



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**EPOXIDAÇÃO DE ÉSTERES METÍLICOS DERIVADOS DO ÓLEO
DE SOJA VIA CATÁLISE ENZIMÁTICA NA PRESENÇA DE
LÍQUIDOS IÔNICOS**

Henrique Lima de Oliveira

Orientador: Prof. Dr. Paulo Anselmo Ziani Suarez

Brasília - DF

Março de 2013

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**EPOXIDAÇÃO DE ÉSTERES METÍLICOS DERIVADOS DO ÓLEO
DE SOJA VIA CATÁLISE ENZIMÁTICA NA PRESENÇA DE
LÍQUIDOS IÔNICOS**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação do Instituto de Química da Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

Henrique Lima de Oliveira

Orientador: Prof. Dr. Paulo Anselmo Ziani Suarez

**Brasília - DF
Março de 2013**

Obstáculos têm a capacidade de tornar o homem mais ou menos capaz, o que determina essa interferência é o modo como esses obstáculos são encarados!

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a todos aqueles que contribuíram para que esse trabalho árduo, porém gratificante, pudesse ser concluído.

À Deus e à Nossa Senhora,
..... pela graça da vida.

Aos meus pais,
..... pela educação, pelo lar, por todo o apoio e força nos momentos mais difíceis e principalmente pelo amor que só pais e filhos conhecem.

À minha irmã,
..... pela companhia e amor eternos e até mesmo pelas brigas, também eternas.

À minha namorada, Karlla,
..... pelo amor incondicional, carinho, atenção e paciência (sem a qual dificilmente ainda estaríamos juntos) e também pelo auxílio e conhecimentos dedicados à realização deste trabalho.

À família da Karlla, seu Ferreira, dona Ana Lúcia e Bruno,
..... que me acolheram tão amavelmente e torceram tanto quanto a minha família para a conclusão deste trabalho.

Ao meu avô Afonso e ao meu padrinho João (*in memorian*),
..... por mostrarem que o trabalho é uma dádiva.

Aos meus avós Araci, Lourdes e Divino,
..... pelo amor e carinho desde o nascimento.

Aos meus familiares, em especial ao meu primo Abdon Jr.,
..... pelo apoio e por todo o amor fraterno dedicado.

Aos companheiros do LMC,

..... por toda companhia e conhecimentos compartilhados.

Aos amigos de laboratório Anderson, Carla, Hugo, Leonardo, Sara, Saulo e Wanessa,

..... que tanto me auxiliaram na realização das partes práticas desse estudo.

Aos meus amigos de graduação Danillo, Jéssica, Raquel e Thaiene e aos amigos da vida Giselle, Janaina, e William,

.....por toda amizade e parceria e por mostrarem que amizades fazem toda a diferença.

Aos professores Wender Alves, Fernando Araripe e Marcos Juliano,

..... que aceitaram o convite para participar da banca examinadora.

Aos professores do IQ,

..... pela formação em Química.

Ao professor Roberto Fernandez-Lafuente e seu grupo de pesquisa,

..... pela enzimas utilizadas na realização deste trabalho.

Ao professor Paulo Suarez

..... pela orientação, ensinamentos e broncas concedidos desde a graduação.

E finalmente às instituições de apoio

..... pelo apoio à pesquisa realizada.

Resumo

No presente trabalho, a reação de epoxidação do biodiesel através da enzima *Candida antarctica* lipase B (CalB) e em meio de líquidos iônicos (LIs) foi estudada para melhorar as propriedades físico-químicas. Na presença dos LIs BMI.BF₄, BMI.PF₆ e BMI.N(Tf)₂ a enzima variou de forma considerável sua atividade em cada um dos casos devido às propriedades distintas de cada um dos LIs. Conhecidamente hidrofílico, o BMI.BF₄ mostrou baixos rendimentos para a formação do epóxido (até 19 % de conversão, mas sem seletividade para o epóxido). Já os LIs BMI.PF₆ e BMI.N(Tf)₂ apresentaram resultados bem superiores (20 % e 51 % de seletividade para o epóxido, respectivamente), porém muito abaixo do esperado para um catalisador heterogêneo com boa atividade. Esses resultados demonstraram que embora o sistema desenvolvido seja capaz de produzir o substrato desejado, a atividade é menor que a esperada para um sistema catalítico eficiente.

Abstract

In the present work, the epoxidation reaction of biodiesel by enzyme *Candida antarctica* lipase B (CalB) and using ionic liquids (ILs) was studied in order to improve its physical-chemical properties. According to the presence of ILs BMI.BF₄, and BMI.PF₆ BMI.N(Tf)₂ the enzyme activity varied considerably. Reportedly hydrophilic, BMI.BF₄ showed low yields for the formation of the epoxide (up to 19 % conversion, without selectivity for the epoxide). Besides, ILs BMI.PF₆ and BMI.N(Tf)₂ had much higher (20 % and 51 % selectivity to the epoxide, respectively), but much lower than expected for a heterogeneous catalyst with good activity. These results demonstrate that although the system developed is able to producing the desired substrate, the activity is lower than that expected for an efficient catalytic system.

Índice

Lista de Abreviaturas e Acrônimos.....	x
Lista de Tabelas.....	xi
Lista de Figuras.....	xii
Capítulo 1: Introdução e Objetivos.....	1
1.1 Introdução.....	2
1.2 Objetivos.....	3
1.2.1 Objetivos específicos.....	3
Capítulo 2: Revisão Bibliográfica.....	4
2.1 Biodiesel e suas propriedades físico-químicas.....	5
2.2 Reação de epoxidação.....	10
2.3 Epoxidação enzimática.....	12
2.4 Emprego de Líquidos Iônicos – LIs – na catálise enzimática.....	17
Capítulo 3: Materiais e Métodos.....	21
3.1 Reagentes.....	22
3.2 Síntese do biodiesel e dos líquidos iônicos e hidratação da enzima.....	22
3.3 Epoxidação do biodiesel de soja.....	23
3.4 Caracterização dos produtos formados.....	25
3.5 Cálculo do percentual de produtos obtidos.....	25
Capítulo 4: Resultados e Discussões.....	29
4.1 Estudos preliminares.....	30
4.1.1 Estudo sobre a hidratação da enzima.....	30
4.1.2 Estudo metodológico para a reação de epoxidação do biodiesel.....	32
4.1.3 Estudo sobre o comportamento da enzima na presença de líquidos iônicos.....	38
4.2 Comportamento de enzimas oriundas de diferentes sínteses.....	44
4.3 Reciclo da CalB.....	46

Capítulo 5: Conclusões e Perspectivas	49
5 Conclusões e perspectivas.....	50
Capítulo 6: Referências Bibliográficas	52
6 Referências bibliográficas.....	53

Lista de Abreviaturas e Acrônimos

ASTM: American Standard Testing Methods

BMI.BF₄: Tetrafluoroborato de 1-*n*-butil-3-metilimidazólio

BMI.NTf₂: Bis(trifluorometilsulfonil)imida de 1-*n*-butil-3-metilimidazólio

BMI.PF₆: Hexafluorofosfato de 1-*n*-butil-3-metilimidazólio

CaIB: *Candida antarctica* lipase B

DAI: 1,3-dialquilimidazólio

DIOL: Éster metílico dihidrolisado

IV: Infravermelho

LI: Líquido Iônico

RMN - ¹H: Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

ULSD: Ultra Low Sulfur Diesel

Lista de tabelas

Tabela 1. Propriedades físico-químicas dos combustíveis B100, B10 e ULSD comparadas aos padrões ASTM.....	7
Tabela 2. Composição de ácidos graxos de alguns óleos e gorduras.....	8
Tabela 3. Propriedades físico-químicas do biodiesel antes e após as reações de modificação.....	9
Tabela 4. Propriedades físico-químicas de líquidos iônicos utilizando o 1-alkil-3-metilimidazólio como cátion.....	18
Tabela 5. Efeito da hidratação da enzima B e reações de branco e do suporte da enzima.....	30
Tabela 6. Desenvolvimento da metodologia para a reação de epoxidação utilizando a enzima B.....	33
Tabela 7. Conversões e rendimentos obtidos utilizando a enzima B nos três LIs e variando o volume destes.....	39
Tabela 8. Conversões e rendimentos obtidos utilizando as enzimas A, B e C nos três LIs.....	44
Tabela 9. Conversões e rendimentos obtidos nas reações de reciclo.....	46

Lista de figuras

Figura 1. Representação geral da reação de transesterificação.....	5
Figura 2. Reação radicalar de oxidação dos ácidos graxos 18:1 e 18:2.....	8
Figura 3. Orbitais e ângulos do grupo epóxido.....	10
Figura 4. Reação de epoxidação do ácido oleico pelo ácido perfórmico.....	11
Figura 5. Esquema da reação de epoxidação do sistema desenvolvido por Torres <i>et al.</i>	12
Figura 6. Estrutura geral de lipases.....	13
Figura 7. Representação do processo de ativação interfacial.....	14
Figura 8. Representação do canal estreito da enzima CalB.....	14
Figura 9. Mecanismo de transesterificação catalisado pela CalB.....	15
Figura 10. Mecanismo de formação do perácido catalisado pela CalB.....	15
Figura 11. Representação geral do BMI com seu ânion.....	17
Figura 12. Estrutura 3D simplificada de LIs do tipo $[(DAI)^x(X)^{x-n}]^{n+}[(DAI)^{x-n}(X)^x]^{n-}$	19
Figura 13. Abertura do anel epóxido.....	20
Figura 14. Aparato reacional utilizado na reação de epoxidação do biodiesel.....	23
Figura 15. Espectro de RMN - 1H do biodiesel no equipamento de (a) 90 MHz e no de (b) 300 MHz.....	26
Figura 16. Integração do espectro de RMN - 1H do biodiesel no equipamento 300 MHz.....	27
Figura 17. Espectro de RMN - 1H da reação com 2% de biocatalisador no RMN de (a) 90 MHz e no de (b) 300 MHz. Observa-se a ausência do sinal referente aos H do produto dihidroxilado e do ácido carboxílico no espectro de 300 GHz devido à permuta entre o D e o H. O sinal em 7,27 ppm, presente no espectro do equipamento mais potente, é referente ao solvente $CDCl_3$ utilizado na preparação da amostra.....	28
Figura 18. Formação do ácido carboxílico através da decomposição radicalar do peróxido de hidrogênio.....	31

Figura 19. Espectro qualitativo das reações de branco, suporte e da avaliação sobre a hidratação da enzima B.....	31
Figura 20. Atividade da enzima B variando a concentração de H ₂ O ₂	33
Figura 21. Atividade da enzima B variando sua massa.....	33
Figura 22. Comportamento da enzima B na presença de variadas concentrações de H ₂ O ₂	34
Figura 23. Espectros de RMN - ¹ H do (a) biodiesel e do (b) biodiesel epoxidado no equipamento de 90 MHz.....	35
Figura 24. Visualização dos estiramentos referentes ao epóxido e ao ácido carboxílico.....	36
Figura 25. Espectros de RMN - ¹ H do (a) biodiesel e do (b) biodiesel epoxidado no equipamento de 300 MHz.....	37
Figura 26. Gráfico referente ao comportamento da enzima na presença de diferentes concentrações de BMI.PF ₆	40
Figura 27. Espectro de IV da enzima na presença de BMI.PF ₆	40
Figura 28. Gráfico referente ao comportamento da enzima na presença de diferentes concentrações de BMI.BF ₄	41
Figura 29. Espectro de IV da enzima na presença de BMI.BF ₄	42
Figura 30. Gráfico referente ao comportamento da enzima na presença de diferentes concentrações de BMI.NTf ₂	43
Figura 31. Espectro de IV da enzima na presença de BMI.NTf ₂	43
Figura 32. Gráficos de conversão e seletividade das enzimas A, B e C empregadas nos LIs.....	45
Figura 33. Rendimentos obtidos na reação base e nos 4 ciclos da enzima.....	47
Figura 34. Emulsão formada durante as reações e nítida perda de massa.....	48

Capítulo 1: Introdução e Objetivos

1.1 Introdução

A partir da crise do petróleo na década de 70, o aumento no custo e a dúvida sobre a disponibilidade futura de combustível fóssil, a inserção do conceito de sustentabilidade e a preocupação com o aumento da emissão de poluentes na atmosfera, tornaram a busca de fontes renováveis de energia uma prioridade; óleos e gorduras tornaram-se alternativas vantajosas para uma possível substituição desse combustível.¹ Dentre as opções viáveis, o biodiesel se mostrou promissor destacando-se pela baixa emissão de compostos sulfurados e baixa viscosidade e sua maior lubricidade, índice de cetano e biodegradabilidade quando comparados ao diesel derivado de combustíveis fósseis.

Contudo, o biodiesel limita-se pela baixa estabilidade oxidativa e elevada temperatura de cristalização.² Alternativa possível e promissora para contornar tais problemas é a modificação do biocombustível através de reações como a hidrogenação, alquilação e hidrólise.¹⁴ Outra reação possível é a de epoxidação, reação que tem se mostrado bastante promissora não só devido ao fato de mudar de forma singular as características físico-químicas do biodiesel, mas também por ser o epóxido um importante intermediário em rotas reacionais e por apresentar elevada importância comercial, por exemplo, na indústria de polímeros e farmacológica.^{3,4}

As enzimas lipase apresentam papel singular com relação ao biodiesel, um produto essencialmente lipídico. É uma classe de enzimas capaz de trabalhar eficientemente em sistemas heterogêneos, isso por várias delas apresentarem fenômeno conhecido como ativação interfacial, o que no caso de materiais lipídicos é uma grande vantagem, já que reduz consideravelmente problemas de interação substrato/solvente.⁵

Especificamente, a enzima *Candida antarctica* lipase B – CalB – vem sendo estudada e aplicada com sucesso em processos envolvendo óleos e gorduras. Apresenta alta seletividade e é conhecida por catalisar reações de esterificação, transesterificação, hidrólise, polimerização e, em destaque, a de epoxidação.⁶ Trabalhos recentes mostram que a CalB é capaz de epoxidar

eficientemente ésteres metílicos de óleo de girassol com rendimentos de até 99,9 %.⁷

Um limitante para a reação de epoxidação empregando a CalB como catalisador é a necessidade de utilizar solventes no meio reacional para melhorar a seletividade do epóxido. Como alternativa para o problema, o emprego de líquidos iônicos – LIs – vem sendo estudado.

1.2 Objetivos

O presente trabalho almeja uma rota alternativa e eficiente para a reação de epoxidação de ésteres metílicos derivados de triacilglicerídeos do óleo de soja. O estudo deseja encontrar um caminho reacional mais condizente com as diretrizes da Química Verde e mais viável do ponto de vista econômico.

1.2.1 Objetivos específicos

- Avaliar a atividade catalítica da enzima CalB ancorada em um suporte hidrofóbico na reação de epoxidação de ésteres metílicos derivados do óleo de soja na presença dos LIs BMI.PF₆, BMI.BF₄ e BMI.NTf₂;
- Testar a reutilização do biocatalisador na reação de epoxidação do biodiesel;
- Verificar a atividade de cada um dos três lotes de enzimas imobilizadas através do mesmo processo.

Capítulo 2: Revisão Bibliográfica

2.1 Biodiesel e suas propriedades físico-químicas

Rudolf Diesel e seu motor de ignição por compressão, desenvolvido no século XIX, abriram precedente para, décadas depois, óleos e gorduras de origem vegetal e animal tornarem-se material de estudo e de possível solução para a disponibilidade limitada de combustíveis fósseis.⁵¹ Já nas décadas de 70 e 80, o alto custo do petróleo motivou intensos estudos experimentais sobre a utilização desses materiais como combustíveis alternativos.¹

Reações como a de craqueamento – ou pirólise – e de transesterificação (Figura 1) de óleos e gorduras passaram a ser estudadas visando obter derivados de triacilglicerídeos com propriedades próximas às do diesel de petróleo. Desta forma, podem-se misturar tais compostos derivados de triacilglicerídeos ao combustível fóssil diesel (blendas) ou mesmo substituir este sem a necessidade de modificação nos motores.⁸

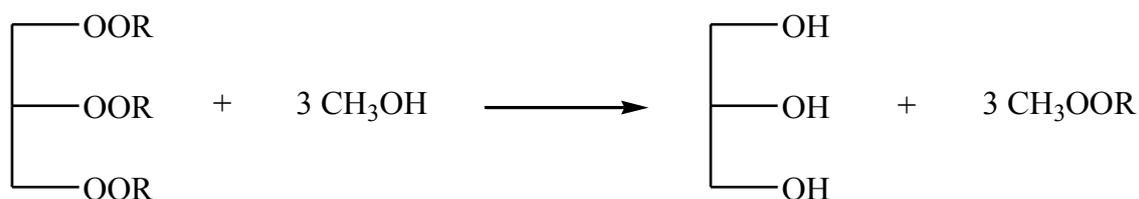


Figura 1: Representação geral da reação de transesterificação em triacilglicerídeos.

Devido a características físico-químicas de óleos e gorduras *in natura*, como alta viscosidade e baixa volatilidade, a utilização direta desse tipo de material em motores pode provocar diversos problemas a longo prazo, como a deposição de material e engasgos do motor.⁸ Reações como a de transesterificação são eficientemente capazes de modificar as propriedades físico-químicas dos óleos permitindo a utilização direta nos motores.

A transesterificação foi uma reação desenvolvida por Duffy e Patrick em 1853. Com o avanço de pesquisas na área da oleoquímica, a reação foi estudada sob as mais variadas condições, utilizando diferentes materiais, como óleos de soja e girassol, álcoois, principalmente metanol e etanol, e em variados sistemas catalíticos, sendo eles homogêneos, heterogêneos, enzimáticos ou em fluidos supercríticos.¹ O produto da reação de transesterificação (mistura de ésteres, geralmente, metílicos ou etílicos de

ácidos graxos, obtidos na reação de alcoólise do triacilglicerídeo) ficou conhecido como biodiesel.⁹

No Brasil, o biodiesel é empregado em forma de blends e, atualmente, todo diesel comercializado, exceto o marítimo, deve apresentar 5 % de ésteres metílicos ou etílicos em sua composição.¹⁰ De forma geral, o biodiesel apresenta, quando comparado ao diesel de petróleo, maior densidade, viscosidade, índice de cetano e ponto de fulgor e menor volatilidade. A utilização de blends proporciona o aprimoramento do combustível, já que a adição do biodiesel, mesmo que em pequenas quantidades, é capaz de alterar as propriedades físico-químicas daquele, agregando características pertinentes à eficiência da combustão.¹¹ Segundo Candeia *et al*¹¹ e seus estudos sobre blends de biodiesel de soja, tal eficácia pode ser atribuída ao fato de cerca de 10 % da massa do biocombustível ser composta por oxigênio, enquanto o diesel de petróleo é composto basicamente por hidrocarbonetos. Essa quantidade a mais de oxigênio propicia uma queima mais efetiva. O aumento do índice de cetano também contribui positivamente, uma vez que esse incremento retarda a ignição do combustível.

