

Artigo

Enzimas e Líquidos Iônicos: Uma Combinação Promissora para um Biodiesel Limpo

Medeiros, G. A.; Gonçalves, S. B.; Rodrigues, D. S.; Neto, B. A. D.*

Rev. Virtual Quim., 2013, 5 (1), 74-94. Data de publicação na Web: 30 de janeiro de 2013

<http://www.uff.br/rvq>

Enzymes and Ionic Liquids: a Promising Combination Towards a Clean Biodiesel

Abstract: The current manuscript describes the advantages of ionic liquids and lipases (enzymes) association towards a clean biodiesel. Acidic and basic catalytic processes, as their technological drawbacks are discussed herein. The main interaction between such enzymes and ionic liquids are presented for a better understanding of the improvement on the catalytic activity of lipase enzymes when these biocatalysts are supported on an ionic media. Selected examples of recent scientific literature are described to show the promising and powerful combination towards a clean biodiesel synthesis.

Keywords: Biodiesel; enzymes; ionic liquids.

Resumo

O presente artigo descreve as vantagens decorrentes da combinação de líquidos iônicos com enzimas (lipases) visando à obtenção de um biodiesel mais limpo. São discutidos os processos catalisados por ácidos e por bases e as suas desvantagens são discutidas. As principais interações entre as enzimas e os líquidos iônicos são apresentadas para se entender o porquê de uma melhora na atividade catalítica de lipases quando estes biocatalisadores são suportados neste meio iônico. Exemplos selecionados da literatura científica atual são descritos para exemplificar o poder e a perspectiva desta combinação tão promissora para a síntese de um biodiesel limpo.

Palavras-chave: Biodiesel; enzimas; líquidos iônicos.

* Universidade de Brasília, Laboratório de Química Medicinal e Tecnológica, Instituto de Química, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Asa Norte, Caixa Postal 4478, CEP: 70904-970, Brasília-DF, Brasil.

✉ brenno.ipi@gmail.com

DOI: [10.5935/1984-6835.20130008](https://doi.org/10.5935/1984-6835.20130008)

Enzimas em Líquidos Iônicos: Uma Combinação Promissora para um Biodiesel Limpo

Gisele A. Medeiros,^{a,b} Silvia B. Gonçalves,^b Dasciana S. Rodrigues,^b
Brenno A. D. Neto^{a,*}

^a Universidade de Brasília, Laboratório de Química Medicinal e Tecnológica, Instituto de Química, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Asa Norte, Caixa Postal 4478, CEP: 70904-970, Brasília-DF, Brasil.

^b Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro Nacional de Pesquisa de Agroenergia. Parque Estação Biológica - PqEB s/n, Asa Norte, Brasília, Brasil. CEP 70770-901.

* brenno.ipi@gmail.com

Recebido em 29 de janeiro de 2013. Aceito para publicação em 30 de janeiro de 2013

1. Introdução
2. Enzimas e a Classe das Lipases
 - 2.1. Lipases
3. Líquidos Iônicos e Enzimas
4. Síntese Enzimática de Biodiesel em Líquidos Iônicos
5. Conclusões e Perspectivas

1. Introdução

As questões relativas ao uso e a geração de energia são, cada vez mais, assunto de muitos debates, controvérsias, crises e preocupações.^{1,2} A geração de energia nos seus primórdios baseava-se na força de animais e humanos e em recursos naturais como vento, água e carvão vegetal. O melhor aproveitamento do uso do carvão vegetal pelos ingleses levou a invenção e popularização da máquina a vapor e deu início a Primeira Revolução Industrial. Durante muito tempo o carvão foi a principal fonte de energia. Com a descoberta do petróleo, os “fornos à vapor” foram sendo

substituídos por motores de combustão interna acionados por sistemas de ignição, e a queima deste combustível é até hoje dominante no mundo. Com o aumento crescente da população mundial e, em consequência, das necessidades de transporte, a queima de combustíveis fósseis aumentou significativamente a emissão de gases poluentes, e estudos recentes apontam que estes gases são responsáveis pelo aumento da temperatura do planeta, degelo das calotas polares, extinção de algumas espécies marinhas, diminuição excessiva do pH das chuvas (chuvas ácidas), alteração de correntes marinhas e do surgimento e agravamento de doenças respiratórias crônicas.³⁻⁵

Uma das soluções para enfrentar a crise energética mundial, com grande aceitabilidade, é o desenvolvimento de fontes renováveis de energia. Um exemplo atual é a utilização do bicomcombustível (e.g. biodiesel) como substituto do diesel, hoje, parcialmente, mas com perspectiva de substituição total. Os óleos vegetais são extremamente eficientes em processos de combustão, o que é sabido desde 1900. Rudolf Diesel testou em seu motor (denominado motor a diesel) o petróleo bruto e o óleo de amendoim. Em ambos os casos, o motor funcionou, porém, naquela época o petróleo era a alternativa mais viável do ponto de vista econômico, pois suas fontes pareciam, a princípio, inesgotáveis.⁶

Entre os biocombustíveis utilizados atualmente,⁷ destacam-se o etanol e o biodiesel.⁸⁻¹⁰ O Brasil é a referência mundial,

desde a década de 70, no uso de etanol como combustível. Atualmente, observa-se um forte investimento governamental para o desenvolvimento de tecnologia do biodiesel, levando o Brasil a se destacar no cenário mundial. A produção brasileira de biodiesel cresce anualmente. A Figura 1 exemplifica o aumento da produção nacional de biodiesel puro (B100), desde 2005. Pode-se observar que a partir de 2008, o aumento passou a ser mais expressivo. Isso ocorreu porque naquele ano a mistura do biodiesel puro (B100) ao óleo diesel passou a ser obrigatória. Inicialmente eram adicionados 2 % de biodiesel no óleo diesel e, atualmente, o percentual é de 5 %, segundo a Resolução CPNE nº 6 de 16/09/2009 da Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP).

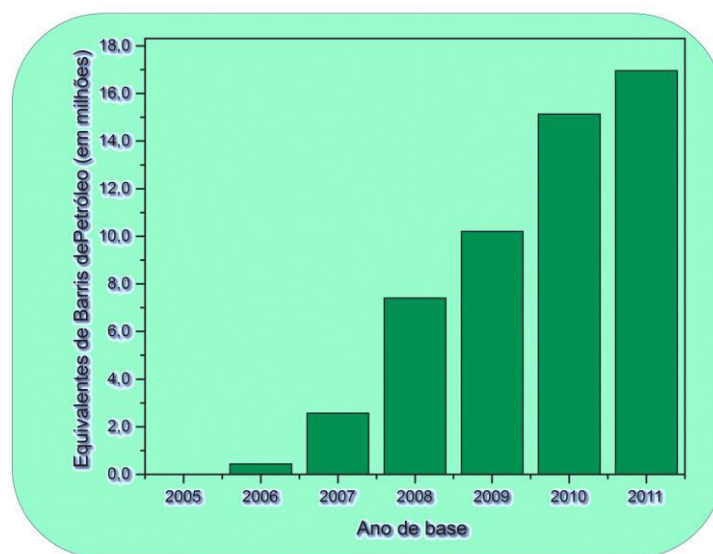


Figura 1. Crescimento da produção nacional de biodiesel puro (B100) por todas as unidades produtoras autorizadas pela ANP desde 2005. (Adaptado da referência 20)

Por possuir características extremamente atrativas, o biodiesel é, sem dúvida, uma alternativa como substituto do diesel mineral. Algumas destas características são:

(i) É obtido a partir matérias-primas renováveis;

(ii) Sua combustão gera menos hidrocarbonetos, monóxido de carbono e

policíclicos aromáticos do que o diesel, além de não produzir dióxido de enxofre;

(iii) Por ser menos viscoso que o óleo diesel, proporciona maior lubrificidade do motor, desgastando menos suas partes;

(iv) Maior eficiência de queima e diminuição significativa de resíduos nas partes internas do motor;

(v) Estudos de ciclo de vida mostram que o biodiesel gera mais de três vezes a energia necessária do que para sua produção, além de proporcionar um saldo negativo de dióxido de carbono, porque sua biossíntese nas plantas fixa CO₂.⁸

Entretanto, pelo fato de ser uma tecnologia extremamente promissora,¹¹ atual e em fase de implementação, a produção do biodiesel ainda apresenta inúmeros problemas tecnológicos. A própria síntese do biodiesel exemplifica esses problemas. Atualmente, o biodiesel produzido no Brasil é sintetizado principalmente através da reação de transesterificação entre óleos vegetais (principalmente o óleo de soja) e monoalcoóis (metanol ou etanol) em reações catalisadas por uma base ou um ácido. Há muito tempo, óleos e gorduras animais e vegetais (constituídos essencialmente por triacilglicerídeos) desempenham um papel importante em muitos segmentos industriais e comerciais, como materiais poliméricos, lubrificantes, biocombustíveis, revestimentos, adesivos estruturais, tintas, entre outros.¹²⁻¹³

O processo que utiliza catálise ácida requer considerável excesso de álcool para obtenção do produto em alto rendimento. Em contrapartida, a catálise básica favorece reações de saponificação, o que dificulta a purificação dos ésteres formados. Em ambos os casos, pode-se observar corrosão nos reatores, provocada pelo meio altamente básico ou ácido, e grande quantidade de água é necessária para a purificação dos ésteres.¹⁴ O excesso de água gera grandes quantidades de rejeitos com pH inadequado para o descarte e uma elevação significativa no custo do tratamento dos resíduos.

