



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Câmpus de São José do Rio Preto

Guilherme de Paula Guarnieri

“Potenciais novos catalisadores para produção de biodiesel: Lipases fúngicas de *Thermomyces lanuginosus* e *Rhizomucor miehei* imobilizadas sobre suportes nanozeolíticos trocados com cátions lantanídeos”

São José do Rio Preto
2021

Guilherme de Paula Guarnieri

“Potenciais novos catalisadores para produção de biodiesel: Lipases fúngicas de *Thermomyces lanuginosus* e *Rhizomucor miehei* imobilizadas sobre suportes nanozeolíticos trocados com cátions lantanídeos”

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

Financiadora: CAPES

Orientador: Prof. Dr. José Geraldo Nery

Coorientador: Dr. Adriano de Vasconcellos

São José do Rio Preto
2021

G916p

Guarnieri, Guilherme de Paula

Potenciais novos catalisadores para produção de biodiesel: Lipases fúngicas de *Thermomyces lanuginosus* e *Rhizomucor miehei* imobilizadas sobre suportes nanozeolíticos trocados com cátions lantanídeos / Guilherme de Paula Guarnieri. -- São José do Rio Preto, 2021

73 f. : il., tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto

Orientador: José Geraldo Nery

Coorientador: Adriano de Vasconcellos

1. Biotecnologia. 2. Enzimas imobilizadas. 3. Biocombustíveis. 4. Zeolites. 5. Enzimas de fungos. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Guilherme de Paula Guarnieri

“Potenciais novos catalisadores para produção de biodiesel: Lipases fúngicas de *Thermomyces lanuginosus* e *Rhizomucor miehei* imobilizadas sobre suportes nanozeolíticos trocados com cátions lantanídeos”

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

Financiadora: CAPES

Comissão Examinadora

Prof. Dr. José Geraldo Nery
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto
Orientador

Prof. Dr. Adriano Aguiar Mendes
UNIFAL – Universidade Federal de Alfenas

Prof. Dr. Fábio Rogério de Moraes
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto

São José do Rio Preto
26 de novembro de 2020

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho à minha mãe Vanessa e ao meu pai Rogério,
por me darem incentivo e apoio ao longo de toda vida.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. José Geraldo Nery, orientador e amigo, pela ajuda em todos os momentos, pelos ensinamentos, conselhos, e por me aceitar como parte de seu grupo de pesquisa.

Ao Dr. Adriano de Vasconcellos pela ajuda em todo o trabalho, tanto no trabalho experimental de laboratório quanto na coorientação em conjunto com o professor Geraldo.

Ao Dr. Alex Silva Paula pelo auxílio no laboratório e pela ajuda com as caracterizações por Difração de Raios-X (DRX).

Ao Doutorando Oscar Niño pela ajuda com as caracterizações por Espectroscopia de Infravermelho (FT-IR).

Ao Doutorando João Vítor Munari Benetti pela ajuda com as análises de Potencial Zeta.

Aos meus colegas de laboratório Adriano de Vasconcellos, Alex Silva Paula, Vinicius Litrenta Medeiros, Oscar Niño, Alex Miller, Janine Contro e Guilherme Sacco por toda força, sorrisos e discussões científicas que agregaram muito à minha formação.

À minha família e meus amigos, por toda compreensão e incentivo.

Ao Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE-UNESP) por fornecer um ambiente que contribuiu para minha formação científica.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, Processo: 88882.434381/2019-01.

“[...] What’s gone will never come back
But it exists when you think of it
And what is anything, anyway
But a series of things running through your brain”
(FRUSCIANTE, 2009)

RESUMO

O intuito desse projeto é trabalhar na busca por novos catalisadores que possam baratear e otimizar a produção de biodiesel pela transesterificação de matérias-primas de terceira geração via rota etílica. Os catalisadores de interesse são enzimas lipases imobilizadas por adsorção sobre suportes sólidos, as nanozeólitas, em específico as de topologia Faujasita Tipo X. As nanozeólitas foram sintetizadas e submetidas a experimentos de troca iônica para substituição dos íons de sódio (Na^+) presentes em sua estrutura por cátions lantanídeos (Ce^{3+} , Dy^{3+} , Gd^{3+} e La^{3+}) empregando-se soluções nas concentrações de 0,1M e 0,5M (os materiais obtidos nessas condições foram denominados “nano-X/-Ln/-c”, onde “-Ln” representa o cátion lantanídeo e “-c” a concentração da solução de troca iônica). Após os experimentos de troca-iônica os materiais foram caracterizados por difração de raios-X (DRX), espectroscopia de infravermelho (FT-IR) e potencial zeta. Os dados de DRX e FT-IR indicaram um nível de amorfização da estrutura cristalina dos materiais em comparação ao material em sua forma sódica. Após a caracterização físico-química os materiais foram utilizados como suportes sólidos para imobilização de enzimas lipases de *Thermomyces lanuginosus* (TLL) e *Rhizomucor miehei* (RML). Inicialmente as imobilizações foram realizadas em tampão fosfato 100mM (pH 7,0). A taxa de imobilização das enzimas TLL e RML sobre cada suporte foi determinada pelo método espectrofotométrico do Ensaio de Bradford. A atividade enzimática dos complexos resultantes, assim como a atividade das enzimas livres, foi determinada pelo método titulométrico em testes de lipólise de óleo de oliva. Os complexos nanozeólita-enzima que apresentaram melhores resultados de atividade foram replicados em tampão fosfato 10mM. As enzimas imobilizadas apresentaram uma queda de atividade com relação às suas formas livres, exceto pelas imobilizações realizadas em tampão fosfato 100mM de TLL sobre o material nano-X/Ce/0,5M e de RML sobre o material nano-X/La/0,1M, as quais foram 158,8% e 96,3% mais ativas que suas formas livres nos testes de lipólise. Dentre os complexos selecionados para a transesterificação de óleo de microalgas, as imobilizações de TLL sobre os materiais nano-X/Ce/0,5M, nano-X/Dy/0,1M e nano-X/Gd/0,5M apresentaram os melhores rendimentos de ésteres etílicos, com taxas de conversão de 78%, 75% e 75%, respectivamente.

Palavras Chave: Zeólita. Faujasita. Troca iônica. Lantanídeos. Terras raras. Imobilização. Lipase. Transesterificação. Biodiesel.

ABSTRACT

The objective of this project is to work on the search of new catalysts that might cheapen and optimize the production of biodiesel through the transesterification of third generation feedstock via ethyl route. The catalysts of interest are lipase enzymes immobilized by adsorption on solid supports, the nanozeolites, specifically those of Faujasite type (X) topology. The nanozeolites were synthesized and submitted to ion exchange experiments for replacement of the sodium ions (Na^+) in their structure by lanthanide cations (Ce^{3+} , Dy^{3+} , Gd^{3+} and La^{3+}) using solutions in concentrations of 0.1M and 0.5M (the obtained materials were named “nano-X/-Ln /-c”, where “-Ln” represents the lanthanide cation and “-c” represents the concentration of the ion exchange solution). After the ion-exchange experiments, the materials were characterized by X-ray diffraction (XRD), infrared spectroscopy (FT-IR) and zeta potential. The XRD and FT-IR data indicated a degree of amorphization of the crystalline structure of the materials compared to the material in its sodium form. After the physical-chemical characterization, the materials were used as solid supports for immobilizing *Thermomyces lanuginosus* lipases (TLL) and *Rhizomucor miehei* lipases (RML). Initially, immobilizations were performed in 100mM phosphate buffer (pH 7,0). The immobilization rate of TLL and RML on each support was determined by the Bradford Assay. The enzymatic activity of the resulting complexes, as well as the activity of the free enzymes, was determined by the titrimetric method in olive oil lipolysis tests. The nanozeolite-enzyme complexes that showed the best activity results were replicated in 10mM phosphate buffer. The immobilized enzymes showed a drop in activity in relation to their free forms, except for the immobilizations performed in 100mM phosphate buffer of TLL on nano-X/Ce/0.5M and RML on nano-X/La/0,1M, which were 158.8% and 96.3% more active than their free forms in the lipolysis tests. Among the complexes selected for the transesterification of microalgae oil, TLL immobilizations on nano-X/Ce/0.5M, nano-X/Dy/0.1M and nano-X/Gd/0.5M showed the best yields of ethyl esters, with conversion rates of 78%, 75% and 75%, respectively.

Keywords: Zeolite. Faujasite. Ion exchange. Lanthanides. Rare earths. Immobilization. Lipase. Transesterification. Biodiesel.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo de produção do biodiesel.....	18
Figura 2: Reação de Transesterificação de triglicerídeos na presença de álcool e um catalisador.....	22
Figura 3: Mecanismo de catálise homogênea básica da transesterificação de óleos vegetais	23
Figura 4: Reação de saponificação a partir de ésteres alquílicos na presença de água ou diretamente da neutralização dos ácidos graxos livres.....	24
Figura 5: Mecanismo de catálise homogênea ácida da transesterificação de óleos vegetais	25
Figura 6: Mecanismo da catálise enzimática da transesterificação de óleos vegetais....	27
Figura 7: Unidades secundárias de construção.....	31
Figura 8: Estrutura de quatro tipos de zeólitas e seus sistemas microporosos com suas respectivas dimensões.....	31
Figura 9: Modelo molecular tridimensional da zeólita tipo Faujasita.....	32
Figura 10: Indicação dos terras raras na tabela periódica.....	33
Figura 11: Padrão de difração de raios-X da zeólita nano-X/Na sintetizada.....	44
Figura 12: Difratoograma teórico da nanozeólita Faujasita tipo X (Hidratada).....	45
Figura 13: Difratogramas dos materiais de troca iônica em concentração de 0,1M com: (A) Original com Sódio; (B) Cério; (C) Disprósio; (D) Gadolínio; (E) Lantânio.....	46
Figura 14: Difratogramas dos materiais de troca iônica em concentração de 0,5M com: (A) Original com Sódio; (B) Cério; (C) Disprósio; (D) Gadolínio; (E) Lantânio.....	47
Figura 15: Difratogramas dos materiais de troca iônica com Cério em concentração de: (A) 0,1M; (B) 0,5M.....	49
Figura 16: Difratogramas dos materiais de troca iônica com Disprósio em concentração de: (A) 0,1M; (B) 0,5M	50
Figura 17: Difratogramas dos materiais de troca iônica com Gadolínio em concentração de: (A) 0,1M; (B) 0,5M	51
Figura 18: Difratogramas dos materiais de troca iônica com Lantânio em concentração de: (A) 0,1M; (B) 0,5M	52
Figura 19: Espectros de infravermelho com transformada de Fourier dos materiais de troca iônica em concentração de 0,1M com: (A) Forma sódica; (B) Cério; (C) Disprósio; (D) Gadolínio; (E) Lantânio.	53

Figura 20: Espectros de infravermelho com transformada de Fourier dos materiais de troca iônica em concentração de 0,5M com: (A) Forma sódica; (B) Cério; (C) Disprósio; (D) Gadolínio; (E) Lantânio.	54
Figura 21: Gráfico de “Concentração x Absorbância” para as diferentes concentrações do padrão albumina de soro bovino.....	56
Figura 22: Placa de sílica após finalização do experimento. 1: Óleo; 2: TLL sobre nano-X/Ce/0,5M; 3: TLL sobre nano-X/Dy/0,1M; 4: TLL sobre nano-X/Gd/0,1M; 5: TLL sobre nano-X/Dy/0,5M; 6: TLL sobre nano-X/Gd/0,5M; 7: RML sobre nano-X/Dy/0,1M	63

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1: Equação para conversão das concentrações das diluições para as concentrações reais das soluções de enzimas	39
Equação 2: Cálculo da massa total de enzima adicionada ao sistema no início do processo de imobilização.....	40
Equação 3: Cálculo da massa de enzima imobilizada (mg) por grama de suporte	40
Equação 4: Determinação da atividade enzimática a partir do volume de NaOH titulado	41
Equação 5: Equação de Scherrer para estimar diâmetro médio das partículas	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Comparação dos rendimentos de óleos extraídos de diferentes biomassas.....	21
Tabela 2: Diluições de BSA em reagente Bradford preparadas	38
Tabela 3: Tamanho médio das partículas dos materiais sintetizados pela equação de Scherrer.....	48
Tabela 4: Potencial zeta dos materiais zeolíticos	55
Tabela 5: Valores de absorbância medidas e concentrações calculadas para as diluições das soluções de enzimas e para as soluções de enzimas.....	57
Tabela 6: Taxas de imobilização obtidas pelo Ensaio de Bradford e massa de enzima imobilizada em cada suporte (tampão fosfato 100mM)	57
Tabela 7: Taxas de imobilização obtidas pelo Ensaio de Bradford e massa de enzima imobilizada em cada suporte (tampão fosfato 10mM)	58
Tabela 8: Valores de atividade catalítica para cada um dos complexos preparados com TLL em tampão fosfato 100mM	60
Tabela 9: Valores de atividade catalítica para cada um dos complexos preparados com RML em tampão fosfato 100mM	60
Tabela 10: Valores de atividade catalítica para cada um dos complexos preparados com TLL em tampão fosfato 10mM	61
Tabela 11: Valores de atividade catalítica para cada um dos complexos preparados com RML em tampão fosfato 10mM	61
Tabela 12: Taxa de conversão de triglicerídeos em ésteres etílicos para cada complexo testado na transesterificação de óleo de microalgas via rota etílica	64

LISTA DE ABREVIATURAS

CO₂	Dióxido de carbono (CO ₂)
DRX	Difração de raios-X
FAEEs	Fatty acid ethyl esters (Ésteres etílicos de ácidos graxos)
FFAs	Free Fatty Acids (Ácidos graxos livres)
FT-IR	Infravermelho com transformada de Fourier
GC	Gas chromatography (Cromatografia gasosa)
IZA	<i>Internacional Zeolite Association</i>
Nano-X	Nanozeólita X
RML	Lipase de <i>Rhizomucor miehei</i>
Si/Al	Razão do número de átomos de silício pelo número de átomos de alumínio
TLC	Thin Layer Chromatography (Cromatografia de camada delgada)
TLL	Lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i>

