Tri (%) ^b	Biodiesel (%)
1	$\text{BMI}\cdot\text{NTf}_2$	8	8.5	0.3	1.2	0	90.0
2	$\text{BMI}\cdot\text{BF}_4$	8	5.3	10.7	3.6	64.4	16.0
3	$\text{BMI}\cdot\text{PF}_6$	8	6.0	6.0	12.5	51.2	24.3
4	$\text{BMI}\cdot\text{FAP}$	8	0	38.2	3.2	3.4	55.2
5	$\text{MEtMI}\cdot\text{FAP}$	8	0	0	1.3	98.7	0
6	$\text{MEtMI}\cdot\text{BF}_4$	8	1.1	0	6.0	92.6	0.3
7	$\text{MEtMI}\cdot\text{NTf}_2$	8	11.2	31.4	2.9	0.3	54.2
8	$\text{EtoMMI}\cdot\text{BF}_4$	8	8.8	1.3	4.9	83.8	1.2
9	$\text{EtoMMI}\cdot\text{FAP}$	8	1.4	0.9	6.2	83.5	8.0
10	$\text{EtoMMI}\cdot\text{NTf}_2$	8	0.7	0	5.0	94.0	0.3
11	$\text{BMI}\cdot\text{OTf}$	8	1.7	0	7.1	87.4	3.8

a) ácidos graxos b) mono, di e triglicerídeos.

Os resultados apresentados na Tabela 8 demonstram que tanto a natureza do cátion quanto a do ânion influenciam profundamente a atividade enzimática. Assim, na série $\text{BMI}\cdot\text{NTf}_2$, $\text{BMI}\cdot\text{FAP}$, $\text{BMI}\cdot\text{PF}_6$, $\text{BMI}\cdot\text{BF}_4$ e $\text{BMI}\cdot\text{OTf}$, o decréscimo de reatividade do sistema parece estar relacionado com o aumento da hidrofília do líquido iônico. Solventes extremamente polares podem interagir desfavoravelmente com a água essencial, indispensável para a manutenção da correta conformação catalítica da enzima^{71,78,89,93}, o que pode ser visto nos resultados encontrados

nos experimentos com BMI·BF₄ e BMI·OTf. Já no caso do emprego de BMI·NTf₂, BMI·FAP e BMI·PF₆, líquidos iônicos menos hidrofílicos, melhores rendimentos de biodiesel foram observados, o que pode ser atribuído a uma menor interação com a água essencial presente na enzima. De forma semelhante, na série BMI·NTf₂, MEtMI·NTf₂ e EtoMMI·NTf₂, que diferem na estrutura do cátion (respectivamente, 0, 1 e 2 átomos de oxigênio), há um aumento de hidrofília que induz um decréscimo de reatividade. Provavelmente interações entre os oxigênios do cátion dos LI e as lipases estejam levando a uma desativação da enzima.

Em nosso melhor resultado (Tabela 8, entrada 1) obteve-se 90 % de conversão do óleo de soja em biodiesel, em 8 horas de reação, sendo este tempo reacional muito próximo ao da catálise básica e dos menores tempos de conversão das reações de transesterificação em meios enzimáticos. Assim, por exemplo, Hama e colaboradores⁶¹ encontraram um rendimento de 75,5% em 29 horas usando a lipase imobilizada *Rhizopus oryzae* em um sistema pré-emulsionado por ultrassom e Iso e colaboradores⁴¹ utilizaram a lipase imobilizada *Pseudomonas fluorescens* e o álcool 1-propanol como agente de transesterificação obtendo uma conversão dos ésteres alquílicos próximas de 100% num tempo bem menor, 10 horas de reação. Entretanto, no estudo de produção de biodiesel de Shieh e colaboradores⁶⁸, foram obtidas as melhores condições de síntese com um tempo reacional de 6,3 horas e conversão de 92,2% do óleo de soja em ésteres metílicos utilizando a lipase *Rhizomucor miehei*. Porém, diferentemente do processo enzimático aqui desenvolvido, neste estudo utiliza-se um solvente derivado do petróleo, o *n*-hexano. Ultimamente, reações de transesterificação livres de solventes são mais favorecidas, pois são mais econômicas.