Berman *et al*¹² estudaram de forma minuciosa a blenda de biodiesel de óleo de mamona/diesel de petróleo (10:90). Nesse estudo, a blenda foi comparada ao diesel com baixo teor de enxofre (ULSD) e ao biodiesel de mamona puro. Observa-se na tabela 1 que a blenda sugerida apresenta características intermediárias a ambos. Propriedades de fundamental importância do ponto de vista funcional do combustível como viscosidade (3,621 mm²/s) e lubricidade (139 μm) apresentaram resultados bastante satisfatórios de acordo com normas da ASTM. Todavia, embora a blenda tenha obedecido a todos os padrões estabelecidos pelas normas, exige-se que o biodiesel puro também esteja dentro de especificações pré-estabelecidas, e em certas análises, como a de viscosidade (15,17 mm²/s) e a de temperatura de destilação (398,7 °C), essas especificações não foram atendidas.

Tabela 1. Propriedades físico-químicas dos combustíveis B100, B10 e ULSD comparadas aos padrões ASTM. (Adaptado de Berman *et al*, 2011.)¹²

Propriedade	ASTM D6751 B100		ASTM D7467 B10		ASTM D975 ULSD	
	Especificação	Resultado	Especificação	Resultado	Especificação	Resultado
Viscosidade cinemática a 40 °C, mm ² /s	1,9 - 6,0	15,17	1,9 - 4,1	3,62	1,9 - 4,1	3,28
Índice de cetano	47 (mín)	48,9	40 (mín)	48,5	40 (mín)	51,4
Ponto de névoa, °C	Informar	-14	Informar	-1	Informar	-1
Estabilidade oxidativa, 110 °C, h	3 (mín)	44	6 (mín)	86,4	20 (mín)	114,7
Temperatura de destilação (recuperação de 90 % do volume), °C	360 (máx)	398,7	343 (máx)	340,8	338 (máx)	n/d
Lubricidade, HFRR a 60 °C, mm	--	--	520 (máx)	139	520 (máx)	n/d

Apesar de a utilização de 100 % do biocombustível ser possível nos motores atuais, um dos maiores empecilhos para sua aplicação é a baixa estabilidade oxidativa. Dependente do grau de insaturação do biodiesel, a oxidação provoca o aumento da viscosidade e uma redução da capacidade calorífica do biodiesel, ocasionando a produção de partículas insolúveis. Esse material indesejado pode provocar o entupimento de filtros e injetores, que por consequência leva a uma ineficiência da queima do combustível.¹³ Outro problema que inviabiliza a utilização do biodiesel puro em motores é a baixa capacidade de escoamento a temperaturas reduzidas. Já é de conhecimento fundamentado que quanto maior a concentração de ésteres saturados no biodiesel, maior a dificuldade de fluidez do material devido ao empacotamento das moléculas.¹⁴

Tabela 2. Composição de ácidos graxos de alguns óleos e gorduras. (Retirado de Carvalho, 2008.)¹⁵

Fonte	Ácidos graxos (% m/m)					Saturação total (%)	
	16:0	18:0	18:1 cis	18:2	18:3	Saturados	Insaturados
Canola	4	2	60	21	11	6	92
Girassol	5	3	34	56	<1	8	90
Soja	8	4	23	54	7	12	84
Gordura de Piqui	40	2	47	4	-	42	51
Banha de porco	24	10	51	11	<1	37	62
Gordura de frango	22	6	40	20	2	30	62

As duplas ligações dos ácidos graxos poliinsaturados 18:1, 18:2 e 18:3, presentes no óleo de soja, estão dispostas na forma não conjugada, ou seja, separadas por grupos CH₂. Esses hidrogênios metilênicos são bastante reativos, podendo ser removidos por espécies radicalares ou nucleofílicas. Na reação de oxidação das olefinas dos ácidos graxos, esses hidrogênios são abstraídos formando um intermediário radicalar. A dupla ligação estabiliza o radical formado mediante um sistema de conjugação radical alílico (Figura 2). Depreende-se daí que quanto maior a quantidade de duplas ligações não conjugadas maior será a estabilidade do radical alílico formado e, conseqüentemente, mais suscetível à oxidação o ácido graxo será.¹⁵

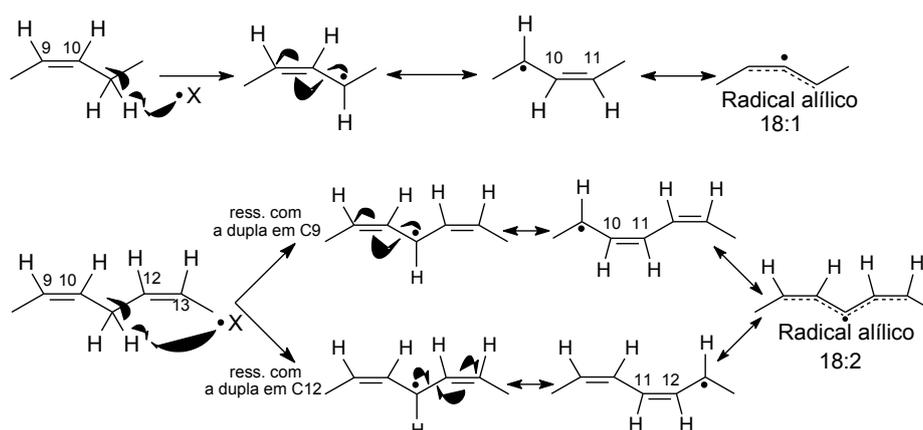


Figura 2. Reação radicalar de oxidação dos ácidos graxos 18:1 e 18:2. (Retirado de Carvalho, 2008.)¹⁵

Tais propriedades, no mínimo contraditórias, evidenciam a necessidade de obter-se um biocombustível capaz de driblar tanto a reduzida estabilidade oxidativa quanto a irregular fluidez do material a baixas temperaturas.

Alternativa com potencial sucesso para contornar tais problemas é a modificação do biodiesel. Através de reações direcionadas aos grupos funcionais do biocombustível, como insaturações e grupos ésteres, há a possibilidade de obterem-se materiais com propriedades físico-químicas dentro dos padrões exigidos.¹⁴ Reações de hidrogenação, esterificação, epoxidação, metátese, alquilação, entre outras, tem sido estudadas com a intenção de obter produtos com propriedades adequadas.¹⁶

Wadumesthrige *et al*¹⁴ analisaram de forma contundente reações de hidrogenação, epoxidação e hidrólise de biodiesel derivado de gordura de aves. As reações mostraram-se efetivas quanto à modificação das propriedades físico-químicas originais do biodiesel. A reação de hidrogenação apresentou-se como um bom método para aumentar tanto a estabilidade oxidativa quanto o índice de cetano do biocombustível, porém, devido à falta de insaturações, a possibilidade de utilização desse produto em temperaturas reduzidas torna-se inviável. Já a reação de hidrólise pode ser empregada satisfatoriamente com o intuito de aumentar a lubricidade do combustível. A reação de epoxidação, entretanto, foi a que melhores resultados apresentou. Apesar de não melhorar as propriedades de fluxo a frio do biodiesel, se enquadra em todas as demais normas ASTM e mostra-se a mais promissora das três modificações propostas.

Tabela 3: Propriedades físico-químicas do biodiesel antes e após as reações de modificação.
(Adaptado de Wadumesthrige *et al*, 2009.)¹⁴

Propriedade	ASTM D6751 B100	Biodiesel destilado	Hidrogenação (2 h)	Epoxidação (5 h)	Hidrólise (18 h)
Índice de acidez, mg KOH/g	0,50 (máx)	0,21	0,387	0,417	0,26
Teor de água, ppm (KF)	--	353±14,2	402±16,2	487±17,1	624±19,4
Viscosidade cinemática, 40°C, mm ² /s	1,9 - 6,0	3,99	5,05	4,26	4,25
Ponto de névoa, °C	Informar	2	15	2	3
Ponto de fluidez, °C	--	-3	18	-3	-3
Estabilidade oxidativa, 110 °C, h	3 (mín)	0,71±0,44	11,8±0,26	4,3±0,34	2,3±0,29
Poder calorífico, MJ/kg	--	39,55±0,02	39,84±0,05	39,33±0,01	39,25±0,05
Índice de cetano	47 (mín)	47,3±1,3	58,4±1,9	63,2±2,3	51,3±1,8
Lubricidade, HFRR a 60 °C, µm	--	565±14	330±17	476±18	199±15

2.2 Reação de epoxidação

De fato, a epoxidação de monoésteres derivados de ácidos graxos tem sido intensamente estudada. Com um imenso potencial industrial, o produto dessa reação é empregado, por exemplo, como fungicida, como revestimento em sistemas que utilizam uretanas e álcoois, como intermediários para processos farmacêuticos, na indústria de polímeros (altera a flexibilidade, elasticidade e resistência do PVC), entre inúmeras outras aplicações.^{17, 18}

A alta reatividade do grupo oxirano formado é o que agrega relevante importância à reação de epoxidação. A elevada tensão angular formada (Figura 3) torna o grupo suscetível a ataques nucleofílicos e a polimerizações.

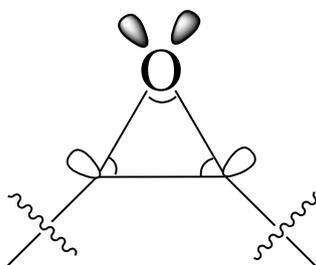


Figura 3. Orbitais e ângulos (aproximadamente 60°) do grupo epóxido.

Observa-se que devido à baixa eletrofilicidade do peróxido de hidrogênio, bem como à tendência em formar radicais, é necessário o uso de catalisadores bastante efetivos para que a reação de epoxidação ocorra. A utilização de ácidos fortes como ativadores do peróxido para que este aja com maior eficiência como doador de oxigênio é comum e industrialmente aplicada.^{19, 20}

Como alternativa, Campanella *et al*⁴ estudaram a epoxidação de biodiesel de soja e de girassol através da formação *in situ* de ácido perfórmico (Figura 4). Aliada às altas conversões obtidas, a amena temperatura utilizada (40 °C) tornou o estudo bastante satisfatório, uma vez que, até então, a reação era comumente realizada a 60 °C. Contudo, o excesso de peróxido de hidrogênio utilizado (60 % em massa, 5 mols) no sistema não é adequado do ponto de vista ambiental.

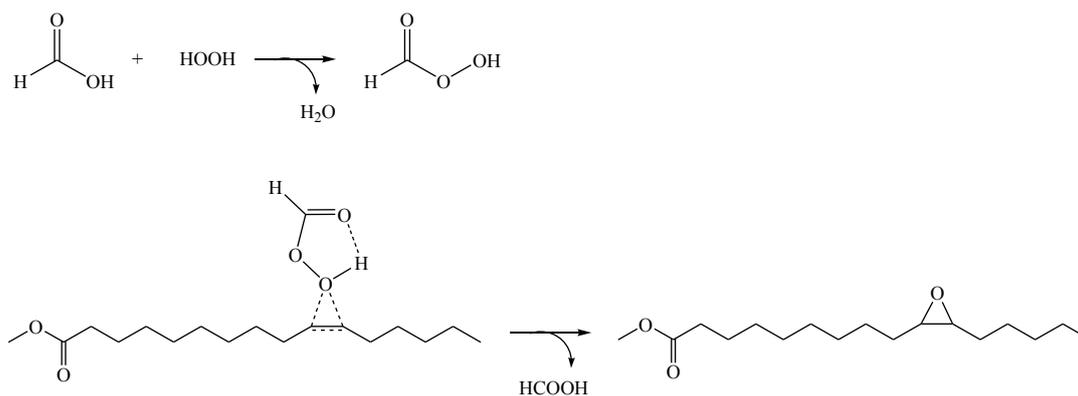


Figura 4. Reação de epoxidação do ácido oleico pelo ácido per fórmico.

Relutando, entretanto, em prosseguir com técnicas que fujam dos princípios norteados pela química verde, o desenvolvimento de catalisadores eficientes tem sido prioridade. Estudos demonstram a eficácia de óxidos do grupo IV suportados em $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$, especialmente o MoO_x (rendimentos > 90 %, reutilizado por 6 vezes sem perda de atividade), na epoxidação de ésteres metílicos do óleo de soja.¹⁷ Catalisadores de $\text{Nb}_2\text{O}_5/\text{SiO}_2$ ²¹ e de $\{\text{PO}_4[\text{W}(\text{O})(\text{O}_2)_2]_4\}^{-3}$ suportado em nanotubos de haloisita²² mostraram-se também ativos para a epoxidação do óleo de soja. Contudo, o catalisador de tungstênio apresenta queda na atividade catalítica após três ciclos, e o de nióbio não demonstra seletividade para epóxidos, gerando o produto dihidroxilado que, segundo os autores, deve-se à presença de sítios ácidos de Brønsted proporcionais à concentração de nióbio no catalisador.

Suarez *et al*²³ estudaram a epoxidação do oleato de metila na presença de catalisadores de Al_2O_3 dopados com Sn, Zn, Ti e Zr com o intuito de avaliar os efeitos dos sítios ácidos de Lewis. Foi observado que o aumento da acidez do catalisador, bem como a diminuição da área superficial, contribuem negativamente com a reação, reduzindo de forma drástica os rendimentos obtidos (33 % com Al_2O_3 comercial para 0,5 com $(\text{Al}_2\text{O}_3)_{0,8}(\text{TiO}_2)_{0,2}$).

Torres *et al*,¹⁹ utilizando peróxido de hidrogênio (2 mols), catalisador derivado do ácido selênico (0,1–1 % mmol) e variados solventes (1 mL), desenvolveram um método muito eficaz para a epoxidação do biodiesel de soja (Figura 5) com altos rendimentos e seletividade para a formação de epóxido (> 99 %) e ainda com a possibilidade de reutilização do catalisador por sete ciclos.

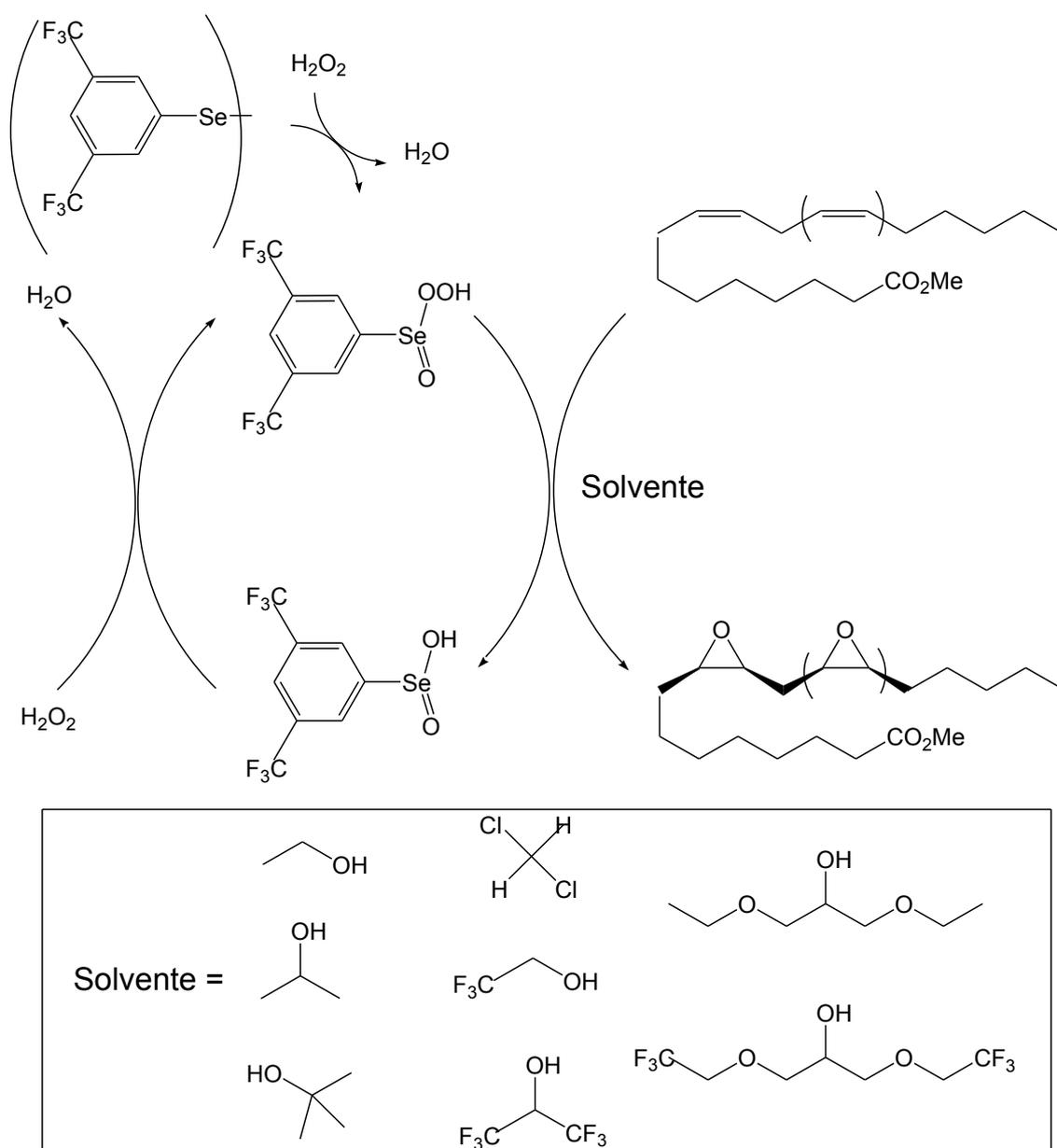


Figura 5: Esquema da reação de epoxidação do sistema desenvolvido por Torres *et al.* (Retirado de Torres *et al.*, 2012.)¹⁹

2.3 Epoxidação enzimática

Ainda que resultados bons tenham sido obtidos com a aplicação de catalisadores químicos heterogêneos na reação de epoxidação de óleos e gorduras, a utilização de enzimas, que são catalisadores biológicos, nesse tipo de mecanismo tem se apresentado de forma bastante satisfatória.

