

SUHELEN TANNÚS DE ALMEIDA

Imobilização de enzimas (lipases fúngicas) em suportes nanozeolíticos trocados com cátions de terras-raras e sua aplicação como catalisadores heterogêneos na produção de biocombustível

SUHELEN TANNÚS DE ALMEIDA

Imobilização de enzimas (lipases fúngicas) em suportes nanozeolíticos trocados com cátions de terras-raras e sua aplicação como catalisadores heterogêneos na produção de biocombustível

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto – SP.

Orientador: Prof. Dr. José Geraldo Nery.

São José do Rio Preto  
2017

Almeida, Suhelen Tannús de.

Imobilização de enzimas (lipases fúngicas) em suportes nanozeolíticos trocados com cátions de terras-raras e sua aplicação como catalisadores heterogêneos na produção de biocombustível / Suhelen Tannús de Almeida. -- São José do Rio Preto, 2017

70 f. : il.

Orientador: José Geraldo Nery.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Microbiologia. 2. Enzimas de fungos. 3. Terras raras. 4. Lipase. 5. Lantanídeos. 6. Nanozeólitas. I. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. II. Título.

CDU – 663.15

SUHELEN TANNÚS DE ALMEIDA

Imobilização de enzimas (lipases fúngicas) em suportes nanozeolíticos trocados com cátions de terras-raras e sua aplicação como catalisadores heterogêneos na produção de biocombustível

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto – SP.

**Comissão Examinadora**

**Prof. Dr. José Geraldo Nery** (Orientador)  
*Unesp – São José do Rio Preto*

**Prof. Dr. Adriano Aguiar Mendes** (Examinador)  
*Unifal – MG*

**Dr. Adriano de Vasconcellos** (Examinador)  
*Unesp – São José do Rio Preto*

São José do Rio Preto  
28 de junho de 2017

Á minha família, meus pais Gilberto Rodrigues de Almeida e Fabíola Tannús de Almeida, meus irmãos Vinícius Tannús de Almeida e Daniella Tannús de Almeida por todo apoio e carinho necessários para a realização deste trabalho.

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar eu agradeço a Deus por iluminar a minha vida, me concedendo saúde e inteligência para que eu pudesse realizar esse trabalho.

Agradeço ao meu orientador Professor. Dr. José Geraldo Nery por me dar a oportunidade de entrar para um grupo de pesquisa tão determinado, onde são realizados projetos científicos reconhecidos no mundo todo. Agradeço por me orientar e me incentivar à pesquisa, obrigada pelos ensinamentos da vida acadêmica, pela amizade e por todo carinho.

Aos meus pais, Gilberto Rodrigues de Almeida e Fabíola Tannús de Almeida e meus irmãos Vinícius Tannús de Almeida e Daniella Tannús de Almeida, meu cunhado Eduardo dos Santos e meus sobrinhos Marina e Enzo, sem vocês hoje eu não estaria aqui, obrigada por todo apoio e força que vocês me deram todos os dias durante esse mestrado e pelo incentivo à vida acadêmica.

Agradeço as minhas avós, vovó Tina e vovó Vânia, obrigada por todo carinho que me deram sempre e por todo apoio, vocês são exemplos de luta e determinação. Agradeço à tia Mabel, tia Sandra, tio Ademar, tio Ângelo, e todos os meus primos por todo apoio na vida acadêmica.

Aos meus colegas de laboratório, Adriano de Vasconcellos, Alex Silva, Danilo, Davi, Gabriel, Ana Paula, Janine, Juliana, Roberto, Vinicius, Erick. Especialmente por toda ajuda, pelas horas que estiveram comigo me ensinando e apoiando no laboratório de pesquisa, obrigada pela amizade de vocês que foi fundamental nessa caminhada acadêmica.

Um agradecimento especial ao meu colega Alex Miller, agradeço pelas horas que estive comigo no laboratório de pesquisa, pelos ensinamentos científicos, amizade e carinho. Obrigada por todo apoio que me deu nessa jornada do mestrado.

Eu agradeço à Vanessa Scarante por todo apoio, generosidade, amizade e companhia que tem me dado durante o mestrado, você torna meus dias mais felizes, obrigada por tudo!

Aos membros da banca de qualificação, Dr. Adriano de Vasconcellos e Prof. Dr. Adriano Aguiar Mendes, por ter aceitado participar da banca de defesa do meu mestrado. É um prazer enorme ter a presença de duas pessoas tão conceituadas e com tanto conhecimento científico para oferecer.

Ao Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE) da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” (UNESP), Campus de São José do Rio Preto.

Ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do IBILCE/UNESP e a coordenadora do programa: Profa. Dra. Eleni Gomes

À CAPES por meio do Programa de Bolsas de MESTRADO, pelo apoio financeiro.

Minha gratidão é eterna!

## RESUMO

As nanozeólitas têm atraído atenção dos pesquisadores em diversas áreas de pesquisa devido às propriedades físico-químicas que elas possuem, como por exemplo, grande área de superfície externa, alta dispersibilidade e facilidade de modulação das suas características de superfície, principalmente em relação à carga de superfície e propriedades de hidrofiliicidade/hidrofobicidade. No presente trabalho foi realizado estudo de sínteses e caracterização da nanozeólita faujasita pura e trocada com terras-raras ( $\text{La}^{3+}$ ,  $\text{Ce}^{3+}$ ,  $\text{Gd}^{3+}$  e  $\text{Dy}^{3+}$ ). Primeiramente as nanozeólitas trocadas com os cátions de terras-raras foram empregadas como catalisadores heterogêneos na reação de transesterificação química de triacilglicerídeos com o intuito de produzir biodiesel via rota metílica e etílica. Em paralelo a esse estudo os nanozeólitos trocados com cátions de terras-raras foram também estudados como suportes ou matrizes sólidas para a imobilização da lipase fúngica, mas especificamente a lipase de *Thermomyces lanuginosus* (LTL). Os complexos nanozeólitas-enzimas foram também empregados como catalisadores na reação de transesterificação de triacilglicerídeos para produção de ésteres etílicos de ácidos graxos utilizando óleo de soja como matéria prima via rota etílica.

Os resultados do estudo de transesterificação do óleo de soja usando apenas as nanozeólitas trocadas com as terras-raras em termos de rendimentos de EEAG e EMAG usando 5% concentração de catalisador (em relação a massa de óleo),  $65^{\circ}\text{C}$ , 8 e 12 horas foram: Nanozeólita faujasita trocada com lantânio a 0.1M/0.5M (0% de EEAG e EMAG), Nanozeólita faujasita trocada com Cério a 0.1M/0.5M (0% de EEAG e EMAG), Nanozeólita faujasita trocada com Gadolínio a 0.1M/0.5M (0% de EEAG e EMAG) e Nanozeólita faujasita trocada com Disprósio a 0.1M/0.5M (0% de EEAG e EMAG). Os mesmos resultados negativos foram obtidos trabalhando-se na temperatura de  $120^{\circ}\text{C}$  com tempo de 8 e 12 horas e mesma concentração de catalisador em relação a quantidade de massa de óleo. Em contrapartida, os resultados experimentais na produção de EEAG obtidos quando se empregou os complexos de nanozeolitas-enzimas foram bastante superiores e promissores em relação ao emprego puro dos nanozeólitos trocados com terras-raras. O rendimento de EEAG obtidos com os complexos Nanozeólita faujasita trocada com lantânio á 0.1M/LTL, Nanozeólita faujasita trocada com Cério á 0.1M/LTL, Nanozeólita faujasita trocada com Gadolínio á 0.1M/LTL e Nano- Nanozeólita faujasita trocada com Disprósio á 0.1M/LTL



foram 67.4%, 0.0%, 24.7%, e 13.68% respectivamente. O rendimento EEAG obtidos com os complexos Nanozeólita faujasita trocada com lantânio a 0.5M/LTL, Nanozeólita faujasita trocada com Cério a 0.5M/LTL, Nanozeólita faujasita trocada com Gadolínio a 0.5M/LTL e Nanozeólita faujasita trocada com Disprósio a 0.1M/LTL foram 20.55%, 0.0%, 42.34%, e 22.94% respectivamente. O resultado mais relevante em termos catalíticos foi obtido para a enzima lipase de *Thermomyces lanuginosus* imobilizada no suporte Nanozeólita faujasita trocada com 0,1 mol.L<sup>-1</sup> de cloreto de lantânio (Nanozeólita faujasita trocada com lantânio á 0.1M/LTL). Os rendimentos de ésteres etílicos de ácidos graxos (EEAG) para esse complexo foram de 67,39%.

**Palavras-chave:** Biodiesel, Terras Raras, Lantanídeos, Lipase, Imobilização, Nanozeólita.

## ABSTRACT

Nanozeolites have attracted the attention of researchers in several research areas due to the physical-chemical properties they possess, such as large external surface area, high dispersibility and ease of modulation of their surface characteristics, mainly in relation to the charge of Surface and hydrophilicity / hydrophobicity properties. In the present work, a synthesis and characterization study of pure faujasite nanozeolite was performed with rare Earths ( $\text{La}^{3+}$ ,  $\text{Ce}^{3+}$ ,  $\text{Gd}^{3+}$  + and  $\text{Dy}^{3+}$ ). First, the nanozeolites exchanged with rare earth cations were used as heterogeneous catalysts in the reaction of chemical transesterification of triacylglycerides in order to produce biodiesel via methyl and ethyl route. In parallel to this study, nanozeolites exchanged with rare earth cations were also studied as solid supports or matrices for the immobilization of fungal lipase, but specifically the lipase *Thermomyces lanuginosus* (TLL). The nanozeolite-enzyme complexes were also used as catalysts in the transesterification reaction of triacylglycerides for the production of ethyl esters of fatty acids using soybean oil as raw material via the ethyl route.

The results of the soybean oil transesterification study using only nanozeolites exchanged with rare earths in terms of FAME and FAEE yields using 5% catalyst concentration (based on oil mass), 65°C, 8 hours and 12 hours Were: faujasite nanozeolite exchanged with lanthanum at 0.1M/0.5M (0% FAME and FAEE), faujasite nanozeolite exchanged with 0.1M /0.5M cerium (0% FAME and FAEE), faujasite nanozeolite exchanged with 0.1M/0.5M Gadolinium (0% FAME and FAEE) and faujasite Nanozeolite exchanged with Dysprosium at 0.1M/0.5M (0% FAME and FAEE). The same negative results were obtained by working at a temperature of 120°C with time of 8 and 12 hours and the same concentration of catalyst in relation to the amount of oil mass. On the other hand, the experimental results in the production of FAEE obtained when using the complexes of nanozeolites-enzymes were much superior and promising in relation to the pure use of the nanozeolites exchanged with rare earths. The FAEE yields obtained with the complexes faujasite Nanozeolite exchanged with lanthanum at 0.1M / TLL, faujasite Nanozeolite exchanged with Cerium at 0.1M / TLL, Nanozeolite faujasita exchanged with Gadolinium at 0.1M / TLL and Nano-Nanozeolite faujasita exchanged with Dysprosium at 0.1M / TLL were 67.4%, 0.0%, 24.7%, and 13.68% respectively. The yield FAEEs obtained with the complexes faujasite faujasite exchanged with lanthanum at 0.5M / TLL, faujasite Nanozeolite exchanged with Cerium at 0.5M / TLL,

faujasite Nanozeolite exchanged with Gadolinium at 0.5M / TLL and faujasite Nanozeolite exchanged with Dysprosium at 0.1M / TLL Were 20.55%, 0.0%, 42.34%, and 22.94% respectively. The most relevant result in catalytic terms was obtained for the enzyme of *Thermomyces lanuginosus* immobilized on the support Nanozeolite faujasita and exchanged with 0.1 mol.L<sup>-1</sup> of lanthanum chloride (faujasite nanozeolite exchanged with lanthanum at 0.1 M / TLL). The yields of ethyl fatty acid esters (FAEE) were 67.39.

**Keywords:** Biodiesel, Rare earth, Lanthanides, Lipase, Immobilization, Nanozeolite.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Estequiometria geral para transesterificação de triglicerídeos em óleo com álcool na presença de catalisador.....	20
<b>Figura 2</b> - Modelo estrutural do sítio ativo de $\alpha/\beta$ hidrolases.....	23
<b>Figura 3</b> - Diferentes formas de RML. Estruturas 3 D. (a) forma fechada; (b) forma aberta. ....	24
<b>Figura 4</b> - Reações catalisadas por lipases do tipo não específica e do tipo 1,3 específica. ....	25
<b>Figura 5</b> - Mecanismo de reação de hidrólise de ligações éster catalisada por esterases e lipases. ....	27
<b>Figura 6</b> - Métodos de imobilização enzimática. ....	30
<b>Figura 7</b> - Estrutura de quatro tipos de zeólitas (faujasitas X e Y; ZSM-12; ZSM-5 ou silicalita-1; Theta-1 ou ZSM-22) e seus respectivos sistemas microporosos e dimensões. ....	35
<b>Figura 8</b> - Tabela periódica demonstrando os elementos de terras-raras. ....	37
<b>Figura 9</b> - a) Principais aplicações das terras-raras e seus percentuais utilização em termos de (b) volume e (c) valor. ....	38
<b>Figura 10</b> - Padrões de difração de raios-X da família de nanozeólita faujasita. ....	49
<b>Figura 11</b> - Difractogramas dos derivados da nanozeólita faujasita (NaX) trocada com diferentes cátions de Terras Raras. Nanozeólita faujasita trocada com lantânio á 0.1M, Nanozeólita faujasita trocada com Cério á 0.1M, Nanozeólita faujasita trocada com Gadolínio á 0.1M e Nanozeólita faujasita trocada com Disprósio á 0.1M. ....	51
<b>Figura 12</b> - Difractogramas dos derivados da nanozeólita faujasita (NaX) trocada com diferentes cátions de Terras Raras. Nanozeólita faujasita trocada com lantânio á 0.5M, Nanozeólita faujasita trocada com Cério á 0.5M, Nanozeólita faujasita trocada com Gadolínio á 0.5M e Nanozeólita faujasita trocada com Disprósio á 0.5M. ....	52

<b>Figura 13</b> - Espectro de infravermelho FTIR-ATR das amostras Nanozeólita faujasita trocada com lantânio á 0.5M, Nanozeólita faujasita trocada com Cério á 0.5M, Nanozeólita faujasita trocada com Gadolínio á 0.5M e Nanozeólita faujasita trocada com Disprósio á 05 M antes e após a imobilização enzimática. ....	54
<b>Figura 14</b> - Rendimentos de ésteres etílicos produzidos com os complexo Nanozeólita faujasita trocada com terras raras. ....	59
<b>Figura 15</b> - Gráfico de atividade enzimática da lipase de <i>Thermomices lanuginosus</i> (%).....	61

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Porcentagem de imobilização e atividade enzimática da lipase <i>Thermomyces lanuginosus</i> em função das condições de troca iônica: concentração molar dos íons em solução (0,1M e 0,5M), tempo (48) e temperatura (60°C).....	57
---	----

## LISTA DE EQUAÇÕES

<b>Equação 1</b> - Determinação da quantidade de proteína total. ....	44
<b>Equação 2</b> - Determinação da atividade enzimática para enzima imobilizada por titulação. ....	45
<b>Equação 3</b> - Determinação do teor de ésteres. ....	46
<b>Equação 4</b> - Determinação da atividade para a enzima livre por espectrofotometria. ....	47

## ***LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS***

<b>Nano-X/Na</b>	Nanozeólita faujasita X na sua forma sódica
<b>NaX</b>	Nanozeólita faujasita X
<b>AGL</b>	Ácidos Graxos livres
<b>AGLs</b>	Ácidos Graxos livres
<b>Nano-X/La/0.1M</b>	Nanozeólita faujasita trocada com lantânio à 0.1 Molar
<b>Nano-X/Ce/0.1M</b>	Nanozeólita faujasita trocada com cério à 0.1 Molar
<b>Nano-X/Gd/0.1M</b>	Nanozeólita faujasita trocada com gadolínio à 0.1 Molar
<b>Nano-X/Dy/0.1M</b>	Nanozeólita faujasita trocada com disprósio à 0.1 Molar
<b>Nano-X/La/0.5M</b>	Nanozeólita faujasita trocada com lantânio à 0.5 Molar
<b>Nano-X/Ce/0.5M</b>	Nanozeólita faujasita trocada com cério à 0.5 Molar
<b>Nano-X/Gd/0.5M</b>	Nanozeólita faujasita trocada com gadolínio à 0.5 Molar
<b>Nano-X/Dy/0.5M</b>	Nanozeólita faujasita trocada com disprósio à 0.5 Molar
<b>DRX</b>	Difração de Raios-X
<b>ATR-FTIR</b>	Infravermelho com transformada de Fourier no modo de reflexão total atenuada
<b>EEAG</b>	Éster etílico de ácido graxo
<b>EMAG</b>	Éster metílico de ácido graxo
<b>LTL</b>	Lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i>



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>18</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>19</b>
2.1 Biodiesel.....	19
2.2 Matérias-primas utilizadas para produção de biodiesel .....	20
2.3 Catalisadores utilizados na produção de biodiesel .....	21
2.4 Aspectos gerais das lipases .....	22
2.5 Especificidade .....	25
2.5.1 Mecanismo de Catálise.....	26
2.5.2 Lipases na produção de biodiesel.....	27
2.6 Métodos de imobilização de enzimas para produção de biodiesel.....	29
2.6.1 Adsorção .....	30
2.6.2 Ligação covalente/reticulação .....	30
2.6.3 Método de confinamento.....	31
2.7 Lipases imobilizadas .....	31
2.7.1 Imobilização de lipases em zeólitas para produção de biodiesel.....	32
2.8 Zeólitas.....	32
2.8.1 Aplicação das zeólitas .....	35
2.9 Elementos terras-raras .....	36
2.9.1 Zeólitas trocadas com cátions de terras-raras.....	39
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>40</b>
3.1 Geral.....	40
3.2 Específicos .....	40
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>41</b>
4.1 Síntese da nanozeólita faujasita pura .....	41
4.2 Síntese das nanozeólitas Nano-X/Na modificadas com lantanídeos através do processo de troca iônica .....	41
4.3 Difração de raios X (DRX) .....	42
4.4 Análises de Infravermelho .....	42
4.5 Transesterificação Química utilizando os derivados obtidos da troca iônica da Nano-X/Na nas concentrações (0.1M) e (0.5M).....	43

4.6 Adsorção de Enzimas sobre as Nanozeólitas .....	44
4.7 Ensaio enzimáticos para medida de atividade enzimática pelo método titulométrico.....	44
4.8 Transesterificação enzimática utilizando os complexos nanozeólitas-enzimas- lantanídeos.....	45
4.9 Análises por Cromatografia Gasosa (CG) do teor dos ésteres etílicos.....	46
4.10 Ensaio para determinação da atividade enzimática da enzima na sua forma livre .....	47
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÕES .....</b>	<b>49</b>
5.1 Síntese da Nanozeólita faujasita pura (NaX) .....	49
5.2 Troca iônica da nanozeólita faujasita (NaX) com as Terras-Raras ( $La^{3+}$ , $Ce^{3+}$ , $Gd^{3+}$ e $Dy^{3+}$ )....	50
5.3 DRX dos derivados da troca iônica obtida a partir da nanozeólita Nanozeólita faujasita/Na trocada com as terras-raras $La^{3+}$ , $Ce^{3+}$ , $Gd^{3+}$ e $Dy^{3+}$ .....	50
5.4 Espectroscopia da região do infravermelho dos derivados da troca-iônica com nanozeólita Nano-X/Na .....	53
5.5 Transesterificação Química utilizando os derivados obtidos da troca iônica da Nanozeólita faujasita (NaX) nas concentrações (0.1M) e (0.5M) .....	54
5.6 Imobilização e atividade enzimática dos derivados obtidos por troca iônica da Nano-X/Na nas concentrações(0,1M e 0.5M).....	55
5.7 Produção de Ésteres etílicos utilizando os complexos nanozeólitas-enzimas.....	58
5.8 Atividade relativa de hidrólise de pNPP pela lipase LTL em soluções com diferentes concentrações de $La^{3+}$ e $Gd^{3+}$ .....	60
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>62</b>
<b>7. PERSPECTIVAS FUTURAS.....</b>	<b>64</b>
<b>8. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>65</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos a produção Biodiesel tem ganhado bastante atenção da Sociedade devido á diversas questões ambientais, como a escassez das reservas de petróleo e outros combustíveis fósseis, poluição ambiental que ocorre devido a queima destes combustíveis, aquecimento global dentre outros (MA e HANNA, 1999).