5. CONCLUSÕES

O líquido iônico BMI·NTf₂ com a lipase PSC-I e etanol 85% à temperatura controlada de 30° foi o sistema que rendeu as melhores conversões para a catálise enzimática e confirmaram a efetividade obtendo uma conversão do óleo de soja em 90% de biodiesel com 8 horas de reação, sendo este tempo reacional muito próximo ao da catálise básica.

Conclui-se que o resultado está relacionado provavelmente à correta interação líquido iônico / água essencial enzimática e à extração do glicerol pela mistura de líquido iônico /álcool⁹², que desloca o equilíbrio para o biodiesel e facilita a purificação deste.

A presença de água pode acelerar a taxa de hidrólise do óleo, rendendo ácidos graxos que, por sua vez, são convertidos nos respectivos ésteres mais rapidamente que pelo caminho de transesterificação^{54,59}.

A solubilidade do glicerol no líquido iônico com álcool (relação 1/5 mol %) alcançada foi de 15% em massa, possibilitando a reutilização do sistema líquido iônico/enzima por pelo menos 4 vezes.

O etanol foi preferencialmente escolhido como fonte de álcool, pois é produzido nacionalmente em larga escala a partir da cana-de-açúcar e a custos altamente competitivos, enquanto que o metanol, além de ser tóxico, necessita ser importado. Além disso, o metanol desativa as enzimas. No processo enzimático existe a vantagem do etanol não precisar ser necessariamente anidro, como no processo químico. A utilização do etanol hidratado apresenta as vantagens de menor preço e toxicidade.

São evidentes os ganhos ambientais desse processo, menor gasto energético (baixas temperaturas), o glicerol é facilmente removido, a purificação de ésteres alquílicos é simplificada, a combinação de enzima/líquido iônico exibiu um efeito sinérgico excelente que realçou a atividade e a durabilidade do sistema catalítico e a utilização de álcool etílico, eliminando o uso do metanol de origem petrolífera. A reciclagem da carga enzimática neste processo também deve receber destaque, pois a fase líquido iônico/enzima pode ser reutilizada por pelo menos 4 vezes sendo que o catalisador e o líquido iônico podem ser recuperados e reincorporados em um novo meio reacional.

O sistema proposto neste trabalho torna-se um método “verde” alternativo para a produção de biodiesel, pois se utiliza óleo de soja e etanol que são fontes renováveis, enzimas