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	16
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
2.1.	Biodiesel.....	18
2.1.1.	Matérias primas para a produção de Biodiesel.....	19
2.1.1.1.	Biodiesel de primeira geração	19
2.1.1.2.	Biodiesel de segunda geração.....	20
2.1.1.3.	Biodiesel de terceira geração.....	20
2.1.2.	Processos catalíticos empregados na produção de Biodiesel	21
2.1.3.	Catalisadores homogêneos	22
2.1.4.	Catálise heterogênea.....	25
2.1.5.	Catálise enzimática - Lipases	26
2.2.	Imobilização Enzimática.....	28
2.3.	Zeólitas	29
2.3.1.	Estrutura das Zeólitas	30
2.3.2.	Troca iônica.....	33
2.3.2.1.	Terras Raras.....	33
3.	OBJETIVOS	35
3.1.	Objetivos Gerais	35
3.2.	Objetivos Específicos.....	35
4.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
4.1.	Síntese da zeólita X em escala nanométrica (nano-X/Na).....	36
4.2.	Síntese das nanozeólitas X modificadas com cátions lantanídeos através de procedimentos de troca iônica.....	36
4.3.	Caracterização por DRX	37
4.4.	Caracterização por FT-IR	37
4.5.	Caracterização por potencial zeta.....	37

4.6.	Determinação das concentrações de proteínas das soluções de enzimas pelo padrão albumina de soro bovino (BSA)	37
4.7.	Imobilização das enzimas lipases sobre os suportes zeolíticos	39
4.8.	Ensaio de Bradford	39
4.9.	Atividade Enzimática (método titulométrico)	40
4.10.	Produção do Biodiesel pela reação de transesterificação	42
4.11.	Cromatografia de camada delgada.....	42
4.12.	Cromatografia gasosa	43
5.	RESULTADOS E DISCUSSÕES	44
5.1.	Caracterização dos materiais sintetizados por Difração de Raios-X (DRX)	44
5.2.	Caracterização dos materiais por Espectroscopia de Infravermelho (FT-IR)	53
5.3.	Caracterização dos materiais por Potencial Zeta.....	55
5.4.	Determinação da concentração de proteínas das soluções de enzimas.....	56
5.5.	Determinação das taxas de imobilização pelo Ensaio de Bradford	57
5.6.	Determinação da atividade enzimática dos complexos pelo método titulométrico.....	59
5.7.	Produção de Biodiesel pela reação de transesterificação.....	62
5.8.	TLC – Verificação da produção de ésteres etílicos	63
5.9.	Cromatografia gasosa (GC) – Quantização da taxa de conversão de triglicerídeos em ésteres etílicos	64
6.	CONCLUSÕES	66
7.	PERSPECTIVAS FUTURAS.....	68
	REFERÊNCIAS	69

1. Introdução

Desde os primórdios da civilização a busca por fontes de energia tem sido uma das principais protagonistas dentre as necessidades humanas. Atualmente, devido à crescente evolução tecnológica, mais do que nunca essa busca se acentua. Aliado ao crescimento populacional, esse aumento do consumo energético pode representar um problema para a humanidade, já que grande parte da energia gerada e consumida pelos humanos vem de fontes não renováveis, com destaque para o carvão mineral, gás natural e principalmente petróleo (CLELAND, 2013; KHARLAMOVA, 2013; MADUKO; AKURU, 2013). Todas essas constituem fontes de energia não renováveis, portanto, alternativas devem ser encontradas para manutenção do desenvolvimento tecnológico em longo prazo, além de motivos econômicos estratégicos “imediatos”.

Atualmente existem várias fontes de energia renováveis, dentre as quais podem ser citadas a energia hidráulica, energia eólica, energia solar e os biocombustíveis. Devido à importância da diversificação dos meios de produção de energia, todas as fontes mencionadas são de extrema importância e compõem as fontes de energia renováveis mais utilizadas no mundo (MADUKO; AKURU, 2013). Esse trabalho se propõe a explorar as propriedades e meios de produção de uma dessas fontes de energia: os biocombustíveis, mais especificamente, o *biodiesel*.

O biodiesel é um biocombustível quimicamente muito similar ao diesel de origem fóssil, possuindo alto valor energético assim como seu “irmão não-renovável”, porém com algumas vantagens importantes como a menor liberação de poluentes em sua queima, a ciclagem de CO₂ envolvida na produção de biomassa e a queima do biocombustível (que contribui para a diminuição do efeito estufa) e a renovabilidade (KHAN; WARITH; LUK, 2012).

Há várias técnicas para a produção do biodiesel. Atualmente a técnica mais popular é a transesterificação de óleos vegetais ou gorduras animais (fontes de triglicerídeos), reação essa que ocorre na presença de um álcool e resulta na produção de glicerol e ésteres alquílicos (biodiesel) (GORJI, 2015). A matéria-prima utilizada é fundamental para garantir um biocombustível de boa qualidade, viável econômica e ambientalmente para produção em larga escala. Ainda que atualmente a maior parte da produção do biodiesel global se dê através de matéria-prima de primeira geração (óleos comestíveis, como óleo de soja e óleo de canola) devido a seu fácil acesso e boa qualidade, problemas relacionados à sustentabilidade da produção em larga escala a partir de tais insumos, como a competitividade com o setor alimentício e problemas ambientais relacionados ao plantio dessas oleaginosas, têm instigado

a busca por outras matérias-primas (NAIK et al., 2010). O biodiesel de terceira geração, produzido essencialmente a partir do óleo de microalgas, é a alternativa mais promissora atualmente devido a, dentre outras características, alta eficiência desses microrganismos na produção de biomassa (ALAM; MOBIN; CHOWDHURY, 2015).

Há três classes de catalisadores para a reação de transesterificação: os catalisadores homogêneos, heterogêneos e enzimáticos (LAM; LEE; MOHAMED, 2010). Os catalisadores enzimáticos (normalmente enzimas lipases) em particular são bastante atraentes nesse contexto por possuírem uma série de vantagens, como condições brandas de temperatura e pressão para a reação, serem ambientalmente seguros e possibilitarem fácil pós-processamento. No entanto, seu alto custo, impossibilidade de reutilização e velocidade de reação relativamente baixa fazem com que seu emprego na indústria seja desencorajado (CHRISTOPHER; HEMANATHAN KUMAR; ZAMBARE, 2014). A fim de mitigar esses problemas, técnicas de imobilização enzimática têm sido empregadas, imobilizando os catalisadores enzimáticos sobre suportes sólidos gerando complexos suporte-enzima que se caracterizam por serem catalisadores heterogêneos, possibilitando a reutilização do catalisador (JEGANNATHAN et al., 2008). Dentre os suportes sólidos, os materiais zeolíticos se destacam por apresentar estrutura estável, baixo custo de síntese e alta versatilidade, relacionada à possibilidade de troca iônica.

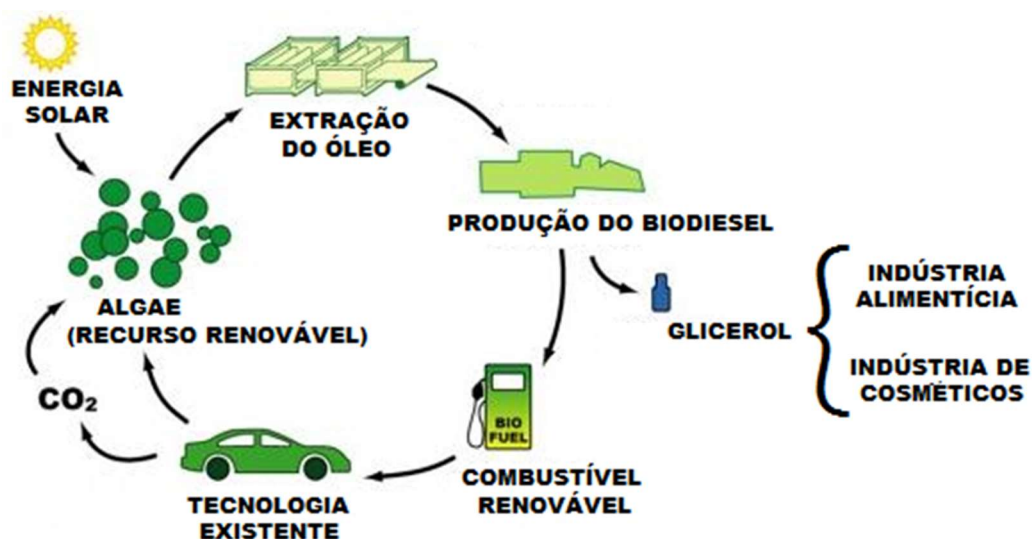
Segundo estudos prévios realizados por Adriano de Vasconcellos, a imobilização de enzimas lipases de *Thermomyces lanuginosus* sobre suportes nanozeolíticos de estrutura Faujasita (tipo X) trocados com metais de transição apresentou forte efeito sinérgico para o material trocado com Níquel (Ni^{2+}) a 0,5M, com rendimentos acima de 94% de FAEEs (DE VASCONCELLOS et al., 2015). Esses dados instigaram o presente trabalho a estudar a nanozeólita X trocada com os terras raras (essencialmente metais de transição maiores e com algumas propriedades particulares), em específico os cátions trivalentes de Cério (Ce^{3+}), Disprósio (Dy^{3+}), Gadolínio (Gd^{3+}) e Lantânio (La^{3+}), assim como a utilização desses materiais como suportes de imobilização para enzimas lipases e o emprego desses complexos nanozeólita-enzima na síntese de biodiesel de terceira geração via rota etílica.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Biodiesel

O biodiesel é um combustível diesel alternativo que tem como finalidade substituir (total ou parcialmente) o diesel de origem fóssil. Ele é um biocombustível produzido a partir de biomassa, normalmente óleos vegetais provenientes de oleaginosas, e apresenta grandes vantagens em relação ao seu irmão de origem fóssil, como maior degradabilidade, menor toxicidade, e menor índice de emissão de gases do efeito estufa, sendo ambientalmente muito mais seguro (KHAN; WARITH; LUK, 2012; KRAWCZYK, 1996; MAKAREVICIENE; JANULIS, 2003; MARIANO et al., 2008). Além disso, um grande atrativo do biodiesel se dá por sua renovabilidade devido à ciclagem do CO_x , que é emitido em sua queima e reabsorvido pelas plantas que futuramente gerarão biomassa para a produção do biocombustível, o que também o confere o efeito de controle da quantidade de gases do efeito estufa na atmosfera, algo muito importante no cenário atual de preocupação ambiental em que o uso contínuo e intenso de combustíveis fósseis agrava o problema do aquecimento global (SHAY, 1993). A representação do ciclo do biodiesel se encontra na Figura 1.

Figura 1: Ciclo de produção do biodiesel



Fonte: Adaptação do trabalho de MESHRAM et al., 2013.

Quimicamente é muito similar ao diesel de origem fóssil, com essencialmente a diferença estrutural da presença de um grupo éster, por isso possui alta densidade energética

(que pode variar de acordo com a matéria-prima utilizada na produção) (MESHRAM et al., 2013).

2.1.1. Matérias primas para a produção de Biodiesel

O biodiesel pode ser produzido a partir de diversas fontes de triglicerídeos, desde gorduras animais até os mais comumente utilizados óleos vegetais (NAIK et al., 2010). A matéria-prima a partir da qual ele é produzido impacta o produto final não somente economicamente mas também em suas propriedades físico-químicas, como sua viscosidade, ponto de fulgor e densidade energética (SINGH; SINGH, 2010). A necessidade de otimização da manufatura do biodiesel instigou diversos estudos que analisaram sua qualidade e viabilidade de produção em escala industrial quando produzido a partir de uma grande variedade de matérias-primas. Assim, dependendo do insumo utilizado na produção o biodiesel pode ser categorizado em: biodiesel de primeira geração, biodiesel de segunda geração e biodiesel de terceira geração.

2.1.1.1. Biodiesel de primeira geração

O biodiesel de primeira geração se caracteriza por ser produzido a partir de oleaginosas comestíveis, mais facilmente encontradas no mercado, como a soja, a canola e a palma (NAIK et al., 2010). Essas oleaginosas foram as primeiras utilizadas na produção do biodiesel devido a sua disponibilidade, uma vez que já havia uma produção em larga escala devido a demanda no setor alimentício, e por isso são denominadas matérias primas de primeira geração. Embora possam ser utilizadas para produzir biodiesel de boa qualidade, há controvérsias com relação a sustentabilidade da produção em larga escala de biocombustíveis utilizando-se matéria prima de primeira geração. A competitividade com o mercado de alimentos pode gerar escassez e aumento de preços dessas oleaginosas e seus derivados, o que pode levar a instabilidades econômicas no setor alimentício (BHUIYA et al., 2014; BRENNAN; OWENDE, 2010; NAIK et al., 2010). Além disso, o plantio das oleaginosas requer grandes áreas de terras aráveis, portanto a produção em larga escala implicaria, possivelmente, em sérios problemas ambientais (BHUIYA et al., 2014; BRENNAN; OWENDE, 2010).

2.1.1.2. Biodiesel de segunda geração

O biodiesel de segunda geração é produzido a partir de matérias primas alternativas, que visam solucionar os problemas de sustentabilidade relacionados ao biodiesel de primeira geração (BHUIYA et al., 2014). As matérias-primas utilizadas incluem óleos vegetais não comestíveis, como o óleo de pinhão-manso (*Jatropha curcas*), o óleo de karanja (*Millettia pinnata*) e o óleo da semente do algodão; óleos residuais ou óleos reciclados, como óleo de cozinha residual, óleo de frituras e óleo de bagaço de oliva; e gorduras animais, como sebo bovino, gordura de aves e subprodutos de óleo de peixe (BHUIYA et al., 2014; KUMAR; VARUN; CHAUHAN, 2013). Essas matérias-primas se mostram mais viáveis para utilização em larga escala pois não competem com o setor alimentício, são mais baratas e também não requerem grandes áreas de plantação devido a natureza residual de muitas delas (BRENNAN; OWENDE, 2010; SINGH; SINGH, 2010). Além disso, matérias-primas de segunda geração se mostram mais eficientes no controle de emissão de CO₂, já que frequentemente são produtos de reciclagem (NAIK et al., 2010). Apesar dos pontos positivos, esses insumos não possuem ampla penetração industrial devido a dificuldades na reação de transesterificação relacionadas ao seu (frequente) alto teor de ácidos graxos livres e também devido a sua baixa escala de produção, não suficiente para suprir a demanda de grandes indústrias.