O consumo de combustíveis fósseis vem crescendo muito nos últimos anos e, no entanto, existe uma necessidade urgente de explorar recursos renováveis para ser utilizado como combustível. O biodiesel é uma opção de biocombustível derivado de triglicerídeos presentes nos óleos vegetais e gorduras animais que pode ser produzido pelo processo de transesterificação utilizando álcoois de cadeia curta. O biodiesel é uma alternativa atraente para ser substituído pelo petróleo diesel, pois apresenta vantagens como a não toxicidade, a utilização de matérias-primas renováveis e a biodegradabilidade. Além disso, o biodiesel é livre de hidrocarbonetos aromáticos, e, portanto considerado muito mais renovável e mais limpo que o petróleo diesel (YANG *et al.*; 2017)

Dentre os diversos suportes sólidos inorgânicos disponíveis para a imobilização de enzimas, as zeólitas micrométricas com estruturas diferentes têm sido cada vez mais estudada pelos pesquisadores e recentemente o uso das zeólitas manométricas como suporte sólido para imobilização de enzimas ou proteínas tem chamado atenção da sociedade acadêmica e da indústria (DIAZ E BALKUS, 1996; GIMON-KINSEL *ET AL.*, 1998; HAN, STUCKY E BUTLER, 1999; CORMA, FORNES E REY, 2002; MACARIO, *ET AL.*, 2008; VASCONCELLOS, 2015)

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Biodiesel

O primeiro relatório do que é denominado biodiesel hoje se encontra descrito em uma patente belga 422877, testado em um ônibus urbano que é provavelmente o primeiro uso documentado do que denominamos de biodiesel, nessa patente emitida em 1.937 por Chavanne são descritos experimentos onde se obteve ésteres etílicos por transesterificação do óleo de palma com etanol (KNOTHE; RAZON, 2017).

A grande demanda de energia no mundo industrializado juntamente com os problemas relacionados à poluição causados pelo uso dos combustíveis fósseis faz com que o desenvolvimento de uma nova fonte de energia renovável se torne fundamental. O biodiesel é um combustível alternativo renovável adequado para utilização de motores á diesel. Esse biocombustível desempenha papel importante na diminuição das reservas de combustíveis fósseis, diminuindo as emissões de gases que provocam o efeito estufa e as alterações climáticas também (FEYZI *et al.*; 2017).

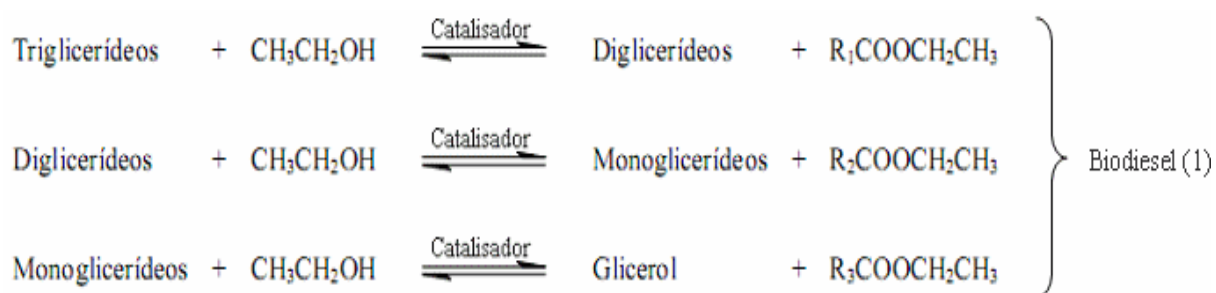
O biodiesel pode ser produzido a partir da transesterificação de triglicerídeos e/ou esterificação de ácidos graxos livres (AGL) presentes em óleos vegetais ou gordura animal na presença de um álcool de cadeia curta podendo ser etanol ou metanol e um catalisador adequado, homogêneo ou heterogêneo, ácido ou básico. A fonte de triglicerídeos para transesterificação pode variar amplamente, incluindo gorduras animais; óleos vegetais; resíduos de óleo de cozinha; óleo de microalgas e óleo fungico. As reações de transesterificação podem ser não catalíticas ou processos catalíticos, utilizando catalisadores homogêneos; catalisadores heterogêneos; biocatalisadores e líquidos iônicos (TRAN *et al.*, 2017).

Devido à demanda por processos mais limpos os catalisadores ácidos heterogêneos se tornaram as melhores opções, pois eles são ambientalmente corretos, não são corrosivos e não requer a neutralização do produto, produzindo menos resíduos (VIEIRA *et al.*; 2017).

Com relação ao álcool, tanto o etanol quanto o metanol podem ser utilizados para produzir biodiesel (FEYZI *et al.*; 2017).

A figura 1 mostra a estequiometria geral para transesterificação de triglicerídeos em óleo com álcool na presença de um catalisador (DEMIRBAS ,2009).

Figura 1 - Estequiometria geral para transesterificação de triglicerídeos em óleo com álcool na presença de catalisador. Um mol de éster é liberado em cada etapa e as reações globais.



Fonte : DEMIRBAS (2009)

## 2.2 Matérias-primas utilizadas para produção de biodiesel

O custo da matéria-prima representa de 60-80% do custo total na produção de biodiesel, o que indica que a escolha da matéria-prima apropriada é de grande importância para garantir a viabilidade econômica do processo. Os óleos comestíveis, tais como o óleo de palma (TALUKDER *et al.*; 2011), óleo de colza (JEONG & PARK, 2008), óleo de girassol (MODI *et al.*; 2007), óleo de farelo de arroz (KAMINI & LEFUGI, 2001) e óleo de soja (YU *et al.*; 2010) são as principais fontes de produção de biodiesel. No entanto, existem sérias preocupações quanto ao uso de óleo comestível na produção de biodiesel, uma vez que são mais caros e a propagação destas plantas levaria ao desmatamento como relatado por Leung *et al.*; (2010). A fim de superar estes problemas, os pesquisadores têm centrado no uso de matérias-primas alternativas, como óleo não comestível, óleos residuais e óleo microbiano para a produção de biodiesel (AARTHY, 2014).

As oleaginosas canola (*Brassica napus*), a soja (*Glycine max*), a palma (*Glycine max*) e o girassol (*Helianthus annuus*) são provenientes da primeira geração de matérias-primas utilizadas para produzir biodiesel, pois estas foram às primeiras culturas a serem utilizadas para a produção de biodiesel (ABBASZAADEH *et al.*, 2012).

Mais de 95% das matérias-primas de produção de biodiesel vem de óleos comestíveis. As propriedades do biodiesel produzido a partir desses óleos são muito apropriadas para serem utilizadas como substituto do combustível diesel. No entanto, podem causar alguns problemas, como concorrência no mercado do óleo comestível, o que aumenta tanto o custo dos óleos comestíveis quanto o do biodiesel. E para superar essas desvantagens

muitos pesquisadores estão interessados em produtos não comestíveis, que são óleos não adequados ao consumo humano devido à presença de alguns componentes tóxicos nos óleos. Além disso, cultivos oleaginosos não comestíveis podem ser cultivados em terras que não são utilizadas para culturas alimentares tornando o preço de cultivo muito menor porque essas culturas podem manter um rendimento razoavelmente elevado sem cuidados especiais (LEUNG, 2010).

### **2.3 Catalisadores utilizados na produção de biodiesel**

A catálise ácida e básica desempenha um papel fundamental para a maioria dos processos que são utilizados atualmente para se produzir biocombustíveis, tais como a transesterificação de óleos vegetais com álcool (metanol) no processo de produção do biodiesel, onde pode se utilizar catalisadores alcalinos como NaOH. Os catalisadores homogêneos utilizados nesses dois processos apresentam algumas desvantagens, devido à neutralização que deve ser realizada ao final da reação. Para evitar esses inconvenientes, muitos esforços tem sido dedicados para a busca de catalisadores sólidos que são mais seletivos, seguros e ambientalmente corretos. Neste cenário, as zeólitas apresentam propriedades importantes para a produção de biodiesel, como alta concentração de sítios ativos, elevada estabilidade térmica/hidrotermal e seletividade de forma (PEREGO, C.; BOSETTI, 2011).

Os catalisadores homogêneos básicos tais como KOH e NaOH demonstraram uma elevada atividade catalítica na reação de transesterificação para produzir éster metílico de ácido graxo. Estes catalisadores homogêneos realizam uma conversão quase completa de triglicerídeos, alto rendimento e fácil recuperação do catalisador. No entanto, os catalisadores heterogêneos são mais desejáveis, pois eles podem ser facilmente separados dos produtos da reação (FEYZI *et al.*; 2017).

O processo catalisado por alcalinos apresenta sérias limitações, pois a presença de ácidos graxos livres (AGLs) e água na matéria-prima pode levar à formação de sabões, o que aumenta a viscosidade do produto e dificulta a separação (SUN *et al.*; 2015).

Os catalisadores ácidos mostram uma atividade mais baixa do que os catalisadores básicos, a utilização de catalisadores básicos heterogêneos para a produção de biodiesel é uma alternativa promissora, mais limpa e mais seletiva quando comparado com o processo homogêneo convencional, devido às seguintes vantagens: pouca ou nenhuma corrosão, fácil

separação, fácil manuseio e reutilização, possível uso de reatores de leito fixo (SANTÓRIO, *et al.*; 2016).

Os catalisadores ácidos são eficazes nas reações de esterificação e transesterificação. Em comparação com os catalisadores alcalinos, sabe-se que os catalisadores ácidos reagem com substratos de qualidade inferior que contêm AGLs elevados e/ou água em condições normais (SUN *et al.*; 2015).

Muitos tipos de catalisadores básicos são sugeridos para o uso na reação de transesterificação como os óxidos de metal alcalino e óxidos metálicos misturados para uma maior atividade do catalisador. Os óxidos de metais alcalino-terrosos tais como CaO, metóxido de cálcio e MgO têm demonstrado uma excelente atividade catalítica e estabilidade para a produção de biodiesel. Os óxidos mistos de Mg-Al e análogos com cátions divalentes (Ca,Zn) e trivalentes (La,Ga) preparados a partir de hidróxidos mistos com hidrotalcite foram relatados na literatura como catalisadores básicos eficientes para produção de biodiesel. Também foi verificado que óxidos mistos de magnésio ou lantânio tais como Zr/La<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, CaO-MgO, CaO- La<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, , Zr/MgO são catalisadores sólidos promissores para a reação de transesterificação (FEYZI *et al.*; 2017).

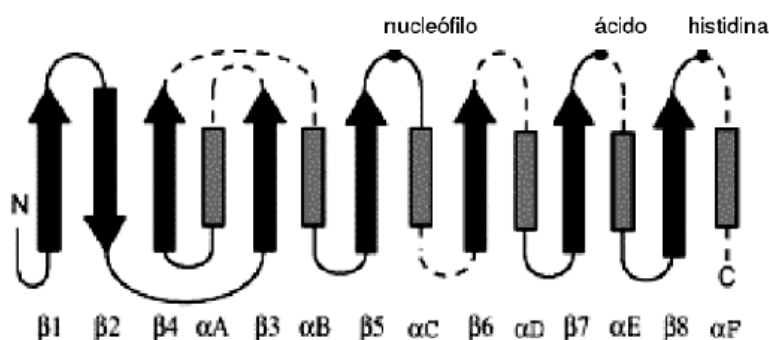
Vários catalisadores ácidos foram testados e relatados na literatura para a reação de transesterificação, tais como SO<sup>42-</sup> / ZrO<sub>2</sub> , SO<sup>42-</sup> / ZrO<sub>2</sub>-TiO<sub>2</sub> / La<sup>3+</sup> , Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> / SO<sup>42-</sup> / MCM-41, SO<sup>42-</sup> / La<sub>2</sub>O<sub>3</sub> e HZSM-5 modificado com ácido cítrico. Mas as zeólitas em particular revelaram ser catalisadores promissores para a reação, apresentando potencial tanto para ser utilizado diretamente como catalisador ou como suporte (VIEIRA, S.S *et al.*; 2017).

## 2.4 Aspectos gerais das lipases

As lipases são enzimas ubíquas produzidas por animais (pâncreas de bovinos, ovinos e suínos), plantas (látex de papaia, colza, sementes de aveia e mamona) e micro-organismos (bactérias, fungos e leveduras). A maioria das lipases vegetais não são comercialmente utilizadas, enquanto a maioria das lipases de origem animal e microbiana apresentam aplicações mais amplas devido à sua tolerância a uma ampla faixa de pH e estabilidade térmica. Entre elas, as lipases microbianas ganharam atenção industrial especial devido à sua estabilidade, ampla especificidade do substrato, altos rendimentos, facilidade de manipulação genética etc. Em geral, as lipases microbianas são proteínas de 19-60 KDa e pertencem à família das hidrolases com a estrutura composta de uma folha β central constituída por até

oito fitas diferentes (1-8) ligadas por até seis  $\alpha$  hélices (A-F). O sítio ativo é formado por uma tríade catalítica constituída por aminoácidos serina, aspartato (ou glutamato) e histidina. O resíduo nucleófilo serina está localizado na extremidade C-terminal da fita  $\beta$  5 de um pentapeptídeo altamente conservado G-X-S-X-G (X pode ser qualquer aminoácido), formando uma característica principal  $\beta$  em torno de  $\alpha$ , denominada como a cavidade nucleofílica (AARTHY *et al.*; 2014). Na figura 2 pode-se visualizar o sítio ativo da lipase.

**Figura 2** - Modelo estrutural do sítio ativo de  $\alpha/\beta$  hidrolases.



Fonte: Pouderoyen *et al.* (2001).

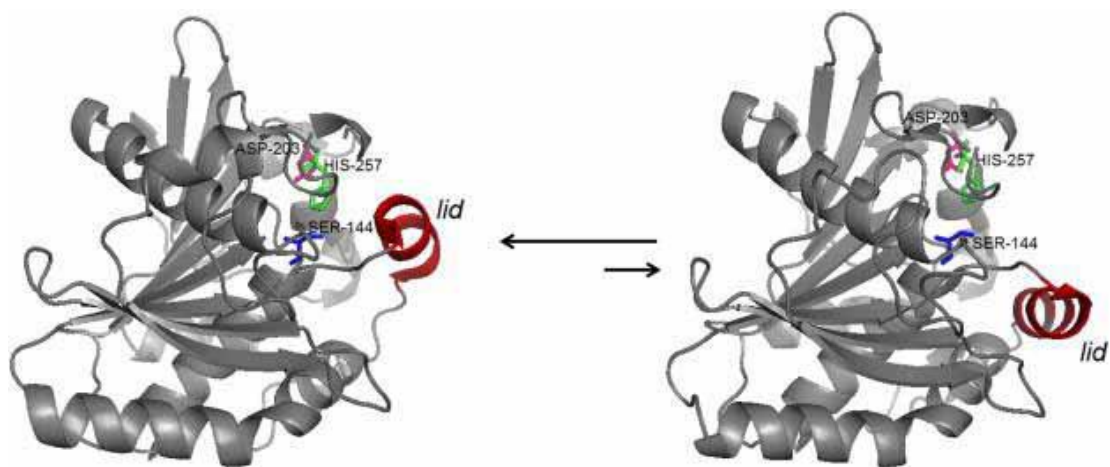
As lipases são enzimas que exercem sua atividade na interface lipídio-água. Elas catalisam naturalmente as reações de hidrólise de triglicerídeos de cadeia longa a diacilglicerol e carboxilato (triacilglicerolacil hidrolase, E.C.3.1.1.1). A lipase de *Thermomyces lanuginosus* (LTL) produzida por um micro-organismo termófilo, exibe massa molecular de 31,7 kDa, dimensões moleculares de de 3,5 Å x 4,5 Å x 5,0 Å e ponto isoelétrico de 4,4. A atividade ótima dessa enzima é a 60°C e pH 9,0. Tanto a temperatura quanto o pH afetam a interações entre o substrato e o sítio catalítico. O sítio catalítico é composto por Ser 146, His 258 e Asp 201, é coberto por uma *lid*, cuja abertura é energeticamente favorável na presença de superfícies hidrofóbicas que conduzem á forma ativa de LTL. Esse mecanismo de ação é denominado “ativação interfacial”. As diversas características de LTL, como sua especificidade, seletividade, alta atividade catalítica e estabilidade térmica fazem com que ela seja uma ótima alternativa para uso como catalisadores em processos químicos específicos e complexos. No entanto, algumas desvantagens podem ser citadas, como a alta tendência de sofrer desnaturação, agregação e as



dificuldades de recuperação do meio reacional quando esta se encontra em forma solúvel ou livre. Nesse contexto, sua estabilização é fundamental para sua implementação. Uma metodologia promissora para estabilizar as enzimas é a imobilização destes em um suporte sólido que confere estabilidade térmica e facilita a reutilização em processos descontínuos ou contínuos (SOTO *et al.*; 2017).