Na Bélgica foi depositada a primeira patente mundial relacionada à etanolise de óleo vegetal (no caso dendê), a qual utilizava bases fortes de Bronsted como catalisadores, como: hidróxidos e alcóxidos de metais alcalinos.¹⁵ Um fato relevante a ser destacado é que este sistema catalítico não pode ser aplicado ao se trabalhar com óleos e gorduras com alto índice de acidez, ou alta

concentração de ácidos graxos livres, devido ao favorecimento da reação indesejável de saponificação, que consome o catalisador e gera sabões em grandes quantidades, levando a formação de emulsões estáveis que dificultam a separação e purificação do biodiesel, sendo essa a principal limitação do sistema catalítico patenteado. Os ácidos fortes de Bronsted foram propostos inicialmente nos Estados Unidos,¹⁶ sendo os principais exemplos os ácidos sulfúrico, fosfórico, clorídrico e organossulfônicos. Os ácidos de Bronsted são preteridos na indústria por serem muito agressivos para os equipamentos, causando um desgaste mais rápido e, por isso, exigindo maiores investimentos e encarecendo o produto, e também por possuírem atividades até 4000 vezes inferiores às dos catalisadores básicos.¹⁷

Tendo em vista todos os aspectos apresentados bem como suas dificuldades inerentes, a catálise usando ácidos de Lewis ou organometálicos tornou-se, naturalmente, a melhor opção para a produção de biodiesel. Na catálise homogênea com metais como Sn⁺², Cd⁺², Zn⁺² e Pb⁺² foram empregados alguns métodos catalíticos com relativo sucesso.¹⁸⁻¹⁹ Entretanto, as condições mais drásticas, inviabilizam, de certa forma, a produção em larga escala e, conseqüentemente, o emprego destas metodologias na indústria. Além de haver contaminação do produto com os respectivos metais, o que é altamente indesejável.

Com o objetivo de se minimizar tantos e diversos problemas tecnológicos associados à síntese de biodiesel, métodos alternativos como o da catálise bifásica (heterogênea), uso de bases orgânicas e mesmo a utilização de diferentes enzimas foram testados ao longo dos anos.²¹⁻²⁴ Ainda hoje, as principais formas de obtenção deste biocombustível ocorrem por vias catalíticas ácidas e básicas, sendo a catálise básica amplamente predominante. Como citado anteriormente, estas vias catalíticas apresentam inúmeras desvantagens. Sendo assim, neste artigo, abordaremos a utilização de lipases

suportadas em líquidos iônicos como meio de síntese do biodiesel, pelo fato de ser um dos sistemas mais promissores no que diz respeito à facilidade de manuseio do catalisador, a obediência aos princípios da química verde e a diversas outras vantagens que serão melhor abordadas e discutidas ao longo do texto.

2. Enzimas e a Classe das Lipases

Enzimas são proteínas capazes catalisar reações biológicas para viabilizar a manutenção e desenvolvimento de células. As proteínas são formadas por ligações amídicas peptídicas entre aminoácidos, e as cadeias podem conter centenas ou até milhares de aminoácidos. A interação entre aminoácidos de diferentes posições da cadeia levam à formação de uma estrutura terciária (Figura 2), cuja integridade é importante para preservação da atividade catalítica destas enzimas.²⁵ A descoberta de que as enzimas podem catalisar reações em ambientes muito diferentes daqueles nos quais elas foram originalmente produzidas e desenhadas para

exercer as suas funções, permitiu o desenvolvimento de novas rotas de síntese de moléculas cuja produção com catalisadores químicos era muito difícil, ou mesmo inviável. Atualmente, vários processos industriais empregam enzimas em diferentes meios, inclusive na presença de solventes orgânicos.²⁶⁻²⁷ Uma das principais vantagens na utilização de enzimas como catalisadores é a seletividade observada nas reações. Isto ocorre devido à preferência elevada por um determinado substrato, ou seja, à capacidade de reconhecer a estrutura de moléculas.²⁸ Do ponto de vista industrial isto é muito interessante, pois facilita a purificação do produto de interesse. Outra vantagem dos processos enzimáticos relaciona-se com o gasto energético. A maioria das enzimas apresenta bom desempenho em condições suaves de temperatura e pressão, demandando baixo consumo de energia quando comparado a outros processos. Além destas vantagens, os processos enzimáticos atendem ao grande apelo ambiental devido ao menor acúmulo de resíduos, pois as enzimas são biodegradáveis.^{29,30}

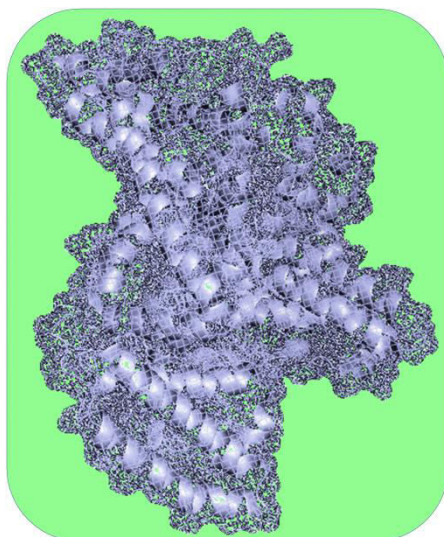


Figura 2. Representação tridimensional da proteína BSA (albumina do soro bovino). Estrutura obtida por difração de raios-X disponível gratuitamente no PDB (*Protein Data Bank* - <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>) sob a identificação PDB ID 3V03

Apesar de as vantagens supracitadas, o elevado custo de produção das enzimas ainda é um dos principais obstáculos para a aplicação comercial mais ampla destes biocatalisadores. Estratégias para estabilização e reuso de enzimas vem sendo investigadas há muito tempo para viabilizar a sua utilização na produção em larga escala de produtos de valor unitário final relativamente baixo, mas que têm grande importância do ponto de vista ambiental, como ocorre com os biocombustíveis.³¹⁻³⁴

O biodiesel, um dos principais biocombustíveis utilizados, é um líquido semelhante ao diesel de petróleo. Entretanto, o biodiesel não tem contaminantes indesejáveis do diesel oriundo do petróleo, como, por exemplo, o enxofre, o que reduz a emissão de poluentes durante a queima.³⁵⁻³⁶ Processos de síntese do biodiesel também podem envolver o uso de líquidos iônicos, fluídos supercríticos, combinações de ambos e mesmo processos de pirólise,^{33,38-40} visando desta forma, a superação dos problemas apresentados por processos puramente ácidos ou alcalinos.^{21,35,40-41} Neste sentido, uma alternativa viável é utilizar a transesterificação enzimática.³³ A transesterificação neste processo ocorre através do uso de lipases, enzimas amplamente utilizadas em reações em meio aquoso e não aquoso, sendo uma das classes

de enzimas mais importantes em processos biotecnológicos.^{28,42}

2.1. Lipases

As lipases (Triacilgliceril-hidrolases, E.C. 3.1.1.3 - Figura 3) desempenham importante função na natureza, a de metabolizar gorduras, uma das principais fontes de energia para os seres vivos. O substrato natural dessas enzimas são os triglicerídeos, porém elas podem catalisar a síntese ou a hidrólise de outros ésteres de ácidos graxos.⁴³ As lipases podem catalisar reações de hidrólise, alcoólise, acidólise, esterificação e transesterificação.³⁷

As lipases podem ser encontradas em tecidos de animais e plantas, podendo também ser produzidas por microorganismos. A escolha da fonte de lipases para aplicações industriais deve levar em consideração a possibilidade de utilização de mono-, di- e triglicerídeos, a utilização de ácidos graxos livres, baixa inibição pelo produto, alta atividade em meio aquoso e não-aquoso, potencial de utilização continuada, estabilidade frente a agentes distorcionantes *e.g.* temperatura e o uso de solventes.^{42,44}

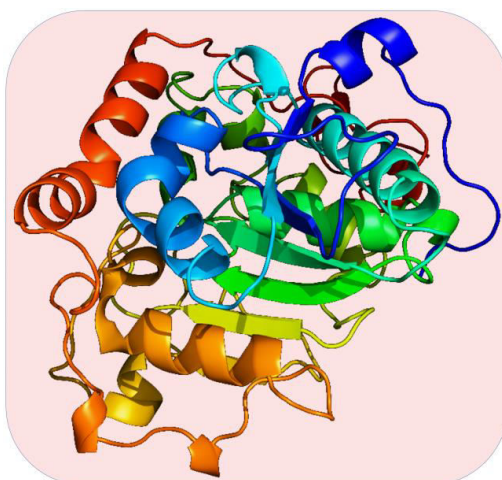


Figura 3. Representação tridimensional da enzima lipase B da *Candida antarctica*. Estrutura obtida por raios-X disponível no PDB (*Protein Data Bank* - <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>) sob a identificação PDB ID 1TCB

A utilização de lipases como catalisadores permite a execução de processos em condições mais suaves de reação com excelente controle e eficiência do processo.⁴⁵ Além disto, não é raro o caso em que lipases apresentam substancial atividade em solventes quase anidros, com manutenção de sua estabilidade e atividade sob grandes variações de condições experimentais.⁴⁶

Com base nas características de lipases de diferentes fontes é possível observar fortes variações em suas propriedades físicas e químicas. A massa molecular de lipases é função do tipo de lipase e pode variar de 19,4 kDa até valores superiores a 300 kDa.⁴⁷ A temperatura ótima de atividade de cada lipase é relacionada com a fonte natural destas enzimas. Ou seja, é possível observar lipases que atuam em temperaturas ótimas de atividade desde 4 °C (organismos psicrófilos)⁴⁸ até temperaturas acima de 100 °C (organismos extremófilos e hipertermófilos).⁴⁹

A aplicação de lipases em muitos processos industriais deve-se a sua seletividade e especificidade.^{41-42,50-51} A seletividade consiste na capacidade da enzima distinguir entre dois ou mais substratos diferentes,⁵² e a especificidade pode ser entendida como a capacidade que a enzima tem de gerar um único produto a partir de um determinado substrato, sendo que algumas enzimas podem gerar diferentes produtos a partir de um substrato.

2.1.1. Mecanismo de Ativação para Lipases e a Transesterificação

Lipases de diferentes fontes têm estruturas terciárias diferentes de modo a atingir um melhor desempenho catalítico. Muitas lipases, quando são dissolvidas em água, assumem, eventualmente, duas estruturas distintas: uma fechada (inativa) e outra aberta (ativa), predominando a forma inativa. Na forma inativa, o sítio ativo da lipase está coberto por uma cadeia de aminoácidos, chamada “tampa”. Na presença

de moléculas hidrofóbicas (e.g. triacilglicerídeos), a tampa desloca-se liberando o sítio ativo, tornando a enzima ativa.⁵³⁻⁵⁴ Este mecanismo é coerente com o entendimento atual de seleção conformacional para o funcionamento das enzimas.⁵⁵⁻⁵⁶

Se uma solução ou mistura contendo uma determinada lipase também contém estruturas hidrofóbicas i.e. triacilglicerídeos, partículas sólidas hidrofóbicas, bolhas de gás, proteínas hidrofóbicas, lipopolissacarídeos ou alguns tipos de solventes, a forma aberta das lipases se torna predominante.^{43,57-58} A ativação interfacial que ocorre pela interação da área que rodeia o sítio ativo com superfícies hidrofóbicas, modifica as propriedades funcionais das lipases, tornando-as mais eficazes. Esta característica é utilizada também com o objetivo de purificar, imobilizar e hiperativar algumas lipases.