2.1.1.3. Biodiesel de terceira geração

O biodiesel de terceira geração é produzido essencialmente a partir de óleo de microalgas. Ainda que o termo “microalgas” não possua valor taxonômico, ele se refere a mais de 300000 espécies de microorganismos algais. Assim como as matérias-primas de segunda geração, os óleos de microalgas não possuem penetração significativa no setor alimentício. Esses microorganismos se caracterizam por serem organismos unicelulares fotossintéticos que crescem em corpos de água ao redor de todo o mundo, convertendo luz solar, água e dióxido de carbono em biomassa (ALAM; MOBIN; CHOWDHURY, 2015; DERNER et al., 2006). Esses organismos são muito mais eficientes do que as plantas vasculares na conversão de luz solar em energia química, a qual é armazenada principalmente na forma de lipídios. Devido a isso, as microalgas têm sido alvo de diversos estudos que buscam uma fonte de biomassa mais eficiente, que possa ser mais economicamente viável que as fontes utilizadas atualmente e mais ecologicamente sustentável (ALAM; MOBIN; CHOWDHURY, 2015). Na Tabela 1 se encontra a comparação entre o rendimento de óleo a partir de diferentes fontes de biomassas, inclusive as microalgas.

Tabela 1: Comparação dos rendimentos de óleos extraídos de diferentes biomassas.

Biomassa	Litro/Hectare/Ano
Soja	400
Girassol	800
Canola	1,600
Jatropha	2,000
Palma	6,000
Microalgas	60,000 – 240,000

Fonte: Adaptação de ALAM et al., 2015.

O cultivo das microalgas pode ser realizado de forma simples em tanques de água a céu aberto, uma vez que precisam de exposição à luz solar para realização da fotossíntese, sob condições normais de temperatura e pressão, o que também contribui para a viabilidade econômica (DERNER et al., 2006). No entanto, sistemas externos são mais suscetíveis a invasão de organismos indesejados (HALIM; DANQUAH; WEBLEY, 2012). Como alternativa existem os sistemas de cultivo internos. Esse tipo de cultivo normalmente é realizado em fotorreatores, os quais possibilitam condições mais controladas de cultivo, assim como menor suscetibilidade a invasões de espécies externas. Contudo, devido ao seu alto custo, os métodos de cultivo externos normalmente são preferidos (HALIM; DANQUAH; WEBLEY, 2012). Devido ao sistema de cultivo, a produção em larga escala de biomassa a partir de microalgas se mostra ambientalmente viável, e atualmente é considerada a fonte de biomassa mais promissora para a produção industrial de biodiesel.

2.1.2. Processos catalíticos empregados na produção de Biodiesel

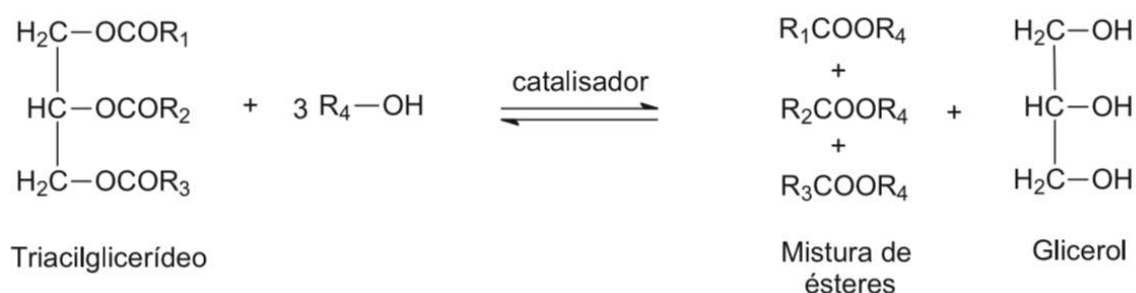
Há essencialmente três maneiras de se produzir o biodiesel: através de microemulsões, craqueamento térmico (pirólise) e a transesterificação de triglicerídeos (MA; HANNA, 1999).

Atualmente a técnica mais explorada se dá através da transesterificação de triglicerídeos, na qual ocorre a troca do grupo RCOO- (ácidos graxos) dos triglicerídeos por uma hidroxila (OH-) proveniente de um álcool (normalmente álcool etílico ou metílico), e a reação desses ácidos graxos liberados com a cadeia lateral do álcool resulta na formação dos ésteres alquílicos (biodiesel). Como subproduto o glicerol é formado ao final da reação.

Pela relação estequiométrica, a proporção molar mínima para que a reação de transesterificação ocorra é de 1:3 (triglicerídeos:álcool), porém o excesso de álcool se faz necessário para deslocar o equilíbrio da reação em direção aos produtos (MA; HANNA, 1999; PORTAL, 2007).

O esquema da reação está exposto na Figura 2.

Figura 2: Reação de Transesterificação de triglicerídeos na presença de álcool e um catalisador

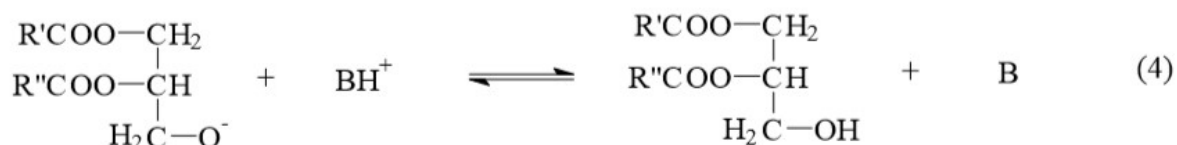
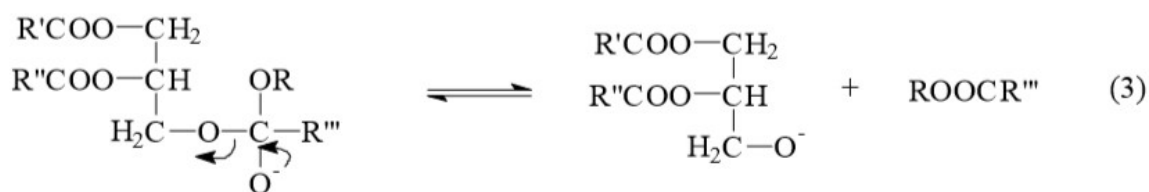


Fonte: Adaptação de GERIS et al., 2007.

A catálise da reação de transesterificação pode ser categorizada essencialmente em três categorias, sendo elas: catálise homogênea, catálise heterogênea e a catálise enzimática, referentes aos diferentes catalisadores utilizados. A catálise homogênea e a heterogênea podem ainda ser divididas em catálise básica e catálise ácida (MA; HANNA, 1999).

2.1.3. Catalisadores homogêneos

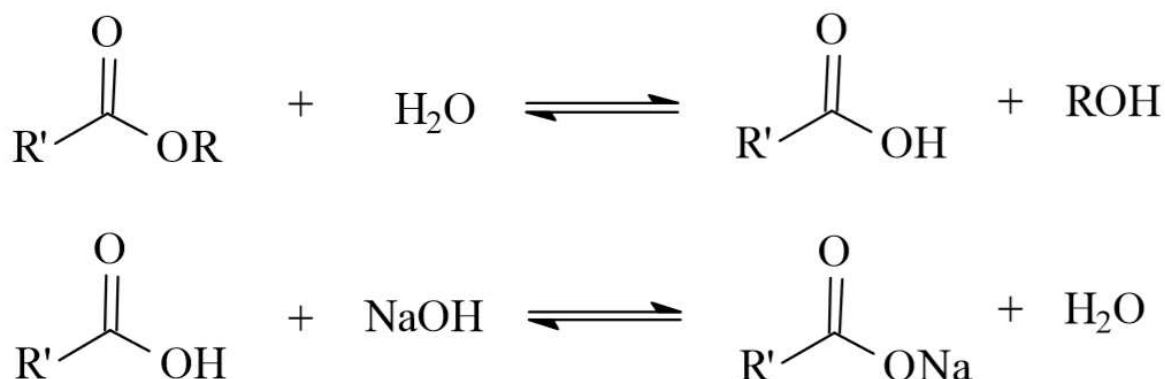
Os catalisadores homogêneos são catalisadores líquidos que se caracterizam por formar uma mistura homogênea com os reagentes, sendo que podem ser de natureza básica ou ácida. Na produção industrial atual de biodiesel, o método mais utilizado é a catálise homogênea básica devido às suas vantagens, dentre as quais podem ser citadas seu relativo baixo custo, curto tempo reacional, temperaturas mais amenas de reação e alta conversão. O hidróxido de sódio (NaOH), metóxido de sódio (CH₃ONa) e o metóxido de potássio (CH₃KO) são exemplos desses catalisadores utilizados na transesterificação (GORJI; GHANEI, 2014). O mecanismo geral desse tipo de catálise está representado na Figura 3.

Figura 3: Mecanismo de catálise homogênea básica da transesterificação de óleos vegetais

Fonte: SCHUCHARDT et al., 1998.

No entanto, esse método também apresenta grandes pontos negativos, como por exemplo a dificuldade de reciclagem do catalisador, sua trabalhosa separação do meio reacional ao final da reação e também riscos ambientais devido ao manuseio de quantidades industriais de substâncias nocivas ao meio ambiente (MA; HANNA, 1999). Além disso, a baixa especificidade desse tipo de catalisador faz com que ele seja particularmente sensível a substâncias indesejadas no meio reacional, como água e ácidos graxos livres, na presença dos quais pode ocorrer a formação de sabão (reação de saponificação; esquematizada na Figura 4), que não somente torna o processo de separação dos produtos mais difícil e custoso, mas também gera um gasto desnecessário de catalisador (MA; HANNA, 1999; PINTO et al., 2005; SCHUCHARDT; SERCHELI; MATHEUS, 1998).

Figura 4: Reação de saponificação a partir de ésteres alquílicos na presença de água ou diretamente da neutralização dos ácidos graxos livres

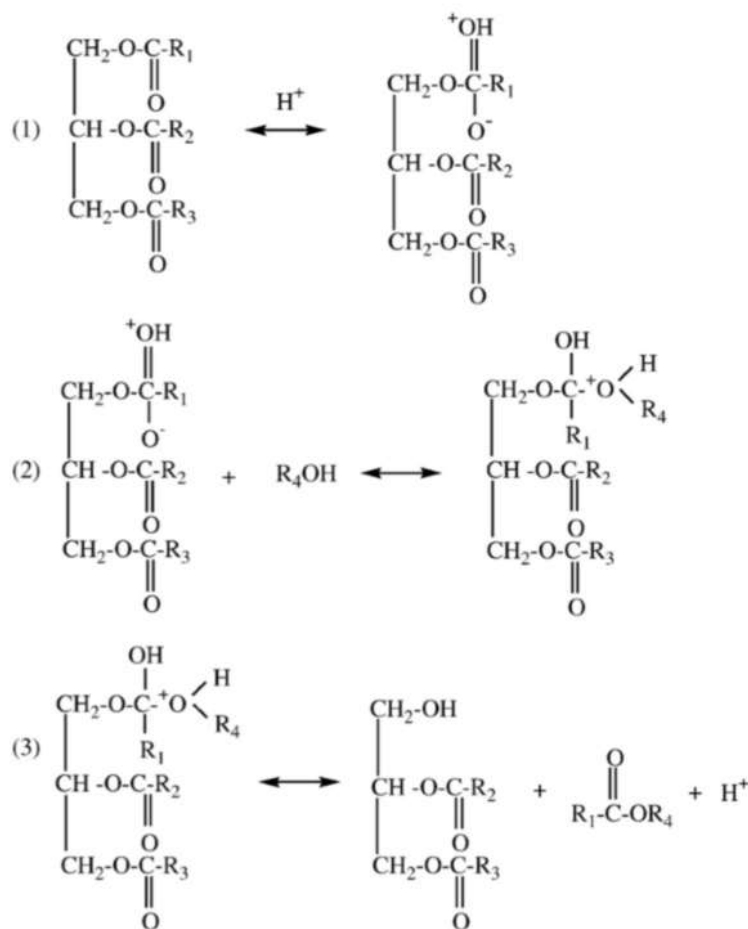


R' = Cadeia carbônica do ácido graxo

R = Grupo alquila do álcool

Fonte: Adaptação de SCHUCHARDT et al., 1998.

Catalisadores homogêneos ácidos podem ser interessantes para evitar a saponificação, além de serem capazes de promover a esterificação de ácidos graxos livres (LAM; LEE; MOHAMED, 2010), mas não possuem alta penetração industrial pois exigem mais tempo de reação, condições reacionais de temperatura e pressão mais extremas e ainda possuem o problema ecológico da formação de grande quantidade de lixos residuais (FREEDMAN; PRYDE; MOUNTS, 1984; MA; HANNA, 1999). Dentre os catalisadores homogêneos ácidos podem ser citados o ácido clorídrico (HCl) e os ácidos sulfônicos (GORJI; GHANEI, 2014). Na Figura 5 se encontra o esquema geral desse tipo de catálise.

Figura 5: Mecanismo de catálise homogênea ácida da transesterificação de óleos vegetais

$\text{R}_1, \text{R}_2, \text{R}_3$ = Cadeias carbônicas de ácidos graxos

R_4 = Grupo alquila do álcool

Fonte: Adaptação de LAM et al., 2010.