A Figura 3 demonstra o mecanismo geral de ativação interfacial das lipases, a lipase de *Rhizomucor miehei* (RML) é utilizada como exemplo. Quando a interface água-lipídio não está presente, o sítio ativo é recoberto por uma “tampa” hidrofóbica ou “*lid*”. No entanto, na presença de substâncias hidrofóbicas, a tampa é aberta e uma ampla superfície hidrofóbica dos sítios catalíticos é exposta, o que torna os sítios ativos acessíveis ao substrato. Supõe-se que esta ampla superfície hidrofóbica interage com a interface lipídica (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010).

**Figura 3** - Diferentes formas de RML. Estruturas 3 D. (a) forma fechada; (b) forma aberta.

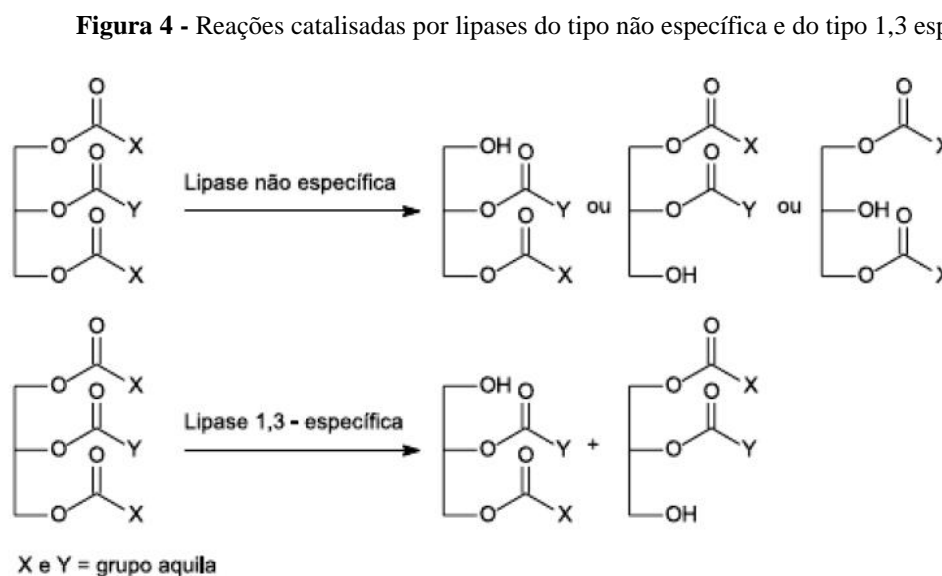


Fonte: Fernandez-Lafuente (2010).

## 2.5 Especificidade

As lipases podem ser divididas em três classes com base em sua especificidade ou seletividade: lipases específicas régio- ou posicionais; lipases específicas do tipo de ácido graxo e lipases específicas para uma determinada classe de acilgliceróis (mono-,di-ou triglicerídeos). Em termos de regiosseletividade, as lipases foram divididas em três tipos: sn-1,3-específico (hidrólise de ligações éster nas posições R1 ou R3), sn-2-específico (hidrólise éster na posição R2) e não específico (não distinguem as posições éster a serem clivadas). As lipases mais conhecidas são 1,3-regioespecífica com atividade nas posições terminais. Como exemplos podemos citar as lipases de *Pseudomonas fluorescens*, *P. cepacia*, *C.rugosa*, *C.antarctica*, *C.cylindracea*, *R.oryzae* e *M.miehei*. Existem diversos fatores que podem influenciar a regiosseletividade das lipases (GOG *et al.*; 2012).

A figura 4 mostra reações catalisadas por lipases do tipo específica do tipo 1,3 específica e não específica.



Fonte: Paques, Macedo (2006).

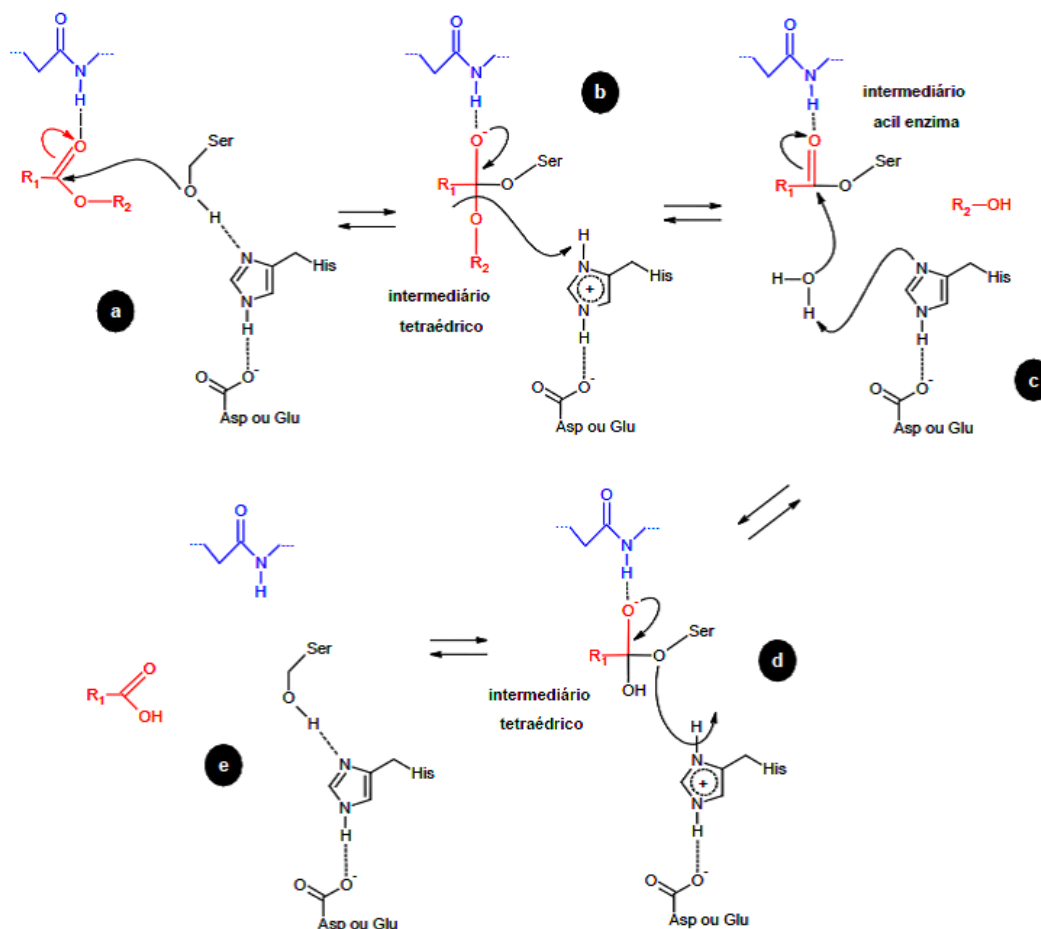
Segundo Aarthy (2014) o processo de transesterificação pode também ser melhorado utilizando uma combinação de lipases devido á variação na especificidade dos substratos das lipases. Huang *et al.*; (2010) produziu biodiesel utilizando banha como substrato combinando a enzima Novoziym 435 (não específica) e Lipozyme TL-IM (1,3-específica) e obteve 97,2% de ésteres metílicos em 20 horas de reação

### 2.5.1 Mecanismo de Catálise

Os mecanismos envolvidos na catálise das serinas hidrolases foram, inicialmente, propostos por Brady *et al.* (1990). Na figura 8, a primeira etapa consiste na retirada de um próton de serina (VAZ, 2012). Ou seja, a serina é ativada por desprotonação. Como consequência a nucleofilicidade dos resíduos hidroxil da serina é reforçada e ataca o grupo carbonil da ligação éster da cadeia do substrato formando um intermediário acil-enzima (BONINE, 2011.; JAEGER, 1994 *et al.*; REIS, 2009 *et al.*; 2011).

O anel imidazólico da histidina se torna protonado e positivamente carregado, e a carga negativa do resíduo ácido estabiliza o anel. Duas pontes de hidrogênio formadas com ligações amida dos resíduos de aminoácidos estabiliza o intermediário tetraédrico. Um álcool é liberado, permanecendo um complexo acil-enzima. Quando um segundo ataque nucleofílico ocorre por um íon hidroxila, o ácido graxo é liberado e a enzima regenerada (Figura 8). (BONINE, 2011.; JAEGER, 1994 *et al.*; REIS, 2009 *et al.*; 2011.; VAZ, 2012).

**Figura 5** - Mecanismo de reação de hidrólise de ligações éster catalisada por esterases e lipases.



A tríade catalítica e a água são visualizadas a preto, os resíduos do espaço oxianiónico de azul e o substrato de vermelho. (a) Ataque nucleofílico do resíduo hidroxil da serina ao carbono susceptível da ligação éster; (b) intermediário tetraédrico; (c) intermediário acil-enzima e ataque nucleofílico da água; (d) intermediário tetraédrico; (e) enzima livre.

Fonte: Vaz *et al.* (2012).

## 2.5.2 Lipases na produção de biodiesel

As lipases (EC 3.1.1.3) são consideradas importantes, pois além das reações de hidrólise, elas também catalisam diversas reações como esterificação, transesterificação e aminólise. As lipases apresentam excelente atividade catalítica e estabilidade em meio não aquoso e sua especificidade, regiosseletividade e enantiosseletividade podem ser usadas em diversas aplicações com êxito na síntese orgânica. Atualmente as lipases têm ganhado atenção especial como biocatalisadores para a produção de biodiesel. Geralmente as lipases exercem sua atividade catalítica em condições mais amenas e com uma grande variedade de substratos de triglicerídeos, incluindo resíduos de óleos e gorduras com níveis elevados AGL. Além

disso, a separação e a purificação do biodiesel se torna muito mais fácil, o que resulta em benefícios ambientais (GOG *et al.*; 2012)

Recentemente, a produção de biodiesel catalisada por enzimas tem recebido bastante atenção devido á suas vantagens, tais como baixo consumo de energia, condições operacionais brandas, não toxicidade e processos favoráveis ao meio ambiente em comparação com os métodos catalisados por químicos. As lipases são catalisadores amplamente utilizados para a síntese de biodiesel. No entanto, o uso de lipases para a produção comercial de biodiesel apresenta custo elevado (KUEPETHKAEW *et al.*, 2017).

Além dessas vantagens citadas acima, a utilização de lipases na produção de biodiesel em escala industrial apresenta como vantagens: a baixa quantidade de álcool utilizada em relação á quantidade de óleo, a fácil recuperação do produto e recuperação do glicerol facilitada por operações simples e a eliminação do catalisador também se torna mais fácil (YAGIZ, 2007).

A produção de biodiesel catalisada por lipases também possibilita a utilização de substratos de qualidade inferior, tais como banha, sebo e óleos vegetais descartados de restaurantes e uso doméstico que apresentam teor de água e ácidos graxos livres superiores. Isto só é possível por causa da especificidade das lipases para esse tipo de reação. Algumas desvantagens do uso das enzimas em processos catalíticos são principalmente: o alto custo da obtenção da enzima desde o isolamento até a purificação e a perda do catalisador no final do processo (MOREIRA, 2007).

Li *et al.*; (2007) utilizou óleo de microalgas produzido pela microalga verde *C.protothecoides* como substrato para produção de biodiesel e obteve uma conversão de 98,15% de ésteres monoalquílicos de ácidos graxos em 12 horas, utilizando lipase de *Candida* sp. 99-125, 10% de H<sub>2</sub>O e 3:1 proporção metanol para óleo e temperatura de reação de 38°C. Logo em seguida, utilizou banha como substrato nas mesmas condições de reações e o rendimento foi de 87,4 de FAME (AARTHY *et al.*; 2014).

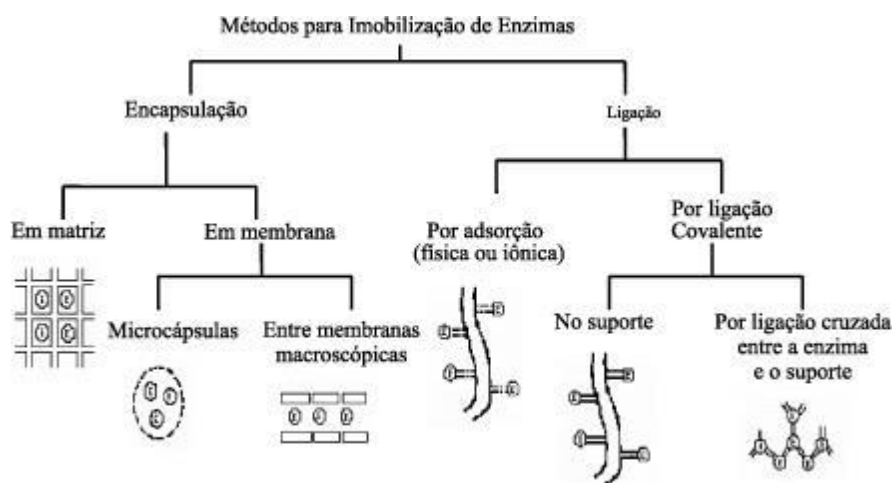
Atualmente, a literatura descreve a utilização de enzimas como a lipase sendo usadas para catalisar o processo de transesterificação por imobilização em um suporte adequado. Uma das vantagens da imobilização é que a enzima pode ser reutilizada sem separação e além disso a temperatura de operação do processo é baixa (50°C) quando comparadas com outras técnicas. As desvantagens incluem os efeitos de inibição observado quando o metanol é utilizado e o custo da enzima que é alto (RANGANATHAN *et al.*; 2007).

## 2.6 Métodos de imobilização de enzimas para produção de biodiesel

O desenvolvimento de técnicas de imobilização na área de enzimas apresenta grande importância, pois permite a reutilização das enzimas, facilita a separação dos produtos e aumenta a estabilidade em solventes orgânicos. O interesse principal em imobilizar as enzimas é a obtenção de um biocatalisador que apresente atividade e estabilidade que não sejam afetadas durante o processo, quando comparado à sua forma livre. A enzima imobilizada idealmente deverá apresentar uma atividade catalítica superior. Além disso, não deverá ocorrer modificações no sítio ativo da enzima e nem alterações estruturais. No entanto, a imobilização enzimática pode aumentar ou inibir a atividade e estabilidade da enzima. Diversos métodos têm sido reportados na literatura e utilizados para resolver os problemas de instabilidade e também otimizar as diversas aplicações (DALLA-VECCHIA et al.; 2004).

Pode-se definir imobilização enzimática como: moléculas enzimáticas confinadas à uma matriz/suporte sólido diferente daquele em que o substrato ou os produtos estão presentes. Ou seja, ligando as enzimas ou as inserindo dentro de um material de suporte adequado. Notando que as moléculas de substrato e os produtos formados devem circular de forma livre dentro e fora da fase para a qual as enzimas são restringidas. Diversos materiais podem ser utilizados como matriz ou sistema de suporte para imobilizar as enzimas, mas normalmente são utilizados os polímeros inertes e os materiais inorgânicos. O suporte ideal deve ser econômico, inerte, estável, apresentar força física, capacidade para aumentar a especificidade enzimática, capacidade de reduzir a inibição do produto e capaz de prevenir a adsorção não específica e a contaminação bacteriana. Como a maioria dos suportes apresentam apenas algumas dessas propriedades citadas, a seleção do suporte para imobilização de enzimas deverá ser escolhida com base nas propriedades e limitações do suporte. Existem diferentes métodos de imobilização enzimática que podem ser agrupados da seguinte forma: 1) Método de adsorção/ligação ao veículo; 2) Ligação covalente/reticulação; 3) Método de confinamento; 4) Confinamento de Membranas. Na figura 6 é mostrada os vários métodos de imobilização enzimática (SIRICHA, V.L et al.; 2016).

**Figura 6 - Métodos de imobilização enzimática.**



Fonte: Dalla-Vecchia, Nascimento e Soldi (2004).

### 2.6.1 Adsorção

O método de imobilização mais utilizado é o de adsorção física, pois é simples, barato, não necessita de ativação do suporte e possibilita a regeneração da matriz utilizada. Nesse método, a enzima é imobilizada em suporte sólido através de ligações de baixa energia, como de van der Waals ou hidrofóbicas, iônicas, etc. Esse método é dependente de diversos fatores como, tamanho da enzima a ser adsorvida, área superficial do adsorvente, porosidade (permitem a ligação da enzima com a superfície interna do suporte, o que fortalece a adsorção) e tamanho do poro. Uma desvantagem desse método é que pode ocorrer dessorção causada pelas variações de temperatura, pH e força iônica. O polietileno, poliprileno, resina sintética e outros podem ser utilizados como suportes (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004; CANILHA; CARVALHO; SILVA, 2006; MENDES *et al.*, 2011).

### 2.6.2 Ligação covalente/reticulação

Esse método de imobilização depende principalmente da formação de ligação covalente entre a enzima e o material utilizado como suporte. A formação de ligações covalentes da enzima com a matriz (suporte) vai ocorrer através dos aminoácidos da cadeia

lateral como histidina, arginina, ácido aspártico, etc. No entanto o que vai definir a reatividade é a presença de diferentes grupos funcionais como por exemplo, o grupo carboxila, grupo amina, grupo fenólico, grupo sulfídrico, dentre outros. Ao impedir a inativação dos resíduos de aminoácidos no sítio ativo pode-se alcançar atividades enzimáticas muito eficientes. Existem estratégias de proteção que são amplamente utilizadas com essa finalidade como a ligação covalente da enzima com a matriz na presença de substrato ou um inibidor competitivo; por formação de um complexo inibidor enzimático covalentemente reversível; a ligação covalente de uma enzima solúvel modificada quimicamente á matriz é alcançada através da incorporação de novos resíduos; um precursor de zimogênio. (SIRICHA *et al.*; 2016).

### **2.6.3 Método de confinamento**

Nesse método vai ocorrer o aprisionamento da enzima dentro de uma rede polimérica através de ligações covalentes ou não covalentes que permitem a passagem de substrato e produtos mas retêm a enzima. Nesse método a enzima não se encontra ligada na matriz ou suporte, o diferencia de outros métodos. A enzima pode entrar no suporte por diferentes estratégias, como inclusão da enzima dentro de uma matriz polimérica altamente reticulada, por dissolução enzimática em uma fase não aquosa, separando a enzima de uma solução utilizando uma microcápsula semipermeável. Existem diversos métodos de aprisionamento de enzimas como o aprisionamento de fibras, aprisionamento de gel, microencapsulação, etc (SIRICHA *et al.*; 2016).

## **2.7 Lipases imobilizadas**

A imobilização das lipase em processos industriais se torna vital, pois a enzima pode ser facilmente recuperada e utilizada em reações contínuas. As enzimas imobilizadas são mais estáveis em relação á temperatura, á química e á desnaturação por cisalhamento e permitem também um fácil manuseamento, recuperação e reciclagem do biocatalisador. As lipases imobilizadas mais comumente utilizadas são extracelulares e comercialmente disponíveis como Novozym 435 (lipase de *C.antarctica* imobilizada sobre uma resina acrílica macroporosa), Lipozyme RM IM (lipase de *Rhizomucor miehei* imobilizada sobre uma resina aniônica) . No entanto, os suportes utilizados nos processos apresentam alto custo e a



atividade das enzimas imobilizadas diminui na reciclagem contínua devido à dessorção, inativação do substrato e inibição do produto. Além disso, utilizando óleo bruto de custo baixo como substrato, as lipases imobilizadas não podem ser utilizadas em muitos ciclos, uma vez que se tornam rapidamente inativadas na presença de uma matéria-prima contendo fosfolípidos (AARTHY *et al.*; 2014).