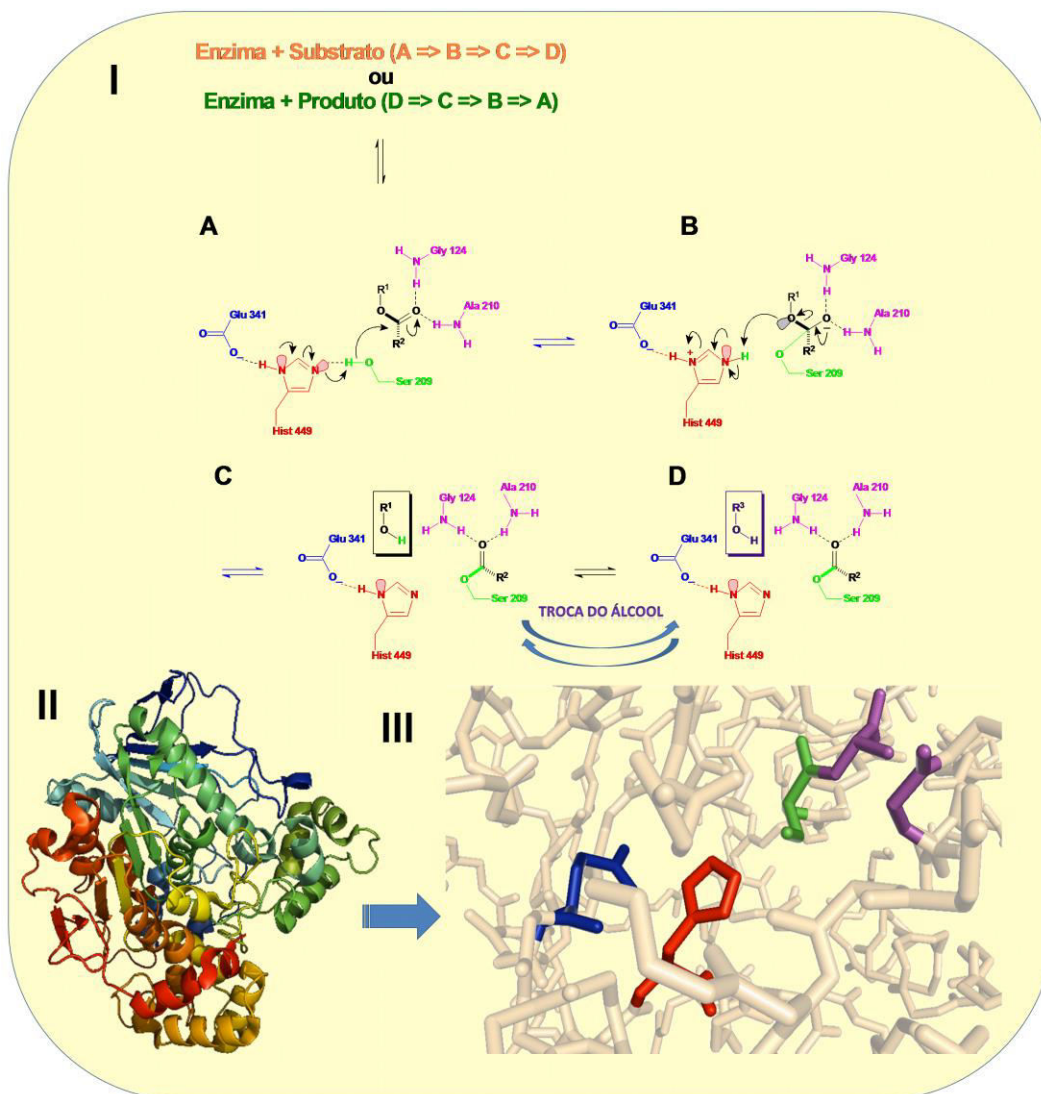
A afinidade de lipases por superfícies hidrofóbicas é utilizada para purificação destas enzimas. Geralmente, durante o cultivo de micro-organismos para produção dessas enzimas, elas são excretadas para um meio contendo centenas de moléculas diferentes (contaminantes). Ao se adicionar um adsorvente hidrofóbico (partículas sólidas hidrofóbicas) no meio contendo as enzimas lipases e contaminantes, somente as lipases serão aderidas ao adsorvente, obtendo-se assim, esta enzima com elevado grau de pureza.⁵⁸⁻⁵⁹

Outro fenômeno observado em soluções aquosas de lipases é a formação de agregados proteicos. A formação destes agregados pode alterar a atividade catalítica, estabilidade e enantiosseletividade da enzima. Isto ocorre porque a interação interproteica (entre duas ou mais lipases) ocorre principalmente através de áreas hidrofóbicas que cercam o centro ativo. Por exemplo, lipases derivadas da *Candida rugosa*, *Humicola lanuginosa* e *Mucor miehei* tendem a formar agregados bimoleculares, em solução. Para conseguir a predominância de formas monoméricas é necessário preparar soluções enzimáticas em baixas

concentrações, preferencialmente, na presença de detergentes. Uma exceção é a lipase da *Candida antarctica* do tipo B, para a qual não se observa agregados em soluções em água convencionais.⁵⁸

A reação de transesterificação de triacilglicerídeos, ou a esterificação direta do

ácido graxo, segue o mecanismo de ativação pela lipase utilizando-se a tríade catalítica, tipicamente Ser-His-Glu (serina – histidina – ácido glutâmico). O Esquema 1 mostra o mecanismo proposto para este tipo de reação.⁶⁰⁻⁶¹



Esquema 1. (I) Mecanismo típico de transesterificação (esterificação) promovido por lipases. No presente exemplo, os resíduos de aminoácidos indicados são da lipase de *Candida rugosa*. O substrato (em preto) é ativado, neste caso, pelos resíduos de glicina e alanina, facilitando a reação da tríade catalítica (serina – histidina – ácido glutâmico). (II) Representação tridimensional da enzima lipase de *Candida rugosa*. Estrutura obtida por difração de raios-X disponível no PDB (*Protein Data Bank* - <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>) sob a identificação PDB ID 1ZG7. (III) Expansão da região do sítio catalítico da enzima lipase de *Candida rugosa*. Note que os resíduos de aminoácidos estão nas posições dadas na estrutura de raios-X mostrada em (II)

Uma glicina (Gly) e uma alanina (Ala) participam da ativação do grupo C=O que irá sofrer a reação de esterificação ou transesterificação próximo ao sítio catalítico da lipase (no caso a *Candida rugosa*). Uma vez que o substrato encontra-se ativado, um mecanismo concertado e em equilíbrio acontece, conforme indicado no Esquema 1, indo de “A” para “B”. Na etapa consecutiva (“B” para “C”) a porção álcool (ou água, quando R¹ = H) do substrato é eliminada, e o mesmo permanece covalentemente unido no sítio catalítico da enzima. Após, o subproduto formado (R¹-OH) é trocado pela nova porção alcoólica que se deseja inserir no substrato (R³-OH), a qual se encontra, normalmente, em excesso no meio de reação. Considerando que o processo acontece em equilíbrio, a liberação do produto acontecerá no caminho inverso ao indicado (D → C → B → A).

2.1.2. Aplicações de Lipases

A busca por tecnologias de produção de baixo custo e ambientalmente favoráveis despertaram o interesse mundial para o desenvolvimento de processos utilizando biocatalisadores em áreas como química fina, farmacêutica, alimentos, têxtil, detergentes, biocombustíveis e agroquímica.⁶²⁻⁶⁴ As lipases, neste contexto, aparecem como um dos principais biocatalisadores utilizados na produção de ésteres, ácidos, alcoóis e outros compostos obtidos por rotas químicas mais dispendiosa.⁵⁵

Algumas aplicações de lipases:

(i) Síntese e modificação de lipídeos para obtenção de melhores propriedades físicas, químicas e nutricionais;⁶⁵

(ii) Síntese de ésteres para aplicações na produção de plastificantes, lubrificantes, fármacos, alimentos, detergentes, cosméticos;⁶⁶

(iii) Síntese de triglicerídeos com inserção de ácido graxo de interesse numa determinada posição do triglicerídeo;⁶⁷

(iv) Produção do aroma distinto de queijos do tipo cheddar;⁶⁸

(v) Produção de substitutos da manteiga, aditivos para cereais, balas, aperitivos e bolos;⁶³

(vi) Adição de lipases em detergentes para degradação lipolítica em processos de lavagem;⁶⁹

(vii) Síntese de compostos opticamente puros e polímeros para uso em alimentos como em produtos de cuidado pessoal da pele, bronzeadores e óleos de banho;⁶⁹

(viii) Produção de ésteres de açúcares para serem usados como biossurfactantes;⁶⁹

(ix) Síntese de produtos ou intermediários de fármacos e herbicidas;⁴⁵

(x) Síntese de biodiesel.³³

A literatura que destaca a aplicação de lipases em síntese e modificação do biodiesel, bem como as diferentes estratégias para melhora de suas atividades e estabilidades, vem aumentando significativamente. Atualmente, esta é uma das aplicações mais promissoras para lipases relacionadas à tecnologia limpa e sustentável de biocombustíveis, como será discutido neste artigo.

2.1.3. Lipases Aplicadas à Síntese de Biodiesel

Por todo o apelo ecológico e grande potencial catalítico das lipases, elas vêm sendo testadas sobre diferentes condições para obtenção de biocombustíveis, em especial o biodiesel. Diversos trabalhos podem ser encontrados na literatura científica explicando as diferentes estratégias utilizadas para melhorar a atividade catalítica e o rendimento de obtenção do biodiesel através do uso de lipases.⁷⁰

Como descrito recentemente, existem muitas vantagens ecológicas para se utilizar enzimas,⁷¹ entretanto, muitos desafios

tecnológicos ainda precisam ser vencidos. Dentre as vantagens do uso de lipases, pode-se destacar:

(i) As reações são, de forma geral, limpas;

(ii) As enzimas podem, em princípio, serem reutilizadas;

(iii) Os rejeitos gerados na reação de transesterificação são o glicerol e a água;

(iv) São evitados os problemas tecnológicos que são observados na catálise ácida e na catálise básica;

(v) Não se observam corrosões nos equipamentos onde as reações são realizadas;

(vi) As enzimas são ecologicamente aceitáveis devido à biodegradabilidade;

(vii) O manuseio das enzimas, de forma geral, não requer maiores cuidados;

(viii) As reações promovidas por estes biocatalisadores não requerem, de forma geral, condições especiais como atmosfera inerte;

(ix) Enzimas são normalmente biocatalisadores não tóxicos;

(x) São muitas as fontes de obtenção destes biocatalisadores.