2.1.4. Catálise heterogênea

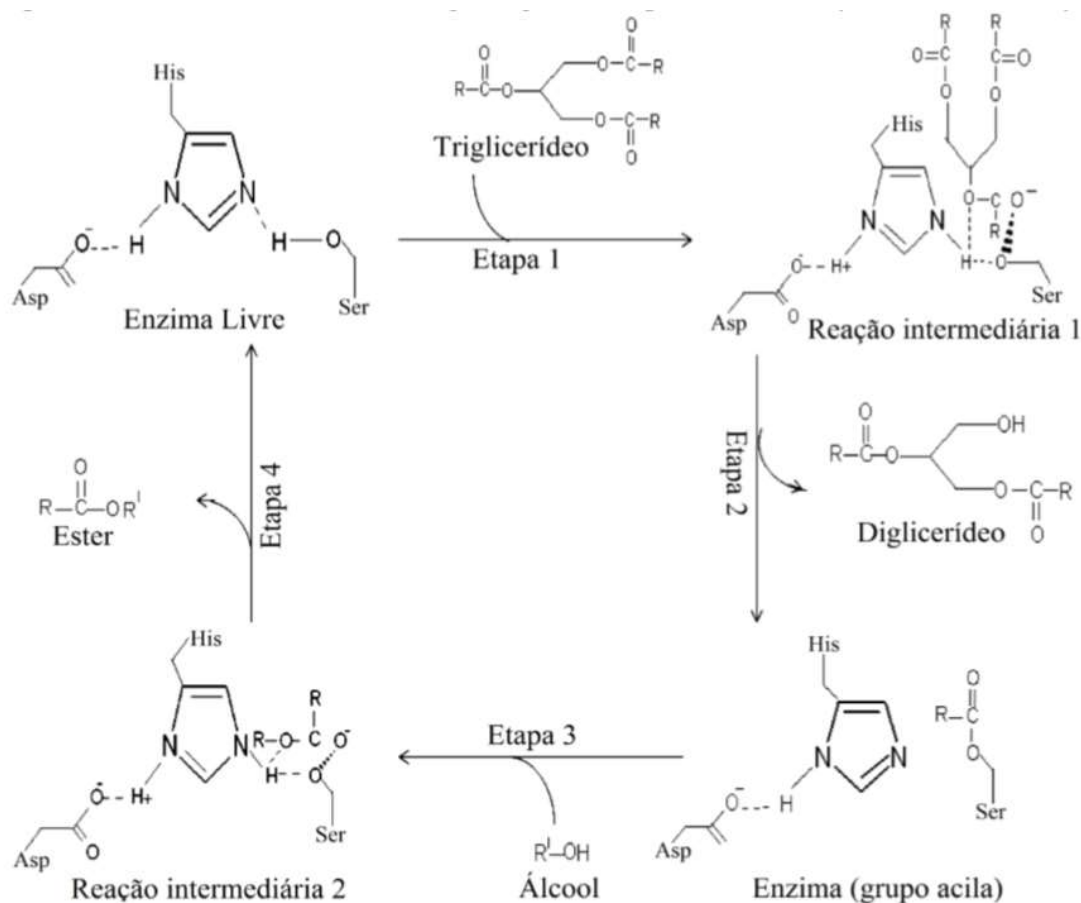
Os catalisadores heterogêneos são catalisadores sólidos que, analogamente aos catalisadores homogêneos, se caracterizam pelo fato de que ao final da reação de transesterificação se encontram em fase separada dos reagentes e dos produtos. Eles também podem ser categorizados em catalisadores heterogêneos ácidos e básicos. Alguns dos catalisadores mais comuns são sólidos inorgânicos, como os metais, óxidos, entre outros. Enzimas imobilizadas também são consideradas catalisadores heterogêneos (KNÖZINGER; KOCHLOEFL, 2003).

Obviamente, o maior ponto positivo desse tipo de catálise se encontra no fato de que ao final da reação o catalisador pode facilmente ser separado (por filtração), recuperado e possivelmente reutilizado, o que reduz o custo de produção, não somente nos custos envolvidos no processo de separação, mas também no rendimento de uma determinada quantidade de catalisador. Apesar disso, apresenta baixa especificidade assim como a catálise homogênea, eventualmente reagindo com substâncias inesperadas no meio reacional, gerando um gasto desnecessário de catalisador além de possíveis “substâncias estranhas” no meio reacional. Isso, juntamente à baixa eficiência catalítica e às altas condições de temperatura e pressão necessárias para a catálise faz com que esse tipo de catalisador possua baixa penetração industrial (DABDOUB; BRONZE; RAMPIN, 2009).

2.1.5. Catálise enzimática - Lipases

A catálise enzimática na produção de biodiesel consiste na utilização de enzimas lipases como catalisadores para a reação de transesterificação. Embora essas enzimas normalmente tenham o papel de catalisar a hidrólise de gorduras na natureza, elas também são capazes de catalisar a alcoólise e esterificação em ambientes com baixo teor aquoso, o que as torna ótimas candidatas para a catálise da transesterificação (JAEGER; REETZ, 1998; SINGH; MUKHOPADHYAY, 2012). Na Figura 6 está esquematizado o mecanismo da transesterificação de óleos vegetais catalisada pelas das enzimas lipases.

Figura 6: Mecanismo da catálise enzimática da transesterificação de óleos vegetais



Fonte: Adaptação de JEGANNATHAN et al., 2008.

Dentre as lipases, as de origem fúngica são as mais interessantes para esse tipo de aplicação devido às suas características como especificidade “1,3”, seletividade de cadeias longas e maior estabilidade na presença de álcoois, o que pode melhorar o rendimento dos ésteres alquílicos em até 90% com relação às lipases menos “adaptadas” para esse tipo de reação (GUPTA et al., 2015).

Esse tipo de catálise possui diversos pontos positivos, como condições brandas de temperatura e pressão, alta especificidade, fácil separação ao final da reação, não produção de resíduos tóxicos, e não menos importante a possibilidade de imobilização sobre suportes sólidos, que podem não somente possibilitar a reutilização desses catalisadores, mas também o aumento da estabilidade dos mesmos (CHRISTOPHER; HEMANATHAN KUMAR; ZAMBARE, 2014; GORJI; GHANELI, 2014).

Assim como na catálise ácida as enzimas possuem a capacidade de realizar a esterificação dos ácidos graxos livres simultaneamente à transesterificação dos triglicerídeos,

fazendo com que esse catalisador seja apropriado para óleos com alto teor de FFA (PEDRO et al., 2018).

Contudo esse tipo de catálise possui pontos negativos que têm impedido sua maior penetração industrial, como sua baixa velocidade reacional, alto custo e a sensibilidade das enzimas ao álcool, que pode causar a inutilização do catalisador (JESIONOWSKI; ZDARTA; KRAJEWSKA, 2014; LAM; LEE; MOHAMED, 2010). Assim, a imobilização enzimática se apresenta como uma possível solução para o alto custo desses catalisadores, possibilitando principalmente a reutilização dos mesmos em diversos ciclos de produção.

2.2. Imobilização Enzimática

A imobilização enzimática é uma alternativa para tornar as enzimas mais atrativas para os processos industriais. Um dos pontos negativos mais relevantes da catálise enzimática é seu alto custo, relacionado a baixa reusabilidade e estabilidade dos catalisadores em diversas reações químicas, o que pode acarretar em perda desnecessária de catalisador (JESIONOWSKI; ZDARTA; KRAJEWSKA, 2014; SIRISHA; JAIN; JAIN, 2016). Nesse contexto a imobilização enzimática se mostra uma boa alternativa para corrigir alguns dos principais problemas desse tipo de catálise.

Essa técnica consiste essencialmente no aprisionamento das enzimas em matrizes sólidas, como polímeros inertes e materiais inorgânicos, a fim de formar complexos que apresentem vantagens sobre as enzimas livres, como maior reusabilidade, estabilidade e maior facilidade de separação dos catalisadores do meio reacional, mas ainda mantendo as características positivas da catálise enzimática, como a alta especificidade, condições brandas de reação e etc. (BASSO; SERBAN, 2019; TUFVESSON et al., 2010).

Tanto a catálise heterogênea quanto a catálise enzimática apresentam pontos negativos que limitam sua aplicação industrial e a imobilização enzimática se destaca pois une algumas vantagens de ambas. No entanto, esse método também traz consigo alguns contratempos como os custos adicionais relacionados aos suportes e o descarte das enzimas imobilizadas depois de “consumidas”, que normalmente é realizado por incineração. Além do mais, as enzimas imobilizadas tendem a apresentar atividade enzimática reduzida quando comparadas à sua forma livre, devido a imobilizações inefetivas e mudanças conformacionais que podem prejudicar sua capacidade catalítica (BASSO; SERBAN, 2019).

Há essencialmente dois tipos de imobilização enzimática de acordo com o tipo de aprisionamento que ocorre, podendo ser por encapsulamento (enzima aprisionada no interior

do suporte) ou por adsorção (enzima imobilizada na superfície do suporte) (FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ; SANROMÁN; MOLDES, 2013; SHELDON, 2007). A imobilização por adsorção ainda pode ser categorizada pela forma como a enzima é adsorvida, que pode ser através de interações hidrofóbicas, covalentes, iônicas ou até por afinidade, que explora a especificidade da enzima para ligá-la ao suporte (SIRISHA; JAIN; JAIN, 2016).

O método mais apropriado para um determinado sistema pode depender da natureza do suporte e da enzima. A adsorção por ligação covalente, por exemplo, que normalmente ocorre através da interação da cadeia lateral de alguns aminoácidos das enzimas com o suporte, é um método de imobilização irreversível e estável; no entanto, a adsorção por interações iônicas é um método bem mais simples que requer condições mais amenas e gera apenas leves mudanças estruturais na enzima o que frequentemente a mantém com boa atividade. Entretanto por advir de interações relativamente fracas apresenta maior chance de desprendimento da enzima, dependendo das condições químicas do meio, como o pH e concentração de tampão utilizado, já que a presença de íons no meio blinda a interação eletrostática suporte-enzima (SIRISHA; JAIN; JAIN, 2016). É interessante ressaltar que mesmo na adsorção iônica outros fatores podem influenciar a imobilização. O ganho de entropia associado a mudança conformacional das enzimas durante a adsorção no suporte sólido pode direcionar a imobilização apesar das interações eletrostáticas, principalmente no caso de enzimas mais suscetíveis a alterações estruturais (BURNS; HOLMBERG; BRINK, 1996).

Independentemente do método de preferência, algo fundamental para que a imobilização seja efetiva é a natureza do suporte, que deve apresentar alta estabilidade, principalmente no contexto de interesse, além de alta capacidade de modulação de suas propriedades físico-químicas para que o material possa ser otimizado para a enzima a ser adsorvida.

2.3. Zeólitas

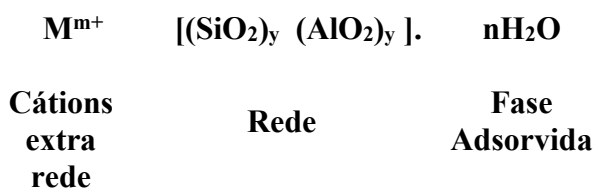
Zeólitas são materiais compostos basicamente de silício e alumínio, sendo assim denominados aluminossilicatos. Atualmente são conhecidas mais de 80 espécies de zeólitas naturais e mais de 150 artificiais. As espécies naturais são formadas em locais onde rochas e cinzas vulcânicas reagem com água alcalina, e também ocorrem em ambientes pós deposicionais em que cristalizaram ao longo de milhares ou milhões de anos. Por raramente serem puras, não possuem grande aplicação industrial, diferentemente das zeólitas sintéticas.

2.3.1. Estrutura das Zeólitas

As zeólitas são materiais cristalinos e microporosos, com uma complexa rede de canais, cujas unidades básicas de formação são tetraedros com um átomo central de silício ou alumínio ligado covalentemente a quatro átomos de oxigênio, sendo o compartilhamento desses átomos de oxigênio o que forma a teia de tetraedros que dá origem à rede cristalina (BRECK, 1974; LUNA; SCHUCHARDT, 2001; SMITH, 1984).

Devido ao número de oxidação do alumínio (3^+) o compartilhamento de elétrons com quatro átomos de oxigênio faz com que os tetraedros de alumínio possuam uma carga líquida negativa. Isso faz com que íons se liguem à estrutura a fim de levar o sistema ao equilíbrio de cargas. Esses íons são denominados íons extra rede ou íons de compensação, e normalmente se encontram no interior microporoso da estrutura zeolítica (MCCUSKER; BAERLOCHER, 2001; SHERRY, 1966).

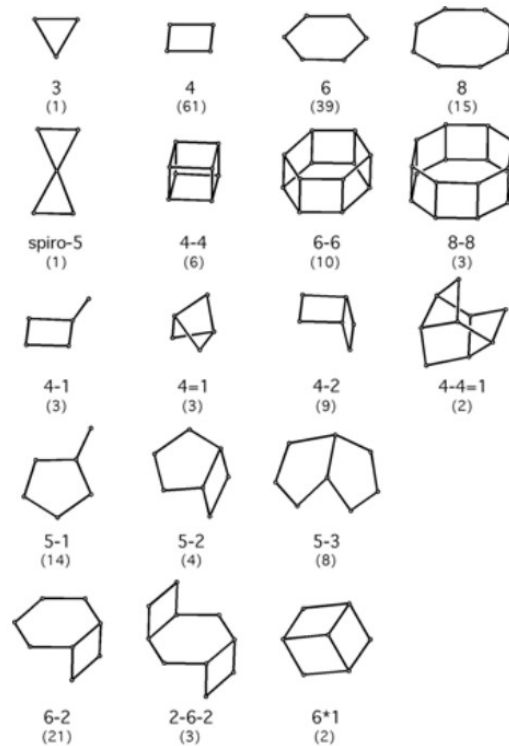
Dessa forma, a fórmula química geral das zeólitas pode ser escrita como:



A fase adsorvida, representada como água, pode ser também um componente orgânico como, por exemplo, o benzeno. O componente aquoso ou orgânico desempenha um importante papel durante a síntese das zeólitas, tornando-se uma parte integrante da estrutura em desenvolvimento. A fase adsorvida pode ser removida da zeólita cristalina por aquecimento ou sob pressão reduzida sem causar danos a estrutura zeolítica. Os três componentes da estrutura das zeólitas – esqueleto cristalino, cátions extra rede e a fase adsorvida – são alvo de intenso interesse e desempenham um papel cujo grau de importância varia de acordo com a sua aplicação (DAVIS, 2002).