Estudos demonstram que já foram utilizados uma grande variedade de materiais como suportes orgânicos e inorgânicos para a imobilização da enzima, tais como as zeólitas, poli (propileno) ou sílica porosa (Bayramoglu e Arica, 2009; Bayramoglu *et al.*; 2013). As partículas superparamagnéticas têm sido amplamente utilizadas para imobilizar enzimas porque elas podem ser prontamente separadas da reação (ZHANG *et al.*; 2016).

### **2.7.1 Imobilização de lipases em zeólitas para produção de biodiesel**

Yagiz, Kazan e Alkin (2007) realizaram transesterificação de óleos residuais de (cozinha) para produção de biodiesel. Os autores utilizaram lipase imobilizada em quatro tipos diferentes de zeólitas como biocatalisadores heterogêneos, mas alcançaram uma baixa porcentagem de enzima imobilizada e baixa conversão de ésteres monoalquílicos quando comparado com outros suportes que foram utilizados nesse estudo.

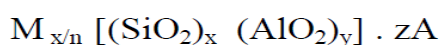
Vasconcellos *et al.*; (2012) utilizaram a zeólita Gismondina (escala micrométrica) trocadas com metais de transição ( $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ) como suporte para imobilização da lipase de *R. miehei* e posteriormente realizaram o procedimento de transesterificação do óleo de soja. O melhor resultado obtido foi do material trocado com níquel, onde se alcançou uma conversão de 56,2 % de ésteres metílicos, superior aos valores alcançados para quantidade relativa do suporte puro (20%) e da enzima livre (39,3).

## **2.8 Zeólitas**

As zeólitas são aluminossilicatos microporosos cristalinos hidratados que são constituídos a partir de estruturas tridimensionais de tetraedros  $\text{TO}_4$  (onde geralmente o T é Al ou Si) que estão conectados uns aos outros por ligações dos átomos de oxigênio. Nessa estrutura se formam numerosos canais e cavidades que contém água e cátions de compensação alcalinos e alcalinos-terrosos (ANBIA *et al.*; 2017). Essas gaiolas são fechadas

e os canais apresentam dimensões moleculares, com distribuição de tamanho de poros limitados e sítios catalíticos ativos fortes (WANG *et al.*, 2016).

Quando ocorre a incorporação de Al na rede estrutural a carga  $3^+$  no Al faz com que a rede se torne carregada negativamente, desta forma é necessário equilibrar cada tetraedro de  $AlO_4$  com uma carga positiva, sendo necessário a presença dos cátions de compensação. Estes cátions podem ser orgânicos ou inorgânicos, eles se mantêm dentro da estrutura fazendo com que a rede consiga se manter neutra. (BIESEKI, 2012 e GIANNETTO *et al.*, 2000). A fórmula da cela unitária de uma zeólita considerando as substituições isomórficas que podem ocorrer na armação estrutural pode ser descrita como:



Onde:

M = cátion de valência n ( $X > 0$ );

A = água, moléculas diversas, pares iônicos ( $Z > 0$ );

Z = moles de água de hidratação;

n = valência do cátion de compensação;

(x+y) = número total de tetraedros por cela unitária.

Os átomos de estrutura T se referem normalmente a átomos de Si, Al ou P e em alguns casos outros átomos, como o B, Ga, Be e Ge, dentre outros. Estes tetraedros  $[SiO_4]$ ,  $[AlO_4]$  ou  $[PO_4]$

são as unidades estruturais básicas da zeólita. Os tetraedros  $TO_4$  são as unidades de construção primária da zeólita, e em uma zeólita, cada átomo de T é ligado a quatro átomos de oxigênio, onde cada átomo de oxigênio faz a ponte entre dois átomos de T. As zeólitas de aluminossilicato construídas a partir de tetraedros  $SiO_4$  e Tetraedros  $AlO_4$  apresentam uma estrutura aniônica, cuja carga negativa é compensada por cátions extra-rede (XU *et al.*, 2007).

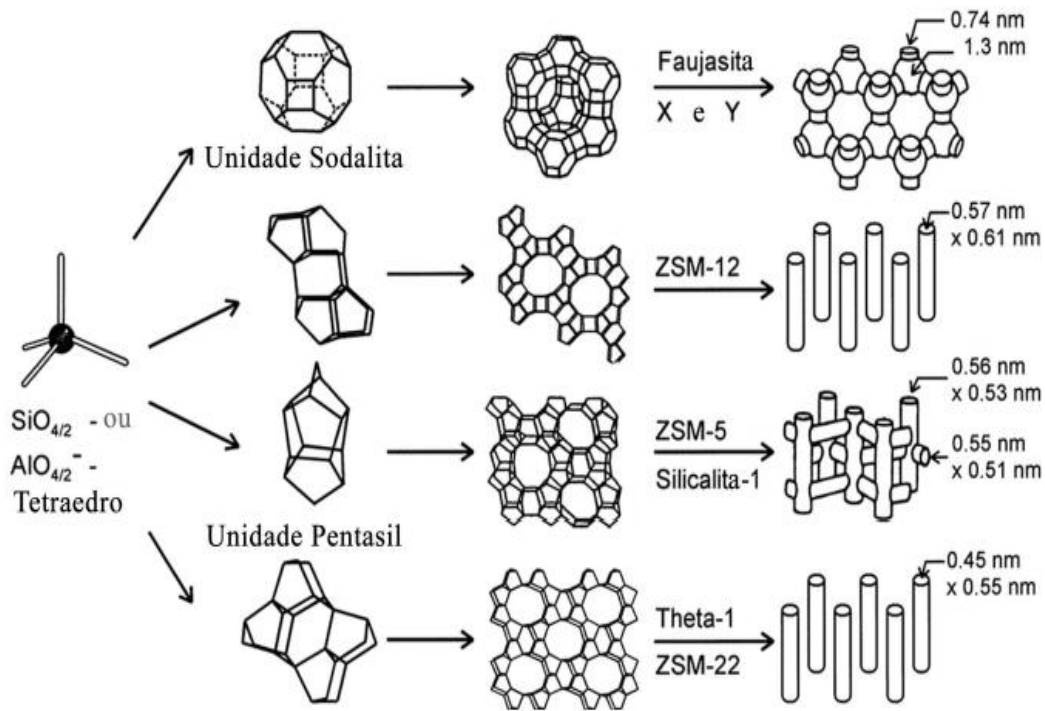
As unidades de construção secundária (SBUs) introduzida por Meier e Smith contém até 16 átomos coordenados tetraedricamente, elas são formadas pelo agrupamento das unidades primárias. Deve-se observar que as SBUs são apenas unidades de construção topológica teóricas (XU *et al.*, 2007). A junção das unidades secundárias de construção levarão a formação de uma estrutura espacial contínua complexa.

As zeólitas faujasitas trocadas com diferentes cátions ( $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Ba^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Li^+$ ,  $Rb^+$ ,  $Sr^{2+}$ ,  $Cs^+$ ) têm sido estudadas nos últimos quarenta anos devido a sua utilização na separação

e na engenharia de catálise petroquímica. As zeólitas faujasita são separadas normalmente em duas classes: X que têm um relação Si/Al entre 1 e 1,5 e Y que apresenta uma relação Si/Al maior que 1,5. Foi descrito na literatura recentemente a zeólita faujasita LSX (Low Silica X) que têm relação Si/Al de 1,0. As distribuições dos diferentes cátions na estrutura zeolítica é muito importante para a compreensão dos mecanismos que envolvem a adsorção e a seletividade (FRISING , LEFLAIVE., 2008)

As peneiras moleculares e mais especificamente as zeólitas oferecem diversas aplicações em catálise (Craqueamento e Isomerização de Xilenos) e Separação de Processos (Preparação de Oxigênio puro e Remoção de água, de gases ou líquidos). Sua gaiola se apresenta como uma estrutura de geometria precisa, contendo poros que se ordenam de forma uniforme por todo o cristal o que a torna muito útil para todas as aplicações citadas nesse texto. O tamanho limitado dos canais impede a formação de intermediários indesejáveis (shape-form selectivity) enquanto a cristalinidade do material irá conduzir as propriedades da partícula inteira. Embora mais de 150 espécies naturais ou sintéticos tenham sido caracterizados, ainda não é possível fazer a variação do tamanho dos poros e das gaiolas de forma sistemática (WANG, XU *et al.*, 2003). Na figura 7 podemos observar a estrutura de quatro tipos de zeólitas diferentes, com seus respectivos sistemas microporosos e dimensões.

**Figura 7** - Estrutura de quatro tipos de zeólitas (faujasitas X e Y; ZSM-12; ZSM-5 ou silicalita-1; Theta-1 ou ZSM-22) e seus respectivos sistemas microporosos e dimensões.



Fonte: Adaptado de Weitkamp, 2000.

### 2.8.1 Aplicação das zeólitas

Devido à estrutura porosa dos materiais zeolíticos, eles possuem uma área superficial elevada. As zeólitas também apresentam alta estabilidade térmica e mecânica. A presença de átomos de alumínio na estrutura gera propriedades ácidas nesse material, e dessa forma as zeólitas são consideradas catalisadores sólidos ácidos. Todas essas propriedades tornam as zeólitas adequadas para diversas aplicações de catálise. Um dos maiores consumidores desses materiais são as indústrias de petróleo, elas dependem das zeólitas para utilização como catalisadores para o craqueamento de hidrocarbonetos pesados. Um exemplo é que 95% do craqueamento catalítico fluído (FCC) dependem das zeólitas faujasita (FAU), enquanto que o hidrocrackeamento catalítico (HDC) utilizam a zeólita do tipo BEA. Já a nanotecnologia de gás para líquido (GTL), tal como processo de Metanol para Gasolina (MTG), o catalisador utilizado é do tipo zeólita MFI. Além da utilização das zeólitas para produção de petróleo, elas também podem ser utilizadas em aplicações para síntese de produtos químicos finos,

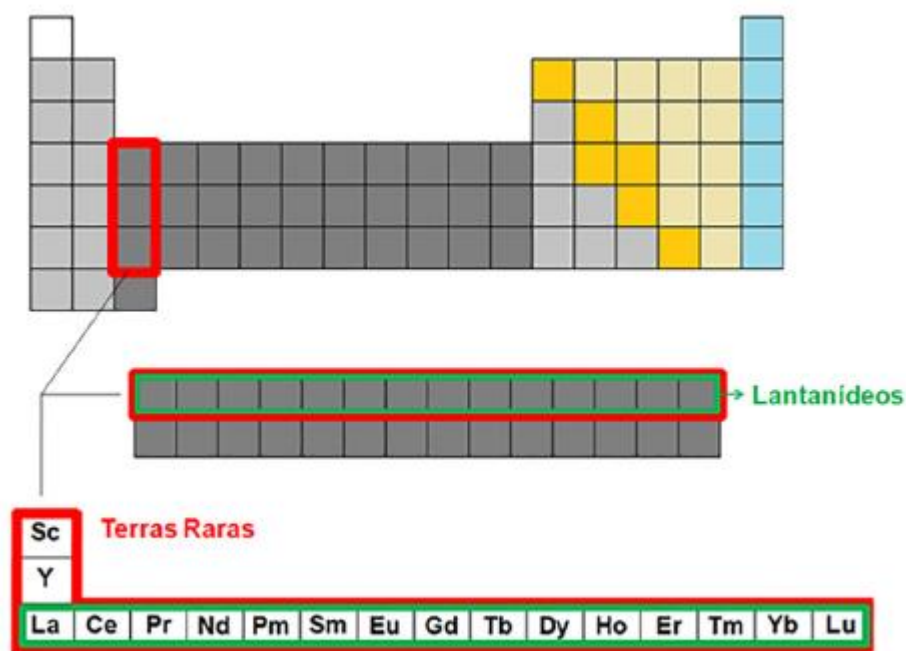
como por exemplo indústrias farmacêuticas em que essas zeólitas são usadas como catalisadores para produção de drogas. E podem ser usadas também como componentes para purificação de água e detergentes para o tratamento da água dura e como adsorventes gerais. A literatura relatou recentemente que esses materiais encontraram aplicações na detecção, separação, lasers e liberação de fármacos (ANIS *et al.*; 2016).

As estruturas zeolíticas podem ter aplicações em diferentes áreas como na agricultura, água e tratamento de águas residuais, petróleo, petroquímica e detergentes devido á suas propriedades como sistema poroso, área de superfície elevada, excelente estabilidade hidrotérmica e química. Os materiais zeolíticos comercializados são fornecidos sob a forma de pó no tamanho micrométrico (ANBIA *et al.*; 2017).

## **2.9 Elementos terras-raras**

A IUPAC (União Internacional de Química Pura e Aplicada) faz recomendações quanto ao uso da expressão “metais de terras-raras” para os elementos Sc, Y e La a Lu. O termo “série do lantânio se reserva para os elementos que apresentam números atômicos 57 a 71 (La e Lu) e o termo “lantanídeo é mais restrito, devido à exclusão do lantânio, incluindo os elementos de números atômicos 58-71 (Ce a Lu). Quando comparado com as terras-raras o elemento escândio apresenta comportamento diferente, sua inclusão na série se justifica com base nas suas propriedades físicos-químicas (ABRÃO, 1994). A figura 8 mostra os elementos de terras-raras na tabela periódica.

**Figura 8** - Tabela periódica demonstrando os elementos de terras-raras.



Fonte: FILHO, P,C.S.; SERRA, O.A, 2014.

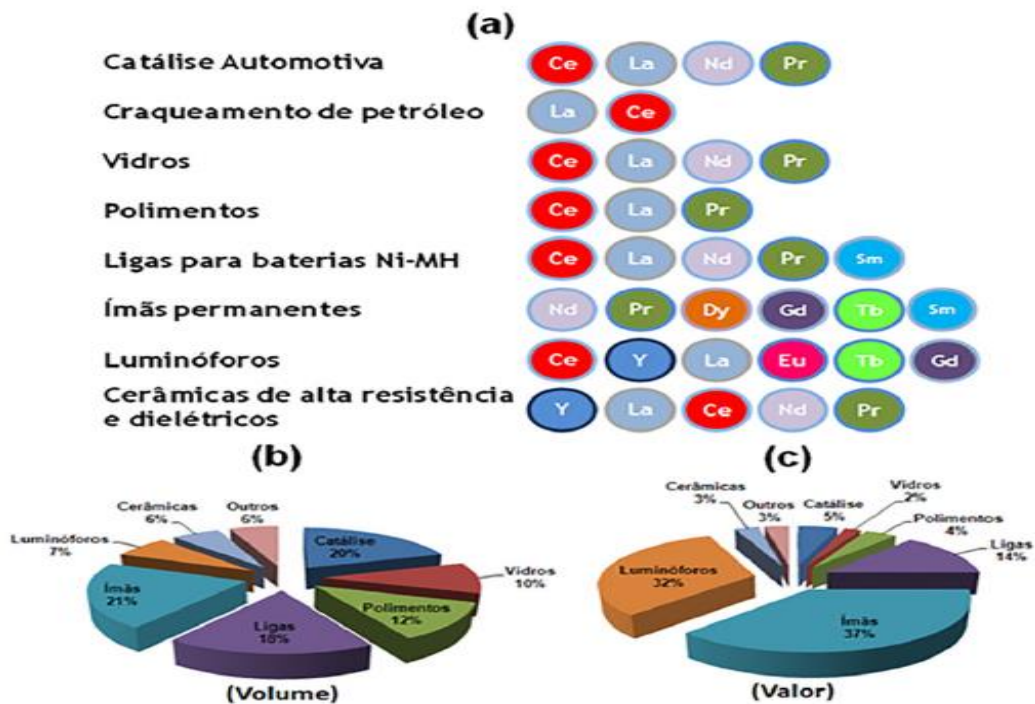
As terras raras são consideradas importantes recursos naturais que são utilizados na geração de energias novas e materiais, na conservação de energia, proteção ambiental e nas indústrias aeroespacial e de informação eletrônica. Recentemente as terras raras são distribuídas principalmente nos países (Estados Unidos, Austrália, Brasil, China e Índia). Entre essas nações apresentadas, a China é o maior produtor e exportador mundial de terras raras, satisfazendo 85% da demanda por terras raras globais e possuindo 31% de reservas de terras raras em 2015 (WANG *et al.*; 2017).

A química das terras-raras é determinada principalmente pelo tamanho dos seus cátions trivalentes. O estado trivalente é uma característica de todas as terras-raras. Elas formam óxidos do tipo  $R_2O_3$ , que se assemelha aos óxidos dos elementos alcalino-terrosos como CaO e BaO, absorvem dióxido de carbono e água do ar para formar carbonatos e hidróxidos. Nos elementos de terras-raras são os elétrons 4f que fazem com que esses elementos exibam individualidade, e possam se distinguir uma terra-rara da outra. Como exemplo pode-se citar as diferenças entre as diversas propriedades semelhantes aos metais de terras-raras, ou, a ocorrência de ferromagnetismo no Gd e a supercondutividade no La. Quando em temperatura ambiente, ou em temperaturas mais baixas, o Gd metálico é atraído por um ímã, pois é ferromagnético, mas as outras terras-raras não. Em temperaturas mais

baixas o elemento La é a única terra-rara metálica que perde sua resistência ao fluxo elétrico. Na temperatura de mais ou menos  $-267\text{ }^{\circ}\text{C}$  esse elemento se torna um condutor forte de eletricidade, i.e., um supercondutor. Das propriedades físicas das Terras-raras, a susceptibilidade magnética e os espectros de absorção dos íons trivalentes apresentam particular interesse (ABRÃO, 1994).

As diversas aplicações dos elementos de terras-raras é devido principalmente às suas propriedades magnéticas, ópticas ou redox inerentes a esses elementos. A figura 9 apresenta as aplicações mais comuns das terras-raras, e a porcentagem que cada tipo de utilização consome do total desses elementos.

**Figura 9** - a) Principais aplicações das terras-raras e seus percentuais utilização em termos de (b) volume e (c) valor.



Fonte: FILHO, P.C.S.; SERRA, O.A, 2014.