Enzimas são biocatalisadores formados por cadeias de resíduos de aminoácidos, possuem elevada atividade, seletividade e especificidade, o que permite realizar reações sob condições experimentais relativamente brandas.²⁴ Dentre as várias classes de enzimas existentes, as lipases (Figura 6) são as que apresentam o maior leque de aplicação – produção de fármacos, cosméticos, produtos de limpeza, alimentos, entre outros. Embora seja reconhecidamente responsável pela hidrólise de triacilglicerídeos, lipases são capazes de interagir com inúmeros outros substratos, tais como ésteres, tióis, amidas, polióis.²⁵

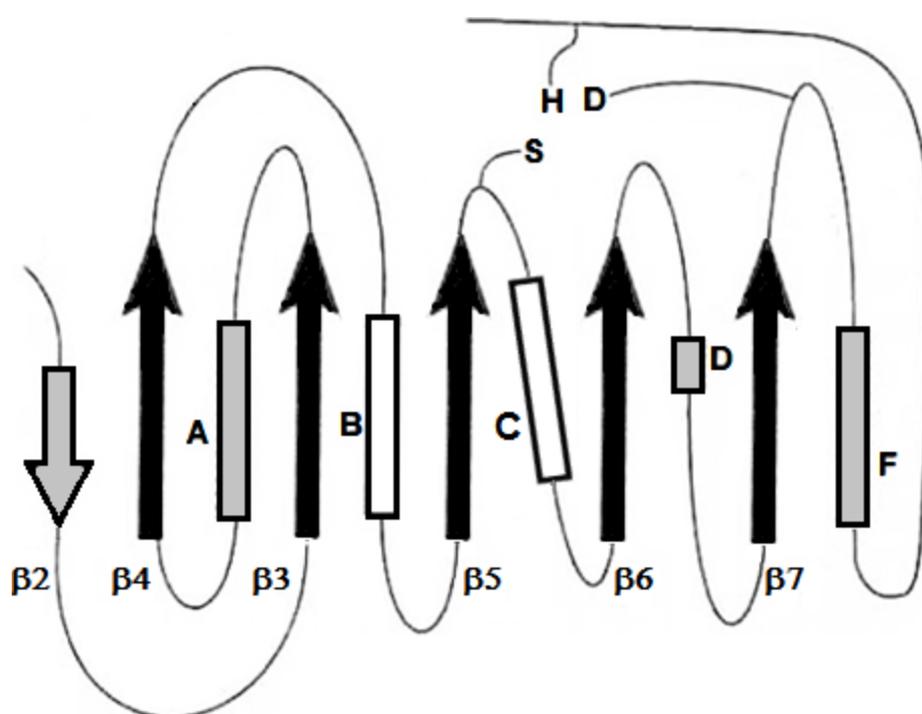


Figura 6. Estrutura geral de lipases. (Adaptado de Brígida, 2010).²⁶

As lipases são classificadas como α/β hidrolases – proteínas com α hélices e folhas β distribuídas por toda a estrutura de forma homogênea. Fica evidenciado na figura 6 essa disposição característica, onde A, B, C, D e F são α hélices e $\beta 2$, $\beta 3$, $\beta 4$, $\beta 5$, $\beta 6$ e $\beta 7$ são folhas β e as estruturas em preto ou branco ocorrem nas estruturas de todas as lipases e as em cinza na maioria delas.

As lipases apresentam ainda um centro ativo formado por uma tríade de aminoácidos – Serina, Histidina e Ácido Aspártico/Glutâmico – e, comumente, uma “tampa” anfifílica que cobre o sítio ativo da enzima. Quando em contato

com a interface aquosa/orgânica, a maioria das lipases sofrem um rearranjo estrutural promovendo a exposição do sítio ativo e gerando uma superfície hidrofóbica e esta por sua vez interagindo com o substrato. Essa interação localizada nas redondezas do sítio ativo e que modifica as propriedades funcionais da enzima é denominada ativação interfacial (Figura 7).²⁶

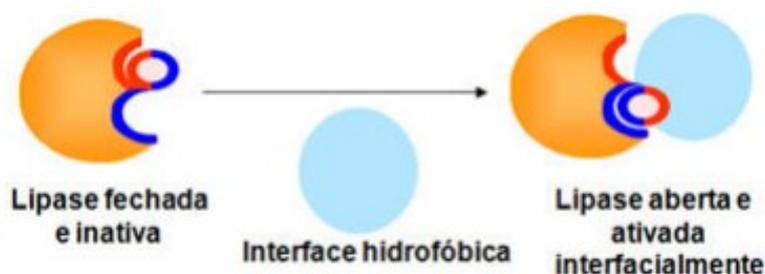


Figura 7. Representação do processo de ativação interfacial. (Retirado de Salvador *et al*, 2009.)²⁷

Dentro da classe das lipases, a *Candida antarctica* lipase B (CalB) tem se apresentado de forma bastante ativa para a reação de epoxidação de derivados de ácidos graxos. Essa enzima apresenta um sítio ativo formado pela tríade de aminoácidos Serina, Histidina e Ácido Aspártico e um orifício formado pelos aminoácidos Glutamina e Treonina, responsáveis por estabilizar intermediários oxiâniônicos através de ligações de hidrogênio. E embora possua a tampa anfifílica mencionada anteriormente, não apresenta o fenômeno de ativação interfacial. No caso da CalB, o acesso ao sítio ativo da proteína é realizado através de um canal bastante estreito (Figura 8).²⁸

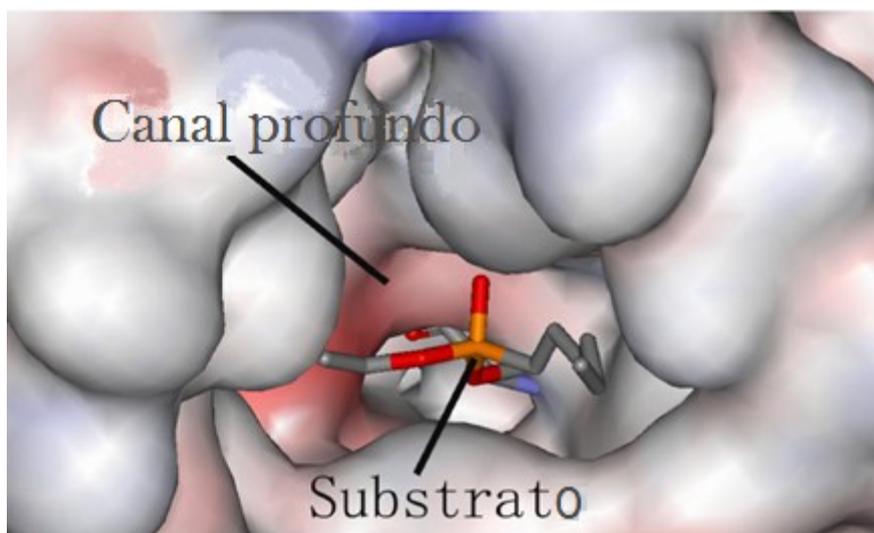


Figura 8. Representação do acesso ao sítio ativo da enzima CalB. (Adapado de Li *et al*, 2010.)²⁹

A reação de epoxidação de ésteres derivados de ácidos graxos de óleos e gorduras pode ser explicada a partir do mecanismo para a transesterificação de ésteres sugerido por Li *et al* (Figura 9).

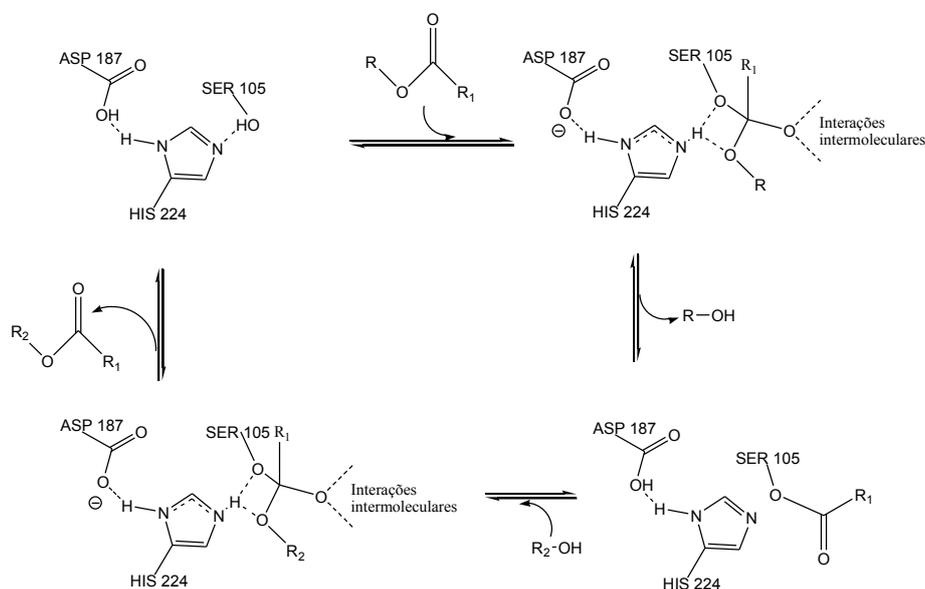


Figura 9. Mecanismo de transesterificação catalisado pela CalB. (Adaptado de Li *et al*, 2010.)²⁹

No caso da epoxidação do biodiesel, por exemplo, a reação de transesterificação é interrompida na entrada do álcool substituinte e inicia-se a hidrólise do éster (Figura 9) formando o ácido carboxílico correspondente. Svedendahl *et al*²⁸ sugeriram um mecanismo (Figura 10) da reação de formação do perácido sendo catalisada pela enzima a partir da Serina 105. Há primeiramente a formação da acilenzima via ataque OH do aminoácido à carbonila do ácido graxo e a eliminação de água. Depois, o peróxido de hidrogênio ataca a carbonila, ligada agora ao aminoácido, formando o perácido e este afastando-se do sítio ativo da enzima. A molécula reage com a olefina fora do biocatalisador formando o epóxido correspondente sem apresentar estereosseletividade.

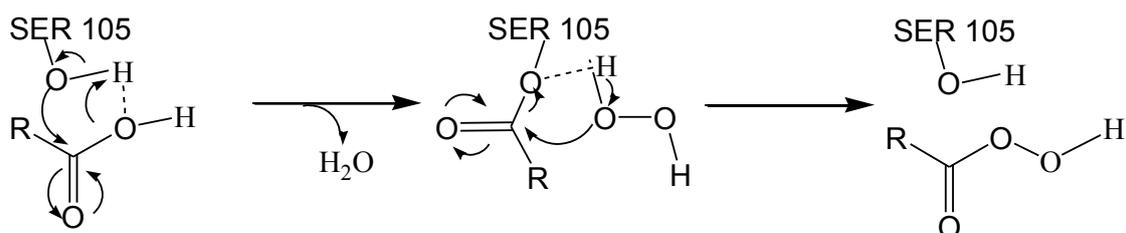


Figura 10. Mecanismo de formação do perácido catalisado pela CalB.

Em 1995, Warwel e Klaas,³⁰ com o intuito de epoxidar diversos ácidos carboxílicos, dos quais se derivam os ésteres metílicos presentes em biocombustíveis, utilizaram um excesso de H₂O₂ 60 % em massa (7,5 mmols) na presença da CalB (100 mg). Rendimentos de até 91 % foram atingidos e a enzima pôde ser reutilizada por quinze vezes sem perda significativa de atividade.

A otimização do processo de epoxidação de ácidos graxos foi analisado por Törnvall *et al.*²⁰ Variáveis como temperatura, concentração de solvente no meio reacional, diluição dos reagentes (a atividade da enzima é consideravelmente reduzida ao utilizar H₂O₂ 12 M e não 6 M) e a dependência hidrofílica por parte da enzima podem contribuir inclusive para a desnaturação do biocatalisador. Prova da sistemática do processo de epoxidação são os estudos apresentados por Orellana-Coca *et al.*³¹ Suas pesquisas demonstram a perda de atividade da enzima CalB ao serem utilizados solventes como o etanol. Segundo os autores, o álcool pode desidratar o biocatalisador tornando a reação inviável.

Vlček e Petrović determinaram as condições ideais para a reação de epoxidação do óleo de soja.³² Com a relação molar de H₂O₂/duplas ligação de 1:1, a adição de 8 % em massa de ácido oleico, 110 % em massa de tolueno e 4 % em massa de CalB (em relação à massa de óleo de soja), a reação de epoxidação apresentou valores superiores a 90 % e especificidade para a formação do grupo oxirano. Entretanto, sob tais condições, observou-se a desnaturação da enzima após alguns ciclos.

Em suas pesquisas, Schneider *et al.*⁷ demonstraram que a CalB é capaz de epoxidar eficientemente ésteres metílicos de óleo de girassol com rendimentos de até 99,9 %. Utilizando um sistema bifásico e o ácido caprílico como precursor, em 16 h o rendimento máximo foi atingido e a formação exclusiva de epóxido também.

2.4 Emprego de Líquidos Iônicos – LIs – na catálise enzimática

Segundo há tempos como advento da Química Verde, os Líquidos Iônicos – LIs – vêm sendo aplicados constantemente na área da catálise. A melhor definição para LIs, ou sais fundidos, é a de que são compostos líquidos que apresentam estruturas cristalinas iônico-covalentes. Mais especificamente, LIs são compostos iônicos que mantêm-se no estado líquido à temperatura ambiente. São compostos bastante estáveis a temperaturas elevadas – cerca 300 °C –, apresentam reduzida pressão de vapor e alta condutividade iônica.³³ Apresentam ainda acidez de Lewis/Brønsted variável e alta polaridade, além de serem solúveis e solubilizarem tanto compostos orgânicos quanto inorgânicos.³⁴ Vale ressaltar a dependência das propriedades físico-químicas à composição do material – ânion/cátion.³⁵

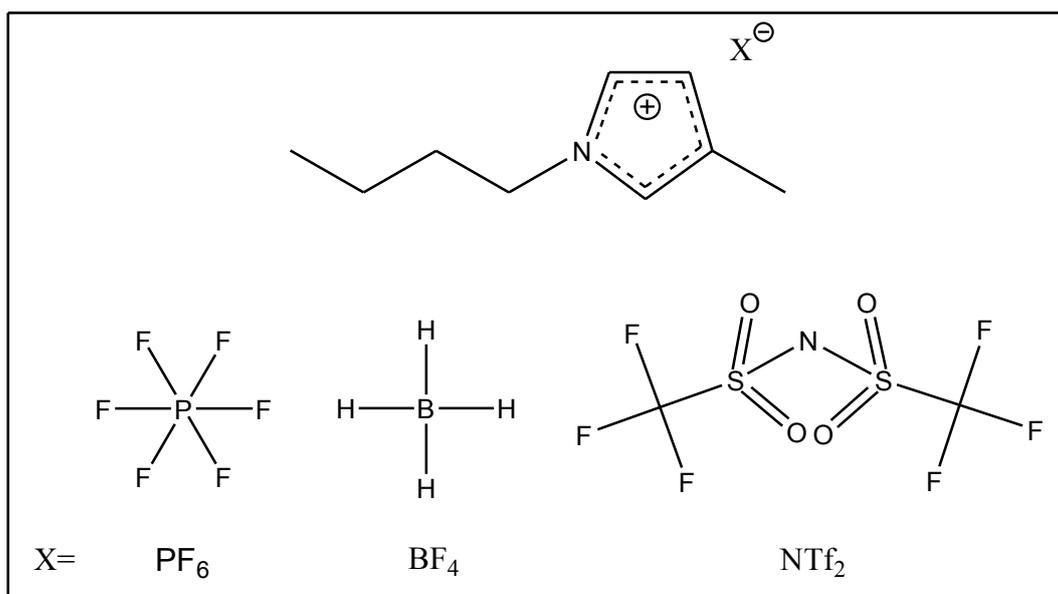


Figura 11. Representação geral do BMI com seu ânion.

LIs derivados do 1,3-dialquilimidazólio – DAI – (Figura 11) têm sido largamente utilizados em catálise.³⁶ O cátion pode ser facilmente modificado a fim de alterar as propriedades do material. A substituição 1,3, aumentando ou diminuindo as cadeias alifáticas, proporciona diferença crucial na solubilidade e interação do LI no meio reacional, tal qual a escolha do ânion, como pode ser observado na tabela abaixo.

Tabela 4. Propriedades físico-químicas de líquidos iônicos utilizando o 1-alkil-3-metilimidazólio como cátion. (Adaptado de Alves, 2007.)³⁷

R	X	Tt ^a (°C)	Tf ^b (°C)	Td ^c (°C)	η (mPa/s) ^d	d (g.cm ⁻³) ^e	s (mScm ⁻¹) ^f
Et	BF ₄	-92	13	447	37	1,28	14
nPr	BF ₄	-88	-17	435	103	1,24	5,9
nBu	BF ₄	-85	-	435	180 (233)	1,21	3,5 (8,6)
nBu	PF ₆	-61	10	-	219 (312)	1,37	1,6 (6,5)
nBu	AlCl ₄	-88	-	-	(294)	1,23	(24,1)
nBu	CF ₃ SO ₃	-	16	-	90	1,22	3,7
nBu	NTf ₂	-	-4	>400	69	1,43	3,9
nBu	CF ₃ CO ₂	-30	-	-	73	1,21	3,2

^a Temperatura de transição vítrea, ^b Temperatura de fusão, ^c Temperatura de decomposição, ^d Viscosidade a 25 °C e entre parênteses a 30 °C, ^e Densidade a 25 °C, ^f Condutividade a 25 °C e entre parênteses a 60 °C.

Os Líquidos Iônicos são materiais bastante organizados estruturalmente falando (Figura 12). Sua estrutura mantém-se similar a do estado sólido mesmo quando no estado líquido. Depreende-se daí a justificativa de o porquê desses compostos apresentarem alta viscosidade e baixa pressão de vapor. Interações presentes nos LIs são as mais variadas. Observamos ligações de hidrogênio entre cátions e ânions, interações de Van Der Waals presentes entre as cadeias alifáticas, do tipo empilhamento π entre os anéis do imidazólio e ainda interações Coulombianas de longo alcance.^{36,15} Estudos evidenciam, contudo, que o comportamento estrutural do LI na presença de outros compostos pode ser modificado e modificar características de enzimas no meio reacional, como atividade e seletividade.^{36,38,39}

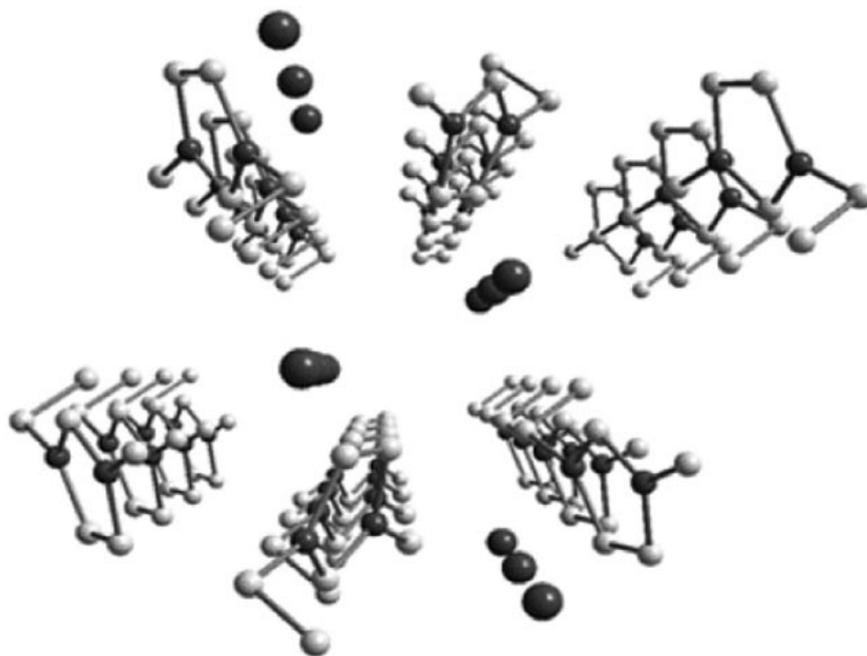


Figura 12. Estrutura 3D simplificada de LIs do tipo $[(DAI)^{\alpha}(X)^{\alpha-n}]^{n+}[(DAI)^{\alpha-n}(X)^{\alpha}]^{n-}$. (Retirado de Dupont *et al*, 2006.)³⁶

Como mencionado, LIs têm sido empregados nos mais variados tipos de reações (de hidrogenações à clivagens e isomerizações).³⁴ A aplicação destes na presença de biocatalisadores também tem sido estudada, e a epoxidação novamente ocorre de forma efetiva.