Por todos estes atrativos, as pesquisas com lipases para a obtenção de biodiesel, em especial, estão entre os destaques para a busca por tecnologias mais limpas e atrativas. Em todo este contexto, os líquidos iônicos são de grande valia para a superação de inúmeros obstáculos tecnológicos, como discutiremos na próxima seção.

3. Líquidos Iônicos e Enzimas

Os líquidos iônicos (LI) são hoje uma das classes de compostos mais promissoras para

se promover processos que atendam os princípios da Química Verde. Os LI mostram-se excelentes substitutos para os solventes orgânicos clássicos, com o diferencial de possuírem a possibilidade de moldagem de acordo com as necessidades da reação.⁷²⁻⁷³ Igualmente, LI são cada vez mais utilizados na Indústria Química em geral.⁷⁴

Apesar de ainda haver muita discussão na literatura sobre a real definição dos LI, existe um conceito mais amplo que parece ser consenso entre os especialistas neste assunto: LI são substâncias eletrolíticas líquidas, a temperaturas abaixo de 100 °C, constituídos exclusivamente por íons.^{72,75-76} Essas substâncias têm atraído um grande interesse, pois possuem características físico-químicas únicas que as tornam um meio extremamente atrativo,⁷³ como:

(i) Possuem pressão de vapor desprezível, ou seja, não contribuem para a poluição atmosférica da forma como contribuem os solventes clássicos, o que torna esses materiais muito atrativos e ecologicamente benéficos;

(ii) São bons solventes para muitos materiais orgânicos e inorgânicos. Isso permite que sejam usados em reações com ambos os tipos de reagentes, sendo, portanto, viáveis e extremamente atrativos do ponto de vista tecnológico e industrial;

(iii) São normalmente constituídos por íons que são fracamente coordenantes, por isso são potencialmente solventes de polaridades ajustáveis e não coordenantes;

(iv) É possível escolher-se o LI desejado dependendo da necessidade de solubilidade de algum outro solvente ou reagente para uma reação de catálise heterogênea;

(v) Por não serem inflamáveis podem ser utilizado em temperaturas elevadas, diminuindo os riscos;

(vi) Muitas reações orgânicas têm sua seletividade e rendimentos melhorados quando realizadas em LI;⁷⁷

(vii) Em muitos casos, os LI conseguem promover reações que são difíceis de serem realizadas em solventes orgânicos clássicos.⁷⁸

Alguns dos efeitos benéficos citados anteriormente podem ser atribuídos à natureza iônica inerente a estrutura desses materiais que são capazes, durante um processo de transformação, co-promover a formação e/ou estabilização de intermediários, em especial os iônicos e polares. Este efeito ocorre através da

formação de diversos pares iônicos e agregados supramoleculares:⁷² é o chamado “efeito do líquido iônico” (“*ionic liquid effect*”).

Os LI imidazólios estão entre os mais importantes e utilizados na atualidade. São estruturas bem organizadas e formam diversos canais iônicos, vistas por difração de raios-X de monocristais. A Figura 4 ilustra um LI dicatiônico, com um ânion $[\text{NiCl}_4]^{2-}$ em sua estrutura.⁷⁹

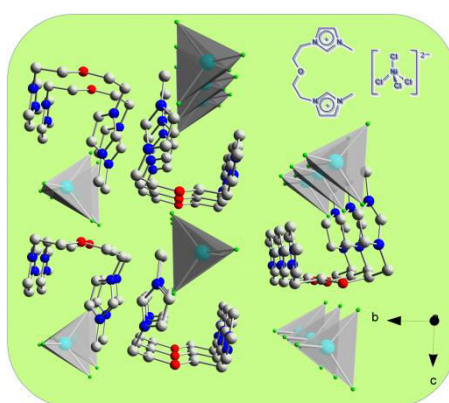


Figura 4. Vista cristalográfica da estrutura de um líquido iônico dicatiônico com o ânion $[\text{NiCl}_4]^{2-}$ ao longo do eixo a . Note que o ânion encontra-se representado como um tetraedro. (Adaptado da referência 79)

Com o aumento do interesse nestes materiais, vários tipos de reações foram testadas e modificadas com sucesso. Um exemplo disso são as reações onde se aplicam métodos catalíticos. O primeiro trabalho referente à biocatálise com enzimas em LI foi publicado em 2000.⁷² Desde então, o número de artigos dedicados ao estudo de reações biocatalisadas por enzimas vêm aumentando. A Figura 5 mostra graficamente, através dos anos, o crescimento do número de trabalhos em que os termos “*ionic liquid* and enzyme**” são usados.

Esse visível crescimento em publicações referente ao uso de enzimas em LI pode ser

atribuído ao fato de que a combinação destes materiais favorece o aumento da atividade enzimática, quando comparado aos solventes orgânicos convencionais (que inibem a atividade catalítica).⁷² O motivo para o incremento na atividade catalítica é inerente às características dos LI. Tais materiais iônicos, por serem moduláveis em suas propriedades, são atrativos visando estudos de combinações de cátions e ânions que possam contribuir para uma maior biocompatibilidade entre a enzima e o meio iônico, bem como aumentar a estabilidade térmica e estrutural enzimática devido as interações benéficas que resultam desta combinação.⁸⁰

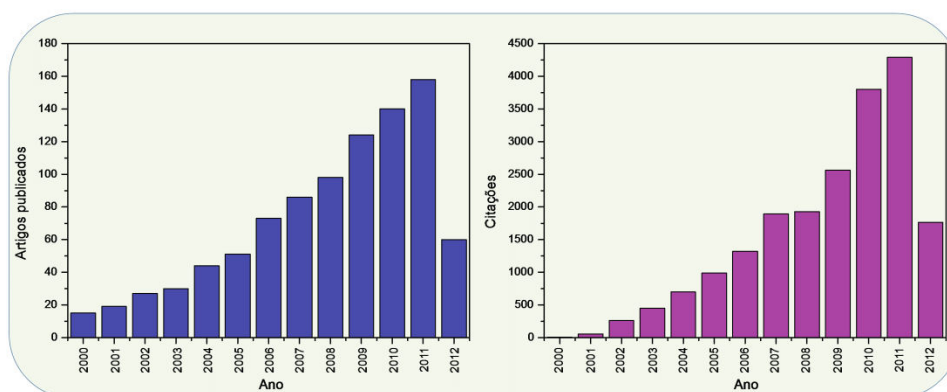


Figura 5. Número de artigos publicados por ano e as citações associadas às palavras-chave “*ionic liquid* and enzyme**”, entre os anos 2000 e 2012. Pesquisa realizada no *ISI Web of Science* em 05/06/2012

É importante ressaltar também que os LI podem ser considerados substâncias relativamente polares⁸¹ (de acordo com os parâmetros de Kamlet-Taft)⁸² contribuindo, por esse motivo, para a estabilização de estados de transição enzimáticos polares e atenuando eventuais distorções conformacionais causada pela desidratação da enzima, fatores esses que influenciam diretamente no aumento da atividade enzimática. Entretanto, deve-se tomar cuidado ao se associar a estabilidade de enzimas exclusivamente ao efeito de LI, pois a mesma pode ser inerente à sua estrutura natural, ou seja, pelo enovelamento característico de suas estruturas terciárias (e/ou quaternárias).

O interesse no estudo de enzimas em soluções contendo sais é bastante antigo e importante, principalmente se considerarmos que o meio natural destas proteínas é repleto de sais.⁸⁰ Sendo assim, a análise das interações iônicas e eletrostáticas em enzimas se faz fundamental para o entendimento de seu comportamento em sistemas biológicos. Os termos “*salting in*” e “*salting out*” surgiram deste estudo. Percebeu-se experimentalmente que ao se adicionar pequena quantidade de um sal a uma solução contendo enzimas os íons formados na dissociação do sal interagem com as proteínas diminuindo as interações enzima-enzima e, conseqüentemente,

aumentando a solubilização. Esse fenômeno foi denominado “*salting in*”. À medida que a concentração do sal aumenta na solução aquosa enzimática, a água passa a interagir mais fortemente com os íons formados, devido à solvatação preferencial. Isso leva à maior interação enzima-enzima e diminuição da interação com a água, ou seja, a solubilidade diminui, provocando a precipitação em processo conhecido como “*salting out*”.⁷²

Ao se discutir a estabilidade de enzimas em LI, os chamados “efeitos de Hofmeister” são fatores importantes a serem considerados. Ao perceber que o comportamento das enzimas frente a alguns íons seguia um padrão, Franz Hofmeister, em 1888, construiu uma série de cátions e uma de ânions que previa a estabilidade juntamente com a solubilidade ou a precipitação das enzimas em solução. Os Esquemas 2 e 3 ilustram o seu trabalho, que hoje é chamado de série de Hofmeister. A série de Hofmeister reflete fatores intrínsecos como estabilidade térmica, atividade catalítica enzimática (a qual é expressa atualmente como “*Turnover number*”),⁸³ cristalização, interação com a água e outros. Neste sentido, a presença de íons em solução tem um reflexo direto na estabilidade da enzima, seja um efeito benéfico ou contrário à sua estabilidade. O Esquema 2 representa antes de “||” a ordem

decrecente da capacidade de estabilização enzimática de alguns ânions. Após “||” encontra-se a ordem decrescente dos ânions

que desestabilizam a estrutura enzimática em solução.



Esquema 2. Ordem decrescente de estabilização (antes da “||”) e desestabilização (depois da “||”) da estrutura enzimática gerada por alguns ânions

O Esquema 3, por sua vez, representa antes da “||” a ordem decrescente da capacidade de estabilização enzimática de alguns cátions. Após a “||” representa a

ordem decrescente dos cátions que desestabilizam a estrutura enzimática em solução.