que são biodegradáveis e líquidos iônicos que são considerados solventes verdes. Além disso, o processo mostra uma eficiência energética, a prevenção de subprodutos e uma química segura para a prevenção de acidentes.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Tilman, D.; Hill, J.; Lehman C. *Science* **2006**, *314*, 1598-1600.
- (2) Tashtoush, G.; Al-Widyan, M. I.; Al-Shyoukh, A. O. *Applied Thermal Engineering* **2003**, *23*, 285-293.
- (3) Meher, L. C.; Vidya Sagar, D.; Naik, S. N. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **2006**, *10*, 248-268.
- (4) Toda, M.; Takagaki, A.; Okamura, M.; Kondo, J. N.; Hayashi, S.; Domen, K.; Hara, M. *Nature* **2005**, *438*, 178.
- (5) DaSilveira Neto, B. A.; Alves, M. B.; Lapis, A. A. M.; Nachtigall, F. M.; Eberlin, M. N.; Dupont, J.; Suarez, P. A. Z. *Journal of Catalysis* **2007**, *249*, 154-161.
- (6) Schuchardt, U.; Sercheli, R.; Vargas, R. M. *Journal Of The Brazilian Chemical Society* **1998**, *9*, 199-210.
- (7) He, H.; Wang, T.; Zhu, S. *Fuel* **2007**, *86*, 442-447.
- (8) Fukuda, H.; Kondo, A.; Noda, H. *Journal Of Bioscience And Bioengineering* **2001**, *92*, 405-416.
- (9) Du, W.; Wang, L.; Liu, D. *Green Chemistry* **2007**, *9*, 173-176.
- (10) Dupont, J.; Suarez, P. A. Z. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2006**, *8*, 2441-2452.
- (11) De Diego, T.; Lozano, P.; Gmouh, S.; Vaultier, M.; Iborra, J. L. *Biomacromolecules* **2005**, *6*, 1457-1464.
- (12) Lozano, P.; García-Verdugo, E.; Piamtongkam, R.; Karbass, N.; De Diego, T.; Burguete, M. I.; Luis, S. V.; Iborra, J. L. *Advanced Synthesis & Catalysis* **2007**, *349*, 1077-1084.
- (13) Lotero, E.; Liu, Y. J.; Lopez, D. E.; Suwannakarn, K.; Bruce, D. A.; Goodwin, J. G. *Industrial and Engineering Chemistry Research* **2005**, *44*, 5353-5363.
- (14) Campbell, M. K. *Biochemistry*; Saunders College: Philadelphia, 1999.
- (15) Reda, S. Y.; Carneiro, P. I. B. *Revista Analytica* **2007**, *27*, 60-67.
- (16) Nelson, D. L.; Cox, M. M. *Lehninger Principles of Biochemistry*; Worth Publishers: New York, 2000.
- (17) Ma, F.; Hanna, M. A. *Bioresource Technology* **1999**, *70*, 1-15.
- (18) Ferrari, R. A.; Oliveira, V. D.; Scabio, A. *Quimica Nova* **2005**, *28*, 19-23.
- (19) Costa Neto, P. R., *Tese de Doutorado*; UFSC, 2002.
- (20) ABIOVE, http://www.abiove.com.br/estatistica_br_0708.html; acessada em dezembro/2008.
- (21) Rodrigues, R. C.; Volpato, G.; Wada, K.; Ayub, M. A. Z. *Journal Of The American Oil Chemists Society* **2008**, *85*, 925-930.
- (22) Ranganathan, S. V.; Narasimhan, S. L.; Muthukumar, K. *Bioresource Technology* **2008**, *99*, 3975-3981.
- (23) ANP, http://www.anp.gov.br/petro/legis_biodiesel.asp; acessada em março/2009.
- (24) ASTM, <http://www.astm.org/Standards/D6751.htm>; acessada em março/2009.
- (25) Agarwal, A. K. *Progress in Energy and Combustion Science* **2007**, *33*, 233-271.
- (26) Pinto, A. C.; Guarieiro, L. L. N.; Rezende, M. J. C.; Ribeiro, N. M.; Torres, E. A.; Lopes, W. A.; Pereira, P. A. P.; Andrade, J. B. *Journal Of The Brazilian Chemical Society* **2005**, *16*, 1313-1330.
- (27) Peterson, C. L.; Hustrulid, T. *Biomass and Bioenergy* **1998**, *14*, 91-101.