No estudo de Silva *et al*⁴⁰ foi analisada a atividade da CalB e de outras lipases na presença de líquidos iônicos hidrofóbicos (BMI.PF₆ e BMI.NTf₂) e de um hidrofílico (BMI.BF₄) para epoxidação do oleato de metila. A utilização de LIs no processo de epoxidação do éster teve por objetivo estudar a estabilização do epóxido formado na presença das enzimas.

Nota-se que grande parte dos estudos realizados anteriormente identificaram a necessidade de utilizar solventes orgânicos a fim de atingir a seletividade esperada para a formação do epóxido. Como já mencionado, devido à grande tensão angular do grupo oxirano, este está suscetível a ataques nucleofílicos (Figura 13).

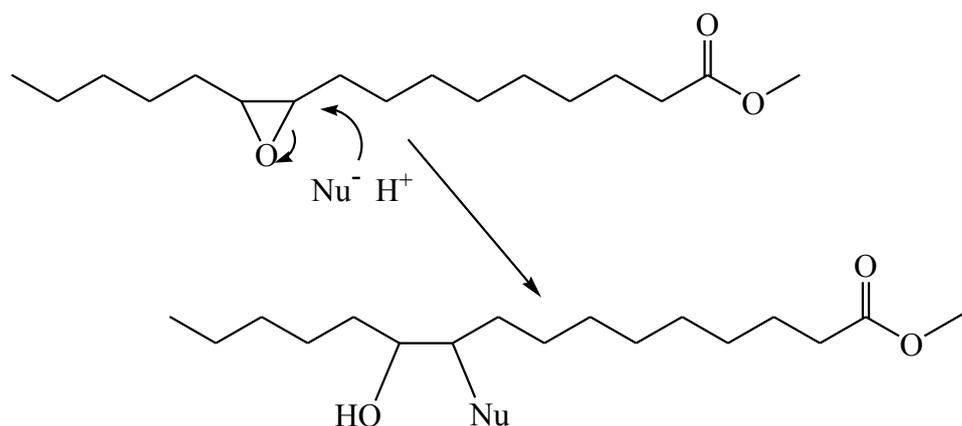


Figura 13. Abertura do anel epóxido.

No caso da epoxidação utilizando H_2O_2 como doador de oxigênio, há liberação de água no meio reacional proporcionando a hidrólise do grupo oxirano e formando o produto dihidroxilado – DIOL –, exatamente o observado pelo grupo de Silva. A substituição de solventes orgânicos por LIs é fundamentada no emprego de um solvente não-tóxico, reutilizável e capaz de atingir a seletividade alcançada por outros solventes.

Capítulo 3: Materiais e Métodos

3.1 Reagentes

Para as sínteses realizadas neste trabalho, foram utilizados reagentes comerciais e sem prévia purificação. Os reagentes adquiridos foram: óleo de soja refinado LIZA; KOH 85,0 %, Al_2O_3 básico, terra de infuzórios, acetonitrila 99,8 %, HCl 37,0 %, H_2O_2 30,0 %, *n*-butanol 99,4 %, trietilamina 99,5 %, CH_2Cl_2 99,5 %, MgSO_4 98,0 % e acetato de etila 99,5 % da VETEC Química Fina LTDA; metanol 99,8 % da Synth; H_2PO_3 85,0 % da Ecibra; tris(hidroximetil)aminometano da Merck; cloreto de metanossulfonila 98,0 % da Alfa Aesar; metilimidazol 97,0 %, NaBF_4 98,0 % e KPF_6 99,5 % da Acros Organic; bis(trifluorometanosulfonil)imida de lítio da TCI America; cilindro de nitrogênio grau industrial da White Martins.

As enzimas utilizadas no trabalho foram cedidas pelo Departamento de Biocatálisis do Instituto de Catálisis y Petroquímica da Universidad Autónoma de Madrid localizada em Madri – Espanha. A ancoragem do biocatalisador foi realizada em um suporte hidrofóbico de cadeias carbônicas de 18 carbonos onde aminoácidos eram responsáveis por fixar a enzima no suporte.⁴³

3.2 Síntese do biodiesel e dos líquidos iônicos e hidratação da enzima

A síntese do éster metílico do óleo de soja foi realizada pela transesterificação em meio básico do óleo de soja de acordo com método já descrito na literatura⁴¹ e produziu um líquido menos viscoso e mais claro que o óleo de soja. A síntese dos LIs BMI. PF_6 , BMI. BF_4 e BMI. NTf_2 também foi realizada segundo método relatado na literatura.⁴² A síntese gerou produtos translúcidos e bastante viscosos. Todos os compostos foram armazenados sob atmosfera de N_2 e o biodiesel foi estocado em um freezer.

Como mencionado, a enzima utilizada foi enviada por colaboradores espanhóis que sintetizaram três lotes da enzima suportada – enzimas A, B e C. A ancoragem do biocatalisador foi realizada em um suporte hidrofóbico de cadeias alifáticas com 18 carbonos onde aminoácidos são responsáveis por

fixar a enzima neste suporte.⁴³ Segundo orientação do grupo, devido ao tempo de transporte, seria aconselhável realizar um hidratação prévia do biocatalisador. Mais tarde foi confirmada por estudos reacionais a necessidade desse procedimento. A hidratação da enzima foi realizada através de uma solução 30 % v/v de acetonitrila em solução tampão com pH 7, preparada utilizando uma solução de tris(hidroximetil)aminometano e outra de HCl. A enzima foi imersa em 5 mL da solução acetonitrila/tampão e agitada por 2 h. Após o tempo transcorrido, a enzima foi lavada com alíquotas de água destilada, totalizando cerca de 30 mL, e decantada.

3.3 Epoxidação do biodiesel de soja

As reações de epoxidação foram realizadas utilizando um balão de duas bocas de 100 mL, um banho termostático com temperatura fixada em $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ e sob agitação magnética durante o tempo desejado. A figura 14 mostra simplificada o aparato utilizado para as reações.

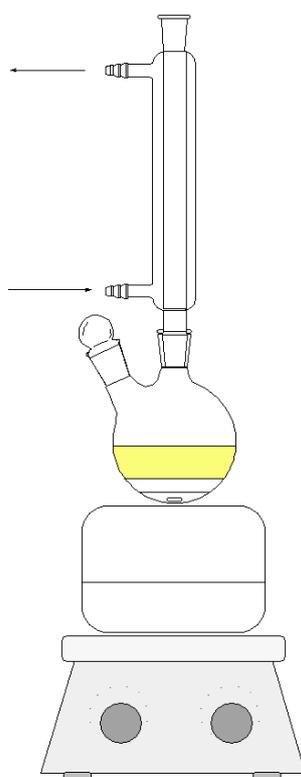


Figura 14. Aparato reacional utilizado na reação de epoxidação do biodiesel.

O procedimento para iniciar a reação foi realizado da seguinte forma:

- a massa de enzima (0,05, 0,1 ou 0,2 g) era pesada, hidratada e lavada;
- 10 g de biodiesel eram pesados diretamente no balão;
- posteriormente, a massa de peróxido de hidrogênio (1, 2, 4 ou 8 mols) também era pesada diretamente no balão;
- por fim, a massa do LI (1, 2,5 ou 5 mL) era pesada também no balão;
- a enzima era adicionada ao balão e a reação então iniciada.

Seis alíquotas de cerca de 0,23 mL (quantidade necessária para a análise de RMN - ^1H) foram retiradas a cada hora com o intuito de identificar o comportamento da reação (essa quantidade de material removido não é capaz de alterar significativamente o meio reacional já que cientificamente é aceito a retirada de até 10 % em massa de reagente). As análises demonstraram um comportamento linear no andamento da reação, dessa forma, como dados efetivos, foram utilizados apenas os resultados obtidos das alíquotas referentes à 6^a hora de cada reação.

Dependendo do sistema são observadas até três fases, sendo a inferior (ou iônica) constituída pelo LI (no início da reação apresenta-se de forma translúcida e no fim esbranquiçada), a fase superior (ou orgânica) formada pelo biodiesel e, no final, também pelos produtos da reação, e por fim, a fase mediana que é composta pelo H_2O_2 e pela enzima.

O estudo do reciclo da enzima foi realizado seguindo parâmetros da alíquota de 2 h da reação com 2 % em massa de CalB (a quantidade de produtos formados já era significativa, simplificando assim o estudo de reuso do biocatalisador). A reação de 2 h foi acompanhada por quatro reciclos, também de 2 h cada. Após o término da reação, todo o meio reacional foi retirado do balão e centrifugado a fim de se separar a alíquota para análises e a enzima para ser reutilizada. Nenhum tratamento foi aplicado à enzima para que pudesse ser reutilizada.

3.4 Caracterização dos produtos formados

As medidas de infravermelho – IV – foram obtidas através do espectrômetro IR Prestige-21 da Shimadzu com frequências de absorção escaladas em cm^{-1} . Para as análises, foi utilizada uma janela de ATR e obtidos espectros de 4000 a 600 cm^{-1} .

As análises de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN - ^1H) foram realizadas utilizando os espectrômetros Eft-90 NMR Spectrometer da Anasazi Instruments, Inc. com 90 MHz e Mercury plus, 7,05 T da VARIAN com 300 MHz. Foi utilizado como solvente para as análises CDCl_3 no equipamento de 300 MHz e CCl_4 no de 90 MHz (quando necessário). Os deslocamentos químicos (δ) dos espectros estão expressos em partes por milhão (ppm).

3.5 Cálculo do percentual de produtos obtidos

No presente trabalho, a análise por infravermelho das alíquotas retiradas teve um caráter apenas qualitativo. Já as análises de RMN - ^1H foram utilizadas para determinar tanto a conversão dos reagentes quanto o rendimento dos produtos obtidos após a reação de epoxidação do biodiesel.

O valor da integração da área de um sinal qualquer no RMN - ^1H é diretamente proporcional à abundância de núcleos de H naquele deslocamento químico.⁴⁴ Dessa forma, conclui-se que o valor da integração também é diretamente proporcional à taxa com que os reagentes são consumidos ou os produtos formados.

Devido à acidez do hidrogênio (H) ligado ao oxigênio (O) do ácido carboxílico formado, a permuta com o deutério (D) do solvente é observada. Sendo assim, a quantificação do ácido carboxílico gerado teve de ser feita pelo equipamento de menor resolução (90 MHz), uma vez que não é necessário o uso de solventes para a análise.

A integração dos sinais foi realizada de forma diferente nos espectros obtidos nos dois equipamentos de RMN. Na primeira, realizada nos espectros do RMN de 90 MHz, as integrais foram referenciadas pelo sinal dos

hidrogênios alifáticos D, E, F, G e H fixando um valor igual a 1. Para reduzir erros quantitativos, foi necessário utilizar essa metodologia, uma vez que não houve separação efetiva entre os picos da região. Na segunda, realizada nos espectros do RMN de 300 MHz, as integrais foram referenciadas pelo sinal do singlete H, referente aos 3 H da metila terminal do éster metílico, também fixando um valor igual a 1. Ambas as metodologias são evidenciadas na Figura 15.

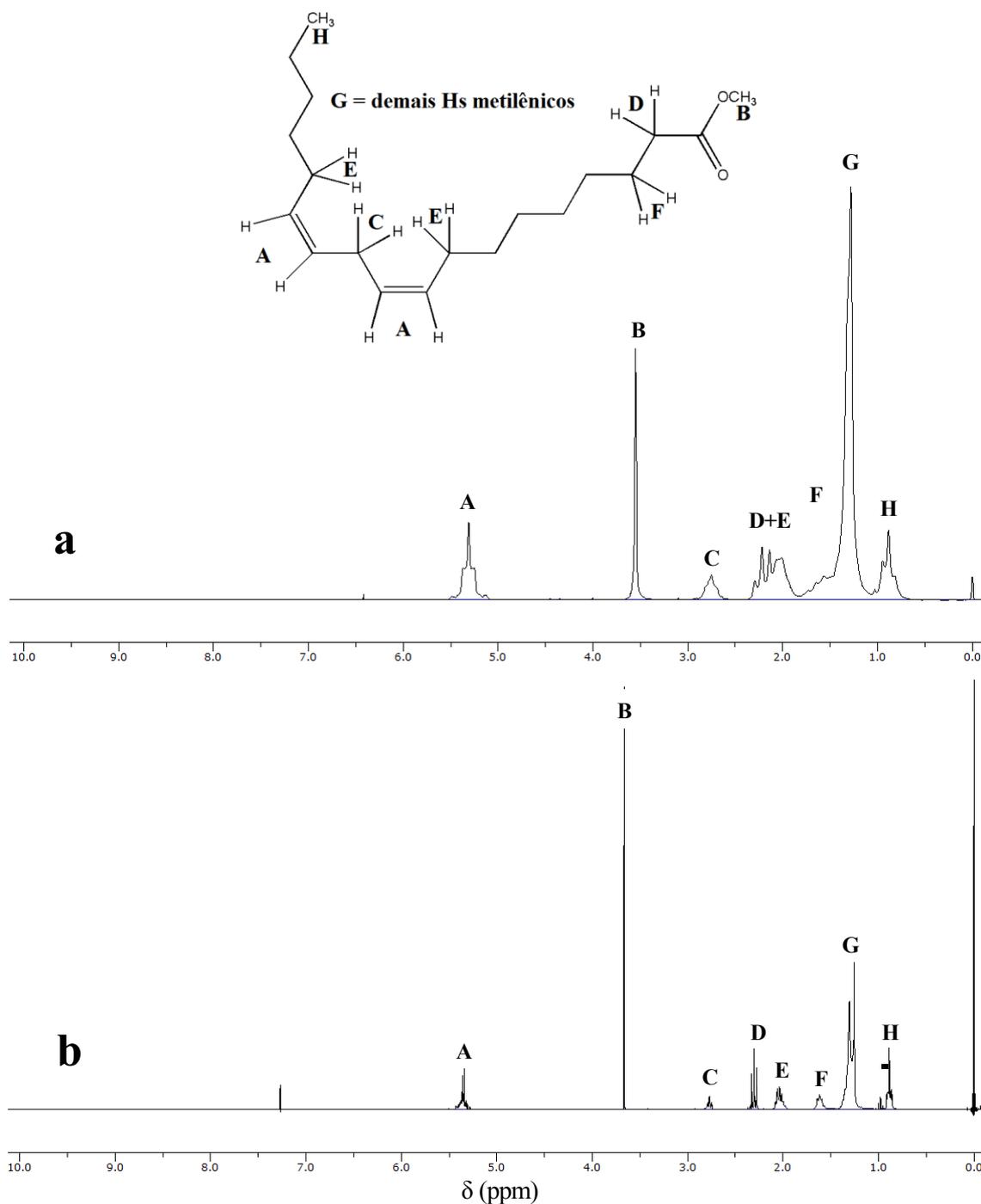


Figura 15. Espectro de RMN - ¹H do biodiesel no equipamento de (a) 90 MHz e no de (b) 300 MHz.

Como visto (Tabela 2), o óleo de soja apresenta em sua composição diferentes concentrações de derivados de ácidos graxos. Caso o biodiesel fosse composto apenas de ésteres derivados do ácido linoleico (18:2), seria esperado uma integração igual a 4, já que duas duplas ligações são compostas por 4 H. Contudo, a distribuição de 18:1/18:2/18:3 (23 %, 54 % e 7%, respectivamente) ¹⁵ no óleo deixa a integração do pico de olefinas com cerca de 3 H (Figura 16), isso devido à concentração de ácido oleico (18:1) que “retira” hidrogênios da região. Como a intensidade do sinal é diretamente proporcional à abundância de H, é observada essa discrepância.

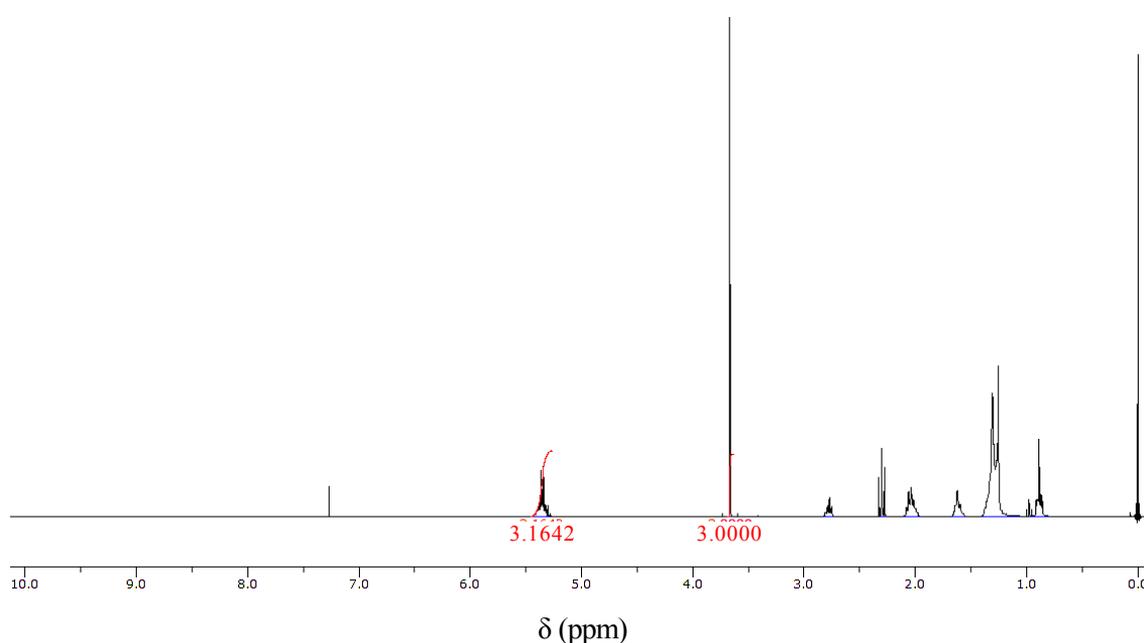


Figura 16. Integração do espectro de RMN - ¹H do biodiesel no equipamento 300 MHz.