### 2.9.1 Zeólitas trocadas com cátions de terras-raras

As zeólitas faujasita do tipo Y trocadas ionicamente com os elementos de terras raras como (La, Ce, Pr, Nd, Sm, etc) são de grande interesse na indústria de refino de petróleo. A troca catiônica nessas zeólitas desempenha uma mudança considerável nas suas propriedades com relação à estabilidade, seletividade, absorção e atividade catalítica. A localização dos cátions a serem trocados dentro da estrutura da zeólita está diretamente relacionada às condições de troca iônica. A quantidade de moléculas de H<sub>2</sub>O durante esse processo é de grande importância, pois os cátions de terras raras (TR<sup>3+</sup>) se hidrolisam dentro das cavidades das zeólitas formando complexos hidrolisados do tipo [TR(OH)]<sup>2+</sup>, fixando a TR<sup>4</sup>. As zeólitas Y quando trocadas com as terras raras vão apresentar alta estabilidade e atividade catalítica, sendo considerado o principal componente ativo dos catalisadores de FCC (ROSA.; SERRA.; AGUIAR, 1992).

Quando introduzimos os elementos de terras raras nas zeólitas evitamos a perda de alumínio na sua estrutura, resultando em uma resistência estrutural melhorada às condições hidrotermais severas que são encontradas, por exemplo, na etapa de regeneração da FCC. Além disso, a presença de espécies catiônicas altamente carregadas também pode modificar a distribuição da força de ácido na zeólita devido à polarização de grupos OH ou a um efeito indutivo nesses grupos. Atualmente existem poucos estudos sobre as influências dos elementos de terras raras em materiais como zeólita beta, dentre outros (MARTINS *et al.*, 2005).

Todavia no que diz respeito ao uso de catalisadores nanozeolíticos trocados com terras-raras usados na geração de biocombustível, existe uma lacuna de informações e poucas referências. Mas especificamente o uso desses materiais como matrizes sólidas para imobilização de enzimas, no melhor de nosso conhecimento não há nenhum registro tanto na literatura científica como patentária, sendo portanto essa a motivação desse projeto de pesquisa.



### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Geral

Sintetizar e caracterizar a nanozeólita faujasita pura e trocada com diferentes lantanídeos. Estudar a transesterificação química das nanozeólitas trocadas com os lantanídeos para produção de biodiesel e a utilização das nanozeólitas –p=como suporte para imobilização da lipase proveniente de *Thermomyces lanuginosus* bem como avaliar a atividade catalítica da zeólita pura, da enzima livre e do complexo nanozeólita/enzima na catálise da reação de transesterificação do óleo de soja a biodiesel via rota etílica

#### 3.2 Específicos

- ✓ Síntese e Caracterização da nanozeólita faujasita pura e trocada com  $\text{La}^{3+}$ ,  $\text{Ce}^{3+}$ ,  $\text{Gd}^{3+}$  e  $\text{Dy}^{3+}$ ;
- ✓ Caracterização das nanozeólitas obtidas por técnicas físicas do estado sólido como cristalografia de Raios-X de materiais policristalinos (DRX), Espectroscopia de Infravermelho;
- ✓ Estudo da transesterificação química via etílica e metílica do óleo de soja utilizando nanozeólita faujasita trocada com diferentes terras-raras como catalisadores.
- ✓ Avaliação da eficiência catalítica dos complexos nanozeólita-enzima, que foram obtidos através de troca iônica da nanozeólita com os lantanídeos ( $\text{La}^{3+}$ ,  $\text{Ce}^{3+}$ ,  $\text{Gd}^{3+}$  e  $\text{Dy}^{3+}$ );
- ✓ Estudo da imobilização da lipase de *T.lanuginosus*;
- ✓ Caracterização da quantidade de proteína adsorvida no suporte zeolítico;
- ✓ Avaliação da atividade enzimática dos complexos (nanozeólita/enzima) na hidrólise do óleo de soja pela análise titulométrica;
- ✓ Testes catalíticos dos materiais imobilizados (nanozeólita/enzima), para a reação de transesterificação do óleo de soja para produção de biodiesel usando etanol e comparação dos resultados obtidos quando os catalisadores são utilizados separadamente;
- ✓ Análise da qualidade do biodiesel através de cromatografia gasosa de acordo com a norma europeia EM 14103.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Síntese da nanozeólita faujasita pura

A síntese da nanozeólita faujasita (Nano-X) com alto teor de alumínio foi realizada da seguinte forma: foram utilizados 5,34g de hidróxido de sódio (*pellets*, 98,5 % *Fluka*), 2,42g de aluminato de sódio ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ : 50-56% e  $\text{Na}_2\text{O}$ : 40-45%, *Sigma-Aldrich*) e preparados em forma de solução adicionando (50,0g) de água destilada. Foi acrescentada 3,43g de sílica *fumed* ( $\text{SiO}_2$ , 99,8%, *Sigma-Aldrich*) á solução de aluminato de sódio para que a composição molar da reação fosse: 5,5  $\text{Na}_2\text{O}$ : 1,0  $\text{Al}_2\text{O}_3$ : 4,0  $\text{SiO}_2$ : 190  $\text{H}_2\text{O}$ . O gel resultante do procedimento descrito acima foi colocado sob agitação magnética (250rpm) e a cristalização sucedeu por 48 horas a 60°C. O produto obtido, identificado como Nano-X/Na, foi recuperado através de centrifugação (12.000 rpm), lavado com água deionizada e seco á temperatura ambiente durante 24 horas, logo em seguida foi realizada análise por difração de raios-X (*Zhan et al.*, 2001; *Zhan et al.*, 2002).

### 4.2 Síntese das nanozeólitas Nano-X/Na modificadas com lantanídeos através do processo de troca iônica

A Nano-X/Na foi submetida à troca iônica, com o intuito de substituir os cátions de sódio por cátion de lantanídeos. As amostras obtidas foram identificadas como Nano-X/-Me/-c/-t em que a letra -Me indica o cátion de lantanídeo ( $\text{La}^{3+}$ ,  $\text{Ce}^{3+}$ ,  $\text{Gd}^{3+}$  e  $\text{Dy}^{3+}$ ), a letra-c indica a concentração molar empregada e a letra -t indica o tempo na etapa de troca iônica. Todas as trocas iônicas foram executadas utilizando 1g da nanozeólita NaX em 30 mL das respectivas soluções de cloretos com os lantanídeos. Ao final da troca iônica os produtos sólidos foram centrifugados, lavados com água destilada por três vezes e seco á temperatura ambiente.

A troca iônica da Nano-X/Na com os cloretos de ( $\text{La}^{3+}$ ,  $\text{Ce}^{3+}$ ,  $\text{Gd}^{3+}$  e  $\text{Dy}^{3+}$ ) foi realizada na concentração de 0,1 M e 0,5 M, mantidas durante uma hora em agitação de 500 rpm e 60°C durante 48 horas.

### 4.3 Difração de raios X (DRX)

A técnica de DRX foi utilizada para caracterizar a estrutura do material zeolítico, através desta técnica podemos identificar a zeólita, o grau de cristalinidade do material, a monitoração das transições de fase, realizar uma avaliação do tratamento de troca iônica e suas mudanças estruturais. A zeólita bem como outros sólidos cristalinos apresentam um padrão de difração único, uma espécie de “impressão digital” para identificação e classificação dos materiais ((Baerlocher, McCusker e Olson, 2007, Vasconcellos, 2015). Um Rigaku Mini Flex II em uma fonte ânodo rotativo com uma placa plana de geometria Bragg-Brentano (operando com radiação Cu K $\alpha$  comprimento de onda = 1,5418 Å) em 40 kV e 40mA e equipado com um monocromador de grafite. foi utilizado para coletar os dados de DRX das amostras de nanozeólitas. Os padrões de difração em pó foram registrados na faixa de  $2\alpha = 3-50^\circ$  com um goniômetro e taxa de scan de 2°/min. A amostra foi inicialmente macerada para assegurar que a superfície da amostra permanecesse lisa e uniforme e adicionada em um porta-amostra para a análise.

### 4.4 Análises de Infravermelho

A análise de infravermelho foi utilizada para fazer a identificação das vibrações das ligações químicas das nanozeólitas puras e imobilizadas e verificar se ocorreram mudanças nessas vibrações após a ativação destas por troca iônica. As análises de infravermelho com transformada de Fourier no modo de reflexão total atenuada (ATR-FTIR) foram realizadas no laboratório de física- IBILCE UNESP, e o equipamento utilizado contém um acessório de diamante ATR (*Perkin Elmer Frontier*) e um espectrômetro FTIR. As análises foram realizadas em um intervalo de 400 a 4000cm<sup>-1</sup>, utilizando 64 varreduras com 4cm<sup>-1</sup> de resolução nos espectros.

#### **4.5 Transesterificação Química utilizando os derivados obtidos da troca iônica da Nano-X/Na nas concentrações (0.1M) e (0.5M)**

Para as reações de transesterificação química, foram utilizados óleo de soja e álcoois etanol e metanol. As condições para a produção de biodiesel foram semelhantes à metodologia descrita por Shu *et al.*, (2007) fazendo as adaptações necessárias nas condições de sínteses para os novos catalisadores. As transesterificações foram realizadas sob as seguintes condições: óleo/etanol de 1:20 e óleo metanol de 1:20, quantidade de catalisador 5% (% em massa em relação ao óleo) , temperaturas de 65°C e 120 °C, tempo de reação: 8 e 12 horas e agitação de 500 rpm.

As reações de transesterificação foram realizadas utilizando os complexos Nano-X/La/0.1M, Nano-X/Ce/0.1M, Nano-X/Gd/0.1M e Nano-X/Dy/0.1M, Nano-X/La/0.5M, Nano-X/Ce/0.5M, Nano-X/Gd/0.5M e Nano-X/Dy/0.5M. As reações foram realizadas utilizando um balão de fundo redondo, equipado com um condensador de refluxo, um termômetro e um agitador mecânico. O frasco foi imerso em um banho de silicone com a temperatura controlada. O óleo de soja juntamente com os complexos de nanozeólita/lantanídeos e o álcool foram aquecidos à temperatura requerida e permaneceram sob agitação (500 rpm) durante 8 e 12 horas. Após o término da reação, o excesso de etanol e metanol foi evaporado utilizando pressão reduzida e o produto foi separado do catalisador por centrifugação.

Após a reação de transesterificação de todo o processo descrito acima foi realizada análise por Cromatografia De Camada Delgada (TLC) de acordo com a metodologia descrita por Yang *et al*, 2009. Inicialmente 25 µL da mistura reacional foi retirada e misturada com 100 µL de hexano. Em seguida foi realizada a separação por centrifugação (2 min.) da amostra. Após esse procedimento, 1 µL da camada superior da amostra foram aplicados em uma placa de sílica gel e logo em seguida a placa foi adicionada em uma cuba de vidro fechada (câmara) contendo uma mistura de solvente hexano/acetato de etila/ácido acético (90:10:1). Após a corrida do solvente, as placas foram secas e reveladas com iodo sublimável (YANG, SOHN E KIM, 2009).

#### 4.6 Adsorção de Enzimas sobre as Nanozeólitas

O procedimento de imobilização utilizado foi adaptado da referência (HU *et al.*, 2009). Inicialmente as lipases comerciais produzida por *T.lanuginosus* foram imobilizadas sobre os suportes: Nano-X/La/0.1M, Nano-X/Ce/0.1M , Nano-X/Gd/0.1M e Nano-X/Dy/0.1 M e Nano-X/La/0.5M, Nano-X/Ce/0.5M, Nano-X/Gd/0.5M e Nano-X/Dy/0.5M A adsorção foi realizada à temperatura ambiente pela incubação das lipases (2mg/mL) e agitada em 200rpm por 16 horas. Os suportes já com as lipases imobilizadas foram separados por centrifugação em 12.000 rpm, submetido a duas lavagens com água deionizada e posteriormente mantido a 25°C “overnight” e logo em seguida armazenado á temperatura de 4°C antes da reação de transesterificação. O método descrito por (BRADFORD, 1976) que utiliza Albumina de Soro Bovino (ASB) como um padrão foi utilizado para determinar a concentração de enzimas imobilizadas. A quantidade de proteína adsorvida sobre a matriz Pg (mg/g) foi calculada de acordo com (YAGIZ, KAZAN E AKIN, 2007) pela Equação 1.

$$P_g = \frac{C_0V_0 - C_fV_f}{w}$$

**Equação 1.** Determinação da quantidade de proteína total.

Na qual:

**C<sub>0</sub>** é a concentração de proteína inicial (mg/ml), **C<sub>f</sub>** a concentração final (mg/mL), **V<sub>0</sub>** é o volume inicial da solução de lipase (mL), **V<sub>f</sub>** é o volume final (ml) e **w** é a massa do suporte usado (g). A quantidade de proteína imobilizada sobre o suporte foi determinada pela medida da concentração inicial e final de proteínas presentes nas soluções e convertida para porcentagem de enzima imobilizada. Posteriormente, o suporte com a lipase imobilizada foi seco a 25°C “overnight” e armazenado em 40°C antes da reação de transesterificação.

#### 4.7 Ensaios enzimáticos para medida de atividade enzimática pelo método titulométrico

Para medir a atividade enzimática dos complexos nanozeólitas/enzimas foi utilizado o método de titulação seguindo os procedimentos experimentais descritos nas especificações (ACS, 1993) e os protocolos de testes padrões da Sigma para ensaios enzimáticos de lipases (EC 3.1.1.3) com algumas modificações (PINSIRODOM E PARKIN, 2001; GUPTA, UPADHYAY & SHRIVASTAVA, 2011; SPERA *et al.*, 2011).

De acordo com essa metodologia, uma mistura composta por 20 mM de tampão fosfato de sódio, goma arábica (1% m/v) e o substrato (óleo de soja) 1:1 (v/v) foi preparada em um volume total de 2 ml. Logo em seguida, 25 mg de um complexo nanozeólita-enzima foi adicionado e a mistura foi incubada por durante 30 minutos à temperatura de 37°C, as reações foram cessadas pela adição de 2,5 mL de etanol a 95%, em seguida resfriada em banho de gelo. A solução foi centrifugada em 12.000 rpm.

A quantidade de ácidos graxos livres liberados presentes no sobrenadante foi determinada por titulação da amostra com NaOH 0,05M, onde a fenolftaleína foi usada como indicador. As medidas foram efetuadas por duplicata e uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima requerida para produzir 1,0 micromol de ácido graxo liberado de um triacilglicerídeo em 1 hora dentro das condições de ensaio. Para o branco, foram utilizadas as amostras das nanozeólitas sem enzimas imobilizadas na mistura reacional. A atividade lipolítica da enzima imobilizada, U/mg sólido, foi calculada de acordo com a Equação 2.

$$\text{Unidades/mg-sólido} = \frac{(\text{NaOH})(\text{Molaridade of NaOH})(1000)(2)}{\text{mg do sólido}}$$

**Equação 2** - Determinação da atividade enzimática para enzima imobilizada por titulação.

Onde:

NaOH = Volume (em mililitros)

1000 = Fator de conversão de miliequivalentes para microequivalentes

Tempo 2 = fator de conversão de 30 minutos para 1 hora (definição da unidade)

mg de sólido = massa (em mg) dos complexos enzima-nanozeolite utilizados

#### **4.8 Transesterificação enzimática utilizando os complexos nanozeólitas-enzimas-lantanídeos**

Para as reações de transesterificação enzimática foram utilizados óleo de soja. As condições para a produção de biodiesel foram idênticas á da metodologia descrita por (MACARIO *et al.*, 2007) e (YAGIZ, KAZAN E AKIN, 2007) fazendo as adaptações essenciais nas condições de sínteses para os novos catalisadores. Foram utilizadas uma razão óleo/etanol de 1:4 para as reações de transesterificação com os complexos nanozeólita/enzima

utilizando temperatura de 40°C. O etanol foi adicionado vagorosamente em (*batelada alimentada*) para evitar a inativação da enzima. Após o término da reação, o excesso de etanol foi evaporado utilizando pressão reduzida e o produto (biosiesel e glicerol) foram separados por centrifugação à 12.000 rpm.

Após a reação de transesterificação e todo o processo descrito acima foi realizada análise por Cromatografia De Camada Delgada (TLC) de acordo com a metodologia descrita por Yang *et al*, 2009.

#### 4.9 Análises por Cromatografia Gasosa (CG) do teor dos ésteres etílicos

A cromatografia gasosa foi utilizada para analisar os teores de ésteres etílicos baseada na norma EM 14203 – método utilizado para determinar a porcentagem de ésteres metílicos de ácidos graxos presentes em uma amostra por cromatografia gasosa com calibração interna (nonadecanoato de etila) sendo este método apropriado para o biodiesel com ésteres etílicos entre C<sub>14</sub> e C<sub>24</sub>. Os reagentes utilizados para realizar a análise de determinação do teor de ésteres etílicos foram: n-heptano 95% e nonadecanoato de etila com pureza conhecida (mínimo 99%).

O cromatógrafo utilizado para as análises foi cromatógrafo gasoso (CG) CLARUS 580-Perkin equipado com detector de ionização de chama (GC-FID), utilizando uma coluna capilar *Restek-Carbowax* (30 m de comprimento x 0,25mm de diâmetro interno). O procedimento seguido para determinação da concentração de ésteres etílicos foi: inicialmente foram pesados 100 mg do éster etílico (amostra) em um *vial* de 10 mL. Logo em seguida, foram adicionados 100 mL de uma solução de nonadecanoato de etila (padrão interno). Posteriormente, a amostra de ésteres etílicos foi injetada nas seguintes condições: hélio como gás de arraste a uma taxa de 2 mL/min., as temperaturas do detector e do injetor foram 250 °C e o início da temperatura do forno foi de 50 °C aumentando até 250 °C em uma taxa de 5 °C/min.

O cálculo do teor de ésteres etílicos foi conforme a Equação 3.

$$C = \frac{(\sum A) - AEI}{AEI} * \frac{CEI * VEI}{m} * 100\%$$

**Equação 3** - Determinação do teor de ésteres.

Na qual,

$\Sigma A$  = Soma da área total dos picos de ésteres etílicos de C<sub>14</sub> até C<sub>24</sub>

$AEI$  = Área do pico correspondente ao nonadecanoato etila.

$CEI$  = Concentração do nonadecanoato de etila (mg/mL)

$VEI$  = Volume do nonadecanoato de etila (mL)

$m$  = Massa da amostra (mg)

#### 4.10 Ensaio para determinação da atividade enzimática da enzima na sua forma livre

A atividade enzimática da enzima lipase na sua forma livre foi determinada pelo protocolo á princípio descrito por Winkler e Stuckmann (1979) e adaptado dos protocolos (KRIEGER, 1995; BRUSH *et al.*, 1999), que consiste em medir a quantidade em micromoles de *p*-nitrofenol liberados através da hidrólise do palmitato de *p*-nitrofenila (*p*-NPP).