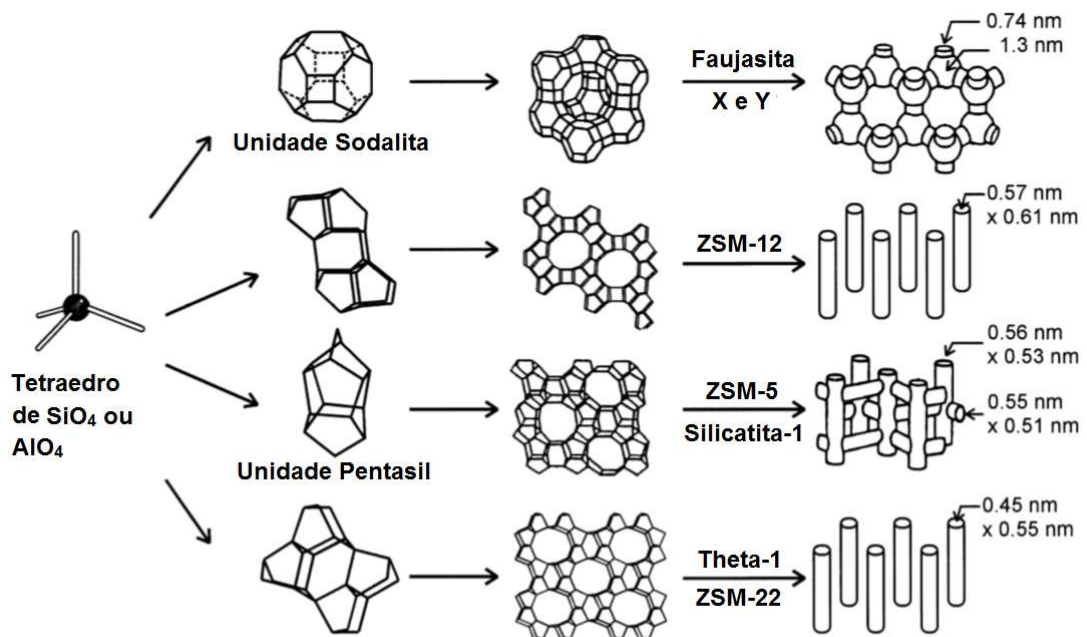
Os ângulos “T-O-T” (onde “T” representa um átomo de Alumínio ou de Silício), ou seja, entre cada oxigênio e dois átomos “T” que o compartilham, podem variar no intervalo de 125° a 180° , e essa variação é um dos fatores responsáveis pela existência de várias espécies zeolíticas com estruturas diferentes. (SMART; MOORE, 1995). Esses tetraedros organizam-se formando as unidades secundárias de construção, constituídas de até 16 tetraedros (MCCUSKER; OLSON; BAERLOCHER, 2007). Essas estruturas inicialmente simples se arranjam de diversas maneiras para dar origem às diversas estruturas zeolíticas. Os esquemas dos níveis estruturais dos materiais zeolíticos estão representados na Figura 7 e na Figura 8.

Figura 7: Unidades secundárias de construção



Fonte: MCCUSKER et al., 2007

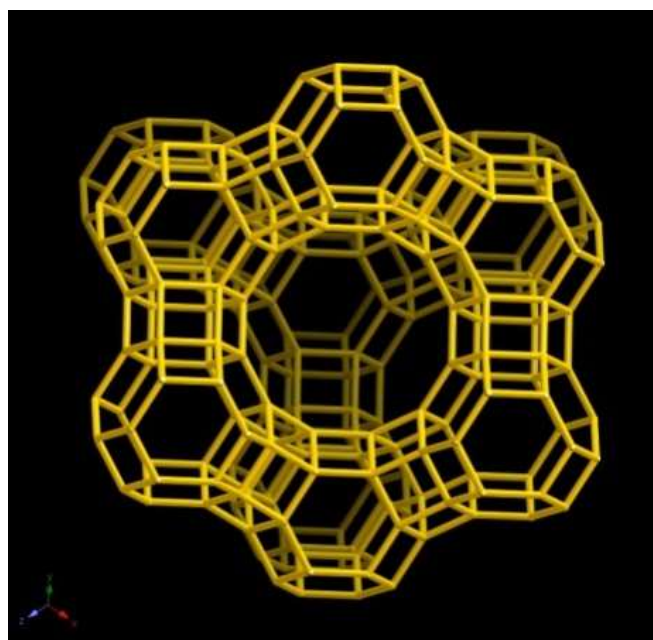
Figura 8: Estrutura de quatro tipos de zeólitas e seus sistemas microporosos com suas respectivas dimensões



Fonte: Adaptação de WEITKAMP, 2000.

As zeólitas do tipo Faujasita são interessantes no contexto desse trabalho por apresentarem síntese simples e barata e alta capacidade de modulação de suas características, inclusive a razão entre o número de átomos de Silício e Alumínio (Si/Al) presentes na estrutura. Quanto maior o número de átomos de alumínio no material, maior será a quantidade de íons de compensação e mais suscetível a zeólita se torna aos procedimentos de troca iônica, o que favorece sua versatilidade. As zeólitas com razão Si/Al = 1 – 1.5 são denominadas X, e as com razão Si/Al = 1.5 em diante são denominadas Y (BARRER; DAVIES; REES, 1969; MCCUSKER; BAERLOCHER, 2001; VERBOEKEND et al., 2016).

Figura 9: Modelo molecular tridimensional da zeólita tipo Faujasita



Fonte: International Zeolite Association (IZA).

As zeólitas podem ser sintetizadas em escala micrométrica ou em escala nanométrica. A diminuição do tamanho dos materiais zeolíticos da escala micrométrica para a escala nanométrica acarreta mudanças na forma e textura desses materiais o que afeta fortemente as suas propriedades físico-químicas. A proporção entre o número de átomos (externos/internos) aumenta rapidamente com a redução do tamanho das partículas, assim nanozeólitas possuem uma ampla área de superfície externa e alta atividade catalítica superficial (TOSHEVA; VALTCHEV, 2005; ZHAN et al., 2002). Como a área superficial da matriz sólida é proporcional à sua capacidade efetiva de imobilização, as nanozeólitas são particularmente interessantes no contexto de imobilização enzimática (CEDERQUIST; KEATING, 2009).

2.3.2. Troca iônica

Como mencionado na seção anterior, a troca iônica é o procedimento pelo qual os íons de compensação presentes na estrutura zeolíticas são trocados por outros íons de interesse. Esse procedimento confere às zeólitas alta versatilidade, pois a interação desses íons com o material estabiliza a estrutura e a substituição desses íons muda a forma com que essa interação ocorre, podendo afetar o arranjo da estrutura cristalina, o tamanho do material e sua densidade de carga superficial (VERBOEKEND et al., 2016). Dessa forma é possível modular o material de forma a otimizar a interação com a enzima. Isso faz com que as zeólitas sejam especialmente efetivas adsorventes (VERBOEKEND et al., 2016). No caso das zeólitas do tipo Faujasita, normalmente os íons de compensação são íons de sódio (Na^+).

2.3.2.1. Terras Raras

Os terras raras são um grupo de dezessete elementos compostos pelos quinze lantanídeos, do lantânio ao lutécio, mais o escândio e o ítrio, os quais são considerados terras raras devido às suas características físico-químicas similares às dos lantanídeos, e também por frequentemente compartilharem os mesmos depósitos minerais (MEHMOOD, 2018). A distribuição dos terras raras na tabela periódica estão indicados na Figura 10.

Figura 10: Indicação dos terras raras na tabela periódica

Group	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Period	1 H																	2 He
2	3 Li	4 Be											5 B	6 C	7 N	8 O	9 F	10 Ne
3	11 Na	12 Mg											13 Al	14 Si	15 P	16 S	17 Cl	18 Ar
4	19 K	20 Ca	21 Sc	22 Ti	23 V	24 Cr	25 Mn	26 Fe	27 Co	28 Ni	29 Cu	30 Zn	31 Ga	32 Ge	33 As	34 Se	35 Br	36 Kr
5	37 Rb	38 Sr	39 Y	40 Zr	41 Nb	42 Mo	43 Tc	44 Ru	45 Rh	46 Pd	47 Ag	48 Cd	49 In	50 Sn	51 Sb	52 Te	53 I	54 Xe
6	55 Cs	56 Ba	57-71 La-Lu	72 Hf	73 Ta	74 W	75 Re	76 Os	77 Ir	78 Pt	79 Au	80 Hg	81 Tl	82 Pb	83 Bi	84 Po	85 At	86 Rn
7	87 Fr	88 Ra	89-103 Ac-Lr	104 Rf	105 Db	106 Sg	107 Bh	108 Hs	109 Mt	110 Ds	111 Rg	112 Cn	113 Uut	114 Fl	115 Uup	116 Lv	117 Uus	118 Uuo

57 La	58 Ce	59 Pr	60 Nd	61 Pm	62 Sm	63 Eu	64 Gd	65 Tb	66 Dy	67 Ho	68 Er	69 Tm	70 Yb	71 Lu
89 Ac	90 Th	91 Pa	92 U	93 Np	94 Pu	95 Am	96 Cm	97 Bk	98 Cf	99 Es	100 Fm	101 Md	102 No	103 Lr

Fonte: ANDERSON et al., 2017.

O que caracteriza os terras raras e os confere características físico-químicas semelhantes é sua distribuição eletrônica. Em suas formas neutras todos os átomos desse grupo apresentam

configuração do tipo: $[\text{Xe}] 4f^n 5s^2 5p^6 5d^{0-1} 6s^2$, onde n pode variar de $n=1$ a $n=14$ dependendo da espécie (exceto o lantânio que não possui nenhum elétron no subnível $4f$). Sua configuração faz com que os cátions lantanídeos trivalentes, que corresponde ao estado de oxidação mais comum e estável para esses elementos, exibam comportamento paramagnético, com exceção dos íons Y^{3+} , La^{3+} e Lu^{3+} , que são diamagnéticos (ANDERSON; TAYLOR; ANDERSON, 2017; MARTINS; ISOLANI, 2005).

Atualmente o interesse pelos terras raras vem aumentando para aplicação em diversos setores industriais, com destaque para a utilização em processos catalíticos, na fabricação de lasers e como materiais luminescentes (MARTINS; ISOLANI, 2005).

3. Objetivos

3.1. Objetivos Gerais

O objetivo deste trabalho é sintetizar a zeólita Faujasita tipo X na escala nanométrica, modificá-la através de experimentos de troca iônica com os cátions lantanídeos e caracterizar os materiais sintetizados através das técnicas de Difração de Raios-X (DRX), Espectroscopia de Infravermelho (FT-IR) e Potencial Zeta. Além disso, realizar a imobilização por adsorção de enzimas lipases de origem fúngica (Lipase de *Thermomyces lanuginosus* (TLL) e Lipase de *Rhizomucor miehei* (RML)) nos suportes zeolíticos e estudar as propriedades dos complexos formados, como capacidade de imobilização e atividade catalítica. Finalmente, empregar os biocatalisadores preparados na produção do biodiesel de terceira geração via rota etílica.

3.2. Objetivos Específicos

- Síntese da zeólita X em escala nanométrica
- Realização de experimentos de troca iônica com os cátions lantanídeos Cério (Ce^{3+}), Disprósio (Dy^{3+}), Gadolínio (Gd^{3+}) e Lantânio (La^{3+}) em concentrações de 0,1M e 0,5M
- Caracterização do material sintetizado por Difração de Raios-X (DRX), Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) e Potencial Zeta.
- Determinação da concentração de proteínas das soluções de enzimas.
- Imobilização por adsorção de enzimas lipases de *Thermomyces lanuginosus* e *Rhizomucor miehei* sobre os materiais zeolíticos sintetizados
- Caracterização dos materiais com base em sua capacidade de imobilização enzimática medida através do ensaio de Bradford.
- Mensuração da atividade catalítica dos complexos preparados através do método titulométrico.
- Utilização dos complexos nanozeólita-enzima como catalisadores na reação de transesterificação de óleo de microalgas via rota etílica para a produção do Biodiesel.
- Caracterização dos produtos da reação de transesterificação através de experimentos de cromatografia de camada delgada e cromatografia gasosa.

4. Materiais e Métodos

4.1. Síntese da zeólita X em escala nanométrica (nano-X/Na)

Os reagentes utilizados para a síntese da nanozeólita X foram: aluminato de sódio (NaAlO_2); hidróxido de sódio (NaOH); dióxido de sódio (SiO_2 , Sigma-Aldrich) e água destilada (H_2O). Foram adicionados 5,34g de NaOH , 2,42g de NaAlO_2 , 3,43g de SiO_2 , e 50,0g de H_2O em um frasco de Teflon, e a solução foi deixada envelhecendo, em agitação, em temperatura ambiente por 24h. Logo após, o gel foi levado ao reator de microondas (CEM-Discovery) em um reator com volume de 80mL, onde permaneceu por 4 horas a 90°C , a uma potência máxima de 300W e pressão máxima de 190psi, com fluxo de ar ligado e agitação alta. Posteriormente o material foi centrifugado e lavado com água destilada, sendo esse procedimento repetido quatro vezes. Finalmente, o material foi levado para a estufa para secagem.

4.2. Síntese das nanozeólitas X modificadas com cátions lantanídeos através de procedimentos de troca iônica

Após a síntese nanozeólita nano-X/Na, parte do material foi submetido à troca iônica com os cátions lantanídeos Ce^{3+} , Dy^{3+} , Gd^{3+} e La^{3+} . As amostras obtidas foram identificadas como nano-X/-Ln/-c, em que a sigla “-Ln” indica o cátion utilizado e a letra “-c” indica a concentração da solução do cátion que foi utilizada no experimento. Todas as trocas iônicas foram executadas utilizando 1g da nano-X/Na em 30mL das respectivas soluções dos cátions.