Na reação de epoxidação utilizando a CalB como catalisador, não se pode concluir que há seletividade em relação aos derivados de ácidos graxos presentes no biocombustível. Com isso, o rendimento de epóxido observado no sinal do espectro também apresenta integração referente a 3 H (Figura 16 - picos B e C).

Outra observação a ser feita é com relação à hidrólise do éster formando ácido carboxílico. A mesma conclusão é alcançada com relação à hidrólise do grupo oxirano, uma vez que a presença de água no meio reacional não é seletiva na abertura do anel. Devido às ligações de hidrogênio presentes entre os produtos, observa-se um único pico referente ao H tanto do grupo álcool

quanto do grupo ácido (Figura 16 - pico A). Dessa forma, embora seja conhecido que a relação de 3:1 H (relação entre 3 H do DIOL e 1 H do ácido carboxílico) existe, não é possível calculá-la. Foi utilizada então a mesma relação entre a conversão de olefinas e da metoxila com o surgimento do sinal referente aos H dos OH tanto alcoólicos quanto ácidos.

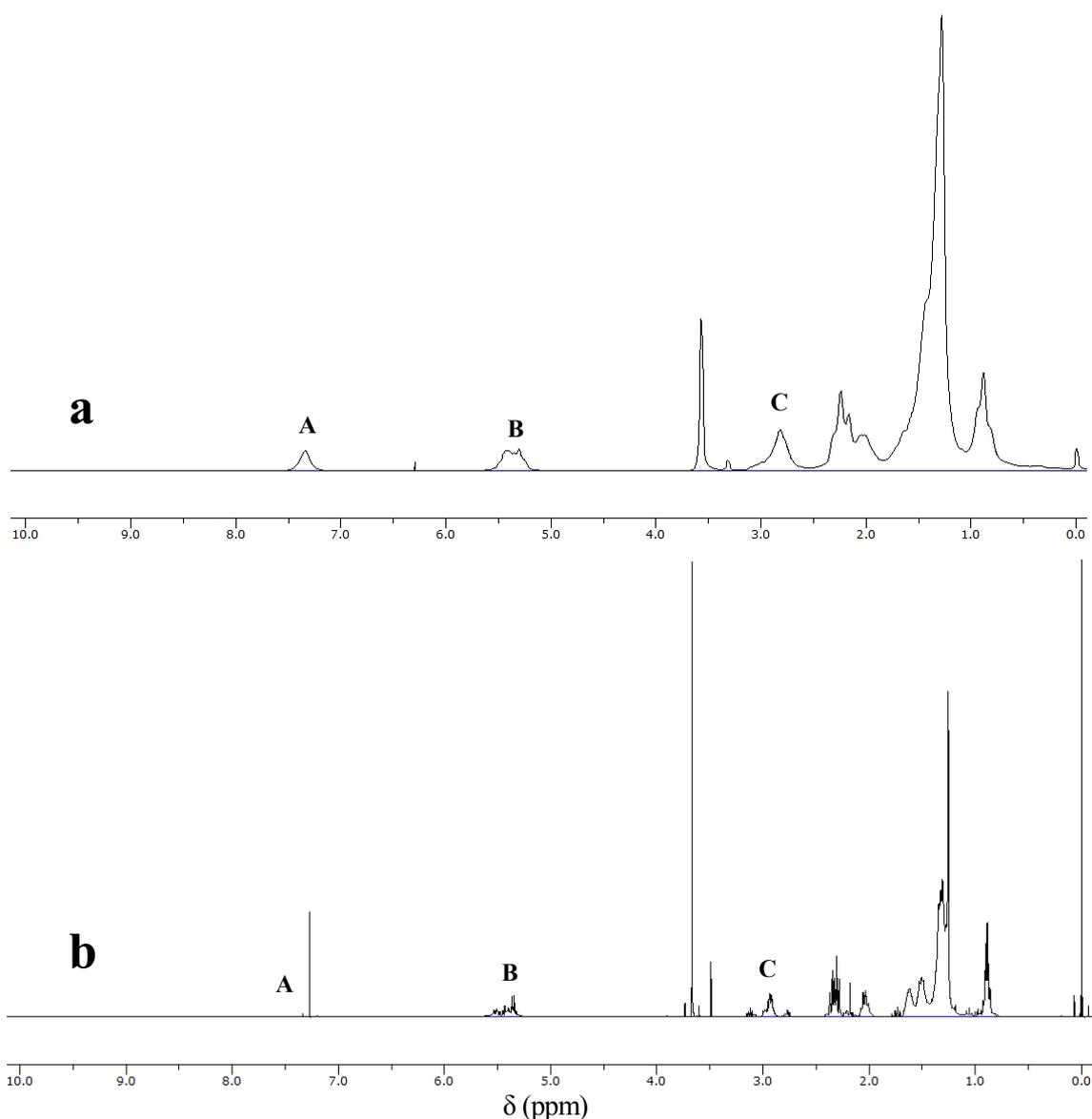


Figura 17. Espectro de RMN - ¹H da reação com 2% de biocatalisador no RMN de (a) 90 MHz e no de (b) 300 MHz. Observa-se a ausência do sinal referente aos H do produto dihidrolisado e do ácido carboxílico no espectro de 300 MHz devido à permuta entre o D e o H. O sinal em 7,27 ppm, presente no espectro do equipamento mais potente, é referente ao solvente CDCl₃ utilizado na preparação da amostra.

Capítulo 4: Resultados e Discussão

4.1 Estudos preliminares sobre a atividade enzimática

4.1.1 Estudo sobre a hidratação da enzima

O presente trabalho tem como intuito testar a atividade catalítica da enzima CalB ancorada em um suporte hidrofóbico constituído por uma cadeia alifática composta por 18 carbonos (C) e alguns aminoácidos servindo como fixantes.

Preliminarmente foram realizados o branco e o teste do suporte em que a enzima está ancorada para eliminar qualquer possibilidade de interferências nos resultados posteriormente obtidos. Embora os valores apresentados pela tabela 5 induzam uma interpretação direcionada para a ocorrência efetiva de reação, estudos presentes na literatura ²³ corroboram com o espectro apresentado na figura 17, onde percebe-se que não há qualquer sobressalto no gráfico e que os valores obtidos pelos espectros de RMN agregaram possivelmente apenas erro instrumental. Vale ressaltar que o valor negativo está relacionado com o erro instrumental do equipamento de RMN.

Tabela 5. Efeito da hidratação da enzima B e reações de branco e do suporte da enzima.

Reação*	Conversão (%)		Seletividade (%)	
	Olefinas	Metoxila	Epóxido	DIOL/Ác. Carbo.
Branco	14	11	0	0
Suporte	12	-6	0	0
Enzima B	19	0	0	0
Enzima B hid.	19	5	0	0

*Condição reacional: 1:1 biodiesel:H₂O₂ e 1% de suporte ou de enzima.

Uma teoria que também pode ser considerada é com relação à oxidação radicalar das duplas ligações do biodiesel, assim como já foi discutido no presente trabalho.¹⁵ A tese inclusive pode justificar o consumo de ésteres metílicos, haja vista que radicais presentes no meio reacional podem atacar o grupo COOR gerando outros compostos como ácidos carboxílicos ou aldeídos

(Figura 18), porém em quantidades tão ínfimas, que não podem ser identificadas pelo equipamento de ressonância magnética nuclear.¹³

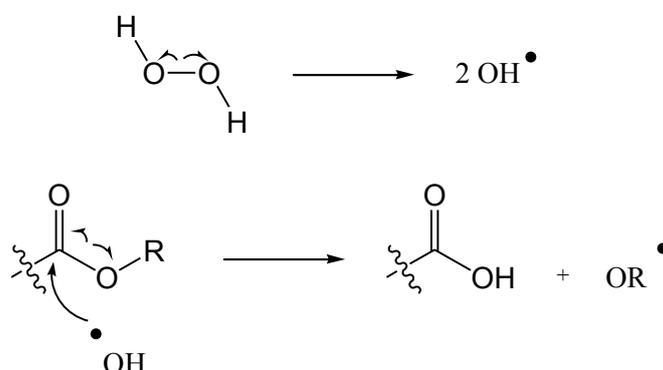


Figura 18. Formação do ácido carboxílico através da decomposição radicalar do peróxido de hidrogênio.

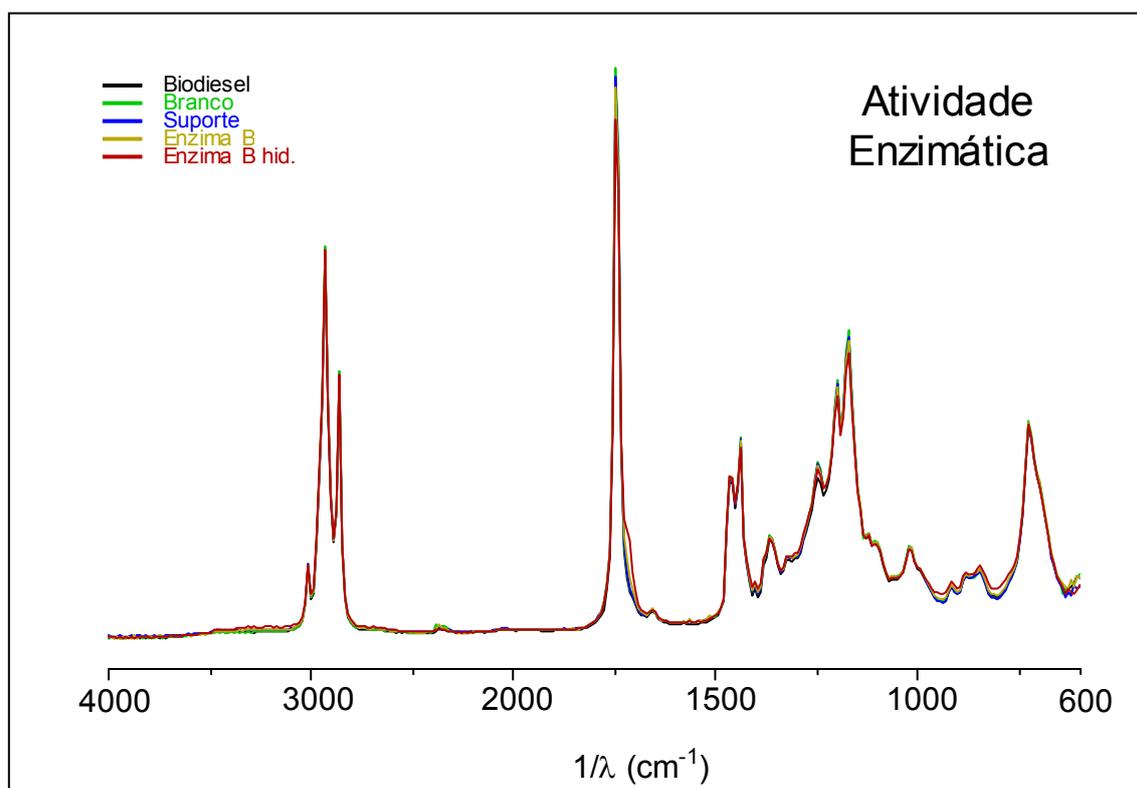


Figura 19. Espectro qualitativo das reações de branco, suporte e da avaliação sobre a hidratação da enzima B.

Confirmada a ineficácia do peróxido de hidrogênio e do suporte enzimático para a reação de epoxidação, iniciou-se a reação comparativa entre a enzima hidratada e a não-hidratada. Observa-se pela tabela 5 que os valores foram bastante próximos aos obtidos nas reações de branco e de teste do suporte, contudo a análise de IV (Figura 19) é capaz de revelar uma pequena

diferença na reação com a enzima hidratada. Observa-se um ombro ao lado do estiramento em 1750 cm^{-1} referente à ligação C=O do éster metílico. Esta elevação deslocada à direita apresenta comprimento de onda ($1/\lambda$) igual a 1710 cm^{-1} , estiramento este referente à ligação C=O de ácido carboxílico, confirmando a hidrólise esperada do éster do biocombustível. Devido à baixa concentração do produto gerado na amostra e à baixa resolução do equipamento de RMN de 90 MHz, não foi possível identificar a presença do ácido carboxílico, tampouco quantificá-la.

4.1.2 Estudo metodológico para a reação de epoxidação do biodiesel

Por questões quantitativas, todo o teste metodológico foi realizado com a enzima denominada aqui como enzima B.

Confirmada a necessidade de hidratar-se a enzima previamente, o passo seguinte foi o desenvolvimento de uma metodologia econômica e ambientalmente favorável.

Inicialmente, testou-se o comportamento da enzima perante diferentes concentrações de H_2O_2 . Essa investigação é motivada por estudos anteriores^{20,45} nos quais a concentração desse reagente é determinante para a atividade catalítica da enzima. Foi observado que com o incremento da concentração de peróxido de hidrogênio, até 4 mols, há atividade significativa do biocatalisador, contudo ao dobrar este valor a reação apresenta rendimentos inferiores para a formação de epóxido (Figura 20). Essa queda no rendimento é justificada tanto pela possível desnaturação da enzima quanto pela quantidade excessiva de H_2O_2 no sistema, o que acaba por dificultar a interação entre o biodiesel e o biocatalisador. A dificuldade em produzir mais ácidos carboxílicos pode explicar a seletividade alcançada nesse patamar de excesso de reagente. Como a quantidade de ésteres hidrolisados é pequena, o perácido formado tende a epoxidar e não a hidrolisar o epóxido já gerado.

Tabela 6. Desenvolvimento da metodologia para a reação de epoxidação utilizando a enzima B.

Reação		Conversão (%)		Seletividade (%)	
		Olefinas	Metoxila	Epóxido	DIOL/Ác. Carbo.
H ₂ O ₂	1 mol	19	5	0	0
	2 mols	34	28	56	53
	4 mols	38	34	57	52
	8 mols	28	26	68	63
CaIB – enzima B	0,05 g	9	5	0	0
	0,1 g	34	28	56	53
	0,2 g	59	43	71	71

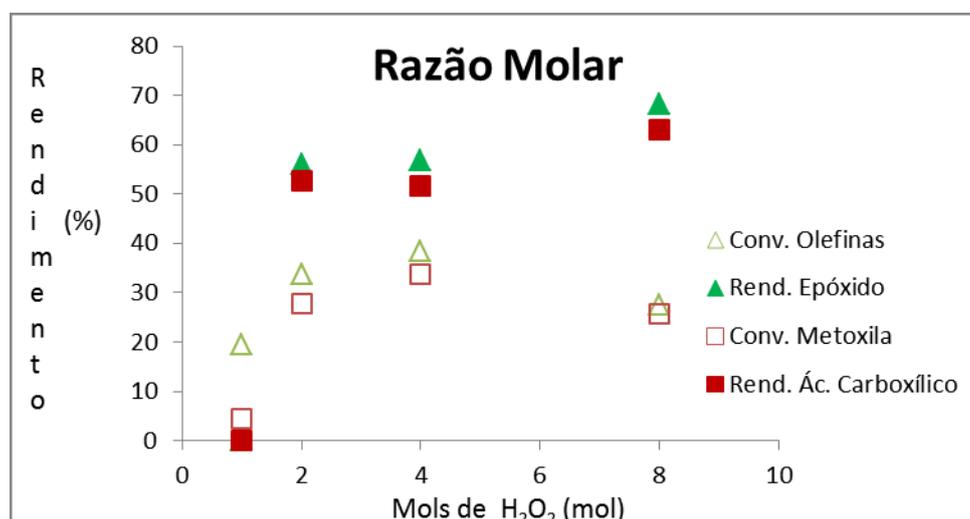


Figura 20. Atividade da enzima B variando a razão molar de H₂O₂.

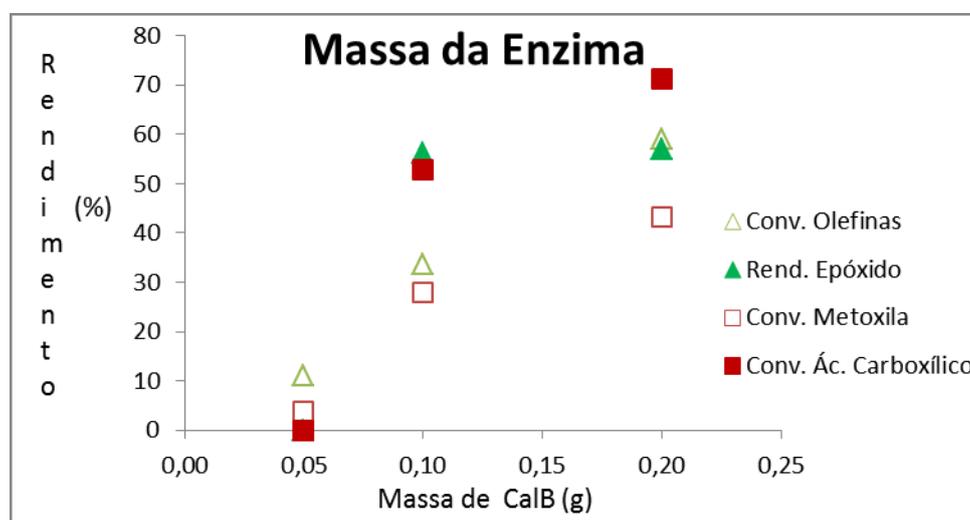


Figura 21. Atividade da enzima B variando sua massa.

Tomando como base a tabela 6, decidiu-se permanecer com a concentração de H_2O_2 de 2 mols. Embora a concentração de 4 mols tenha apresentado conversão de olefinas maior, apresentou também conversão maior da metoxila gerando o ácido carboxílico correspondente, o que não é um dos objetivos do trabalho (Figura 20).