Nessa metodologia uma solução de *palmitato de p-nitrofenila* (*p*-NPP) (3mg/mL) foi preparada em álcool isopropílico (solução A), enquanto outra solução (solução B) foi preparada a partir de goma arábica (0,5%, m/v) e Triton X-100 (2%, m/v), as duas soluções foram diluídas em tampão fosfato de sódio (pH 7, 0,05 M). Logo após esse procedimento, 1mL da solução A foi adicionado a 9 mL da solução B. Esta mistura foi denominada de substrato. Foram preparadas soluções estoques de enzima em tampões contendo diferentes concentrações (0,0001; 0,001 e 0,01 M) de Gadolínio (Gd<sup>3+</sup>) e Lantânio (La<sup>3+</sup>) (0,0001; 0,001 e 0,01 M) para realizar o teste de atividade enzimática.

O seguinte procedimento foi utilizado para determinar a atividade da enzima livre: foram adicionados 100 µL L de enzima livre diluída em tampão fosfato em 900 µL da solução final de substrato, logo em seguida, essa mistura foi incubada por 1 minuto a 37°C. A quantidade de *p*-nitrofenol liberada foi determinada espectrofotometricamente (410 nm) e todas as medidas foram realizadas em triplicata. A atividade lipolítica da enzima livre, U, foi calculada de acordo com a Equação 4.

$$U = \left( \left\{ \frac{Abs * V_t}{\epsilon * X_e * T} \right\} * 10^3 \right) * D$$

**Equação 4** - Determinação da atividade para a enzima livre por espectrofotometria.



Na qual:

**U**, unidade de atividade enzimática é expressa como U/mL, onde 1 unidade de atividade é definida como a formação de 1 μmol de *p*-nitrofenol liberado de *p*-NPP por minuto dentro das condições do ensaio; **Abs**, abosorbância da amostra em 410nm; **Vt**, volume total da reação (mL); **Xe**, volume da solução enzimática (mL).

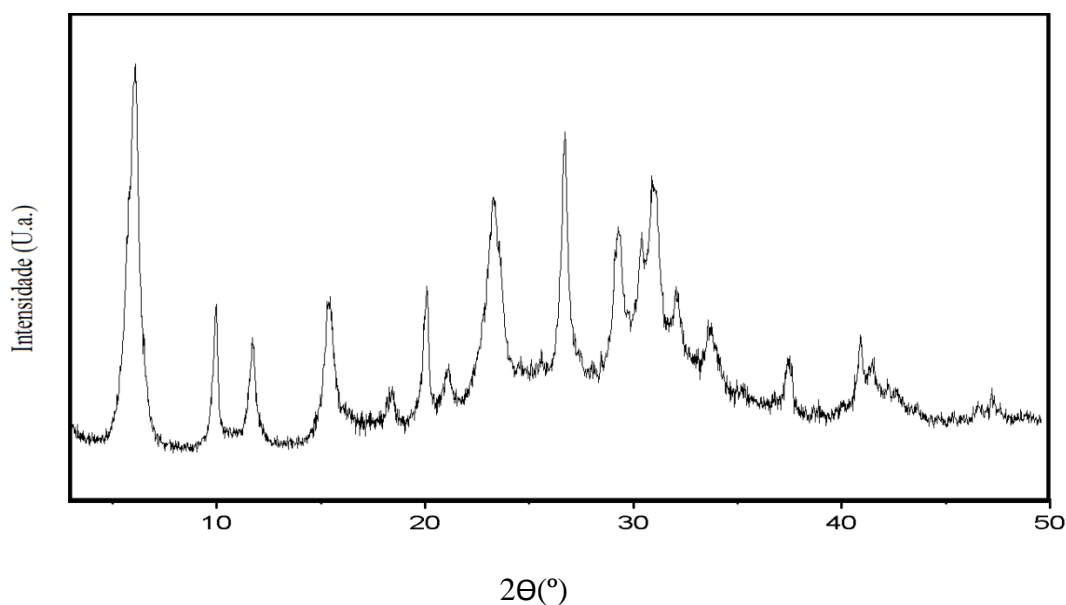
## 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1 Síntese da Nanozeólita faujasita pura (NaX)

A zeólita faujasita pura na escala nanométrica foi sintetizada seguindo a metodologia descrita por Zhan *et al.*, 2001; Zhan *et al.*, 2002 e posteriormente foi realizada análise por difração de raios-X para identificar o nanomaterial.

Foi revelado através da técnica de raios-X que o material sintetizado apresenta alta pureza, pois só foram formadas fases que pertencem á família da zeólita faujasita (FAU). Verificou-se uma reflexão menos intensa e alargada em  $2\Theta=6^\circ$ , essa reflexão está relacionada ao plano (111) da faujasita. Essa estrutura apresenta outras reflexões de difração importantes que também foram identificadas e se localizam na região de  $2\Theta=16^\circ$  (331),  $27^\circ$  (646). (VASCONCELLOS, 2015; ZHAN *et al.*, 2001; ZHAN *et al.*, 2002).

**Figura 10** - Padrões de difração de raios-X da família de nanozeólita faujasita.



## **5.2 Troca iônica da nanozeólita faujasita (NaX) com as Terras-Raras ( $\text{La}^{3+}$ , $\text{Ce}^{3+}$ , $\text{Gd}^{3+}$ e $\text{Dy}^{3+}$ )**

O objetivo da troca iônica é obter materiais mais ativos, nesse trabalho estudou-se a propriedade de troca iônica para a nanozeólita faujasita, pois com base na literatura e no trabalho publicado em 2012 pelo nosso grupo (DE VASCONCELLOS *et al.*, 2012) sabe-se que a troca iônica parcial ou total de zeólitas na escala micrométrica provoca mudanças nas características desses materiais, modificando a forma como estes interagem com a enzima o que torna estes materiais muito mais ativos para a imobilização de enzimas.

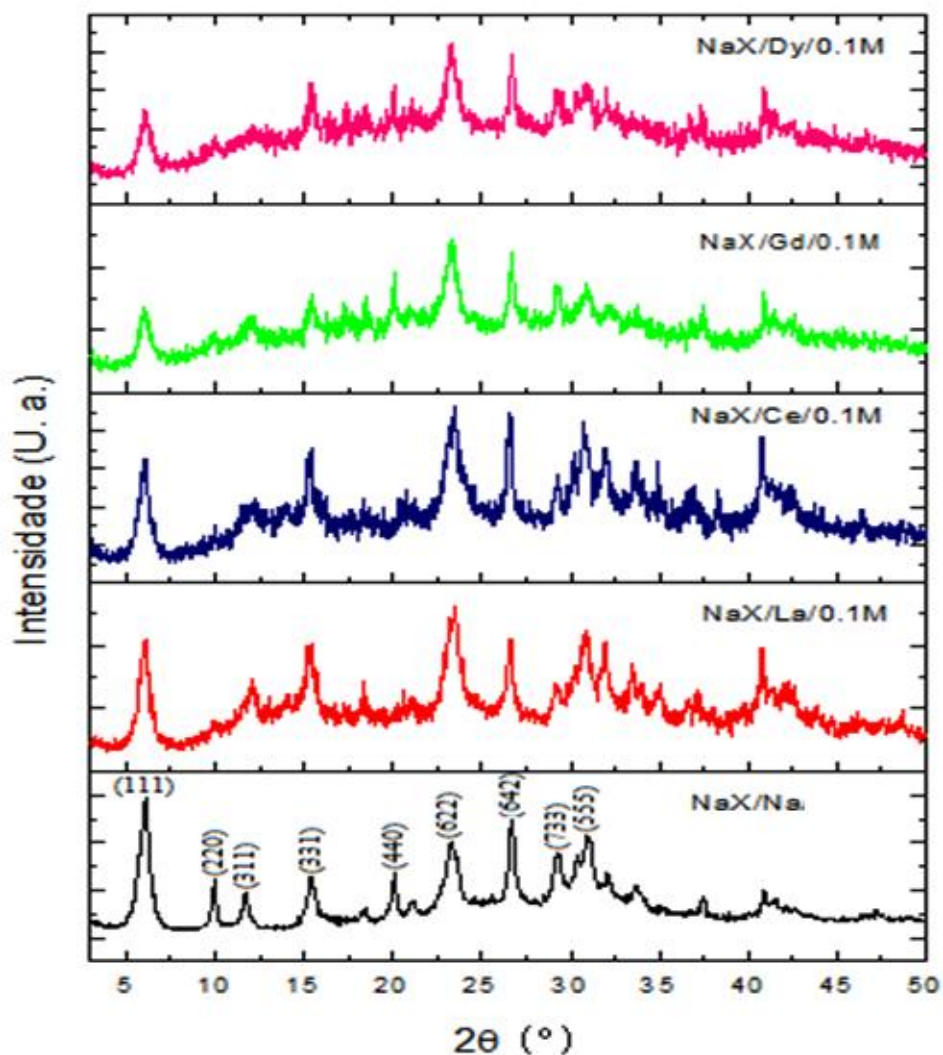
Para determinar os parâmetros ideais de troca iônica foi escolhida a nanozeólita faujasita (NaX) que proporciona algumas vantagens no seu uso, pois pode ser sintetizada pelo método hidrotermal convencional, ou seja, sem adição de direcionadores orgânicos de estrutura, o que torna o processo mais eficiente e econômico. A nano-X apresenta quantidade de alumínio elevada, ou seja, baixa razão Si/Al o que favorece os estudos de troca iônica (De VASCONCELLOS *et al.*, 2015).

Foi realizada a troca iônica da nanozeólita faujasita (NaX) utilizando os seguintes cátions:  $\text{La}^{3+}$ ,  $\text{Ce}^{3+}$ ,  $\text{Gd}^{3+}$  e  $\text{Dy}^{3+}$  nas concentrações molares (0,1 M e 0.5 M).

## **5.3 DRX dos derivados da troca iônica obtida a partir da nanozeólita Nanozeólita faujasita/Na trocada com as terras-raras $\text{La}^{3+}$ , $\text{Ce}^{3+}$ , $\text{Gd}^{3+}$ e $\text{Dy}^{3+}$ .**

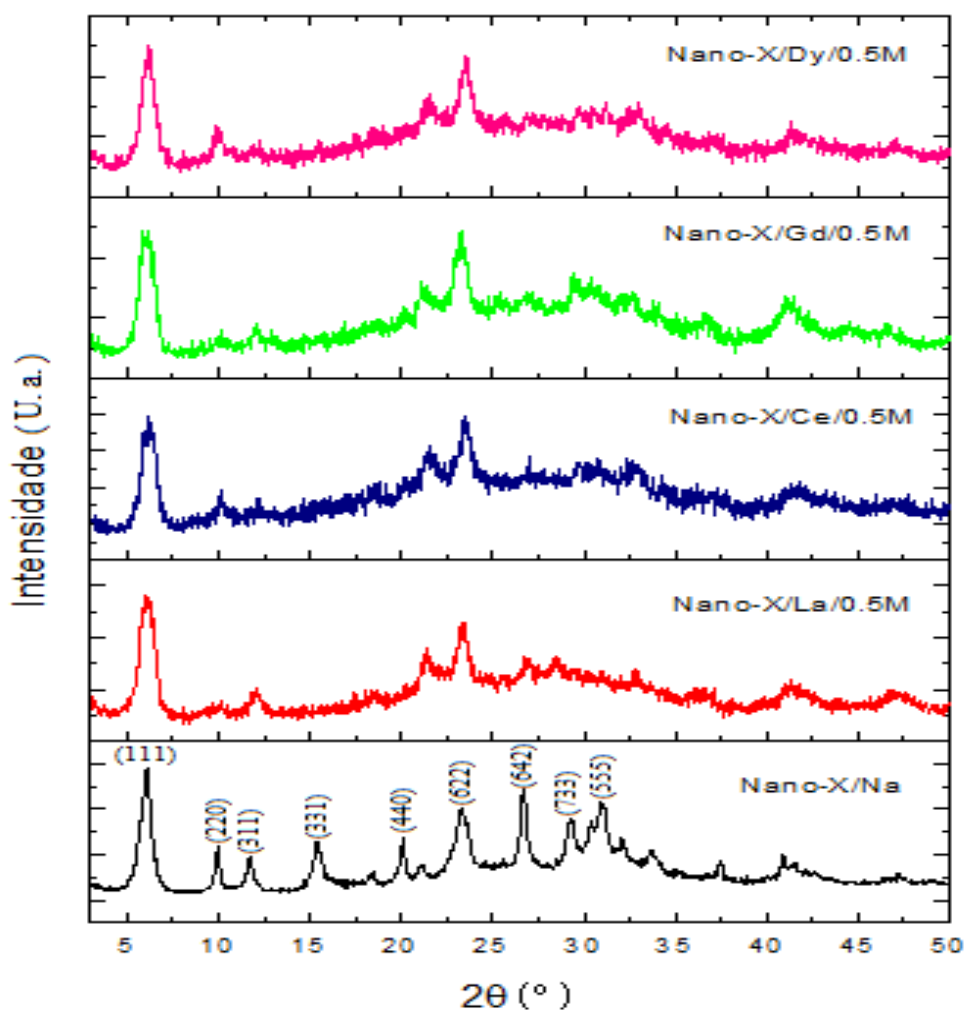
Após a Troca iônica da nanozeólita faujasita com as Terras-Raras realizou-se um estudo dos difratogramas de raios-X das amostras nanozeólita Faujasita trocada com os diferentes cátions ( $\text{La}^{3+}$ ,  $\text{Ce}^{3+}$ ,  $\text{Gd}^{3+}$  e  $\text{Dy}^{3+}$  na concentração 0,1M e  $\text{La}^{3+}$ ,  $\text{Ce}^{3+}$ ,  $\text{Gd}^{3+}$  e  $\text{Dy}^{3+}$  na concentração 0.5M) em comparação ao da nanozeólita na sua forma sódica (Nanozeólita Faujasita/Na) com o intuito de observar se ocorreu mudança na estrutura cristalina da zeólita faujasita após o procedimento da troca iônica. Os difratogramas das amostras descritas acima estão apresentados nas Figuras 11 e 12.

**Figura 11** - Difratomogramas dos derivados da nanozeólita faujasita (NaX) trocada com diferentes cátions de Terras Raras. Nanozeólita faujasita trocada com lantânio à 0.1M, Nanozeólita faujasita trocada com Cério à 0.1M, Nanozeólita faujasita trocada com Gadolínio à 0.1M e Nanozeólita faujasita trocada com Disprósio à 0.1M.



A análise dos padrões de DRXs de todas as amostras de nanozeólitas trocadas com Terras-Raras à 0,1 M apresentadas revelou diminuição na intensidade das reflexões de difração em consequência á presença de cátions, no entanto quando comparadas com a amostra original (Nanozeólita faujasita/Na) essas não apresentaram mudanças estruturais significativas, pois a maior parte das reflexões originais de Bragg presentes na amostra (Nano-X/Na) sintetizada se mantiveram.

**Figura 12** - Difratogramas dos derivados da nanozeólita faujasita (NaX) trocada com diferentes cátions de Terras Raras. Nanozeólita faujasita trocada com lantânio à 0.5M, Nanozeólita faujasita trocada com Cério à 0.5M, Nanozeólita faujasita trocada com Gadolínio à 0.5M e Nanozeólita faujasita trocada com Disprósio à 0.5M.



A análise dos padrões de DRXs de todas as amostras de nanozeólitas trocadas com terras raras à 0,5 M apresentadas revelou diminuição na intensidade das reflexões de difração em consequência à presença de cátions, e quando comparadas com a amostra original (Nanozeólita faujasita/Na) algumas das principais reflexões originais de Bragg continuaram presentes nas amostras.

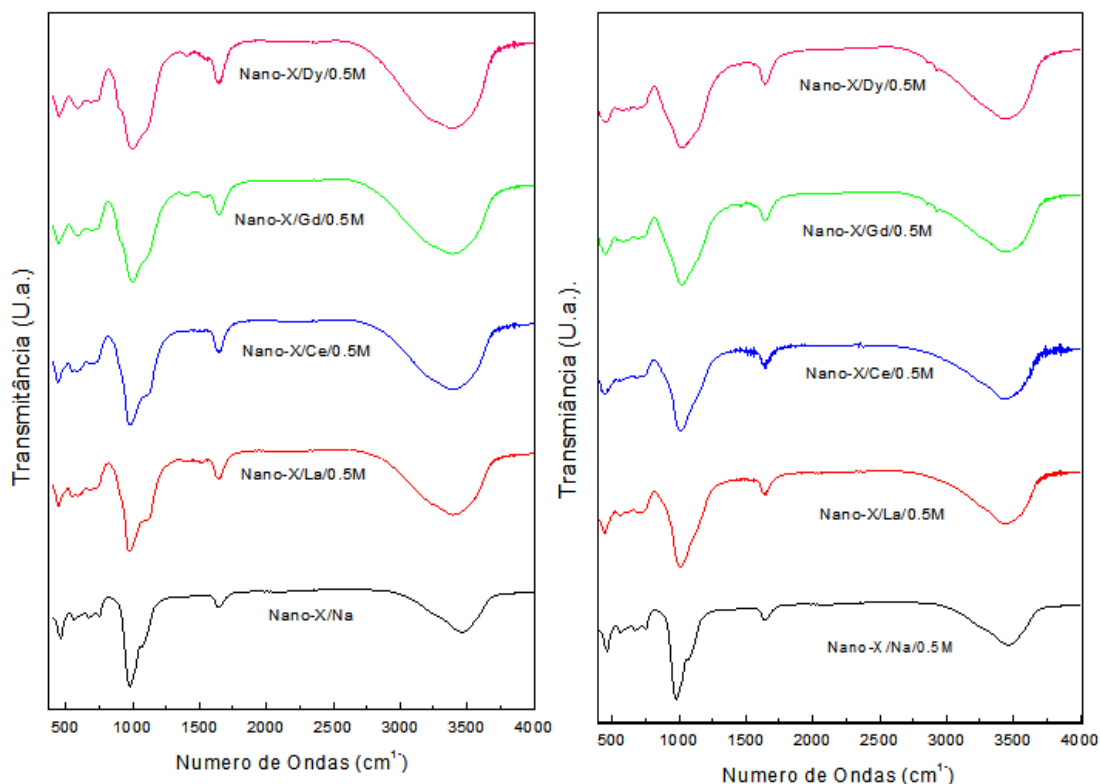
#### **5.4 Espectroscopia da região do infravermelho dos derivados da troca-iônica com nanozeólita Nano-X/Na**

A figura 13 demonstra a amostra da nanozeólita Nano-X/Na trocadas com os cátions de Terras-Raras foram analisadas por FTIR-ATR. O objetivo dessa análise é verificar se ocorreu alguma mudança nas vibrações das ligações químicas do suporte nanozeolítico. As análises das bandas de absorção foram realizadas na região estrutural da nanozeólita 400-4000 $\text{cm}^{-1}$ .