A troca iônica foi realizada nas concentrações de 0,1M e 0,5 M, inicialmente mantida em agitação por 8h e posteriormente levada à estufa a 80°C por 16h. Feito isso, o material foi centrifugado e lavado com água destilada, sendo esse procedimento repetido quatro vezes e por último levado para a estufa para secagem. Após a troca iônica, os derivados do procedimento foram então denominados:

- Nano-X/Ce/0,1M
- Nano-X/Ce/0,5M
- Nano-X/Dy/0,1M
- Nano-X/Dy/0,5M
- Nano-X/Gd/0,1M
- Nano-X/Gd/0,5M
- Nano-X/La/0,1M
- Nano-X/La/0,5M

4.3. Caracterização por DRX

A caracterização por DRX foi realizada para verificação, a partir da comparação com o padrão de reflexões previsto na literatura, da formação da estrutura característica da nanozeólita X sintetizada de acordo com a seção 4.1, e também para a observação de possíveis alterações estruturais nos materiais de troca iônica devido à incorporação dos cátions lantanídeos. As análises foram realizadas em um aparelho *Rigaku Miniflex* (Tokyo, Japão) equipado com uma placa plana de geometria Bragg-Brentano e monocromador de grafite; operando com radiação Cu-K α ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$) com voltagem de 40 kV e corrente elétrica 40 mA. A radiação refletida foi coletada em intervalo $2\theta = 3\text{-}50^\circ$ com um passo de $0,02^\circ$ (taxa de 10s/ passo). Todos os materiais aqui sintetizados foram caracterizados por DRX.

4.4. Caracterização por FT-IR

Os espectros de FTIR foram coletados por meio de um espectrômetro SHIMADZU (IRTracer-100). Todas as amostras foram analisadas 32 vezes na capacidade de resolução espectral de 2 cm^{-1} entre 4000 cm^{-1} e 400 cm^{-1} . Todos os materiais aqui sintetizados foram caracterizados por FTIR.

4.5. Caracterização por potencial zeta

As análises de potencial zeta foram realizadas para todos os suportes sintetizados no presente trabalho, para o melhor entendimento da interação entre os suportes sólidos e as enzimas, dada a componente eletrostática dessa interação. As amostras foram preparadas em concentração de 1mg/mL dos materiais nanozeolíticos em tampão fosfato de sódio (pH 7,0; 10mM) (0,1 wt.%), e antes de serem levadas para as análises foram dispersadas com o auxílio de um sonicador por cerca de 20 minutos. As medidas foram realizadas por meio da mobilidade eletroforética utilizando-se um Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments).

4.6. Determinação das concentrações de proteínas das soluções de enzimas pelo padrão albumina de soro bovino (BSA)

As concentrações de proteínas das soluções de enzimas foram determinadas pelo padrão albumina de soro bovino (BSA), que consiste de uma solução de proteínas de concentração conhecida. Cinco amostras com diluições da BSA (1mg/mL) em reagente Bradford foram

preparadas em concentrações de 15µg/mL, 20µg/mL, 30µg/mL, 40µg/mL e 50µg/mL, como esquematizado na Tabela 2.

Tabela 2: Diluições de BSA em reagente Bradford preparadas

Amostra	Volume de BSA (µL)	Volume de Reagente Bradford (µL)	Concentração final da diluição (µg/mL)
1	15	985	15
2	20	980	20
3	30	970	30
4	40	960	40
5	50	950	50

Fonte: Autoria própria

Depois de preparadas, elas foram deixadas em repouso por 30 minutos para o equilíbrio da reação. Decorridos os 30 minutos as amostras foram levadas ao espectrofotômetro (UV-Vis Quimis Q798U) ajustado em 595nm, onde foram medidos os valores de absorbância de cada amostra. O gráfico de “Concentração x Absorbância” pode ser descrito pela equação de uma reta ($y = A + Bx$, onde “y” é a absorbância medida, “x” é a concentração da amostra, “A” é o ponto onde a reta intercepta o eixo “y” e “B” é o coeficiente angular da reta) devido ao seu caráter linear.

Com o padrão albumina de soro bovino obtido, o experimento foi repetido para as amostras das soluções de enzimas. Para tal, inicialmente foi preparada uma diluição de 100µL da solução de enzimas (TLL/RML, Sigma-Aldrich) em 900 µL de tampão fosfato de sódio (pH 7,0; 10mM) (1:9; v/v). Feito isso, 50µL dessa solução foi adicionada a 950µL do reagente Bradford, resultando em um volume de 5µL das soluções de enzimas na solução de análise que totaliza 1mL, e a mistura foi deixada em repouso por 30 minutos para o equilíbrio da reação. Decorridos os 30 minutos, as amostras foram novamente levadas ao espectrofotômetro (UV-Vis Quimis Q798U) ajustado em 595nm, onde foram medidos os valores de absorbância para cada amostra. As concentrações dessas diluições foram determinadas por comparação com os resultados obtidos para o padrão BSA.

A conversão das concentrações das diluições para as concentrações das soluções de enzimas foi realizada através da Equação 1, onde C_1 é a concentração da diluição encontrada diretamente da comparação com o padrão BSA, V_1 é o volume no qual a diluição tem concentração “ C_1 ” (1mL), C_2 é a concentração real da solução de enzimas (a ser calculada) e V_2 é o volume da solução de enzimas que de fato foi utilizado no experimento (5µL).

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

Equação 1: Equação para conversão das concentrações das diluições para as concentrações reais das soluções de enzimas

4.7. Imobilização das enzimas lipases sobre os suportes zeolíticos

Para a imobilização das enzimas lipases foi utilizado 250mg de material zeolítico, 4,5mL de tampão fosfato de sódio 100mM (pH 7,0), 0,5mL da solução de enzimas (TLL/RML, Sigma Aldrich) e 10μL de óleo de soja para ativação da enzima. Posteriormente, as imobilizações que apresentaram melhores atividades enzimáticas (TLL sobre os suportes: nano-X/Ce/0,5M; nano-X/Dy/0,1M; nano-X/Gd/0,1M/ nano-X/Gd/0,5M; e RML sobre os suportes: nano-X/Dy/0,1M; nano-X/Gd/0,5M) foram repetidas em tampão fosfato de sódio 10mM (pH 7,0) seguindo-se o mesmo protocolo, para análise das taxas de imobilização em menor força iônica, dada a natureza eletrostática da interação suporte-enzima. O procedimento foi feito em um frasco de vidro, onde foi pipetado o volume de tampão fosfato, o volume de enzima lipase e então adicionada a massa de material zeolítico (esse procedimento foi realizado com cada um dos materiais sintetizados). As soluções foram deixadas em agitação magnética (350-400rpm) em temperatura ambiente por 16h. Posteriormente o material foi centrifugado e lavado com água destilada. Então, o material foi deixado para secar em temperatura ambiente.

4.8. Ensaio de Bradford

O ensaio de Bradford foi utilizado no presente trabalho para determinação das taxas de imobilização e das massas de enzimas imobilizadas sobre cada suporte zeolítico. Da primeira centrifugação da solução de imobilização foi coletado o líquido sobrenadante, denominado água-mãe (contendo todas as enzimas que não foram imobilizadas). A água-mãe foi diluída em reagente Bradford na proporção de 19:1 (v/v) (*Bradford: água-mãe*) totalizando 1mL de solução. Essa mistura foi deixada em repouso por 30 minutos e então levada ao espectrofotômetro. Esse processo foi realizado para todos os materiais após o processo de imobilização.

Além disso, foi preparada uma solução padrão, contendo a mesma concentração de enzima presente no início do processo de imobilização, representando o cenário em que não há imobilização alguma, sendo esse padrão a solução referência à qual as outras foram comparadas. Essa solução foi diluída em reagente Bradford seguindo exatamente o mesmo protocolo exposto acima.

O espectrofotômetro (UV-Vis Quimis Q798U) foi utilizado na região de 595nm, como sugerido pelo fabricante do reagente Bradford. As medidas de absorbância foram realizadas em duplicata, e em comparação com a absorbância da solução padrão foram extraídas as informações a respeito da proporção de enzimas imobilizadas para cada um dos suportes.

Para mensuração da massa de enzima imobilizada por grama de cada suporte foram utilizados os dados a respeito das concentrações de proteínas das soluções de enzimas (como descrito na seção 4.6). Inicialmente foi calculada a massa total de enzima adicionada ao sistema no início do processo de imobilização através da Equação 2, onde M_{total} representa a massa total de enzima (mg) adicionada ao sistema (a ser calculada), 0,5 representa o volume da solução de enzimas utilizado no processo de imobilização (0,5mL) e C_e representa a concentração da solução de enzimas (mg/mL).

$$M_{total} = 0,5 \cdot C_e$$

Equação 2: Cálculo da massa total de enzima adicionada ao sistema no início do processo de imobilização

A partir disso, a taxa de imobilização fornece a massa de enzima imobilizada por grama de suporte através da Equação 3, onde M_{ei} representa a massa (mg) de enzimas imobilizadas por grama de suporte zeolítico (a ser calculado), M_{total} representa a massa total de enzima adicionada ao sistema no início do processo de imobilização (calculada através da Equação 2), T_i representa a taxa de imobilização das enzimas em cada suporte zeolítico e 0,250 representa a massa em gramas de suporte zeolítico adicionada no processo de imobilização (250mg, como descrito na seção 4.7).

$$M_{ei} = \frac{(M_{total} \cdot T_i)}{0,250}$$

Equação 3: Cálculo da massa de enzima imobilizada (mg) por grama de suporte

4.9. Atividade Enzimática (método titulométrico)

Em um frasco de vidro foram pipetados 1mL de tampão fosfato de sódio pH 7,0 (100mM; 10mM para as imobilizações realizadas em tampão fosfato de sódio 10mM), 1mL de óleo de oliva (Aldrich) e então adicionado 25mg do complexo nanozeólita-enzima (esse experimento foi realizado para cada um dos complexos preparados). Essa solução foi então

levada para um banho de silicone com temperatura entre 37°C – 39°C (temperatura ótima para a enzima) onde permaneceu por 30 minutos cronometrados com agitação magnética na faixa de 300rpm. Depois a solução foi centrifugada para separação dos catalisadores e a solução sobrenadante de tampão fosfato, óleo de oliva e ácidos graxos (possíveis produtos) foi transferida para um erlenmeyer resfriado contendo 2,5mL de álcool etílico 95% e 20µL de uma solução de fenolftaleína. Nessa mistura foi titulada uma solução previamente preparada de NaOH 0,05M até que ela atingisse a leve coloração rosada típica da fenolftaleína em meio básico, o que indica um pH no limiar neutro/básico. O mesmo experimento foi realizado na ausência de catalisador para determinação da acidez natural do óleo, a qual foi levada em consideração no processamento dos dados.

O volume da solução de NaOH titulado é relacionado à atividade enzimática do complexo utilizado através da Equação 4.

$$\text{Unidades/g-complexo} = \frac{(\text{NaOH})(\text{Molaridade de NaOH})(10^6)}{(30)(g \text{ do complexo})}$$

Equação 4: Determinação da atividade enzimática a partir do volume de NaOH titulado

Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade (µmol) de ácidos graxos produzidos em 1 minuto dentro das condições do ensaio. Sendo assim:

- NaOH: Volume em L
- Molaridade de NaOH: em mol/L
- 10⁶: Fator de conversão para microequivalentes
- Tempo 30: fator de conversão de 30 minutos para 1 minuto
- g de complexo: massa (g) do complexo nanozeólita-enzima utilizado

A atividade enzimática específica (atividade enzimática por miligrama de enzima) foi obtida substituindo-se a massa de complexo da Equação 4 pela massa (mg) de enzima imobilizada referente à quantidade do complexo nanozeólita-enzima utilizado nos testes de atividade (25mg), a qual é calculada sabendo-se a massa de enzima imobilizada por grama de suporte (vide seção 4.8).

Para determinação da atividade enzimática das enzimas livres foi realizado o mesmo procedimento experimental realizado para os testes enzimáticos dos complexos, substituindo-se a massa de complexo por um volume de 5µL das soluções de enzimas, cuja massa de enzima

associada foi determinada através das concentrações das soluções enzimas obtidas de acordo com a seção 4.6. A massa de enzima foi aplicada na equação Equação 4 para a obtenção da atividade enzimática por massa (mg) de enzima.

4.10. Produção do Biodiesel pela reação de transesterificação

Para a reação de transesterificação foram utilizados 1g de óleo de microalgas, 75mg do biocatalisador e 340 μ L de etanol. O volume de álcool foi adicionado em batelada alimentada para evitar a inativação das enzimas, tendo sido dividido em quatro seções iguais de 85 μ L, com uma delas no tempo zero de reação e as outras espaçadas em no mínimo 3h. A reação foi realizada em um banho de silicone com agitação magnética em torno 350rpm e temperatura controlada entre 37°C e 40°C, temperatura ideal para as enzimas. O tempo total de reação foi de 48h.

Após o procedimento os produtos de reação foram coletados, supostamente contendo o óleo não consumido, o álcool etílico não consumido, o catalisador, os ésteres etílicos formados e o glicerol. Essa mistura foi então centrifugada, para a remoção do catalisador e do glicerol. Por último a mistura resultante foi levada para a estufa a 80°C por 2h para a evaporação do etanol, restando então apenas o óleo não consumido e os ésteres etílicos supostamente formados na reação.

4.11. Cromatografia de camada delgada

A partir das misturas obtidas ao final de todo o procedimento mencionado na seção anterior, foi feita a análise por TLC para verificação da suposta produção dos ésteres etílicos. Para tal, 100 μ L das misturas foi adicionado a 500 μ L de hexano e a mistura foi agitada. Então 2 μ L dessa solução foram aplicados a uma placa de sílica gel. Esse procedimento foi realizado para todos os produtos das reações de transesterificação em uma mesma placa de sílica gel, juntamente com 2 μ L de uma solução padrão de comparação contendo 100 μ L de óleo e 500 μ L de hexano.