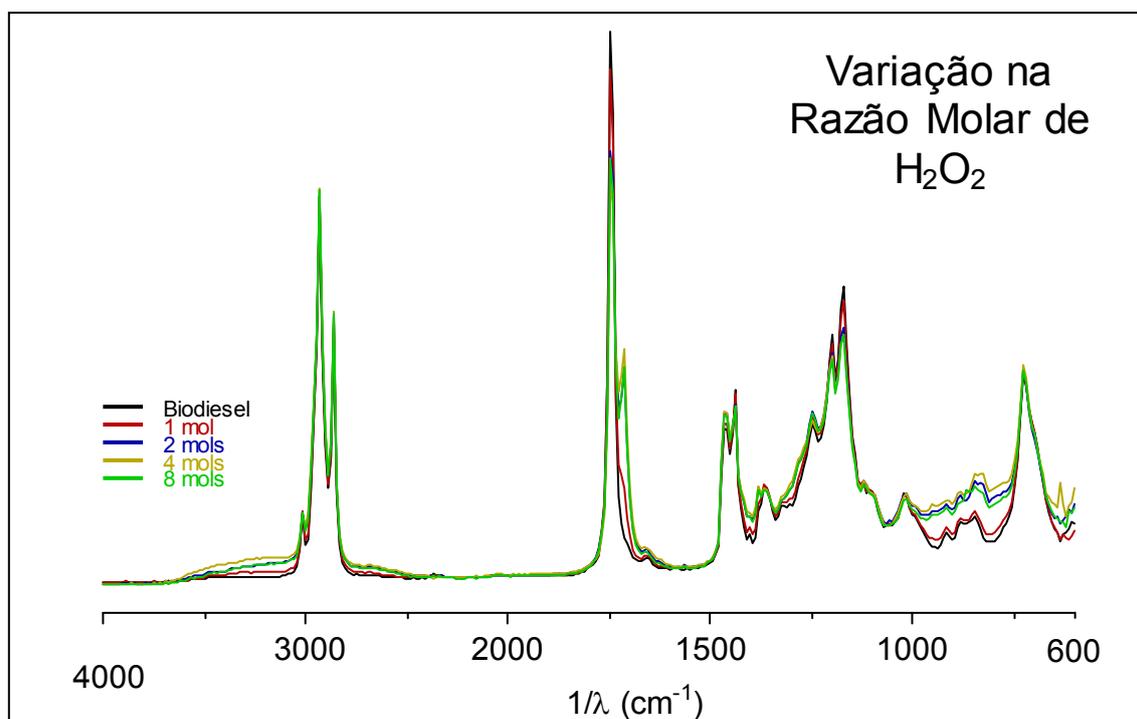


Figura 22. Comportamento da enzima B na presença de variadas concentrações de H_2O_2 .

Identificado o comportamento da enzima na presença do peróxido de hidrogênio, o passo seguinte foi investigar a relação entre o rendimento de epóxido e a concentração da enzima no meio reacional. Foi observado que a escassez de biocatalisador limita a velocidade com que a reação ocorre, bem como que o excesso de enzima, apesar de apresentar alta conversão de duplas ligações em epóxido, produz bastante ácido carboxílico (Figura 21), o que mais uma vez foge do objetivo do trabalho.

Pode-se observar na figura 23 a alta conversão atingida na reação com 2% em massa de biocatalisador e a formação tanto do epóxido quanto do ácido carboxílico. Vale ressaltar que o deslocamento relativamente baixo do H do ácido carboxílico ($\delta = 7,3$ ppm) está associado à hidrólise do epóxido. A formação do produto dihidrolisado gera dois OH (diácool) que interagem com o

OH derivado da hidrólise do éster dificultando a interação com o campo magnético do equipamento.⁴⁰

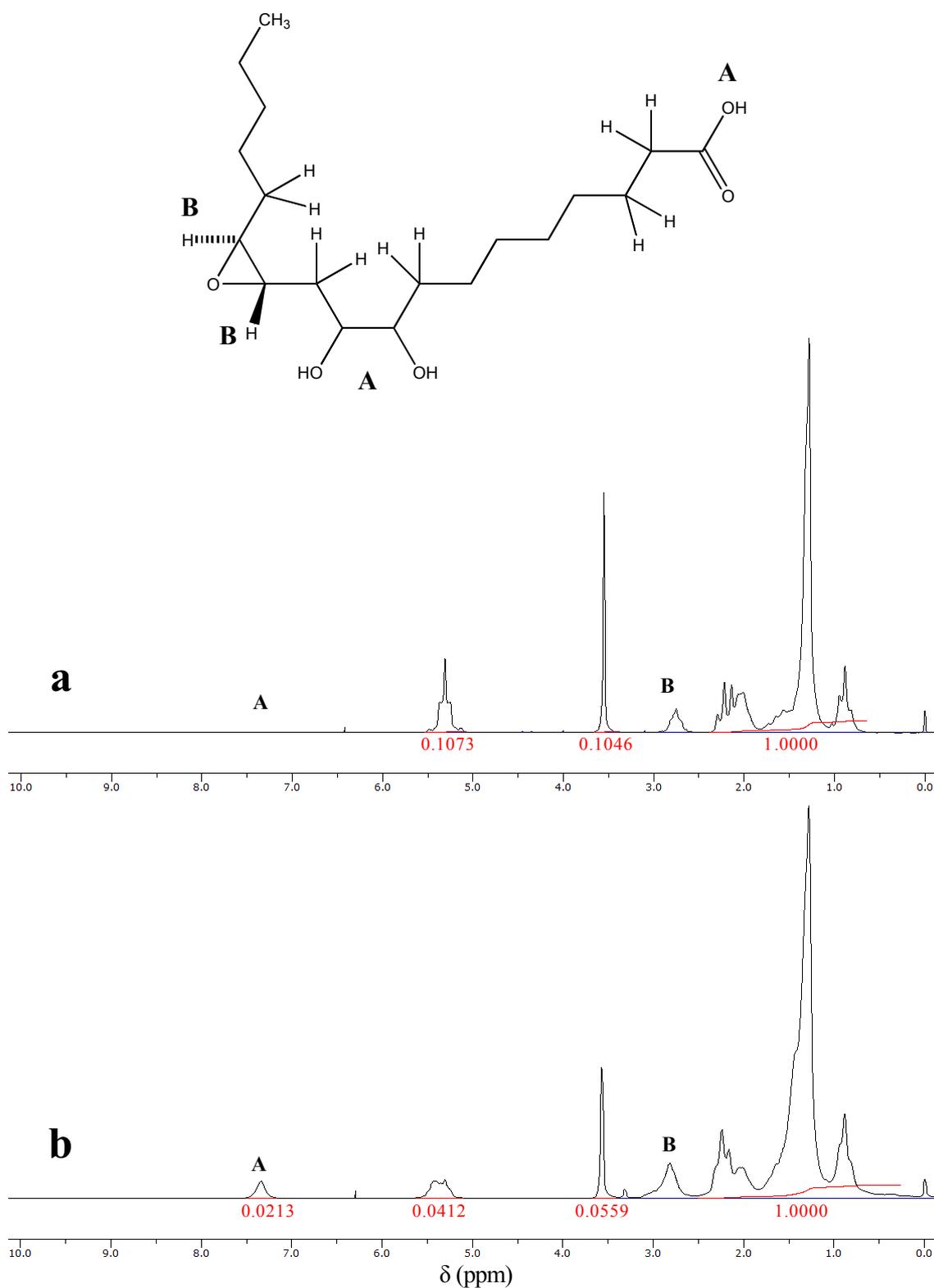


Figura 23. Espectros de RMN - ¹H do (a) biodiesel e do (b) biodiesel epoxidado no equipamento de 90 MHz.

A caracterização do epóxido foi realizada pelo espectro de IV e pelo de RMN. Observa-se no espectro da figura 24 o estiramento em 824 cm^{-1} referente à ligação C-O-C do anel epóxido, confirmando a atividade da CalB para a reação de epoxidação.⁴⁶ Corrobora com o resultado observado no IV, os espectros obtidos por RMN - ^1H , onde é possível identificar dois picos com $\delta = 2,9$ e $3,1$ (Figura 25 – Pico B), referentes aos H ligados diretamente ao grupo oxirano, e ainda dois picos com $\delta = 1,5$ e $1,7$ (Figura 25 – Picos D e C), referentes aos H metilênicos α ao grupo epóxido e entre os grupos epóxidos, respectivamente.⁴⁷

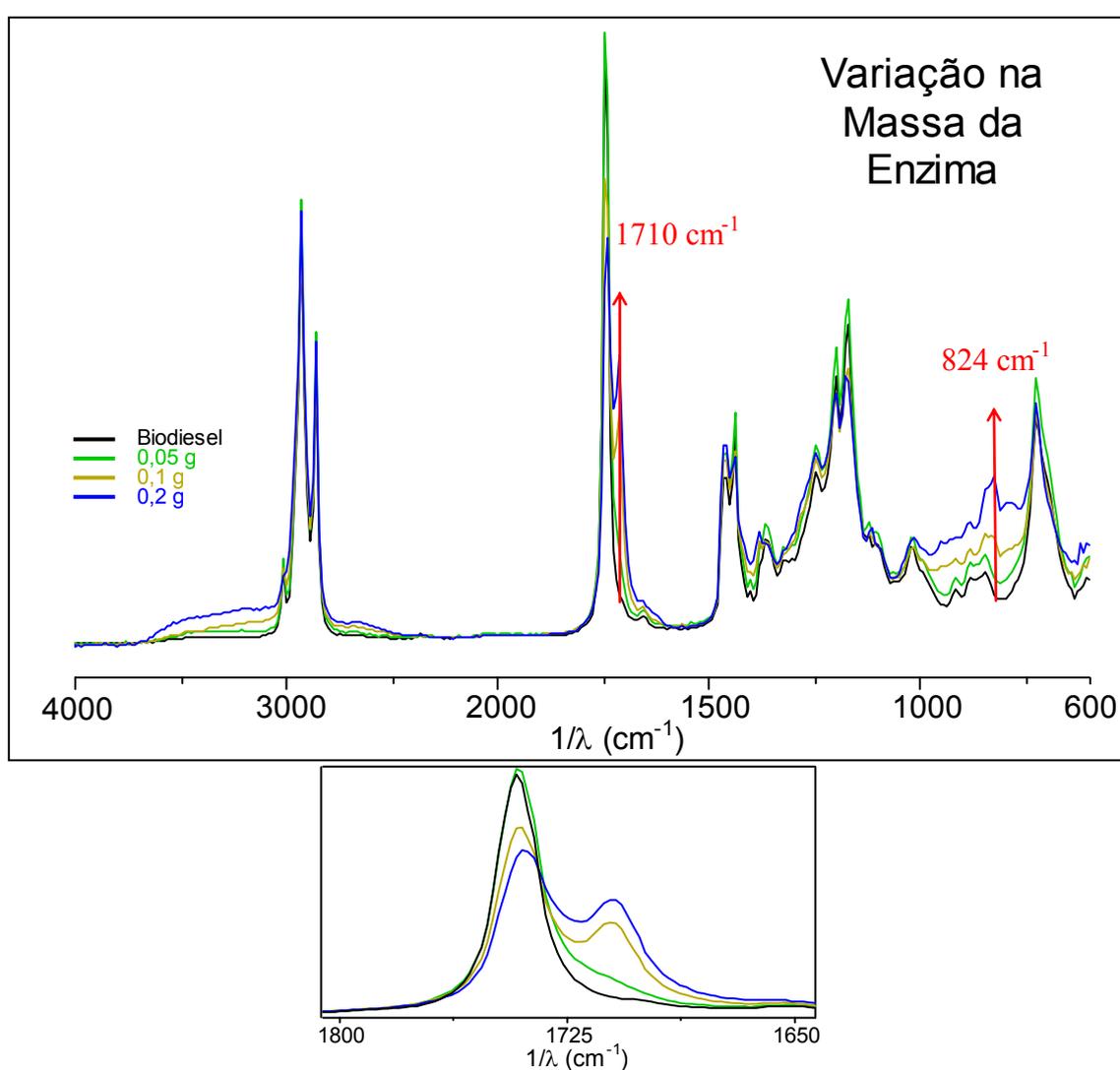


Figura 24. Visualização dos estiramentos referentes ao epóxido e ao ácido carboxílico.

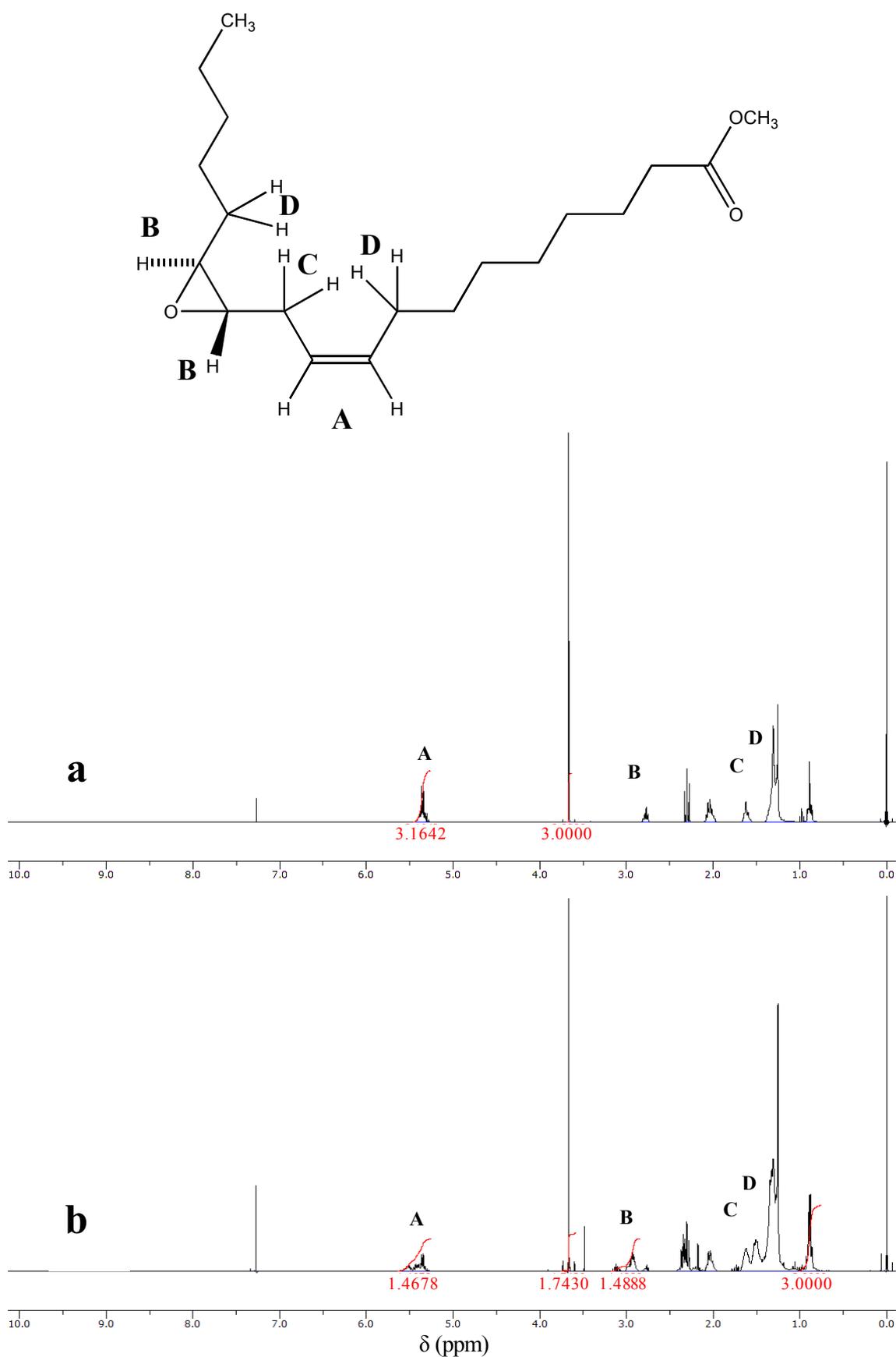


Figura 25. Espectros de RMN - ^1H do (a) biodiesel e do (b) biodiesel epoxidado no equipamento de 300 MHz.

4.1.3 Estudo sobre o comportamento da enzima na presença de líquidos iônicos

Encontrada uma metodologia razoável, partiu-se para o teste dos LIs. Foram escolhidos para a realização das reações volumes de 1, 2,5 e 5 mL dos líquidos iônicos BMI.PF₆, BMI.BF₄ e BMI.NTf₂.

Sabe-se que o aumento das cadeias alifáticas do cátion 1,3-dialquilimidazólio gera um incremento na hidrofobicidade do material, uma vez que as interações de van der Waals também são mais presentes. Devido a essa característica, é observado que os LIs tendem a se acumular na porção não polar da enzima formando bolsões hidrofóbicos e, estes por sua vez, obstruindo o sítio ativo do biocatalisador. Esse é inclusive um dos maiores problemas em utilizar LIs como solvente para reações biocatalisadas, já que sua utilização reduz a hidratação superficial da enzima.^{38, 39}

Contudo, a variação do ânion do LI também é capaz de modificar a forma com que o material comporta-se no meio reacional. Para melhor compreender esse fenômeno, vale buscar o conceito de íon cosmotrópico e caotrópico empregados em sistema aquoso. O primeiro faz referência a íons pequenos e com alta densidade eletrônica capazes de quebrar ligações de hidrogênio das moléculas de água propiciando a solvatação destas em torno do cátion. O segundo refere-se a íons grandes e carregados com cargas simples que permitem uma maior liberdade das moléculas de água.⁴⁸ Nessa última classe encaixam-se os ânions PF₆⁻, BF₄⁻ e NTf₂⁻.

Tabela 7. Conversões e rendimentos obtidos utilizando a enzima B nos três LIs e variando o volume destes.

Reação		Conversão (%)		Seletividade (%)	
		Olefinas	Metoxila	Epóxido	DIOL/Ác. Carbo.
PF ₆	1 mL	21	12	20	19
	2,5 mL	6	6	0	0
	5 mL	10	0	0	0
BF ₄	1 mL	3	-5	0	0
	2,5 mL	15	8	0	0
	5 mL	19	2	0	0
NTf ₂	1 mL	18	4	0	0
	2,5 mL	28	23	51	55
	5 mL	15	6	13	0

É observado na tabela 7 que os LIs apresentam comportamentos distintos e dependentes da concentração no meio reacional. O primeiro a ser analisado foi o BMI.PF₆ e verificou-se que seu excesso provoca uma redução no rendimento de epóxido (Figura 26). Pode-se observar também que a seletividade é bastante baixa. A força das interações estabelecidas entre a enzima e os ânions de PF₆⁻, dominadas por forças de dispersão e ligações de hidrogênio, parece ser a principal responsável pela perda de atividade da enzima.³⁹

Pode-se destacar como complicador para a reação de epoxidação a decomposição dos LIs BMI.PF₆ e BMI.BF₄. Quando em meio aquoso, esses compostos decompõem-se em ácido fluorídrico, acarretando uma acidificação do meio reacional que por sua vez é responsável pela hidrólise do grupo oxirano. Vale ressaltar ainda o ataque à enzima pelo HF, justificando a redução de rendimentos.⁵⁰

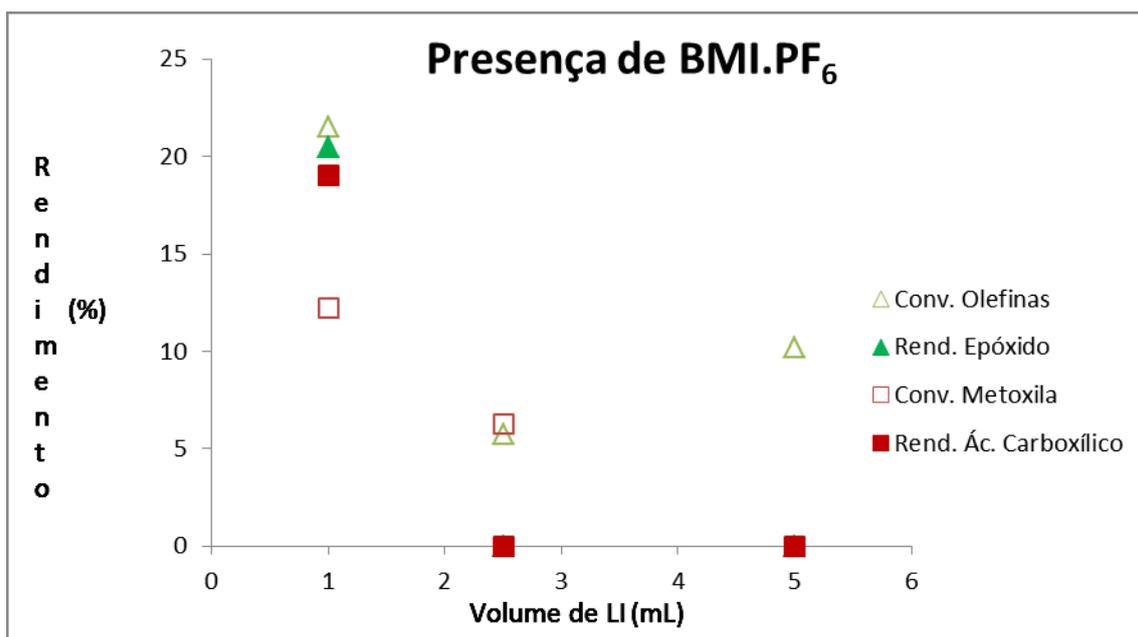


Figura 26. Gráfico referente ao comportamento da enzima na presença de diferentes concentrações de BMI.PF₆.