- (28) Bagley, S. T.; Gratz, L. D.; Johnson, J. H.; McDonald, J. F. *Environmental Science & Technology* **1998**, *32*, 1183-1191.
- (29) Fernando, S.; Hall, C.; Jha, S. *Energy & Fuels* **2006**, *20*, 376-382.
- (30) Bozbas, K. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **2008**, *12*, 542-552.
- (31) Luque, R.; Herrero-Davila, L.; Campelo, J. M.; Clark, J. H.; Hidalgo, J. M.; Luna, D.; Marinas, J. M.; Romero, A. A. *Energy & Environmental Science* **2008**, *1*, 542-564.
- (32) Sheehan, J.; Camobreco, V.; Duffield, J.; Graboski, M.; Shapouri, H. *An Overview of Biodiesel and Petroleum Diesel Life Cycles*, 1998.
- (33) Frondel, M.; Peters, J. *Energy Policy* **2007**, *35*, 1675-1684.
- (34) Freedman, B.; Butterfield, R. O.; Pryde, E. H. *Journal Of The American Oil Chemists Society* **1986**, *63*, 1375-1380.
- (35) Demirbas, A. *Energy Conversion and Management* **2008**, *49*, 125-130.
- (36) Georgogianni, K. G.; Kontominas, M. G.; Pomonis, P. J.; Avlonitis, D.; Gergis, V. *Energy & Fuels* **2008**, *22*, 2110-2115.
- (37) Zheng, S.; Kates, M.; Dubé, M. A.; McLean, D. D. *Biomass and Bioenergy* **2006**, *30*, 267-272.
- (38) Liu, X.; Piao, X.; Wang, Y.; Zhu, S. *Energy & Fuels* **2008**, *22*, 1313-1317.
- (39) Chai, F.; Cao, F.; Zhai, F.; Chen, Y.; Wang, X.; Sua, Z. *Advanced Synthesis & Catalysis* **2007**, *349*, 1057-1065.
- (40) Nelson, L. A.; Foglia, T. A.; Marmer, W. N. *Journal Of The American Oil Chemists Society* **1996**, *73*, 1191-1195.
- (41) Iso, M.; Chen, B. X.; Eguchi, M.; Kudo, T.; Shrestha, S. *Journal Of Molecular Catalysis B-Enzymatic* **2001**, *16*, 53-58.
- (42) Shimada, Y.; Watanabe, Y.; Sugihara, A.; Tominaga, Y. *Journal Of Molecular Catalysis B-Enzymatic* **2002**, *17*, 133-142.
- (43) Marchetti, J. M.; Miguel, V. U.; Errazu, A. F. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **2007**, *11*, 1300-1311.
- (44) Sanli, H.; Canakci, M. *Energy & Fuels* **2008**, *22*, 2713-2719.
- (45) Harding, K. G.; Dennis, J. S.; von Blottnitz, H.; Harrisona, S. T. L. *Journal of Cleaner Production* **2007**, *16*, 1368-1378.
- (46) Van Gerpen, J. *Fuel Processing Technology* **2005**, *86*, 1097-1107.
- (47) Amorim, H. L. N., *Dissertação de Mestrado*; UFRGS, 1997.
- (48) Voet, D.; Voet, J. G. *Biochemistry*; John Wiley & Sons: Hoboken, 2004.
- (49) Berg, J. M.; Tymoczko, J. L.; Stryer, L. *Biochemistry*; W.H. Freeman: New York, 2003.
- (50) Gandhi, N. N. *Journal Of The American Oil Chemists Society* **1997**, *74*, 621-634.
- (51) Costa, V. E. U.; Amorim, H. L. N. *Quimica Nova* **1999**, *22*, 863-873.
- (52) Salis, A.; Pinna, M.; Monduzzi, M.; Solinas, V. *Journal Of Biotechnology* **2005**, *119*, 291-299.
- (53) Watanabe, Y.; Shimada, Y.; Sugihara, A.; Noda, H.; Fukuda, H.; Tominaga, Y. *Journal Of The American Oil Chemists Society* **2000**, *77*, 355-360.
- (54) Kaieda, M.; Samukawa, T.; Kondo, A.; Fukuda, H. *Journal Of Bioscience And Bioengineering* **2001**, *91*, 12-15.
- (55) Wu, W. H.; Foglia, T. A.; Marmer, W. N.; Phillips, J. G. *Journal Of The American Oil Chemists Society* **1999**, *76*, 517-521.
- (56) Foresti, M. L.; Pedernera, M.; Ferreira, M. L.; Bucalá, V. *Applied Catalysis A: General* **2008**, *334*, 65-72.