A placa de sílica foi então levada à câmara de desenvolvimento contendo a quantidade de solvente de desenvolvimento (solução previamente preparada composta de hexano, acetato de etila e ácido acético, na proporção de 90:10:1 respectivamente) suficiente para preencher a câmara até cerca de 1cm de altura. A placa de sílica foi deixada descansando na câmara até que o solvente alcançasse altura suficiente para a verificação das informações de interesse. Logo

após a placa foi retirada da câmara de desenvolvimento e levada a uma câmara fechada contendo cristais de iodo.

4.12. Cromatografia gasosa

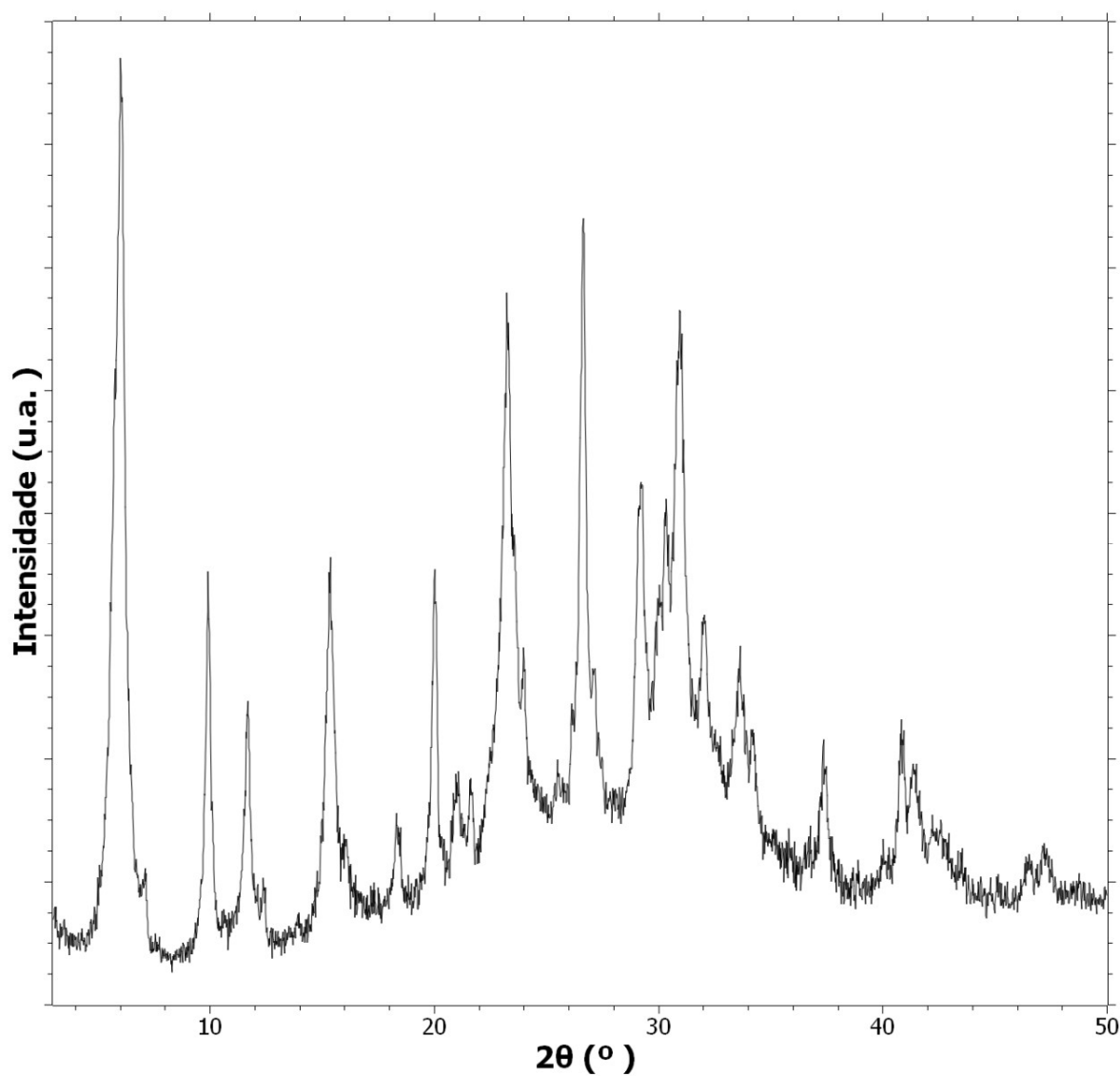
As análises foram realizadas em um cromatógrafo a gás HP 6890 equipado com detector por ionização em chama e coluna HP-Innowax (comprimento: 30m; diâmetro interno: 530mm; espessura do filme: 1mm). Volumes de 1mL de solução de amostra foram injetados manualmente em triplicata no modo splitless. As temperaturas do injetor e do forno foram ajustadas em 220°C e do detector em 250°C. H₂ foi utilizado como gás de arraste a uma pressão constante de 3,93psi. A seletividade do método foi comprovada por comparação entre cromatogramas da amostra de biodiesel com e sem a adição do padrão interno. A precisão instrumental foi determinada através das medidas dos tempos de retenção e das áreas dos principais picos do cromatograma. Foram realizadas 8 injeções consecutivas de uma mesma solução. A precisão para cada parâmetro foi expressa através do desvio-padrão relativo (DPR). A exatidão foi avaliada por comparação com o método EN14103, o qual utiliza heptadecanoato de metila como padrão interno. A precisão intermediária foi determinada a partir de 3 resultados obtidos em dias diferentes por dois analistas distintos.

5. Resultados e Discussões

5.1. Caracterização dos materiais sintetizados por Difração de Raios-X (DRX)

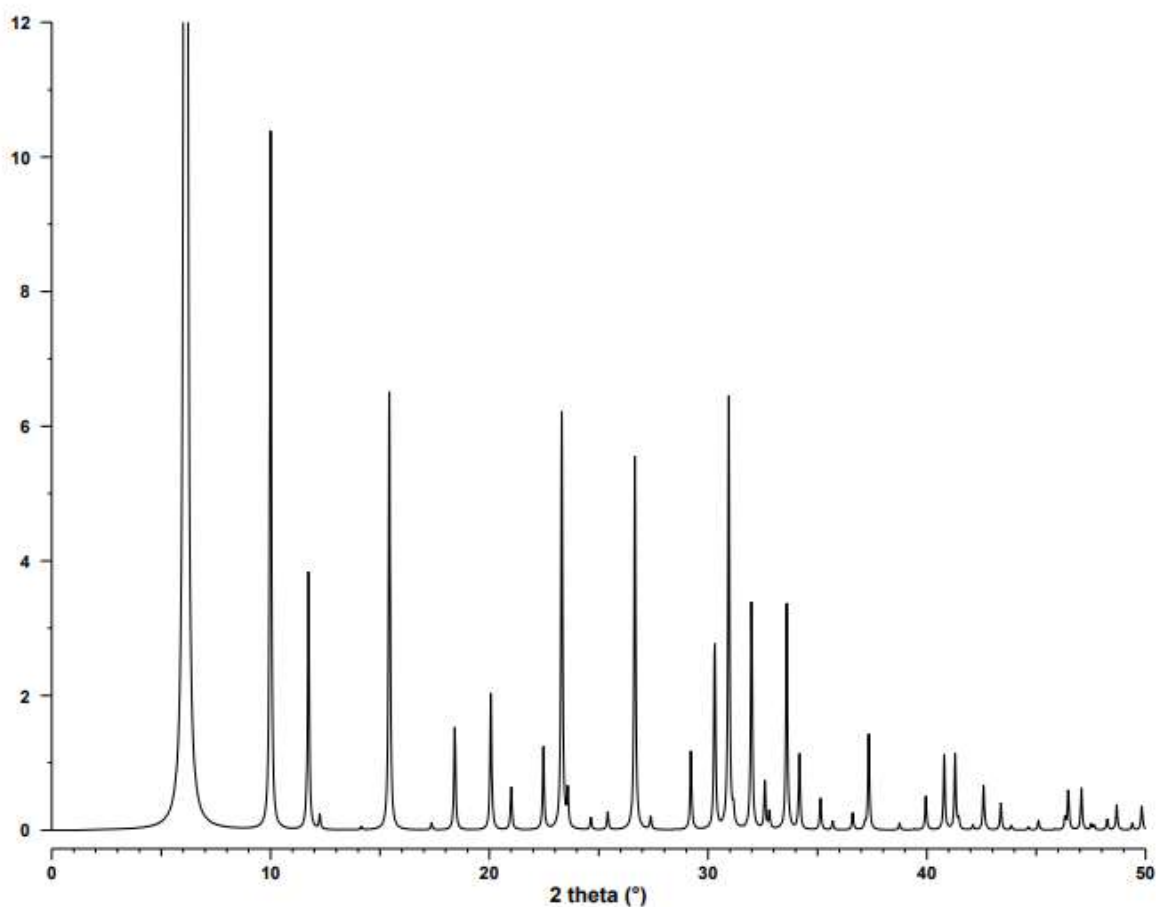
As análises de DRX foram realizadas de acordo com a seção 4.3. Na Figura 11 se encontra o difratograma do material zeolítico sintetizado em sua forma sódica (nano-X/Na) e na Figura 12 o difratograma teórico da zeólita Faujasita Tipo X de acordo com a *International Zeolite Association* (IZA).

Figura 11: Padrão de difração de raios-X da zeólita nano-X/Na sintetizada



Fonte: Autoria própria

Figura 12: Difratoograma teórico da nanozeólita Faujasita tipo X (Hidratada)

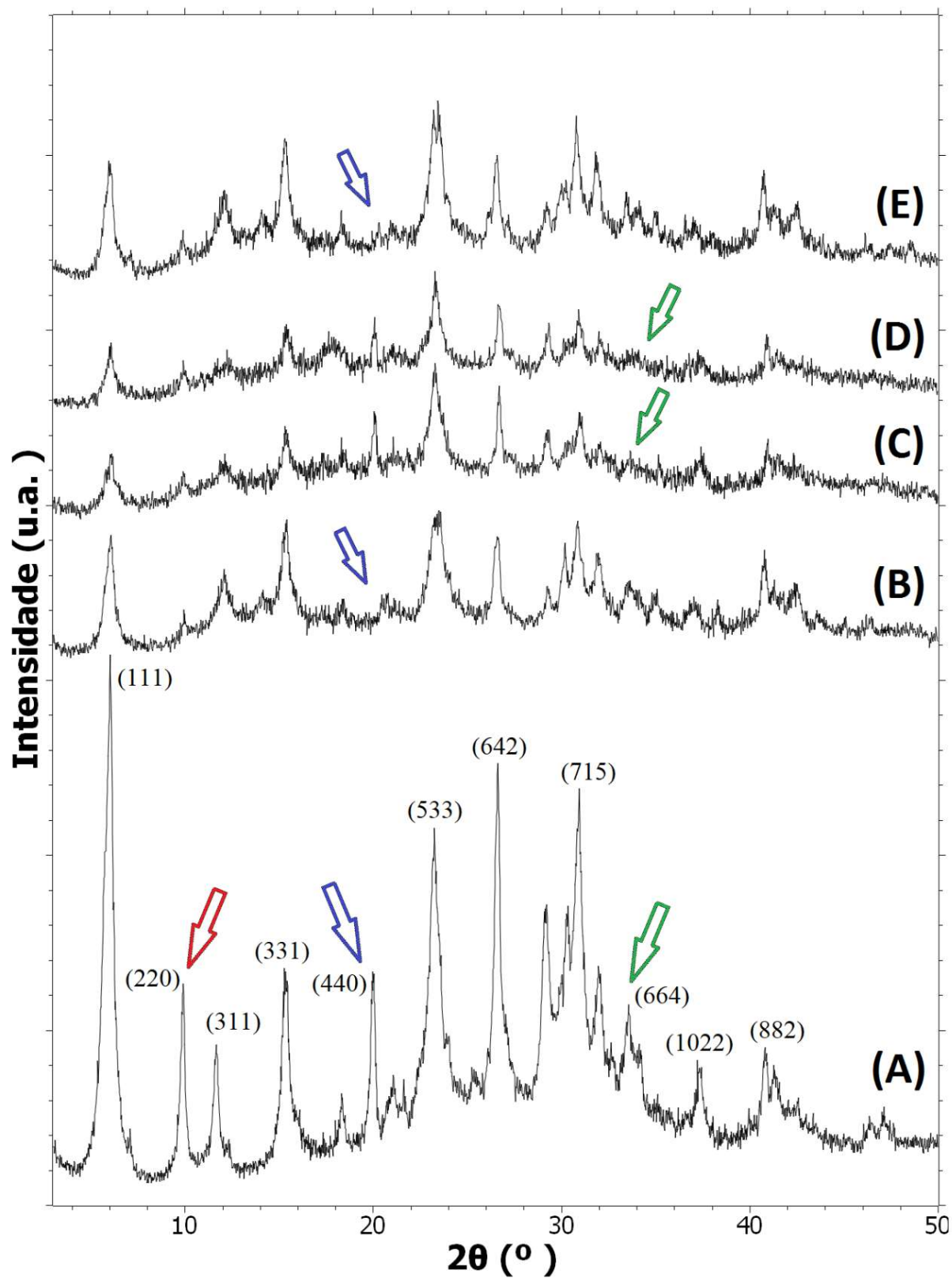


Fonte: IZA

Pode-se observar que o difratograma do material sintetizado exhibe o padrão de reflexões característico de Faujasita Tipo X quando comparado com o padrão estabelecido na IZA, o que indica que a síntese do material ocorreu como esperado.