Esquema 3. Ordem decrescente de estabilização (antes da “||”) e desestabilização (depois da “||”) da estrutura enzimática gerada por alguns cátions

Entretanto, a série de Hofmeister não foi, ainda, totalmente discutida, principalmente no contexto dos LI, uma vez que não foi explicado como tais ânions e cátions ajudam na estabilização enzimática. Uma forma mais completa de se entender o comportamento das enzimas frente aos íons é analisando os mesmos quanto à sua caotropicidade (originalmente classificado como um desestabilizante da enzima) e/ou cosmotropicidade (que estabilizam a enzima). Essas definições descrevem a interação dos íons com a água e como elas influenciam o equilíbrio da mesma em alta ou baixa densidade, bem como seus efeitos diretos na estabilização enzimática. Considerando-se os LI, já se sabe que os mesmos sofrem grandes desvios da série de Hofmeister, em especial considerando-se os cátions.

De forma ampla, íons cosmotrópicos possuem uma elevada densidade de carga e, sendo assim, interagem fortemente com a água, enfraquecendo as interações água-água e solubilizando-se brandamente na solução. Ao contrário, íons caotrópicos

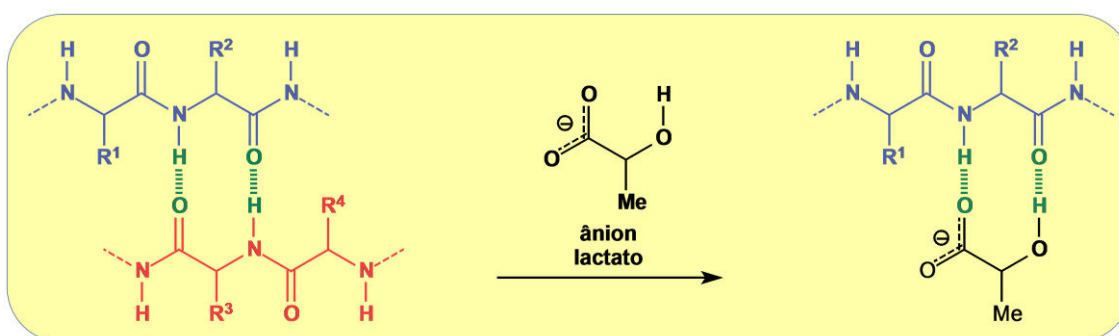
normalmente possuem uma baixa densidade de carga e, por esse motivo, interagem mais fracamente com a água. Sendo assim, mostram uma tendência menor a solvatação estando, portanto, mais desnudos para estabelecerem uma maior interação desestabilizante com as enzimas.

A chamada água estruturada (aw), responsável pela manutenção mínima da estrutura terciária e atividade da enzima, desempenha um papel fundamental para os processos biocatalisados. Este parâmetro pode ser entendido como a quantidade mínima de água necessária para a manutenção da atividade da enzima. Estudos de estabilização de enzimas em LI evidenciaram que alguns destes sais fundidos são mais eficientes em acondicionar enzimas, pois estabilizam cineticamente a enzima mantendo sua atividade catalítica elevada por mais tempo mesmo em condições drásticas (150 °C),⁸⁴ pois são capazes de ajudar a enzima a manter a aw.

Com base no conhecimento de todas as variáveis que podem contribuir para

estabilização enzimática e, consequentemente, com o sucesso experimental, é possível buscar associações de cátions e ânions que componham um LI com as características de interesse. Entretanto, interações entre cátions e ânions modificam drasticamente suas propriedades isoladas, fazendo com que LI não sigam linearmente o padrão caotropicidade e cosmotropicidade. Cada LI deve ser analisado individualmente com a enzima de interesse para se observar se a junção será produtiva ou não.

A pergunta “de que forma os LI estabilizam ou desestabilizam as enzimas?”, entretanto, ainda não foi respondida adequadamente. Neste sentido, as ligações de hidrogênio, em especial o efeito do ânion, parecem ser cruciais para o entendimento da questão.⁸⁵ Ânions capazes de fazer ligações de hidrogênio fortes (e.g. lactato) podem causar uma dissociação das mesmas nas estruturas terciárias e secundárias (em especial em folhas β e α -hélices), modificando assim a enzima. No Esquema 4, vemos um exemplo da ação do ânion lactato modificando a estrutura enzimática.



Esquema 4. Representação esquemática simplificada de ligações de hidrogênio em estruturas secundárias do tipo folha β e a interferência do ânion lactato desestabilizando a estrutura secundária

O efeito do cátion, por sua vez, é bem mais complexo do que o do ânion, em especial para os imidazólios. Entretanto, a presença de ligações de hidrogênios nanoestruturadas na região de interação com a enzima e devido às regiões polares e não polares, podem ser responsáveis pela manutenção da estrutura da enzima e, por consequência, da sua atividade.⁷⁶ A presença de cátions imidazólios, entretanto, apesar de comumente estabilizarem a enzima, podem alterar a sua estrutura secundária. Em alguns casos, foram observadas mudanças de α -hélices para folhas β .⁸⁶

Tendo em vista o aspecto “verde” atribuído às reações catalisadas por enzimas,²⁹⁻³⁰ o fato de LI serem ecologicamente amigáveis,⁷⁵ bem como o incremento da atividade catalítica

comumente proporcionado pelos LI às enzimas,^{72-75,80} a junção dos mesmos se torna incrivelmente atrativa do ponto de vista da sustentabilidade. Além disto, atraindo grande interesse por parte da indústria química, em especial visando à obtenção de biodiesel, apesar de ainda não haver indústrias produzindo biodiesel por rotas enzimáticas. Uma das aplicações desses sistemas catalíticos tão promissores será discutido na seção seguinte.

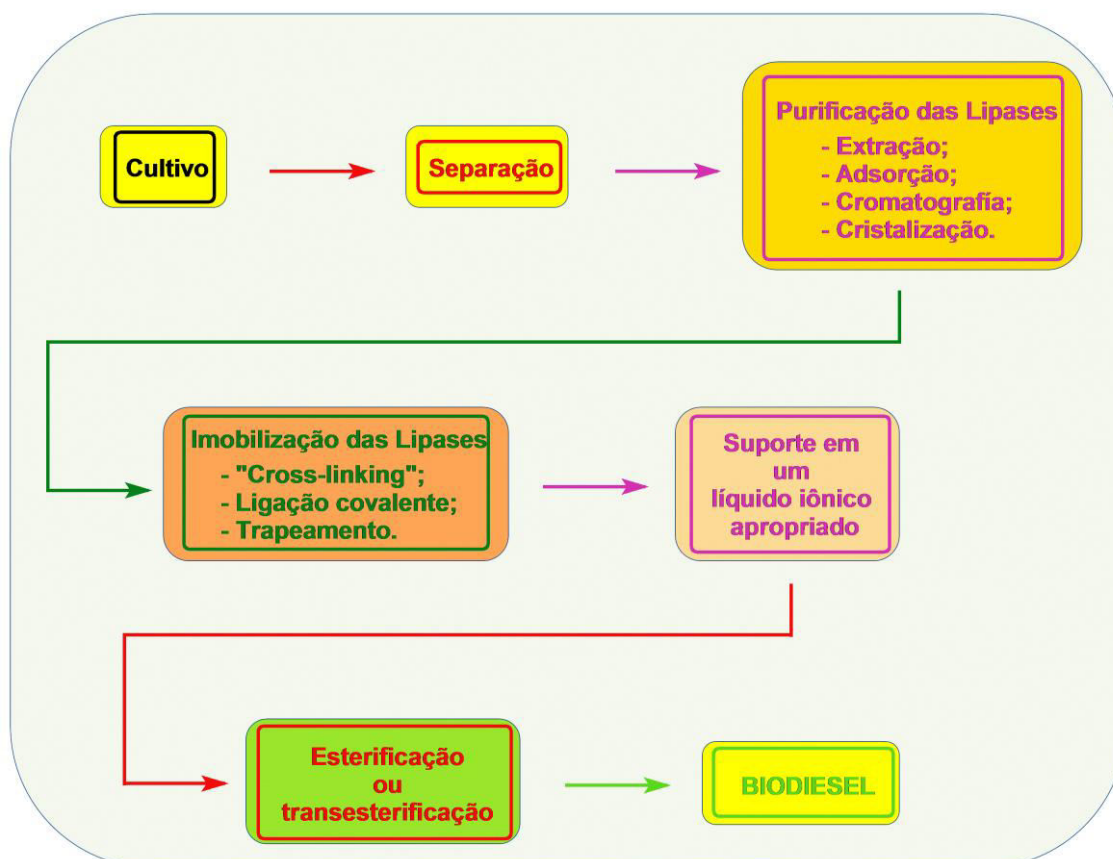
4. Síntese Enzimática de Biodiesel em Líquidos Iônicos

Por todos os efeitos e propriedades promissoras dos LI e, por todas as vantagens

de se utilizar enzimas lipases como biocatalisadores, nada mais lógico do que a combinação sistemática de lipases e LI na busca de um biodiesel mais limpo e produzido com maior eficiência. Além disto, lipases também podem ser utilizadas para modificação do biocombustível e não apenas para a sua síntese.