- (57) Samukawa, T.; Kaieda, M.; Matsumoto, T.; Ban, K.; Kondo, A.; Shimada, Y.; Noda, H.; Fukuda, H. *Journal Of Bioscience And Bioengineering* **2000**, *90*, 180-183.
- (58) Royon, D.; Daz, M.; Ellenrieder, G.; Locatelli, S. *Bioresource Technology* **2007**, *98*, 648-653.
- (59) Kaieda, M.; Samukawa, T.; Matsumoto, T.; Ban, K.; Kondo, A.; Shimada, Y.; Noda, H.; Nomoto, F.; Ohtsuka, K.; Izumoto, E.; Fukuda, H. *Journal Of Bioscience And Bioengineering* **1999**, *88*, 627-631.
- (60) Ban, K.; Hama, S.; Nishizuka, K.; Kaieda, M.; Matsumoto, T.; Kondo, A.; Noda, H.; Fukuda, H. *Journal Of Molecular Catalysis B-Enzymatic* **2002**, *17*, 157-165.
- (61) Hama, S.; Yamaji, H.; Fukumizu, T.; Numata, T.; Tamalampudi, S.; Kondo, A.; Noda, H.; Fukuda, H. *Biochemical Engineering Journal* **2007**, *34*, 273-278.
- (62) Shimada, Y.; Watanabe, Y.; Samukawa, T.; Sugihara, A.; Noda, H.; Fukuda, H.; Tominaga, Y. *Journal Of The American Oil Chemists Society* **1999**, *76*, 789-793.
- (63) Chen, J. W.; Wu, W. T. *Journal Of Bioscience And Bioengineering* **2003**, *95*, 466-469.
- (64) Goma-Doncescu, N.; Legoy, M. D. *Journal Of The American Oil Chemists Society* **1997**, *74*, 1137-1143.
- (65) Abigor, R.; Uadia, P.; Flogia, T.; Haas, M.; Jones, K.; Okpefa, E.; Obibuzor, J.; Bafor, M. *Biochemical Society Transactions* **2000**, *28*, 979-981.
- (66) Shah, S.; Sharma, S.; Gupta, M. N. *Energy & Fuels* **2004**, *18*, 154-159.
- (67) Al-Zuhair, S.; Jayaraman, K. V.; Krishnan, S.; Chan, W. H. *Biochemical Engineering Journal* **2006**, *30*, 212-217.
- (68) Shieh, C.-J.; Liao, H.-F.; Lee, C.-C. *Bioresource Technology* **2003**, *88*, 103-106.
- (69) Van Rantwijk, F.; Sheldon, R. A. *Chemical Reviews* **2007**, *107*, 2757-2785.
- (70) Park, S.; Kazlauskas, R. J. *Current Opinion in Biotechnology* **2003**, *14*, 432-437.
- (71) Yang, Z.; Pan, W. *Enzyme and Microbial Technology* **2005**, *37*, 19-28.
- (72) Dupont, J.; de Souza, R. F.; Suarez, P. A. Z. *Chemical Reviews* **2002**, *102*, 3667-3691.
- (73) Dupont, J. *Quimica Nova* **2000**, *23*, 825-831.
- (74) Dupont, J. *Journal Of The Brazilian Chemical Society* **2004**, *15*, 341-350.
- (75) Dupont, J.; Spencer, J. *Angewandte Chemie-International Edition* **2004**, *43*, 5296-5297.
- (76) Chiappe, C.; Pieraccini, D. *Journal Of Physical Organic Chemistry* **2005**, *18*, 275-297.
- (77) Dupont, J.; Consorti, C. S.; Spencer, J. *Journal Of The Brazilian Chemical Society* **2000**, *11*, 337-344.
- (78) Zhao, D.; Wu, M.; Kou, Y.; Min, E. *Catalysis Today* **2002**, *2654*, 1-33.
- (79) Earle, M. J.; Seddon, K. R. *Pure and Applied Chemistry* **2000**, *72*, 1391-1398.
- (80) Prado, A. G. S. *Quimica Nova* **2003**, *26*, 738-744.
- (81) Silva, F. M.; Lacerda, P. S. B.; Junior, J. J. *Quimica Nova* **2005**, *28*, 103-110.
- (82) Albini, A.; Fagnoni, M. *ChemSusChem* **2008**, *1*, 63-66.
- (83) Cassol, C. C.; Ebeling, G.; Ferrera, B.; Dupont, J. *Advanced Synthesis & Catalysis* **2006**, *348*, 243-248.
- (84) Holcapek, M.; Jandera, P.; Fischer, J.; Prokes, B. *Journal of Chromatography A* **1999**, *858*, 13-31.
- (85) Suarez, P. A. Z.; Einloft, S.; Dullius, J. E. L.; de Souza, R. F.; Dupont, J. *Journal De Chimie Physique Et De Physico-Chimie Biologique* **1998**, *95*, 1626-1639.

- (86) Fonseca, G. S.; Umpierre, A. P.; Fichtner, P. F. P.; Teixeira, S. R.; Dupont, J. *Chemistry-A European Journal* **2003**, *9*, 3263-3269.
- (87) Micaêlo, N. M.; Soares, C. M. *The Journal of Physical Chemistry B* **2008**, *112*, 2566-2572.
- (88) Ulbert, O.; Belafi-Bako, K.; Tonova, K.; Gubcza, L. *Biocatalysis and Biotransformation* **2005**, *23*, 177-183.
- (89) Zhao, H. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2005**, *37*, 16-25.
- (90) Van Rantwijk, F.; Secundo, F.; Sheldon, R. A. *Green Chemistry* **2006**, *8*, 282-286.
- (91) Watanabe, Y.; Shimada, Y.; Sugihara, A.; Tominaga, Y. *Journal Of Molecular Catalysis B-Enzymatic* **2002**, *17*, 151-155.
- (92) Abbott, A. P.; Cullis, M. P. M.; Gibson, M. J. J.; Harris, R. C. C.; Raven, E. *Green Chemistry* **2007**, *8*, 868-872.
- (93) Lozano, P.; De Diego, T.; Carrié, D.; Vaultier, M.; Iborra, J. L. *Biotechnology Letters* **2001**, *23*, 1529-1533.