Segundo Flanigen (1979) as bandas que se localizam na região de 1200-450  $\text{cm}^{-1}$  são referentes aos estiramentos das ligações entre Si-O-Al, Si-O-Si, Si-O e Al-O. Na região do esqueleto estrutural de 500-1600  $\text{cm}^{-1}$  (figura) é demonstrado através da análise dos espectros de FTIR-ATR obtidos para as nanozeólitas Nano-X/Na algumas variações em relação às amostras que foram submetidas à troca iônica: Nano-X/La/0.5 M, Nano-X/Ce/0.5 M, Nano-X/Gd/0.5 M à 0.5M e Nano-X/Dy/0.5 M.

Segundo Kong et al, 2007 os grupamentos amida I e II são principalmente feitos na região de 1700-1600  $\text{cm}^{-1}$  por causa dos estiramentos C=O nas amidas I e aos estiramentos C-N e N-H nas amidas II. Os dados do infra vermelho analisados na região de 1500-1700  $\text{cm}^{-1}$  onde se encontram as vibrações características das amidas 1,2 e 3 não são tão evidentes e portanto são consideradas não conclusivas.

**Figura 13** - Espectro de infravermelho FTIR-ATR das amostras Nano-X/La/0.5 M, Nano-X/Ce/0.5 M, Nano-X/Gd/0.5 M e Nano-X/Dy/0.5 M antes e após a imobilização enzimática.



### 5.5 Transesterificação Química utilizando os derivados obtidos da troca iônica da Nanozeólita faujasita (NaX) nas concentrações (0.1M) e (0.5M)

Após a troca iônica da Nanozeólita faujasita (NaX) todos os derivados dela: Nano-X/La/0.1M, Nano-X/Ce/0.1M, Nano-X/Gd/0.1M e Nano-X/Dy/0.1M. Nano-X/La/0.5M, Nano-X/Ce/0.5M, Nano-X/Gd/0.5 e Nano-X/Dy/0.5M foram aplicados na reação de transesterificação química com o intuito de produzir ésteres etílicos de ácidos graxos e ésteres metílicos de ácidos graxos. As condições utilizadas para a reação de transesterificação foram: 5% de catalisador (Nanozeólita faujasita trocada com os cátions de terras-raras), Álcool (etanol e metanol), temperaturas (65 °C e 120 °C).

Após a transesterificação via etílica e metílica as amostras foram submetidas à cromatografia de camada delgada (TLC) a fim de verificar a possível formação de ésteres etílicos e metílicos de ácidos graxos. Após a análise verificou-se que não foram formados ésteres etílicos e metílicos de ácidos graxos e portanto as amostras não foram submetidas à análise por cromatografia gasosa (CG).

Shu *et al.*; (2007) durante um experimento utilizou a zeólita beta trocada com nitrato de lantânio sob condições: proporção óleo:metanol 1:20; 5% de catalisador em 4 horas de reação alcançou 48,9% de ésteres metílicos de ácidos graxos, podendo evidenciar de acordo com a literatura que o tipo de zeólita utilizada no processo exerce grande influência na produção de ésteres metílicos de ácidos graxos.

### **5.6 Imobilização e atividade enzimática dos derivados obtidos por troca iônica da Nano-X/Na nas concentrações(0,1M e 0.5M)**

Os valores de porcentagem de imobilização e atividade enzimática da lipase de *Thermomyces lanuginosus* para o suporte (Nano-X/Na) mostrados na tabela 1 foi retirado de um trabalho realizado pelo nosso grupo de pesquisa (Vasconcellos et al, 2015) com intuito de comparar os valores de porcentagem de imobilização e atividade enzimática da lipase *Thermomyces lanuginosus* do suporte puro com o suporte trocado com as Terras-Raras realizado nesse projeto.

Após a troca iônica as medidas de atividades enzimáticas foram de  $(20,0 \pm 0,1$  U/mg suporte) para Nano-X/La/0.1 M . A Nano-X/Ce/0.1M apresentou atividade enzimática de  $(20,0 \pm 0,5$  U/mg suporte). O complexo Nano-X/Gd/0.1M apresentou o maior valor de atividade enzimática  $(22,0 \pm 0,2$  U/mg suporte) e o menor valor de atividade enzimática foi para o complexo Nano-X/Dy/0.1M que apresentou  $(12,0 \pm 0,3$  U/mg suporte). O maior valor de atividade enzimática para o suporte de Gadolínio pode indicar que a atividade enzimática está relacionada com o cátion presente na estrutura do suporte nanozeolítico.

Os dados de porcentagens de imobilização para o suporte (Nano-X/Na) foi de  $(20,6 \pm 0,9\%)$  e a atividade enzimática desse complexo apresentou  $(3,2 \pm 0,3$  U/mg suporte). Com relação á quantidade de enzima imobilizada o complexo Nano-X/La/0.1 M apresentou  $(52,9 \pm 0,2\%)$ , sendo este o maior valor de porcentagem de imobilização dentre os complexos nanozeólitas/enzimas utilizados. O complexo Nano-X/Ce/0.1M apresentou valor intermediário  $(12,0 \pm 0,2\%)$  de porcentagem de imobilização. E os suportes Nano-X/Gd/0.1M e Nano-X/Dy/0.1M apresentaram valores mais baixos de porcentagem de imobilização  $(8,0 \pm 0,3\%$  e  $6,0 \pm 0,5\%)$ . Segundo Vasconcellos (2015) a nanozeólita Nano-X/Na trocada com diferentes cátions pode afirmar que a quantidade de enzima imobilizada e a atividade enzimática são extremamente dependentes da natureza iônica presente nesses sólidos.



A porcentagem de enzima imobilizada e a atividade enzimática dependem da estrutura cristalina dos suportes sólidos. Devido á um trabalho realizado por Vasconcellos (2012) já era esperado uma baixa atividade enzimática para os suportes zeolíticos na sua forma pura, já que a literatura descreve um comportamento similar para zeólita micrométrica em sua forma sódica (YAGIZ, KAZAN E AKIN, 2007; DE VASCONCELLOS *et al.*,2012).

Após a troca iônica da Nano-X/Na com as Terras-Raras á 0.5 M foram avaliadas as medidas de atividades enzimáticas dos complexos Nano-X/La/0.5 M, Nano-X/Ce/0.5M, Nano-X/Gd/0.5M e Nano-X/Dy/0.5M e através dos dados obtidos podemos afirmar que a menor atividade enzimática foi para o Nano-X/La/0.5 M ( $17,2 \pm 0,9$  U/mg suporte). O Nano-X/Ce/0.5M e Nano-X/Dy/0.5M apresentaram valores intermediários de atividade enzimática ( $20,8 \pm 0,3$  U/mg suporte e  $30,8 \pm 0,6$  U/mg suporte). O maior valor de atividade enzimática foi obtido através do complexo Nano-X/Gd/0.5M ( $44,0 \pm 0,2$  U/mg suporte) e podemos observar que o complexo Nano-X/Gd/0.1M mostrado na tabela acima, também apresentou o maior valor de atividade enzimática ( $22,0 \pm 0,2$  U/mg suporte) reforçando que a atividade enzimática está relacionada com o cátion presente na estrutura do suporte nanozeolítico.

A maior porcentagem de imobilização foi alcançada para o complexo Nano-X/Gd/0.5M (40,9 %), e podemos verificar que esse complexo é o mesmo que apresentou a maior atividade enzimática. Esse resultado se difere dos dados obtidos para o complexo Nano-X/Ce/0.5M (8,2 %), no qual apresenta uma porcentagem de imobilização menor, mas sua atividade enzimática ( $20,8 \pm 0,3$ ) é maior do que para o complexo de Nano-X/La/0.5 M que apresentou (20%) de porcentagem de imobilização mas apenas ( $17,2 \pm 0,9$  U/mg suporte) de atividade enzimática. E o complexo Nano-X/Dy/0.5M apresentou valor intermediário de porcentagem de imobilização (40,2%) e atividade enzimática ( $30,8 \pm 0,6$  U/mg suporte).

Vaconcellos (2015) trabalhou com a Nanozeólita faujasita trocada com metais de transição á 0.5 M e alcançou alguns valores próximos de porcentagem de imobilização e atividade enzimática quando comparados com esse trabalho. Os valores obtidos de porcentagem de imobilização foram: Nanozeólita faujasita trocada com Manganês á 0.5M/Enzima Lipase (77,5%) , Nanozeólita faujasita trocada com Cobre á 0.5M/Enzima Lipase (68,4%), Nanozeólita faujasita trocada com Cobalto á 0.5M/Enzima Lipase (100%), Nanozeólita faujasita trocada com Zinco á 0.5M/Enzima Lipase (90,8%) e Nanozeólita faujasita trocada com Níquel á 0.5M/Enzima Lipase (43,7%) e os valores de atividade enzimática foram: Nano-X/Mn/0.5M ( $28,4 \pm 2,4$  U/mg suporte), Nano-X/Cu/0.5M ( $9,6 \pm 0,7$

U/mg suporte), Nano-X/Co/0.5M (24,8±0,1 U/mg suporte), Nano-X/Zn/0.5M (25,2±1,2 U/mg suporte) e Nano-X/Ni/0.5M (51,6±1,8 U/mg suporte). A Tabela 1 apresenta os valores de imobilização e atividade enzimática em função da troca iônica realizada sob as seguintes condições: concentração da solução dos cátions (0,1M e 0.5M), tempo (48 horas) e temperatura (60°C).

**Tabela 1** - Porcentagem de imobilização e atividade enzimática da lipase *Thermomyces lanuginosus* em função das condições de troca iônica: concentração molar dos íons em solução (0,1M e 0,5 M), tempo (48) e temperatura (60°C) e porcentagem de imobilização e atividade enzimática da lipase *Thermomyces lanuginosus* em função das condições de troca iônica: concentração molar dos íons em solução (0,5M), tempo (48) e temperatura (60°C).

<b>Suporte Zeolítico (Catalisador)</b>	<b>Imobilização (%)</b>	<b>Atividade enzimática (U/mg suporte)</b>
Nano-X/Na	20,6 ± 0,9	3,2 ± 0,3
Nano-X/La/0.1 M	52,9 ± 0,3	20,0 ± 0,1
Nano-X/Ce/0.1M	12,0 ± 0,2	20,0 ± 0,5
Nano-X/Gd/0.1M	8,0 ± 0,3	22,0 ± 0,2
Nano-X/Dy/0.1M	6,0±0,5	12,0 ±0,3
Nano-X/La/0.5M	20,0 ± 0,3	17,2 ± 0,9
Nano-X/Ce/0.5M	8,2 ± 0,2	20,8 ± 0,3
Nano-X/Gd/0.5M	40,9 ± 0,7	44,0 ± 0,2
Nano-X/Dy/0.5M	40,2 ± 0,1	30,8 ± 0,6

\* Porcentagem de imobilização de *Thermomyces lanuginosus* = (massa de enzima na solução final - massa de enzima na solução inicial) / massa de enzima na solução inicial \* 100.

## 5.7 Produção de Ésteres etílicos utilizando os complexos nanozeólitas-enzimas

A Transesterificação via catálise enzimática foi realizada utilizando os complexos derivados da troca iônica realizada: Nano-X/La/0.1M, Nano-X/Ce/0.1M Nano-X/Gd/0.1M, Nano-X/Dy/0.1M e Nano-X/La/0.5M, Nano-X/Ce/0.5M, Nano-X/Gd/0.5M e Nano-X/Dy/0.5M. Para a reação de transesterificação enzimática foram usadas as seguintes condições: razão molar O:E de 1:4, quantidade de catalisador 5% (% em massa em relação ao óleo) a 40°C, tempo de 48h.

Foi utilizada Cromatografia gasosa (CG) para quantificar os ésteres etílicos formados a partir dos complexos nanozeólitas/enzimas como catalisadores. O Complexo Nano-X/Ce/0.1 M e Nano-X/Ce/0.5 M não foram submetidos á análise de (CG) devido á não ter apresentado rendimento de ésteres etílicos na cromatografia de camada delgada.

Os complexos utilizados para produção de biodiesel foram: Nano-X/La/0.1M, Nano-X/Gd/0.1M, Nano-X/Dy/0.1M, Nano-X/La/0.5M, Nano-X/Gd/0.5M Nano-X/Dy/0.5M.

O complexo Nano-X/La/0.1M apresentou o maior valor de conversão do óleo de soja à ésteres etílicos (67,39%), já o complexo Nano-X/La/0.5M apresentou (20,55%) de ésteres etílicos.

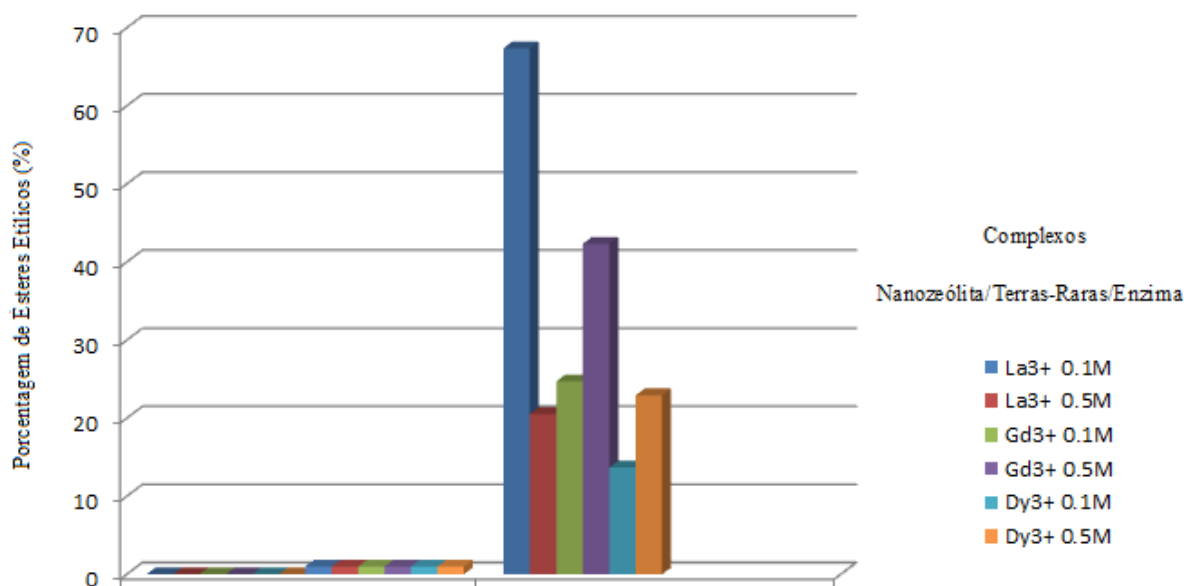
Os complexos Nano-X/Gd/0.1M e Nano-X/Gd/0.5M apresentaram valores intermediários de ésteres etílicos de ácidos graxos (24,73 e 42,34%) Nano-X/Dy/0.1M e Nano-X/Dy/0.5M apresentaram o menor valor de porcentagem de ésteres etílicos (13,68 % e 22,94%) respectivamente.

O complexo Nano-X/La/0.1M apresentou o valor mais relevante. A enzima na sua forma imobilizada obteve rendimento de 67,39 % de ésteres etílicos de ácidos graxos (EEAG). Segundo Vasconcellos (2015) existem algumas hipóteses que podem explicar esse o esses valores obtidos para o complexo Nano-X/La/0.1M , são eles: maior proteção da enzima quando imobilizada, nesses suportes pode haver uma quantidade maior de água ou coordenada que pode favorecer um microambiente favorável para a imobilização da enzima, os suportes Nano-X/La/0.1M e Nano-X/La/0.5M apresentam carga positiva e podem exercer o movimento dinâmico que estabiliza a enzima na melhor orientação com o sítio catalítico voltado para o meio reacional.

A Figura 14 demonstra a produção de ésteres etílicos a partir do óleo de soja, obtida através dos complexos nanozeólitas faujasita trocada com cátions de Terras-Raras/ Enzima Lipase. Os resultados das análises apresentados na figura demonstra que a lipase de

*Thermomyces lanuginosus* immobilizada em diferentes complexos foram capazes de catalisar a reação de transesterificação do óleo de soja com etanol para produzir ésteres etílicos.

**Figura 14** - Rendimentos de ésteres etílicos produzidos com os complexo Nanzeólita faujasita trocada com terras raras.



Complexo Nano-X/La/0.1 M, Nano-X/Gd/0.1 M, Nano-X/Dy/0.1 M e Nano-X/La/0.5 M, Nano-X/Gd/0.5 M e Nano-X/Dy/0.5 M de *Thermomyces lanuginosus*. AS Condições de Reação foram: 48 h em 40°C razão óleo de soja: etanol igual 1:4 e 5 % (m/m) da razão óleo:biocatalisador.

Yagiz, Kazan e Alkin (2007) realizaram transesterificação de óleos residuais de (cozinha) para produção de biodiesel. Os autores utilizaram lipase immobilizada em quatro tipos diferentes de zeólitas como biocatalisadores heterogêneos, mas alcançaram uma baixa porcentagem de enzima immobilizada e baixa conversão de ésteres monoalquílicos quando comparado com outros suportes que foram utilizados nesse estudo.

Macario *et al.*; (2007) utilizaram lipases produzidas pelo fungo *R.miehei* immobilizadas em algumas zeólitas (Silicalita-1 e ITQ-2) como catalisador, via rota metálica sob condições de temperatura de 40°C e obtiveram um rendimento acima de 90% de ésteres metílicos. Os autores encontraram dificuldade quanto ao reuso das enzimas na transesterificação para os suportes utilizados devido á possível dessorção da lipase immobilizada na matriz sólida durante as reações.

Vasconcellos *et al.*; (2012) utilizaram a zeólita Gismondina (escala micrométrica) trocadas com metais de transição ( $Ni^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ) como suporte para imobilização da lipase

de *R.miehei* e posteriormente realizaram o procedimento de transesterificação do óleo de soja. O melhor resultado obtido foi do material trocado com níquel, onde se alcançou uma conversão de 56,2 % de ésteres metílicos, superior aos valores alcançados para quantidade relativa do suporte puro (20%) e da enzima livre (39,3%). A sinergia dos cátions de compensação não foram observadas para os demais materiais testados, no entanto eles exerceram grande influência no material trocado com níquel. O mesmo autor em 2015 alcançou 94,3% de ésteres etílicos em um experimento utilizando a lipase de *Thermomyces lanuginosus* imobilizada na zeólita faujasita trocada com níquel, sob as condições de reação: 48 h em 40°C, razão óleo:etanol igual 1:4 e 5% (m/m) da razão óleo:biocatalisador.