Os LI agem como um suporte eficiente da

enzima nano-organizando o sistema. Quando os meios de suporte são solventes orgânicos convencionais, as reações não alcançam altos rendimentos uma vez que a glicerina formada se acumula ao redor da enzima ocasionando sua desativação no decorrer do tempo.⁸⁷ O Esquema 5 mostra o processo para se utilizar as enzimas na produção do biodiesel suportadas em LI.⁸⁸



Esquema 5. Etapas de processamento das enzimas para serem utilizadas na produção de biodiesel

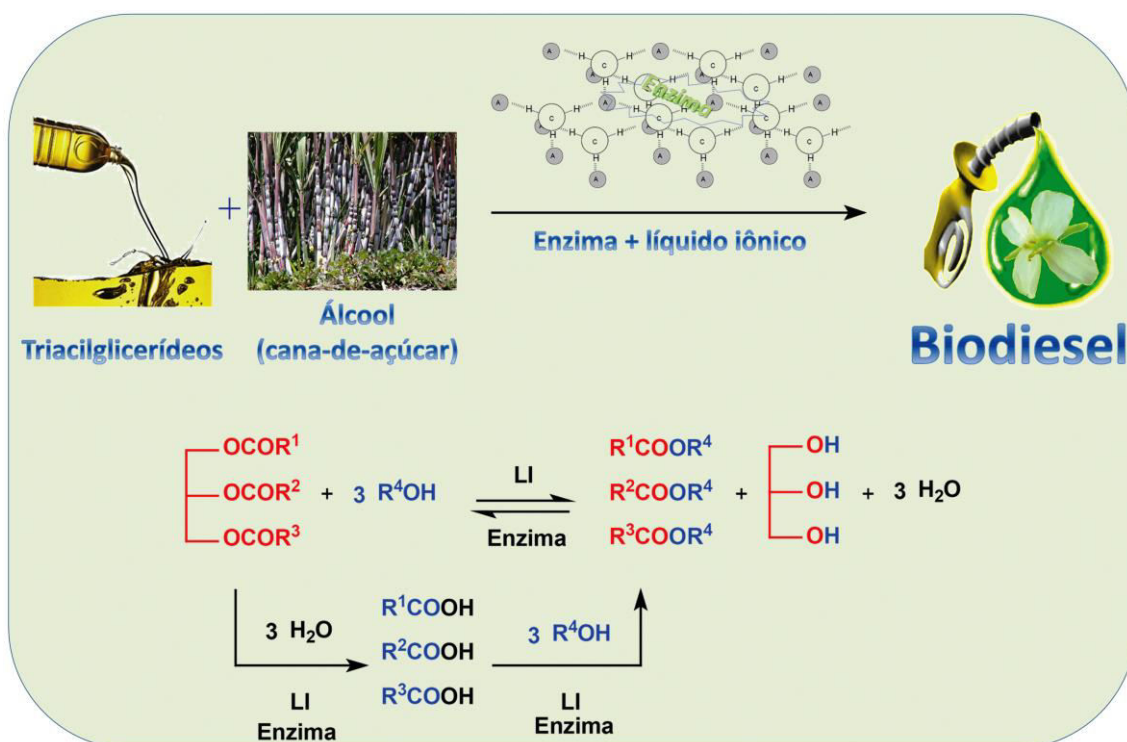
Lipases são, sabidamente, caras. Comparadas aos outros métodos de catálise e quando utilizadas sem um meio de suporte na produção de biodiesel não é possível a sua recuperação,⁸² o processo passa a ser ainda mais inviável economicamente. Em 2008, Yu e colaboradores citaram que a produção mundial de biodiesel catalisada por enzimas é apenas de 20.000 toneladas.⁸⁹ A baixa utilização deste método é explicada pelo fato de que meios de suporte (ou de imobilização) adequados para enzimas ainda estarem em

fase de estudo. Dentre os suportes para as lipases, com certeza, os LI estão entre os mais promissores. Sendo assim, observa-se que muitos artigos publicados recentemente, analisam a associação destas enzimas com LI, com o objetivo de entender como o sistema é organizado e de que forma contribui para o aumento do rendimento, além do processo altamente desejável de recuperação da enzima. Uma das principais vantagens citadas por todos os autores é a possibilidade de reciclo do sistema catalítico, sem com isso, se

perder a atividade catalítica. Entretanto, como bem frisado, é a possibilidade e não a certeza do reciclo.

Dupont e colaboradores⁹⁰ publicaram, em 2008, um trabalho em que sugerem que a melhor combinação de LI e enzima para produção de biodiesel é utilizando 1-*n*-butil-3-metilimidazólio bis(trifluorometanossulfonil)imidato (BMI.NTf₂) e a enzima lipase da *Pseudomonas*

cepacea. Os autores conseguiram obter até 96 % de rendimento nas melhores condições, sendo possível realizar reações de reciclagem com rendimentos elevados. No trabalho foi, ainda, destacado que, quando havia água no meio, a hidrólise era mais rápida do que a transesterificação e, por conseguinte, o biodiesel era obtido por um processo de hidroesterificação (hidrólise seguida de esterificação) enzimática (ver Esquema 6).



Esquema 6. Esterificação e transesterificação enzimática em líquidos iônicos imidazólios. O processo descreve tanto a transesterificação quanto a hidroesterificação para a síntese do biocombustível que ocorrem concomitantemente, dependendo da quantidade de água no meio de reação

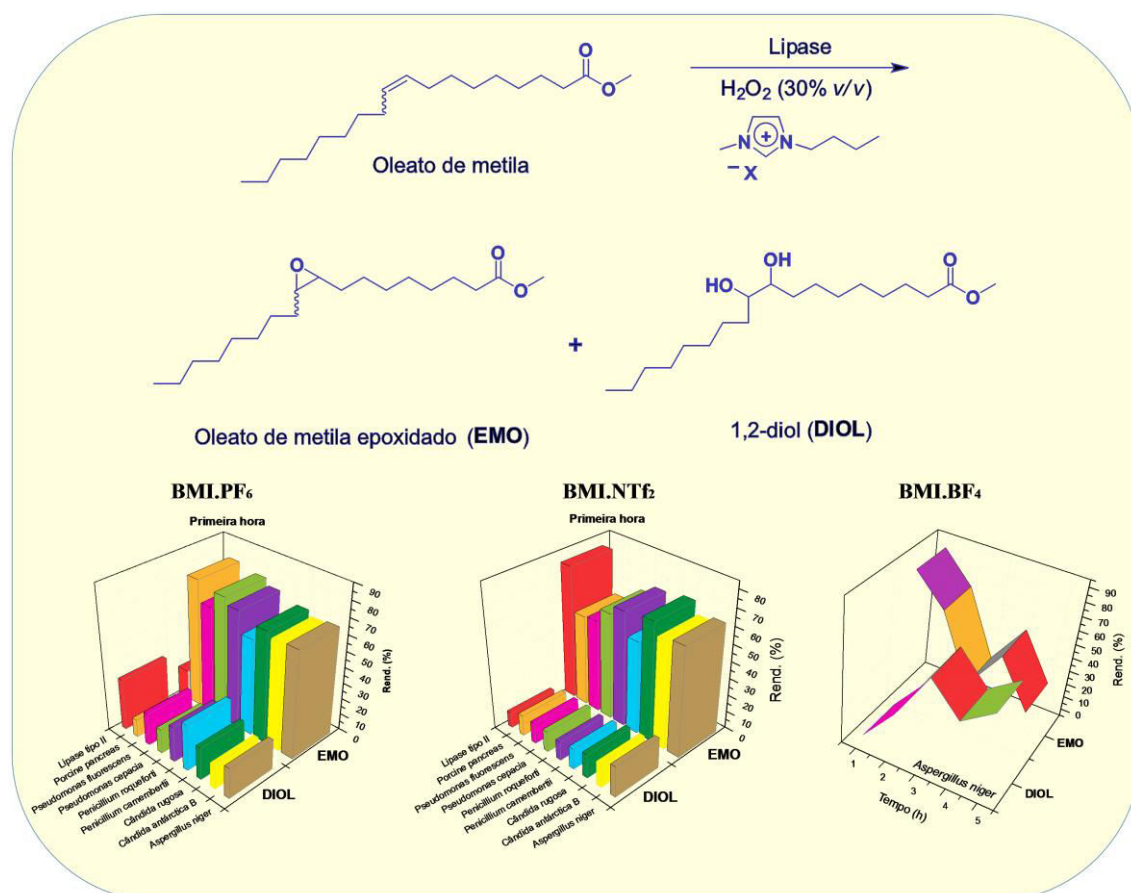
Em busca de sínteses mais “verdes”, algumas pesquisas têm se focado na extração de óleo de algas e sua transesterificação com enzimas suportadas em LI.⁸⁷ De fato, biodiesel advindo de algas são um desafio imenso na atualidade, mas também extremamente promissor,⁹¹ principalmente se considerando a eficiência de extração de matérias-primas para biocombustíveis diretamente de algas, utilizando-se LI imidazólios.⁹²

A utilização de LI na produção de biodiesel advindo de microalgas foi recentemente relatada.⁸⁷ Os autores utilizaram BMI.PF₆ (hexafluorofosfato de 1-*n*-butil-3-metilimidazólio) como suporte e Novozima 435 (lipase B imobilizada da *Candida antartica*) ou PEL (lipase de *Penicillium expansum*). No trabalho foi mostrado que o biodiesel poderia ser obtido em 48 h de reação com rendimentos similares (80-90 %)

para as duas lipases testadas, quando as mesmas eram suportadas em BMI.PF₆.

Um trabalho bastante importante foi descrito por Iborra e colaboradores.⁹³ No estudo, foram utilizados líquidos iônicos com cadeias longas (16 e 18 carbonos) em um dos nitrogênios e tendo o [NTf₂]⁻ como ânion. Após a reação de transesterificação, o sistema (inicialmente homogêneo) separava-se em três fases distintas, permitindo a separação do produto e a recuperação do catalisador (Novozima 435) que se encontrava na fase dos LI. Desta forma, foi possível a recuperação do sistema catalítico, sendo o mesmo utilizado 9 vezes. Entretanto, apesar de promissor, em ambos os LI estudados observou-se uma queda na atividade enzimática nas reações de reciclo que foram conduzidas.

Algumas características do biodiesel também precisam ser ajustadas a fim de se melhorar sua estabilidade oxidativa. A estratégia de se epoxidar algumas de suas ligações C=C aumenta a estabilidade oxidativa. Sem falar que alguns derivados das reações de epoxidação são usados como lubrificantes, plastificantes de PVC e estabilizantes, diluentes de tintas, intermediários de síntese, dentre outras aplicações.¹² Neste sentido, foi recentemente relatado a utilização de nove enzimas lipases para a síntese do derivado epoxidado do oleato de metila (EMO), sendo as mesmas suportadas em diferentes BMI.BF₄ (tetrafluoroborato de 1-butil-3-metilimidazólio), BMI.PF₆ e BMI.NTf₂.⁹⁴ Observou-se um comportamento distinto dependendo do ânion do LI (Esquema 7).