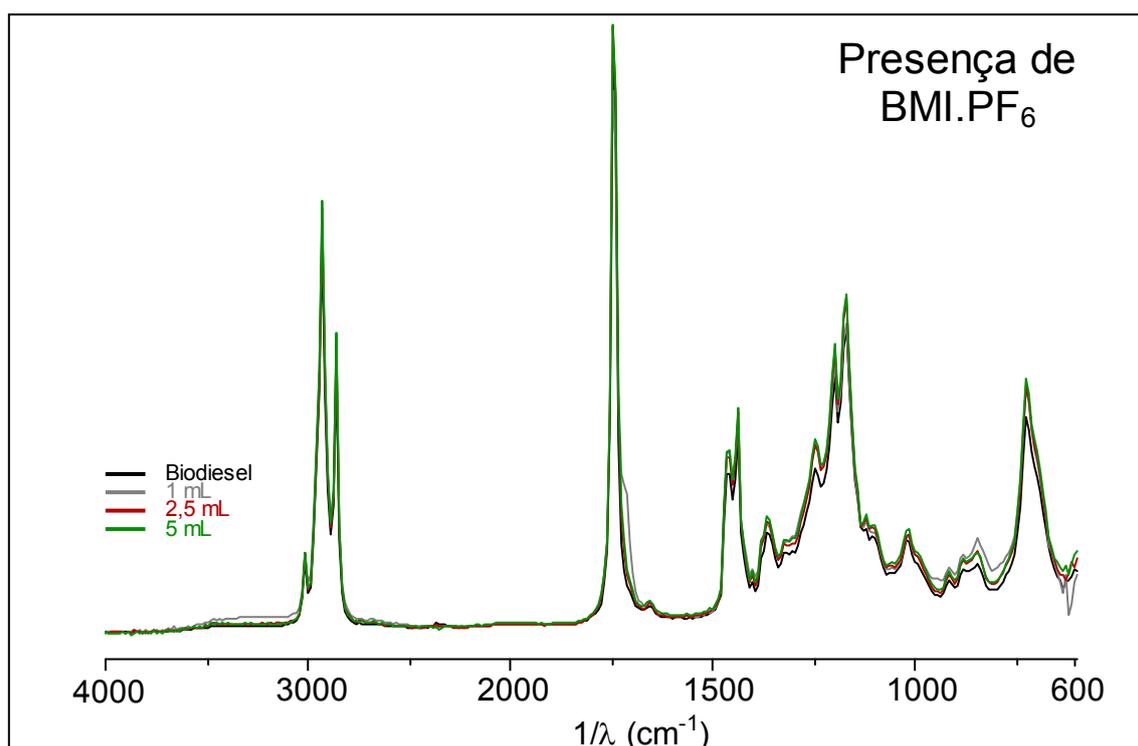


Figura 27. Espectro de IV da enzima na presença de BMI.PF₆.

Consorti *et al*⁴⁹ relatam a variação da entalpia da solução de solventes na presença de LIs. Verificaram que em baixas concentrações de BMI.PF₆ há um declínio na entalpia da solução. O decréscimo da entalpia está relacionado com a separação das moléculas do solvente. Esse comportamento pode

explicar a queda no rendimento obtido nas reações com BMI.PF₆ (concentrações utilizadas no trabalho de 5 a 30 mmols), uma vez que considerando a separação das moléculas do solvente, no caso o peróxido de hidrogênio, admite-se uma menor interação entre o ácido carboxílico e o H₂O₂.

Já no estudo do BMI.BF₄, foi obtido o pior rendimento dentre os três LIs testados (Tabela 7). A literatura mostra que LIs hidrofílicos, quando utilizados como solvente, suprimem a atividade de biocatalisadores, ao contrário dos LIs hidrofóbicos. Isso ocorre porque LIs hidrofílicos podem remover a água ligada internamente à enzima, desidratando esta.⁴⁸ A enzima ao invés de permanecer dissolvida no LI, favorecendo a interação entre o biocombustível e o reagente, mantém-se em suspensão.

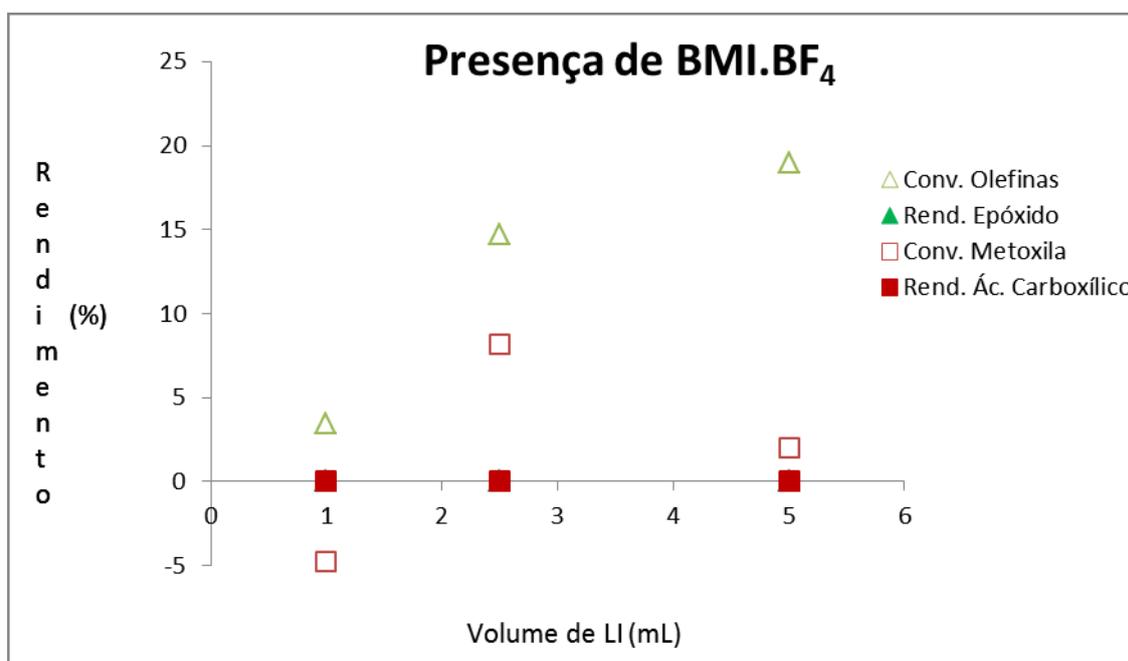


Figura 28. Gráfico referente ao comportamento da enzima na presença de diferentes concentrações de BMI.BF₄.

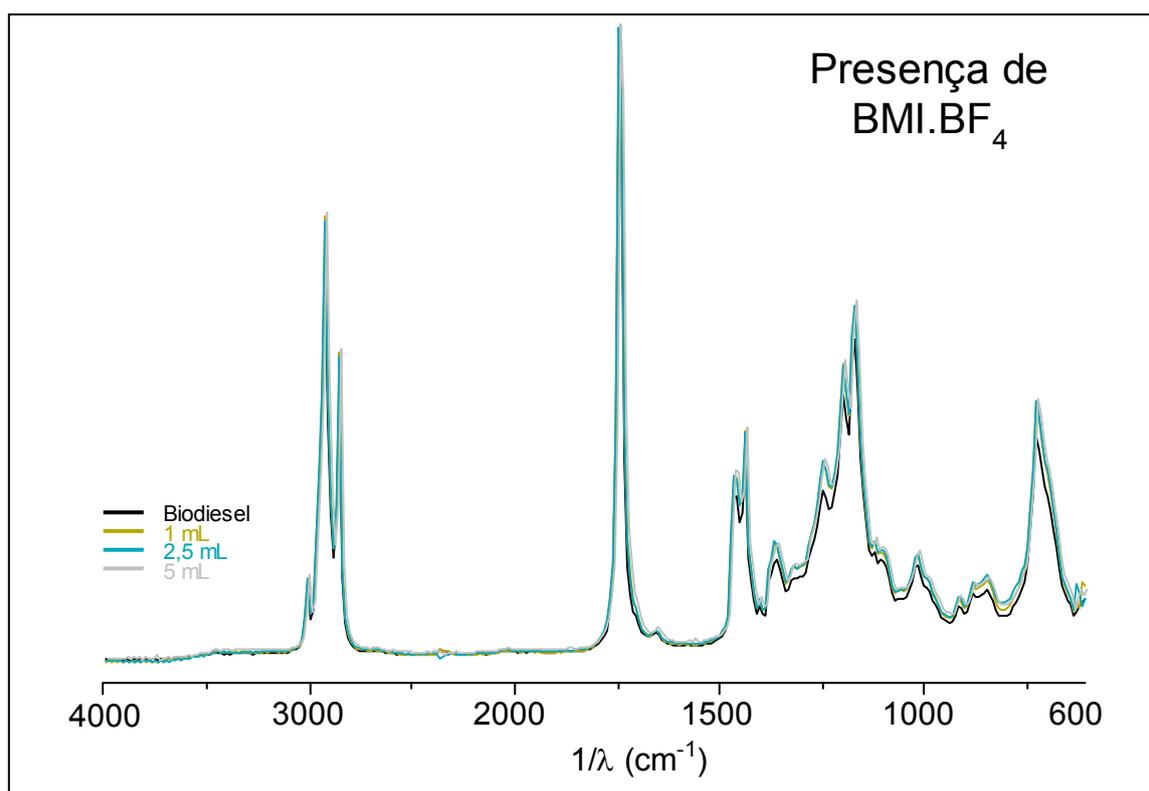


Figura 29. Espectro de IV da enzima na presença de BMI.BF₄.

No estudo do comportamento do BMI.NTf₂ obteve-se, dentre os LIs testados, a melhor condição reacional para a epoxidação do biodiesel. Um comportamento inesperado é observado na figura 30 onde há uma queda de rendimento na reação com o aumento da concentração de LI. Esse comportamento também pode ser explicado pelo aumento da concentração de ânions NTf₂⁻ no sistema. Essa quantidade a mais acaba por saturar o meio, solvatando a CalB e dificultando a interação enzima/biodiesel.

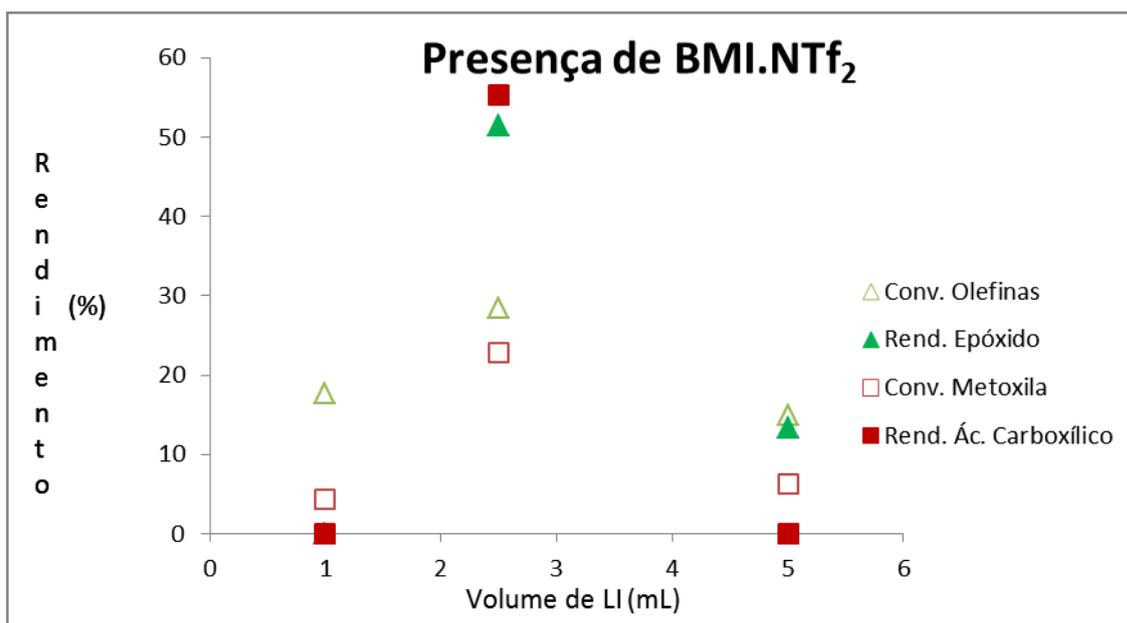


Figura 30. Gráfico referente ao comportamento da enzima na presença de diferentes concentrações de BMI.NTf₂.

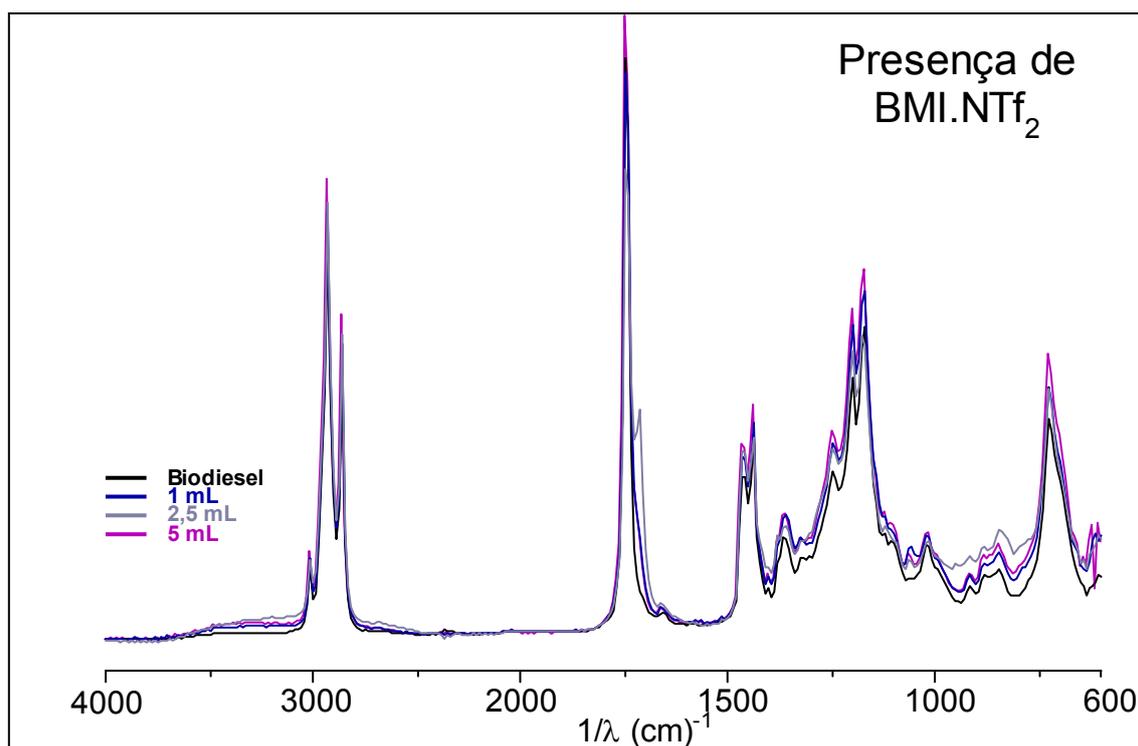


Figura 31. Espectro de IV da enzima na presença de BMI.NTf₂.

4.2 Comportamento de enzimas oriundas de diferentes sínteses

Como verificado na catálise heterogênea, catalisadores oriundos de sínteses diferentes apresentam diferentes atividades quando aplicados em uma mesma reação. Foi observado o mesmo comportamento nas reações em que as enzimas A, B e C, todas as três derivadas da enzima CalB e ancoradas no suporte hidrofóbico, são comparadas.

Tabela 8. Conversões e rendimentos obtidos utilizando as enzimas A, B e C nos três LIs.

Reação		Conversão (%)		Seletividade (%)	
		Olefinas	Metoxila	Epóxido	DIOL/Ác. Carbo.
1 mL de PF ₆	A	19	12	24	28
	B	21	12	20	19
	C	10	1	0	0
2,5 mL de BF ₄	A	8	-2	0	0
	B	15	8	0	0
	C	8	-5	0	0
2,5 mL de NTf ₂	A	20	21	45	42
	B	28	23	51	55
	C	17	13	32	45

Observa-se na figura 32 que realmente há diferença na atividade das enzimas derivadas de sínteses diferentes. A enzima C foi a que apresentou piores resultados enquanto a B apresentou os melhores. O que chama a atenção é que os três LIs apresentaram o comportamento visto na seção 4.1.3 na presença das três enzimas (Tabela 8).