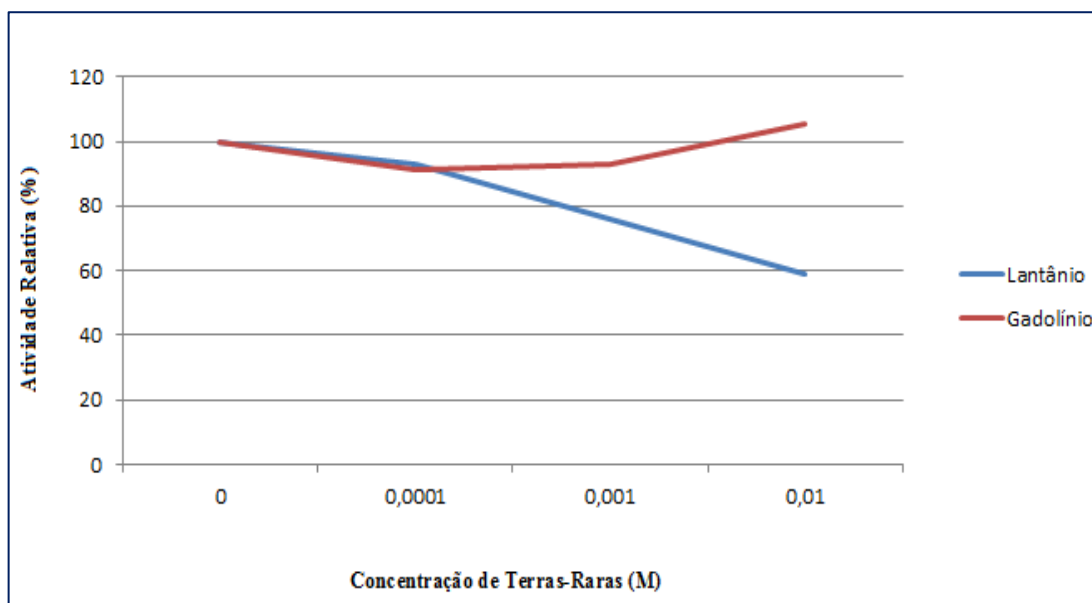
### **5.8 Atividade relativa de hidrólise de pNPP pela lipase LTL em soluções com diferentes concentrações de $\text{La}^{3+}$ e $\text{Gd}^{3+}$ .**

Foram escolhidos os cátions de Terras-Raras de Gadolínio ( $\text{Gd}^{3+}$ ) e Lantânio ( $\text{La}^{3+}$ ) para serem submetidos aos testes de atividade enzimática da enzima lipase na sua forma livre, devido ao alto rendimento de ésteres etílicos de ácidos graxos que esses cátions apresentaram quando trocados com a nanozeólita faujasita e submetidos á reação de transesterificação enzimática juntamente com a enzima lipase de *Thermomyces lanuginosus*.

Na Figura 15, acima podemos observar que na concentração 0 ou seja, na ausência de Terras-Raras a atividade relativa da enzima lipase de *Thermomyces lanuginosus* é de 100% , para soluções contendo 0,0001 M de  $\text{La}^{3+}$  obteve-se uma atividade relativa de: (93,9%), e para a mesma concentração de soluções de  $\text{Gd}^{3+}$  a atividade relativa é de (91,25%). Na concentração molar de 0,001 de solução de lantânio a atividade decresce para (76,04%), e gadolínio aumenta para (93,09%). E na concentração de 0,01 M de lantânio e Gadolínio temos respectivamente (58,99) e (105,53).

No gráfico podemos observar que houve decréscimo da atividade relativa para ambas Terras-Raras, seguida de um aumento acima de 100% para o  $\text{Gd}^{3+}$ . O caráter qualitativo das curvas demonstra a diferença da influência dos dois cátions de Terras-Raras na atividade enzimática. O Gadolínio não reduziu consideravelmente a atividade, e com o aumento da concentração ele melhorou a atividade da enzima (105,53%). Já na presença do lantânio observou-se um decréscimo na atividade, decréscimo este aumentado conforme foi aumentada a concentração do mesmo.

**Figura 15** - Gráfico de atividade enzimática da lipase de *Thermomyces lanuginosus* (%).



## 6. CONCLUSÕES

Os Resultados de (DRX) indicaram que a nanozeólita faujasita foi sintetizada de forma pura. Quando a nanozeólita faujasita foi trocada com as terras-raras ( $\text{La}^{3+}$ ,  $\text{Ce}^{3+}$ ,  $\text{Gd}^{3+}$  e  $\text{Dy}^{3+}$ ) nas condições (0,5M/48h) apresentaram mudanças estruturais significativas devido à incorporação dos cátions na estrutura zeolítica. No entanto, A análise de DRXs indicou que as trocas iônicas realizadas com as Terras-Raras de diferentes concentrações (0.1M e 0.5M) não levou a um colapso estrutural da estrutura.

A troca iônica proporcionou materiais mais ativos, sendo confirmado pelo grau de e atividade da lipase de *Thermomyces lanuginosus*

Os dados do infra vermelho analisados na região de 1500 à 1700  $\text{cm}^{-1}$  onde se encontram as vibrações características das amidas 1, 2 e 3 não são tão evidentes e se tornam não conclusivas.

A Nanozeólita faujasita na sua forma pura e todos os derivados dela: Nanozeólitas trocadas com Terras-Raras à 0.1 M e à 0.5M submetidos à transesterificação química não obtiveram resultados significativos de ésteres etílicos de ácidos graxos e ésteres metílicos de ácidos graxos nas condições: razão molar O:E e O:M de 1:20, quantidade de catalisador 5% (% em massa em relação ao óleo, temperaturas de 65°C e 120°C nas análises de cromatografia de camada delgada (TLC). Devido ao não rendimento de ésteres etílicos de ácidos graxos as amostras não foram submetidas à cromatografia gasosa (CG).

A Transesterificação via enzimática utilizando todos os complexos derivados da troca iônica realizada: Nano-X/La/0.1M, Nano-X/Ce/0.1M Nano-X/Gd/0.1M Nano-X/Dy/0.1M, Nano-X/La/0.5M, Nano-X/Ce/0.5M, Nano-X/Gd/0.5M e Nano-X/Dy/0.5M nas condições: razão molar óleo:etanol de 1:4, quantidade de catalisador 5% (% em massa em relação ao óleo) a 40°C, tempo de 48h apresentaram resultados significativos de teores de ésteres etílicos de ácidos graxos, mas o melhor resultado obtido foi para o complexo Nano-X/La/0.1M no qual apresentou 67,39% de ésteres etílicos de ácidos graxos.

O Resultado da atividade enzimática expressa em atividade relativa (%) demonstrou que diferentes cátions de Terras-Raras e diferentes molaridades das soluções desses cátions exercem diferentes comportamentos na atividade da enzima lipase de *Thermomyces lanuginosus*, influenciando a produção de ésteres etílicos de ácidos graxos.

É necessário dar continuidade à pesquisa e encontrar melhores condições para alcançar o teor de ésteres etílicos necessários para ser considerado Biodiesel.



## 7. PERSPECTIVAS FUTURAS

- Estudo aprofundado da morfologia da nanozeólita faujasita trocada com os cátions de terras-raras com o intuito de verificar as modificações estruturais no nanomaterial;
- Estudos aprofundados e sistemáticos da atividade enzimática da lipase de *Thermomyces lanuginosus*;
- Estudo de diferentes parâmetros (temperatura, molaridade, catalisador) na transesterificação enzimática para encontrar as melhores condições e aperfeiçoar o processo;
- Estudar dos diferentes sistemas de (ligações covalente, adsorção hidrofóbica e adsorção iônica) para a o complexo nanozeólita/terras-raras/enzimas;
- Realizar testes do reuso do biocatalisador (Nanozeólita/terras-raras/enzima).

## 8. REFERÊNCIAS

AARTHY, M.; SARAVANAN, P.; GOWTHAMAN, M.K.; ROSE, C.; KAMINI, N.R. Enzymatic transesterification for production of biodiesel using yeast lipases: An overview. **Journal Chemical Engineering Research and Design**, V. 92, p.1591-1601, 2014.

ABBASZAADEH, A.; GHOBADIAN, B.; OMIDKHAH, M. R.; NAJAFI, G. Current biodiesel production technologies: A comparative review. **Energy Conversion and Management**, v. 63, n. 0, p. 138-148, 11// 2012.

ABRÃO, A. Química e Tencnologia das Terras-Raras. Série Tecnologia Mineral, nº 66, Rio de Janeiro: CETEM/CNPQ, 1994.

AMINI, Z.; LLHAM, Z.; ONG, H.C.; MAZAHARI, H.; CHEN, W.H. State of the art and prospective of lipase-catalyzed transesterification reaction for biodiesel production. **Journal Energy Conversion and managemente**, 2016. Impresso.

AMINI, Z.; ONG, H.C.; HARRISON, M.D.; KUSUMO, F.; MAZAHARI, H.; LLHAM, Z. Biosiesel production by lipase-catalyzed transesterification of *Ocimum basilicum* L. (sweet basil) seed oil. **Journal Conversion na Management**, V.132, p.82-90,2017.

ANBIA, M.; KOOHSARYAN, E.; BORHANI, A. Novel hydrothermal synthesis of hierarchically-structured zeolite LTA microspheres. **Materials chemistry and Physics**, v.193, p.380-390, 2017.

ANBIA, S.F.; KHALIL, A.; SAEPURAHMAN, SINGARAVEL, G.; HASHAIKEH, R. A review on the fabrication of zeolite and mesoporous inorganic nanofibers formation for catalytic applications. **Microporous and Mesoporous**, v.236, p.176-192, 2016.

BRADY, L, BRZOZOWSKI, A.M.; DEREWENDA, Z.S.; DODSON, E.; DODSON, G.; TOLLEY, S.; TURKENBURG, J.P.; CHRISTIANSEN, L.; HUGE-JENSEN, B.; NORSKOV, L. A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase. **Nature**, v. 343, p. 767-770, 1990.

BAERLOCHER, C.; MCCUSKER, L. B.; OLSON, D. H. **Atlas of zeolite framework types**. Elsevier, 2007.

BAYRAMOGLU, G.; ARBULUT, A, OZALP, V.C.; ARICA, M.Y. Immobilized lipase on micro-porous biosilica for enzymatic transesterification of algal oil. **Journal Chemical Engineering Research and Design**, V. 95, p.12-21, 2015.

BONINE, B. M. **Produção de lipase pelo fungo *Myceliophthora* sp. F2.1.4, caracterização e imobilização da solução enzimática bruta**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto. 2011. 84p.

CANILHA, L.; CARVALHO, WALTER, D.; SILVA, JOÃO, B. Biocatalisadores Imobilizados: Uso de células e enzimas imobilizadas em processos biotecnológicos. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 9, p.48-57, 2006.

CORMA, A.; FORNES, V.; REY, F. Delaminated zeolites: An efficient support for enzymes. **Advanced Materials**, v. 14, p. 71-74, 2002.

DALLA-VECCHIA, R.; DA GRAÇA NASCIMENTO, M.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, v. 27, p. 623-630, 2004.

DE VASCONCELLOS, A. et al. Synergistic effect in the catalytic activity of lipase *Rhizomucor miehei* immobilized on zeolites for the production of biodiesel. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 163, p. 343-355, 2012.

DIAZ, J. F.; BALKUS, K. J. Enzyme immobilization in MCM-41 molecular sieve. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 2, p. 115-126, 1996.

FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Lipase from *Thermomyces lanuginosus*: Uses and prospects as an industrial biocatalyst. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.62, p. 197-212, 2010.

FEYZI, M.; HOSSEINI, N.; YAGHOBI, N.; EZZATI, R. Preparation, characterization, kinetic and thermodynamic studies of MgO-La<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanocatalysts for biodiesel production from sunflower oil. **Chemical Physics Letters**, v.677, p.19-29, 2017.

FILHO, P.C.S.; SERRA, O.A. Terras Raras no Brasil: Histórico, Produção e Perspectivas, **Química Nova**, v.37, p.753-760, 2014

GAO, S.; WANG, J.; WANG, W.; LUO, G.; DAI, Y. Enhancing performance of lipase immobilized on methyl-modified silica aerogels at the adsorption and catalysis processes: Effect of cosolvents. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.62, p.218-224, 2010.

GOG, A.; ROMAN, M.; TOSA, M.; PAIZS, C.; IRIMIE, F.D. Biodiesel production using enzymatic transesterification-Current state and perspectives. **Renewable Energy**, v.39, p.10-16, 2012.

GIMON-KINSEL, M. E. et al. Mesoporous molecular sieve immobilized enzymes. In: L. Bonnevot, F. B. C. D. S. G. a. S. K. (Ed.). **Studies in Surface Science and Catalysis**: Elsevier, v. 117, p.373-380, 1998.

HAN, Y. J.; STUCKY, G. D.; BUTLER, A. Mesoporous silicate sequestration and release of proteins. **Journal of the American Chemical Society**, v. 121, p. 9897-9898, 1999.

KNOTHE, G.; RAZON, L.F. Biodiesel fuels. **Journal Progress in Energy and Combustion Science**, V. 58, p. 36-59, 2017.

KONG, J.; YU, S. Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 39, n. 8, p. 549-559, 2007.

KUEPETHKAEW, S.; SANGKHARAK, K.; BENJAKUL, S.; KLOMKLAO, S. Optimized synthesis of biodiesel using lipase from Pacific White shrimp (*Litopenaeus vannamei*) hepatopancreas. **Journal of Renewable Energy**, V. 104, p.139-147, 2017.

LEUNG, D.Y.C.; WU, X.; LEUNG, M.K.H. A review on biodiesel production using catalyzed transesterification. **Journal of Applied Energy**, V.87, p.1083-1095, 2010.

MACARIO et al.; Biodiesel production by immobilized lipase on zeolites and related materials. In: GEDEON, A.; MASSIANI, P., *et al* (Ed.). **Zeolites and Related Materials: Trends, Targets and Challenges, Proceedings of the 4th International Feza Conference**, v.174, 2008. p.1011-1016. (Studies in Surface Science and Catalysis).

MACARIO, A. et al. Hydrolysis of alkyl ester on lipase/silicalite-1 catalyst. **Catalysis Letters**, v. 122, p. 43-52, 2008.

MEIER, W. M. Zeolite structures. **Molecular sieves**, p. 10-27, 1968.

MOHAMAD, M.; NGADI, N.; WONG, S.L.; JUSOH, M.; YAHYA, N.Y. Prediction of biodiesel yield during transesterification process using response surface methodology. **Journal Fuel**, V.190, p.104-112, 2017.

MOREIRA, A. B. R. et al. Biodiesel synthesis by enzymatic transesterification of palm oil with ethanol using lipases from several sources immobilized on silica-PVA composite. **Energy & Fuels**, v. 21, n. 6, p. 3689-3694, 2007.

PAQUES, F.W.; MACEDO, G.A. Lipases de latex vegetais: propriedades e aplicações industriais. **Química nova**, v.29, 2006.

POUDEROYEN, G.; EGGERT, T.; JAEGER, K.E.; DIJKSTRA B.W. The crystal structure of *Bacillus subtilis* lipase: A minimal a/b hydrolase fold enzyme. **J. Mol. Biol**, v. 309, p. 215 – 226, 2001.

SANTÓRIO, R.; VELOSO, C.O.; HENRIQUES, C.A. Preparation, basic properties and catalytic activity of Mg/La and Al/La catalysts for biodiesel production from refined and acid soybean oil. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, v.422, p.234-247, 2016.

SHU, Q.; YANG, B.; YUAN, H.; QING, S.; SHU, G. Synthesis of biodiesel from soybean oil and metanol catalyzed by zeolite beta modified with La<sup>3+</sup>. **Journal Catalysis Communications**, V. 8, p. 2159-2165, 2007.

SIRICHA, V.L.; JAIN, A.; JAIN, A. Enzyme immobilization: An overview on methods, support material, and applications of immobilized enzymes. **Advances in Food and Nutrition Research**, v. 79, 2016.

SILVA, G.F.; CAMARGO, F.L.; FERREIRA, A.L.O. Application of response surface methodology for optimization of biodiesel production by transesterification of soybean oil with ethanol. **Journal Fuel Processing Technology**, V. 92, p.407-413, 2011.

SOTO, I.; ESCOBAR, S.; MESA, M. Study of the physicochemical interactions between *Thermomyces lanuginosus* lipase and silica-based supports and their correlation with the biochemical activity of the biocatalysts. **Materials Science & Engineering C**, 2017. doi: 10.1016/j.msec.2017.05.088

SUN, K.; LU, J.; MA, L.; HAN, Y.; FU, Z.; D, J. A comparative study on the catalytic performance of different types of zeolites for biodiesel production. **Journal Fuel**, v.158, p.848-854, 2015.

TRAN, D.T.; CHANG, J.S.; LEE, D.J. Recent insights into continuous-flow biodiesel production via catalytic and non-catalytic transesterification processes. **Journal of Applied Energy**, V. 185, p. 376-409, 2017.

VASCONCELOS, A.—**Nanozeólitas como suportes sólidos para imobilização enzimática: Síntese, caracterização de complexos nanozeólitas/enzimas e sua aplicação como catalisadores heterogêneos para produção de biodiesel via rota etílica**. Tese de doutorado, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto. 2015. 204p.

VASCONCELLOS, A. et al. Potential new biocatalysts for biofuel production: the fungal lipases of *Thermomyces lanuginosus* and *Rhizomucor miehei* immobilized on zeolitic supports ion exchanged with transition metals. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 214, p. 166-180, 2015.

VAZ, M.; CHOUPINA, A. Lipases: Biocatalysts of the hydrolysis of triacylglycerols. **Revista Eletrônica de Biologia**, V.5, p. 42-58, 2012.

VIEIRA, S.S.; MAGRIOTIS, Z.M.; GRAÇA, I.; FERNANDES, A.; RIBEIRO, M.F.; LOPES, J.M.F.M.; COELHO, S.M.; SANTOS, N.A.P. Production of biodiesel using HZSM-5 zeolites modified with citric acid and  $\text{SO}_4^{2-}/\text{La}_2\text{O}_3$ . **Catalysis Today**, v.279, p.267-273, 2017.

YAGIZ, F.; KAZAN, D.; AKIN, A. N. Biodiesel production from waste oils by using lipase immobilized on hydrotalcite and zeolites. **Chemical Engineering Journal**, v.

YANG, J.; FENG, Y.; ZENG, T.; GUO, X.; LI, L.; HONG, R.; QIU, T. Synthesis of biodiesel via transesterifications of tung oil catalyzed by new Brønsted acidic ionic liquid. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 117, p. 584-592, 2017.

WANG, X.; GE, J.; LI, K.; HAN, A. Market impacts of environmental regulations on the production of rare earths: A computable general equilibrium analysis for China. **Journal of Cleaner Production**, v.154, p.614-620, 2017.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de São José do Rio Preto

## TERMO DE REPRODUÇÃO XEROGRÁFICA

Autorizo a reprodução xerográfica do presente Trabalho de Conclusão, na íntegra ou em partes, para fins de pesquisa.

São José do Rio Preto, 28/07/2017

Debelin Gomes de Almeida  
Assinatura do autor