Esquema 7. Comportamento enzimático em diferentes líquidos iônicos imidazólios na reação de epoxidação do oleato de metila com nove lipases suportadas no meio iônico

Em algumas condições observou-se a formação do produto di-hidroxilado (DIOL) como resultado da abertura do anel epóxido. Com a utilização de um LI hidrofílico (BMI.BF₄) observou-se o melhor rendimento para o EMO (≈ 90 %) na primeira hora de reação, sendo que nos LI hidrofóbicos (BMI.PF₆ e BMI.NTf₂) a reação na primeira hora não mostrou um rendimento tão alto, apesar dos resultados terem sido muito bons. O Esquema 7 também ilustra o diferente comportamento das enzimas testadas com os LI hidrofóbicos.

5. Conclusões e Perspectivas

Uma das principais vantagens em se utilizar a catálise enzimática em LI, além da excelente estabilização que este meio de reação promove em diferentes enzimas, é a possibilidade de reciclo. Esse fato é extremamente interessante do ponto de vista industrial, econômico e ecológico. Sem dúvida, a utilização dos LI para processos enzimáticos é extremamente promissora, apesar de ainda existirem muitos impedimentos tecnológicos associados a tais processos.

Observa-se, também, a necessidade de se estudar mais profundamente as interações entre as enzimas e os LI, em especial para se entender mais claramente o que de fato contribui para estabilização enzimática e, conseqüentemente, se visar uma abordagem no sentido do aumento da atividade catalítica.

Por todos estes motivos, a combinação de LI e enzimas permite que se possa vislumbrar um futuro energético mais limpo e com uma síntese de biodiesel sem todos os problemas comumente associados nas diferentes formas de catálise, principalmente a ácida e a básica. Tal tecnologia caminha, ainda, lentamente quando comparada com a catálise organometálica, mas já começa a andar com passos largos.

Agradecimentos

Os autores agradecem às diferentes agências de fomento que financiam as pesquisas do Grupo de Pesquisas Rede de Estudos em Oleoquímica (CNPq, FINEP, FAPEAL, FAPDF), ao INCT-CATÁLISE e em especial à CAPES (PROCAD 2005, Projeto nº 0023051; e PROCAD NF 2009, Projeto nº 735/2010) que permitiram a mobilidade de alunos e professores das equipes. Os autores agradecem também ao CNPq e CAPES pelas bolsas de pesquisa concedidas aos pesquisadores e alunos de graduação e pós-graduação.

Referências Bibliográficas

- ¹ Farrell, A. E.; Plevin, R. J.; Turner, B. T.; Jones, A. D.; O'Hare, M.; Kammen, D. M. *Science* **2006**, *311*, 506. [CrossRef]
- ² Tilman, D.; Hill, J.; Lehman, C. *Science* **2006**, *314*, 1598. [CrossRef]
- ³ Patz, J. A.; Campbell-Lendrum, D.; Holloway, T.; Foley, J. A. *Nature* **2005**, *438*, 310. [CrossRef]
- ⁴ Milly, P. C. D.; Dunne, K. A.; Vecchia, A. V. *Nature* **2005**, *438*, 347. [CrossRef]
- ⁵ Shindell, D.; Kuylenstierna, J. C. I.; Vignati, E.; van Dingenen, R.; Amann, M.; Klimont, Z.; Anenberg, S. C.; Muller, N.; Janssens-Maenhout, G.; Raes, F.; Schwartz, J.; Faluvegi, G.; Pozzoli, L.; Kupiainen, K.; Hoglund-Isaksson, L.; Emberson, L.; Streets, D.; Ramanathan, V.; Hicks, K.; Oanh, N. T. K.; Milly, G.; Williams, M.; Demkine, V.; Fowler, D. *Science* **2012**, *335*, 183. [CrossRef]
- ⁶ Suarez, P. A. Z.; Meneghetti, S. M. P. *Quim. Nova* **2007**, *30*, 2068. [CrossRef]
- ⁷ Pousa, G.; Santos, A. L. F.; Suarez, P. A. Z. *Energy Policy* **2007**, *35*, 5393. [CrossRef]
- ⁸ Dunn, R. O. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2005**, *82*, 381. [CrossRef]
- ⁹ Dunn, R. O.; Shockley, M. W.; Bagby, M. O. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1996**, *73*, 1719. [CrossRef]

- ¹⁰ Al-Zuhair, S.; Jayaraman, K. V.; Krishnan, S.; Chan, W. H. *Biochem. Eng. J.* **2006**, *30*, 212. [CrossRef]
- ¹¹ Pinto, A. C.; Guarieiro, L. L. N.; Rezende, M. J. C.; Ribeiro, N. M.; Torres, E. A.; Lopes, W. A.; Pereira, P. A. D.; de Andrade, J. B. *J. Braz. Chem. Soc.* **2005**, *16*, 1313. [CrossRef]
- ¹² Schuster, H.; Rios, L. A.; Weckes, P. P.; Hoelderich, W. F. *Appl. Catal. A: Gen.* **2008**, *348*, 266. [CrossRef]
- ¹³ Sepulveda, J.; Teixeira, S.; Schuchardt, U. *Appl. Catal. A: Gen.* **2007**, *318*, 213. [CrossRef]
- ¹⁴ Antolin, G.; Tinaut, F. V.; Briceno, Y.; Castano, V.; Perez, C.; Ramirez, A. I. *Bioresour. Technol.* **2002**, *83*, 111. [CrossRef]
- ¹⁵ Chavanne, G. Belgium 1937; Vol. BE 422,877, (CA 1938, 32, 4313).
- ¹⁶ Keim, G. I.; US 2,383-601; **1945**.
- ¹⁷ Freedman, B.; Pryde, E. H.; Mounts, T. L. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1984**, *61*, 1638. [CrossRef]
- ¹⁸ Abreu, F. R.; Lima, D. G.; Hamu, E. H.; Einloft, S.; Rubim, J. C.; Suarez, P. A. Z. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2003**, *80*, 601. [CrossRef]
- ¹⁹ Abreu, F. R.; Lima, D. G.; Hamu, E. H.; Wolf, C.; Suarez, P. A. Z. *J. Mol. Catal. A Chem.* **2004**, *209*, 29. [CrossRef]
- ²⁰ Sítio da ANP - Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. Disponível em: <http://www.google.com.br/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=7&ved=0CGMQFjAG&url=http%3A%2F%2Fwww.anp.gov.br%2F%3Fdw%3D8739&ei=5aPPT82SPMal6AHc0cW7DA&usg=AFQjCNFCyMy1T7o713UMJ_dtKPK2PSJmpA&sig2=vABDg566r6p3bScTvS540w>. Acessado em: 06 junho 2012.
- ²¹ Ma, F.; Hanna, M. A. *Bioresour. Technol.* **1999**, *70*, 1. [CrossRef]
- ²² Schuchardt, U.; Sercheli, R.; Vargas, R. M. *J. Braz. Chem. Soc.* **1998**, *9*, 199. [CrossRef]
- ²³ Lang, X.; Dalai, A. K.; Bakhshi, N. N.; Reaney, M. J.; Hertz, P. B. *Bioresour. Technol.* **2001**, *80*, 53. [CrossRef]
- ²⁴ Fukuda, H.; Kondo, A.; Noda, H. *J. Biosci. Bioeng.* **2001**, *92*, 405. [CrossRef]
- ²⁵ Lehninger, A. L.; Nelson, D. L.; Cox, M. M.; *Princípios de Bioquímica*, 4a. ed., Sarvier: São Paulo, 2006.
- ²⁶ Rotticci, D.; *Tese de doutorado*, Royal Institute of Technology, Suécia, 2000. [Link]
- ²⁷ Gupta, M. N.; Roy, I. *Eur. J. Biochem.* **2004**, *271*, 2575. [CrossRef]
- ²⁸ Barros, M.; Fleuri, L. F.; Macedo, G. A. *Braz. J. Chem. Eng.* **2010**, *27*, 15. [CrossRef]
- ²⁹ Hasan, F.; Shah, A. A.; Hameed, A. *Enzyme Microb. Tech.* **2006**, *39*, 235. [CrossRef]
- ³⁰ Posorske, L. H. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1984**, *61*, 1758. [CrossRef]
- ³¹ Ranganathan, S. V.; Narasimhan, S. L.; Muthukumar, K. *Bioresour. Technol.* **2008**, *99*, 3975. [CrossRef]
- ³² Robles-Medina, A.; González-Moreno, P. A.; Esteban-Cerdán, L.; Molina-Grima, E. *Biotechnol. Adv.* **2009**, *27*, 398. [CrossRef]
- ³³ Gog, A.; Roman, M.; Tosa, M.; Paizs, C.; Irimie, F. D. *Renew. Energy* **2012**, *39*, 10. [CrossRef]
- ³⁴ Tan, T.; Lu, J.; Nie, K.; Deng, L.; Wang, F. *Biotechnol. Adv.* **2010**, *28*, 628. [CrossRef]
- ³⁵ Helwani, Z.; Othman, M. R.; Aziz, N.; Kim, J.; Fernando, W. J. N. *Appl. Catal. A: Gen.* **2009**, *363*, 1. [CrossRef]
- ³⁶ Cantrell, D. G.; Gillie, L. J.; Lee, A. F.; Wilson, K. *Appl. Catal. A: Gen.* **2005**, *287*, 183. [CrossRef]
- ³⁷ Bisen, P. S.; Sanodiya, B. S.; Thakur, G. S.; Baghel, R. K.; Prasad, G. B. K. S. *Biotechnol. Lett.* **2010**, *32*, 1019. [CrossRef]
- ³⁸ Andreani, L.; Rocha, J. D. *Braz. J. Chem. Eng.* **2012**, *29*, 1. [CrossRef]
- ³⁹ Lai, J.; Hu, Z.; Wang, P.; Yang, Z. *Fuel* **2012**, *95*, 329. [CrossRef]
- ⁴⁰ Leung, D. Y. C.; Wu, X.; Leung, M. K. H. *Appl. Energy* **2010**, *87*, 1083. [CrossRef]
- ⁴¹ Van Gerpen, J.; Shanks, B.; Pruszko, R.; Clements, D.; Knothe, G. Biodiesel production technology. 1617 Cole Boulevard, Golden, Co: National Renewable Energy Laboratory; 2004.
- ⁴² Bajaj, A.; Lohan, P.; Jha, P. N.; Mehrotra, R. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2010**, *62*, 9. [CrossRef]
- ⁴³ Lafuente, R. F.; Armisen, P.; Sabuquillo, P.; Lorente, G. F.; Guisán, J. M. *Chem. Phys. Lipids* **1998**, *93*, 185. [CrossRef]
- ⁴⁴ Mendieta, O.; Kamimura, E.S.; Maugeri F.; *Simpósio Nacional de Fermentações*, 12 – *Anais do XII SINAFERM*, Uberlândia, 1998.