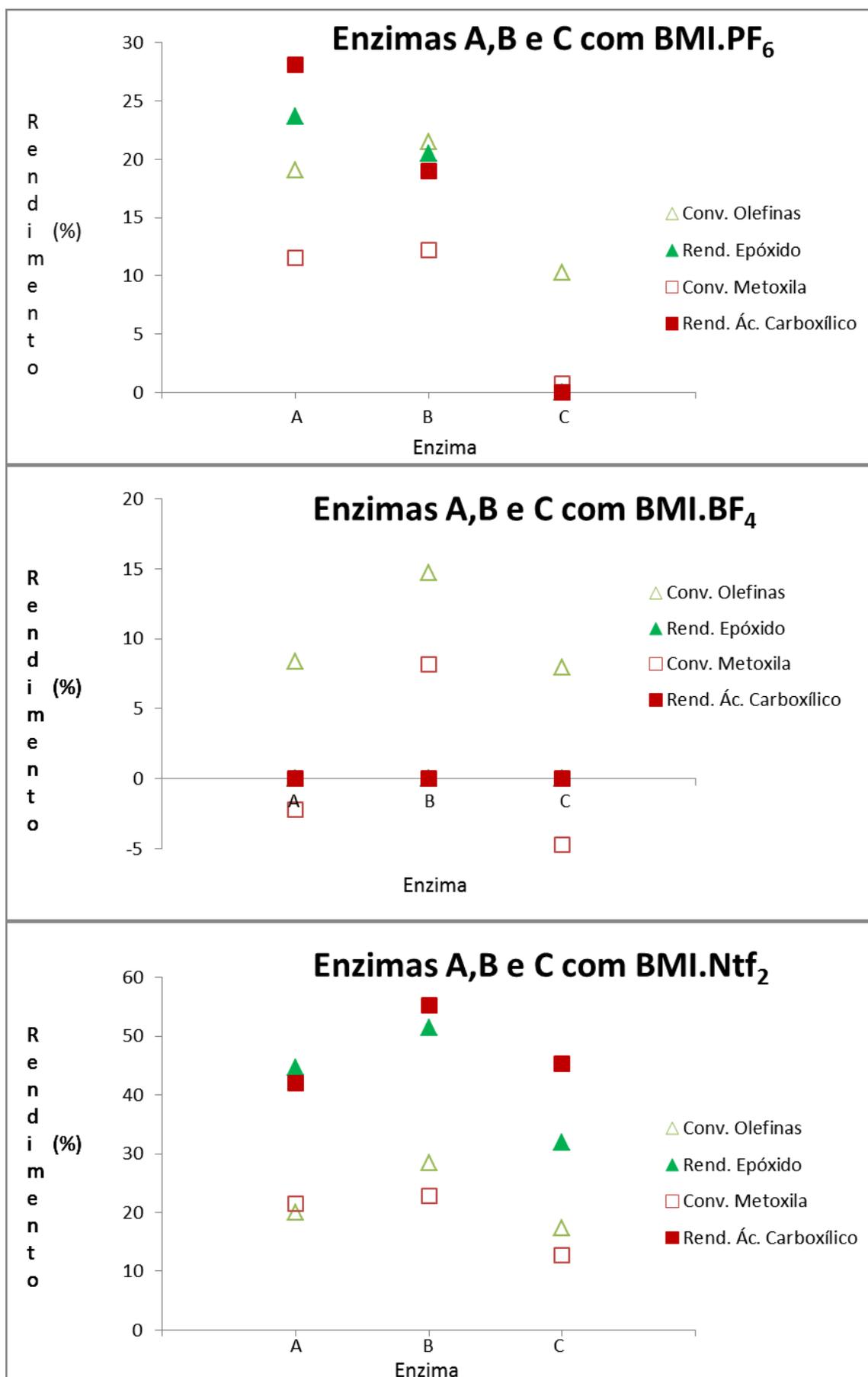


Figura 32. Gráficos de conversão e seletividade das enzimas A, B e C empregadas nos LIs.

4.3 Reciclo da CalB

Ponto de fundamental importância para qualquer catalisador heterogêneo é questão do reciclo deste. O estudo de reciclo da enzima foi realizado seguindo os parâmetros da alíquota de 2 h da reação com 2% em massa de CalB. A reação de 2 h é acompanhada por quatro reciclos, também de 2 h cada, totalizando 10 h de uso da enzima. Os resultados obtidos através da análise de RMN - ^1H são apresentados na tabela abaixo.

Tabela 9. Conversões e rendimentos obtidos nas reações de reciclo.

Reação de Reciclo*	Conversão (%)		Seletividade (%)	
	Olefinas	Metoxila	Epóxido	DIOL/Ác. Carbo.
2 h	16	21	55	40
4 h	25	23	47	48
6 h	22	14	27	41
8 h	21	12	21	29
10 h	21	8	20	17

*1:2 óleo/H₂O₂ e 2,0 % de enzima (30 °C). A alíquota foi escolhida devido à quantidade considerável de produtos gerados em um curto espaço de tempo.

Pode ser observado um comportamento bastante característico de testes de reciclo com catalisadores heterogêneos. A reação inicial, embora tenha um rendimento de epóxido superior ao 1º reciclo, apresenta uma conversão de olefinas inferior. Isso pode ser explicado pelo fato de restar alguma contaminação no biocatalisador, que após as duas primeiras horas de reação é retirada do sítio ativo da proteína aumentando assim a conversão.

Essa explicação completa-se ao se observar o mesmo comportamento “sobe-desce” relacionado à conversão da metoxila. Como citado neste trabalho, a reação de hidrólise do éster do biodiesel acontece no sítio ativo da enzima. Sendo assim, conclui-se que a seletividade de ácido graxo é reduzida nas 2 primeiras horas de reação por haver algum impedimento no sítio ativo do biocatalisador.

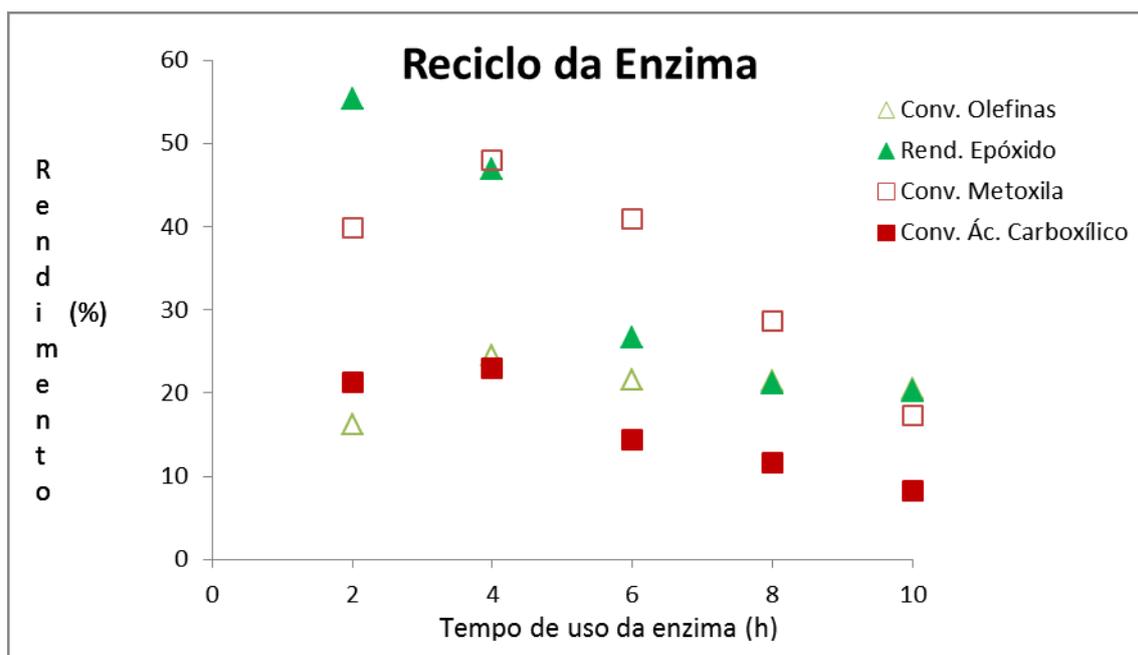


Figura 32. Rendimentos obtidos na reação base e nos 4 reciclos da enzima.

Observa-se que apenas no primeiro reciclo há boa atividade catalítica. A partir daí, o biocatalisador perde atividade tornando sua reutilização inviável. Podem-se indicar algumas explicações:

- Primeiramente a massa de enzima que é perdida durante o processo de separação da reação anterior (Figura 34). Devido à formação de uma emulsão bastante densa contendo biodiesel, produtos, H_2O_2 e a enzima, não é possível retirar apenas o biocatalisador. Devolver ao reciclo toda a emulsão retirada da reação anterior não garantiria a confiabilidade com que os resultados obtidos das reações posteriores seriam adquiridos.
- Outra explicação possível seria a perda de atividade do catalisador, não percebida na análise de dados do reciclo (Figura 33). Estudos³⁰ indicam que o biocatalisador é bastante estável sob essas condições e que sua reutilização é possível por várias vezes sem perda significativa de atividade.



Figura 34. Emulsão formada durante as reações e nítida perda de massa.

Capítulo 5: Conclusões e Perspectivas

5 Conclusões e perspectivas

A finalização do trabalho permitiu chegar a várias conclusões pertinentes. A enzima *Candida antarctica* lipase B apresenta real capacidade de epoxidar ésteres metílicos derivados do óleo de soja sem régio ou estereosseletividade. A presença de líquidos iônicos no sistema inibe em parte a atividade catalítica da enzima. Entretanto, a redução no rendimento observada com a utilização de LIs não pode ser relacionada à perda de estabilidade do biocatalisador, mas sim à questão de solvatação dos ânions no meio reacional. Estudos comprovam inclusive o incremento na estabilização enzimática obtido na presença de LIs.^{38, 40}

Com relação aos LIs, foi observado que o BMI.PF₆ e o BMI.NTf₂ apresentaram os melhores resultados, enquanto o BMI.BF₄ os piores. Tais resultados podem ser justificados pela característica hidrofílica do BMI.BF₄, o que possibilita a desidratação da enzima por parte do LI.

Pode-se ainda destacar como um obstáculo para a reação de epoxidação a decomposição dos LIs BMI.PF₆ e BMI.BF₄ que, quando em meio aquoso, decompõem-se em ácido fluorídrico hidrolisando o grupo oxirano formado e atacando a enzima.

Com relação à superior eficiência do BMI.NTf₂ para a reação de epoxidação, argumento válido está relacionado ao comportamento do ânion NTf₂. Apesar de ser um íon classificado como caotrópico, é capaz de estabilizar a enzima devido ao seu volume, sem impedir, contudo, o acesso ao sítio ativo do biocatalisador.

Um ponto que deve ser enfatizado diz respeito às condições em que o sistema foi desenvolvido. A razão entre os reagentes é considerada baixa para um sistema catalítico heterogêneo realizado a uma temperatura considerada amena (1:2:0,007/0,016/0,01:0,1 - biodiesel:H₂O₂:LI(PF₆/BF₄/NTf₂):CalB a 30 °C).

Fica clara a necessidade de serem realizados mais estudos com o intuito de atingir seletividade maior para o produto epoxidado. A reação de hidrólise tanto do éster quanto do epóxido formado é algo que deve ser investigado com mais atenção.

Como perspectivas, podem ser utilizados outros LIs capazes de estabilizar de forma mais efetiva a enzima CalB e permitir acessibilidade ao sítio ativo do biocatalisador, atingindo assim uma maior seletividade para o produto epoxidado. Outro estudo possível é o emprego de outros tipos de suporte para a ancoragem da enzima.

Capítulo 6: Referências Bibliográficas

6 Referências bibliográficas

1. Balat, M.; Balat, H.; *Energy Conversion and Management* **2008**, *49*, 2727.
2. Torres, M.; Jiménez-Osés, G.; Mayoral, J. A.; Pires, E.; *Bioresour. Technol.* **2011**, *102*, 2590.
3. Wadumesthrige, K.; Salley, S. O.; Ng, K. Y. S.; *Fuel Process. Technol.* **2009**, *90*, 1292.
4. Campanella, A.; Fontanini, C.; Baltanas, M. A.; *Chem. Eng. J.* **2008**, *144*, 466–475.
5. Kapoor, M.; Gupta, M. N.; *Process Biochem.* **2012**, *47*, 555.
6. Idris, A.; Bukhari, A.; *Biotechnol. Adv.* **2012**, *30*, 550.
7. Schneider, R. C. S.; Lara, L. R. S.; Bitencourt, T. B.; Nascimento, M. G.; Nunes, M. R. S.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2009**, *20*, 8, 1473.
8. Lam, M. K.; Lee, K. T.; Mohamed, A. R.; *Biotechnol. Adv.* **2010**, *28*, 500.
9. Ferreira, K. M. C.; *Avaliação de Catalisadores Heterogêneos para Produção de Ésteres Metílicos de Ácidos Graxos*, UnB, **2012**.
10. <http://www.biodieselbr.com> – Acessado em 28/01/2013.
11. Candeia, R. A.; Silva, M. C. D.; Carvalho Filho, J. R.; Brasilino, M. G. A.; Bicudo, T. C.; Santos, I. M. G.; Souza, A. G.; *Fuel* **2009**, *88*, 738.
12. Berman, P.; Nizri, S.; Wiesman, Z.; *Biomass and Bioenergy* **2011**, *35*, 2861.
13. Chuck, C. J.; Bannister, C. D. Jenkins, R. W.; Lowe, J. P.; Davidson, M. G.; *Fuel* **2012**, *96*, 426.
14. Wadumesthrige, K.; Salley, S. O.; Ng, K. Y. S.; *Fuel Process. Technol.* **2009**, *90*, 1292.
15. Carvalho, M. S.; *Hidrogenação Seletiva do Biodiesel de Soja em Sistema Bifásico Utilizando o Líquido Iônico BMI.BF₄*, UnB, **2008**.
16. Sharma, B. K.; Doll, K. M.; Erhan, S. Z.; *Bioresour. Technol.* **2008**, *99*, 7333.
17. Satyarthi, J. K.; Srinivas, D.; *Appl. Catal., A* **2011**, *401*, 189.
18. Solano, D. M.; Hovos, P.; Hernaiz, M. J.; Alcantara, A. R.; Sanchez-Montero, J. M.; *Bioresour. Technol.* **2012**, *115*, 196.
19. Torres, M.; Arends, I. W. C. E.; Mayoral, J. A.; Pires, E.; Jemenez-Oses, G.; *Appl. Catal., A* **2012**, *425*, 91.
20. Törnvall, U.; Orellana-Coca, C.; Hatti-Kaul, R.; Adlercreutz, D.; *Enzyme and Microb. Technol.* **2007**, *40*, 447.
21. Serio, M.; Turco, R.; Pernice, P.; Aronne, A.; Sannino, F. Santacesaria, E.; *Catal. Today* **2012**, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cattod.2012.03.069>.
22. Jiang, J.; Zhang, Y.; Yan, L.; Jiang, P.; *Appl. Surf. Sci.* **2012**, *258*, 6637.
23. Suarez, P. A. Z.; Pereira, M. S. C.; Doll, K. M.; Sharma, B. K.; Erhan, S. Z.; *Ind. Eng. Chem. Res.* **2009**, *48*, 3268.
24. Mateo, C.; Palomo, J. M.; Fernandez-Lorente, G.; Guisán, J. M.; Fernandez-Lafuente, R.; *Enzyme and Microb. Technol.* **2007**, *40*, 1451.
25. Gandhi, N. N.; *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1997**, *74*, 6.
26. Brígida, A. I. S.; *Imobilização de Lipases Utilizando Fibra da Casca de Coco Verde como Suporte para Aplicações Industriais*, UFRJ, **2010**.
27. Salvador, A. A.; Ribas, C.; Maso, L.; Palharez, S.; Furigo jr.; A.; *Biodiesel: Aspectos Gerais e Produção Enzimática*, UFSC, **2009**.

28. Svedendahl, M.; Carlqvist, P.; Branneby, C.; Allnér, O.; Frise, A.; Hult, K.; Berglund, P.; Brinck, T.; *Chem. Bio Chem.* **2008**, *9*, 2443.
29. Li, C.; Tan, T.; Zhang, H.; Feng, W.; *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 28434.
30. Warwel, S.; Klaas, M. R.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **1995**, *1*, 29.
31. Orellana-Coca, C.; Billakanti, J. M.; Mattiasson, B.; Hatti-Kaul, R.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2007**, *44*, 133.
32. Vlček, T.; Petrović, Z. S.; *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2006**, *83*, 3.
33. Schröder, U.; Wadhawan, J. D.; Compton, R. G.; Marken, F.; Suarez, P. A. Z.; Consorti, C. S.; Souza, R. F.; Dupont, J.; *New J. Chem.* **2000**, *24*, 1009.
34. Zhao, D.; Wu, M.; Kou, Y.; Min, E.; *Catal. Today* **2002**, *74*, 157.
35. Suarez, P. A. Z.; Einloft, S.; Dullius, J. E. L.; Souza, R. F.; Dupont, J.; *J. Chim. Phys.* **1998**, *95*, 1626.
36. Dupont, J.; Suarez, P. A. Z.; *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2006**, *8*, 2441.
37. Alves, M. B.; *Alcoólise de Óleo Vegetal em Sistema Multifásico Utilizando Catalisadores Acorados no Líquido Iônico BMI.InCl₄, UnB*, **2007**.
38. Naushad, M.; ALOthman, Z. A.; Khan, A. B.; Ali, M.; *Int. J. Biol. Macromol.* **2012**, *51*, 555.
39. Ventura, S. P. M.; Santos, L. D. F.; Saraiva, J. A.; Coutinho, J. A. P.; *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2012**, *28*, 2303.
40. Silva, W. S. D.; Lapis, A. A. M.; Suarez, P. A. Z.; Neto, B. A. D.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2011**, *68*, 98.
41. Freedman, B.; Pryde, E.H.; Mounts, T.L. *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *61*, 1638.
42. Cassol, C. C.; Ebeling, G.; Ferrera, B.; Dupont, J.; *Adv. Synth. Catal.* **2006**, *348*, 243.
43. Hernandez, K.; Fernandez-Lafuente, R.; *Process Biochem.* **2011**, *46*, 873.
44. Kollar, S. R. M.; *Desenvolvimento de Metodologias Analíticas para Análise de Biodiesel por RMN – ¹H 1,4 T*, UnB, **2012**.
45. Torres, M.; Jiménez-Osés, G.; Mayoral, J. A.; Pires, E.; Blanco, R. M.; Fernández, O.; *Evaluation of several catalytic systems for the epoxidation of methyl oleate using H₂O₂ as oxidant*, *Catal. Today* **2012**, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cattod.2012.05.005>.
46. Patchara, K.; Supawan, T.; *Preparation of Cold Flow Improver Property from Epoxidized Palm Oil and 2-Ethylhexanol*, PACCON2011, **2011**.
47. Angeloni, L. M.; *Polímeros Obtidos a partir do Biodiesel Epoxidado dos Óleos de Oliva e Soja:Preparação e Caracterização Química e Físico-Química*, UFRGS, **2011**.
48. H. Zhao, O. Olubajo, Z. Song, A.L. Sims, T.E. Person, R.A. Lawal, *Bioorg. Chem.* **2006**, *34*, 15.
49. Consorti, C. S.; Suarez, P. A. Z.; Souza, R. F.; Burrow, R. A.; Farrar, D.; H.; Lough, A. J.; Loh, W.; Silva, L. H. M.; Dupont, J.; *J. Phys. Chem. B.* **2005**, *109*, 4341.
50. Dupont, J.; Souza, R. F.; Suarez, P. A. Z.; *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 3667.
51. Rodrigues, J. P., *Avaliação da Produção de Combustíveis em Processo de Craqueamento Térmico de Óleo de Soja em Regime Contínuo*, UnB, **2007**.