- ⁴⁵ García, R.; García, T.; Martíne, M.; Aracil, J. *Biochem. Eng. J.* **2000**, *5*, 185. [[CrossRef](#)]
- ⁴⁶ Létisse, F.; Lamare, S.; Legoy, M. D.; Graber, M. *Biochim. Biophys. Acta* **2003**, *1652*, 27. [[CrossRef](#)]
- ⁴⁷ Salameh, M.; Wiegel, J. *Adv. Appl. Microbiol.* **2007**, *61*, 253. [[CrossRef](#)]
- ⁴⁸ Joseph, B.; Ramteke, P. W.; Thomas, G. *Biotechnol. Adv.* **2008**, *26*, 457. [[CrossRef](#)]
- ⁴⁹ Salameh, M. A.; Wiegel, J. *Appl. Environ. Microb.* **2007**, *73*, 7725. [[CrossRef](#)]
- ⁵⁰ Rodrigues, D. S.; Mendes, A. A.; Filice, M.; Lafuente, R. F.; Guisan, J. M.; Palomo, J. M. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2009**, *58*, 36. [[CrossRef](#)]
- ⁵¹ Pereira, E. B.; *Dissertação de mestrado*, Universidade Estadual de Maringá, Brasil, 1999. [[Link](#)]
- ⁵² Takwa, M.; *Doctoral Thesis*, Royal Institute of Technology, Sweden 2010. [[Link](#)]
- ⁵³ Wong, C.H.; Whitesides, G. M.; *Enzymes in Synthetic Organic Chemistry*, Pergamon Press: Oxford, 1994.
- ⁵⁴ Palomo, J. M.; Muñoz, G.; Lorente, G. F.; Mateo, C.; Lafuente, R. F.; Guisán, J. M. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2002**, *19-20*, 279. [[CrossRef](#)]
- ⁵⁵ Ringe, D.; Petsko, G. A. *Science* **2008**, *320*, 1428. [[CrossRef](#)]
- ⁵⁶ Boehr, D. D.; Wright, P. E. *Science* **2008**, *320*, 1429. [[CrossRef](#)]
- ⁵⁷ Bastida, A.; Sabuquillo, P.; Armisen, P.; Lafuente, R. F.; Hugué, J.; Guisán, J. M. *Biotechnol. Bioeng.* **1998**, *58*, 486. [[CrossRef](#)]
- ⁵⁸ Palomo, J. M.; Fuentes, M.; Lorente, G. F.; Mateo, C.; Guisan, J. M.; Lafuente, R. F. *Biomacromol.* **2003**, *4*, 1. [[CrossRef](#)]
- ⁵⁹ Palomo, J. M.; Penãs, M. M.; Lorente, G. F.; Mateo, C.; Pisabarro, A. G.; Lafuente, R. F.; Ramíres, L.; Guisán, J. M. *Biomacromol.* **2003**, *4*, 204. [[CrossRef](#)]
- ⁶⁰ Cygler, M.; Grochulski, P.; Kazlauskas, R. J.; Schrag, J. D.; Bouthillier, F.; Rubin, B.; Serreqi, A. N.; Gupta, A. K. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 3180. [[CrossRef](#)]
- ⁶¹ Dodson, G.; Wlodawer, A. *Trends Biochem. Sci.* **1998**, *23*, 347. [[CrossRef](#)]
- ⁶² Dumitriu, E.; Secundo, F.; Patarin, J.; Fechete, I. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2003**, *22*, 119. [[CrossRef](#)]
- ⁶³ Jaeger, K. E.; Eggert, T. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2002**, *13*, 390. [[CrossRef](#)]
- ⁶⁴ Al-Duri, B.; Goddard, R.; Bosley, J. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2001**, *11*, 825. [[CrossRef](#)]
- ⁶⁵ Gunnlaugsdottir, H.; Wannerberger, K.; Sivik, B. *Enzyme Microb. Technol.* **1998**, *22*, 360. [[CrossRef](#)]
- ⁶⁶ Zaidi, A.; Gainer, J. L.; Carta, G.; Mrani, A.; Kadiri, T.; Belarbi, Y.; Mir, A. *J. Biotechnol.* **2002**, *93*, 209. [[CrossRef](#)]
- ⁶⁷ Soumanou, M. M.; Bornscheuer, U. T.; Schmid, U.; Schmid, R. D. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **1998**, *100*, 156. [[CrossRef](#)]
- ⁶⁸ Hickey, D. K.; Kilcawley, K. N.; Beresford, T. P.; Wilkinson, M. G. *J. Dairy Sci.* **2007**, *90*, 47. [[CrossRef](#)]
- ⁶⁹ Paiva, A. L.; Balcão, V. M.; Malcata, F. X. *Enzyme Microb. Technol.* **2000**, *27*, 187. [[CrossRef](#)]
- ⁷⁰ Jothiramalingam, R.; Wang, M. K. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2009**, *48*, 6162. [[CrossRef](#)]
- ⁷¹ Neto, B. A. D. *BiodieselBR* **2010**, *4*, 59. [[Link](#)]
- ⁷² Rantwijk, F.; Sheldon, R. A. *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 2757. [[CrossRef](#)]
- ⁷³ Lozano, P. *Green Chem.* **2010**, *12*, 555. [[CrossRef](#)]
- ⁷⁴ Plechkova, N. V.; Seddon, K. R. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 123. [[CrossRef](#)]
- ⁷⁵ Dupont, J.; Souza, R. F.; Suarez, P. A. Z. *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 3667. [[CrossRef](#)]
- ⁷⁶ Dupont, J. *J. Braz. Chem. Soc.* **2004**, *15*, 341. [[CrossRef](#)]
- ⁷⁷ Para exemplos ver: Pilli, R. A.; Robello, L. G.; Camilo, N. S.; Dupont, J.; Lapis, A. A. M.; DaSilveira Neto, B. A. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 1669; [[CrossRef](#)] Neto, B. A. D.; Ebeling, G.; Gonçalves, R. S.; Gozzo, F. C.; Eberlin, M. N.; Dupont, J. *Synthesis* **2004**, 1155; [[CrossRef](#)] Lapis, A. A. M.; da Silveira Neto, B. A.; Scholten, J. D.; Nachtigall, F. M.; Eberlin, M. N.; Dupont, J. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 6775. [[CrossRef](#)]
- ⁷⁸ Para exemplos ver: Chauvin, Y.; Mussmann, L.; Olivier, H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1996**, *34*, 2698; [[CrossRef](#)] Dullius, J. E. L.; Suarez, P. A. Z.; Einloft, S.; de Souza, R. F.; Dupont, J. *Organometallics* **1998**, *17*, 815; [[CrossRef](#)] Carmichael, A. J.; Earle, M. J.; Holbrey, J. D.; McCormac, P. B.; Seddon, K. R.

- Org. Lett.* **1999**, *1*, 997; [CrossRef] de Bellefon, C.; Pollet, E.; Grenouillet, P. *J. Mol. Catal. A: Chem.* **1999**, *145*, 121. [CrossRef]
- ⁷⁹ Kuhn, M. C. A.; Lapis, A. A. M.; Machado, G.; Roisnel, T.; Carpentier, J. F.; Neto, B. A. D.; Casagrande, O. L. *Inorg. Chim. Acta* **2011**, *370*, 505. [CrossRef]
- ⁸⁰ Weingärtner, H.; Cabrele, C.; Herrmann, C. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2012**, *14*, 415. [CrossRef]
- ⁸¹ Guo-hong, T.; Ming,Z.; Xiao-hua, W.; Zhi-yu, C.; Evans, D. G.; Yuan, K. *Aust. J. Chem.* **2005**, *58*, 327. [CrossRef]
- ⁸² Ab Rani, M. A.; Brant, A.; Crowhurst, L.; Dolan, A.; Lui, M.; Hassan, N. H.; Hallett, J. P.; Hunt, P. A.; Niedermeyer, H.; Perez-Arlandis, J. M.; M. Schrems, M.; Welton, T.; Wilding, R. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, *13*, 16831. [CrossRef]
- ⁸³ Umpierre, A. P.; de Jesus, E.; Dupont, J. *Chem. Cat. Chem.* **2011**, *3*, 1413. [CrossRef]
- ⁸⁴ Lozano, P.; de Diego, T.; Carrie, D.; Vaultier, M.; Iborra, J. L. *Biotechnol. Prog.* **2003**, *19*, 380. [CrossRef]
- ⁸⁵ van Rantwijk, F.; Secundo, F.; Sheldon, R. A. *Green Chem.* **2006**, *8*, 282. [CrossRef]
- ⁸⁶ De Diego, T.; Lozano, P.; Gmouh, S.; Vaultier, M.; Iborra, J. L. *Biomacromol.* **2005**, *6*, 1457. [CrossRef]
- ⁸⁷ Lai, J.; Hu, Z.; Wang, P., Yang, Z. *Fuel* **2012**, *95*, 329. [CrossRef]
- ⁸⁸ Du, W.; Li, W.; Sun, T.; Chen, X.; Liu, D. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, *79*, 331. [CrossRef]
- ⁸⁹ Yu, D.; Wang, C.; Yin, Y.; Zhang, A.; Gao, G.; Fang, X. *Green Chem.* **2011**, *13*, 1869. [CrossRef]
- ⁹⁰ Gamba, M.; Lapis, A. A. M.; Dupont, J. *Adv. Synth. Catal.* **2008**, *350*, 160. [CrossRef]
- ⁹¹ Suarez, P. A. Z.; Pinto, A. C. *J. Braz. Chem. Soc.* **2011**, *22*, 2023. [CrossRef]
- ⁹² Teixeira, R. E. *Green Chem.* **2012**, *14*, 419. [CrossRef]
- ⁹³ De Diego, T.; Manjon, A.; Lozano, P.; Iborra, J. L. *Bioresour. Technol.* **2011**, *102*, 6336. [CrossRef]
- ⁹⁴ Silva, W. S. D.; Lapis, A. A. M.; Suarez, P. A. Z.; Neto, B. A. D. *J. Mol. Cat. B: Enzym.* **2011**, *68*, 98. [CrossRef]