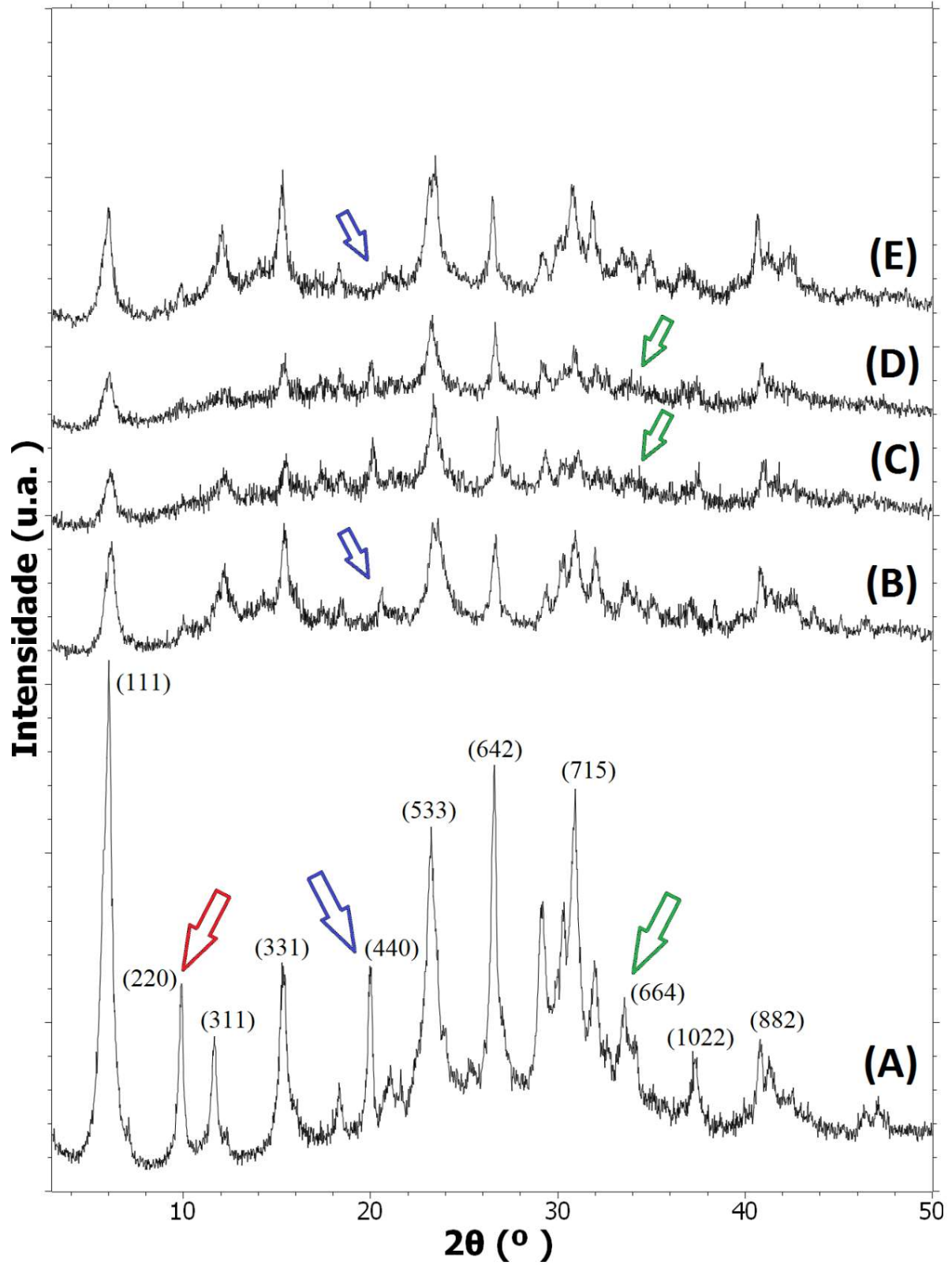
Além disso, os padrões de difração de raios-X para os materiais trocados com os cátions lantanídeos foram coletados para comparação com o padrão obtido para a zeólita em sua forma sódica, com o intuito de investigação dos possíveis impactos estruturais devido à incorporação desses íons. Os difratogramas dos materiais trocados com os cátions lantanídeos empregando-se soluções em concentração de 0,1M se encontram na Figura 13 e em concentração de 0,5M na Figura 14.

Figura 13: Difratomogramas dos materiais de troca iônica em concentração de 0,1M com: (A) Original com Sódio; (B) Cério; (C) Disprósio; (D) Gadolínio; (E) Lantânio.



Fonte: Autoria própria

Figura 14: Difratomogramas dos materiais de troca iônica em concentração de 0,5M com: (A) Original com Sódio; (B) Cério; (C) Disprósio; (D) Gadolínio; (E) Lantânio.



Fonte: Autoria própria

Pode-se notar uma diminuição na intensidade dos picos de difração dos materiais que passaram pela troca iônica, provavelmente devido a uma leve amorfização consequente da acomodação dos cátions lantanídeos em suas estruturas, o que pode ter gerado algum tipo de distorção na rede cristalina. No entanto, a maioria das reflexões presentes no material original ainda está presente nos difratogramas dos produtos de troca iônica, o que indica que para todos os materiais a estrutura foi parcialmente mantida.

O diâmetro médio das partículas sintetizadas pode ser estimado através da equação de Scherrer (Equação 5), que correlaciona as características das reflexões obtidas com o tamanho das partículas do material.

$$D = \frac{K\lambda}{\beta \cos \theta}$$

Equação 5: Equação de Scherrer para estimar diâmetro médio das partículas

Onde K é uma constante que depende do formato do material (nesse caso $K \approx 0,9$), λ é o comprimento de onda do raio-X incidente, β é a largura a meia altura da reflexão mais intensa e o ângulo θ é o ângulo de Bragg do pico de difração mais intenso. Os valores calculados se encontram na Tabela 3.

Tabela 3: Tamanho médio das partículas dos materiais sintetizados pela equação de Scherrer

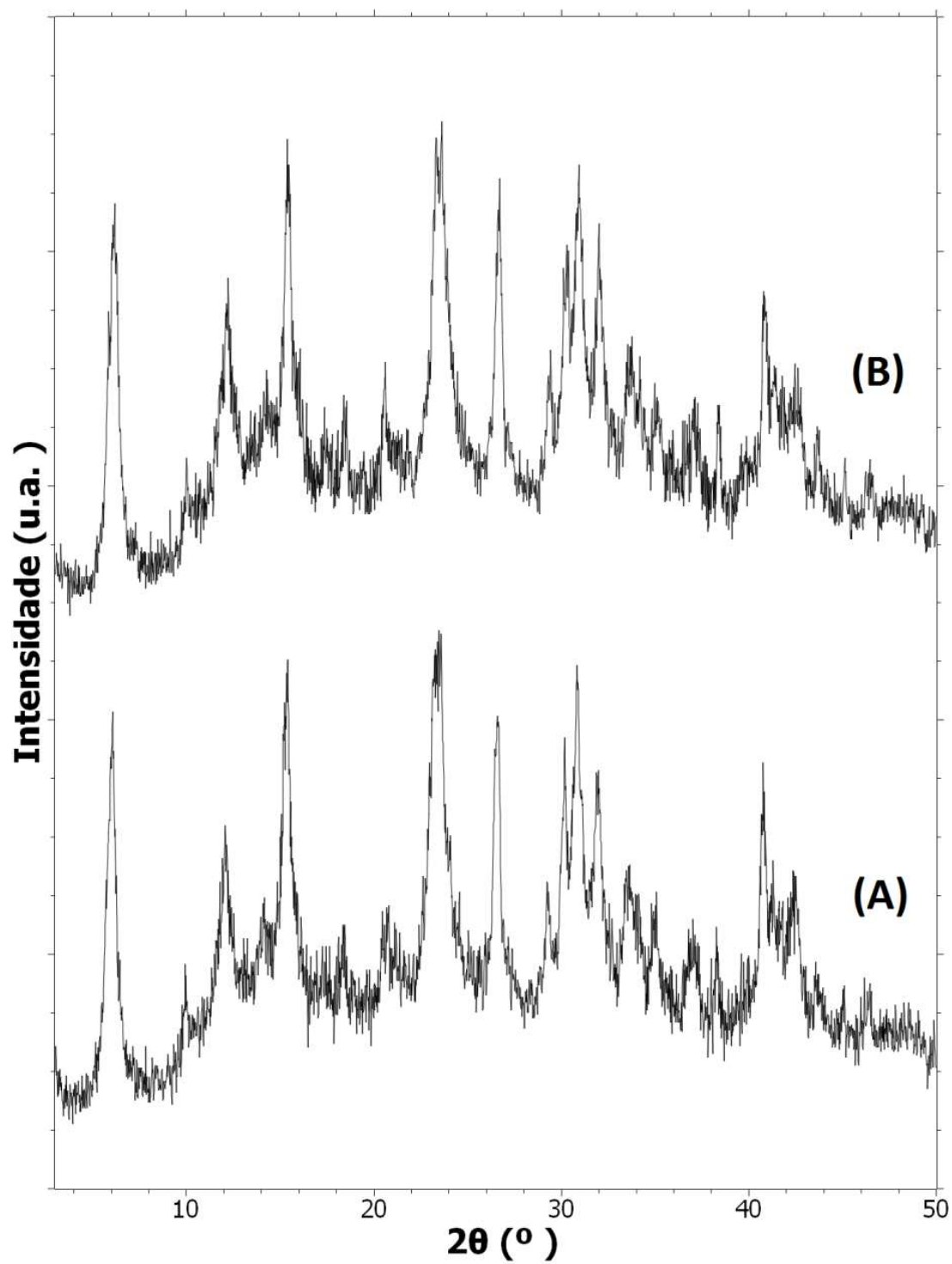
Materiais	Diâmetro médio das partículas (nm)
Nano-X/Na	14,66
Nano-X/Ce/0,1M	8,82
Nano-X/Dy/0,1M	13,29
Nano-X/Gd/0,1M	23,14
Nano-X/La/0,1M	12,49
Nano-X/Ce/0,5M	9,62
Nano-X/Dy/0,5M	15,29
Nano-X/Gd/0,5M	16,21
Nano-X/La/0,5M	12,31

Fonte: Autoria própria

Ainda que quantitativamente imprecisos, os resultados obtidos indicam que os materiais foram sintetizados em escala nanométrica, de acordo com o esperado.

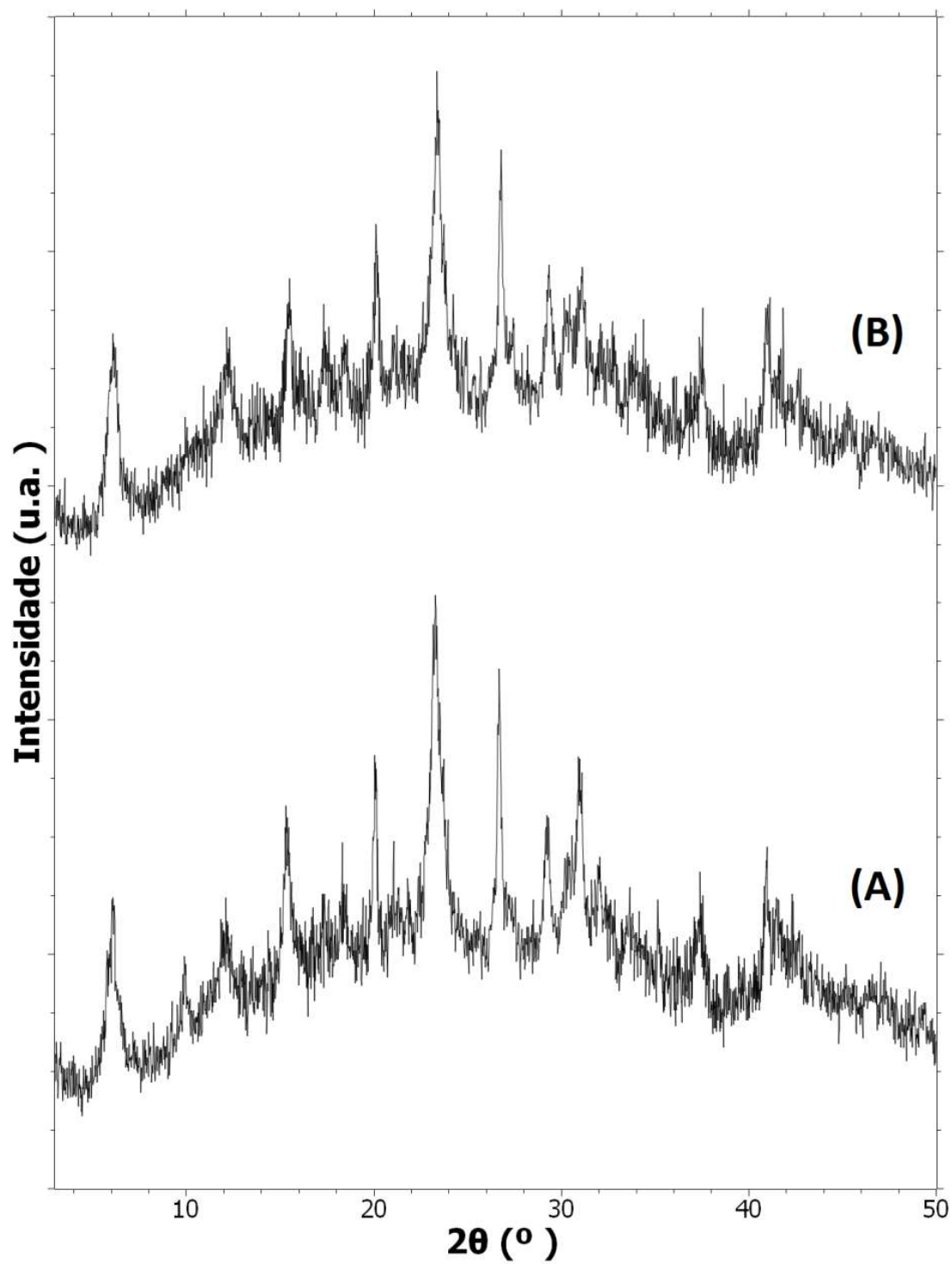
Na Figura 15, Figura 16, Figura 17 e Figura 18 é possível comparar os difratogramas dos materiais de troca iônica com o mesmo cátion em concentrações diferentes.

Figura 15: Difratogramas dos materiais de troca iônica com Cério em concentração de: (A) 0,1M; (B) 0,5M



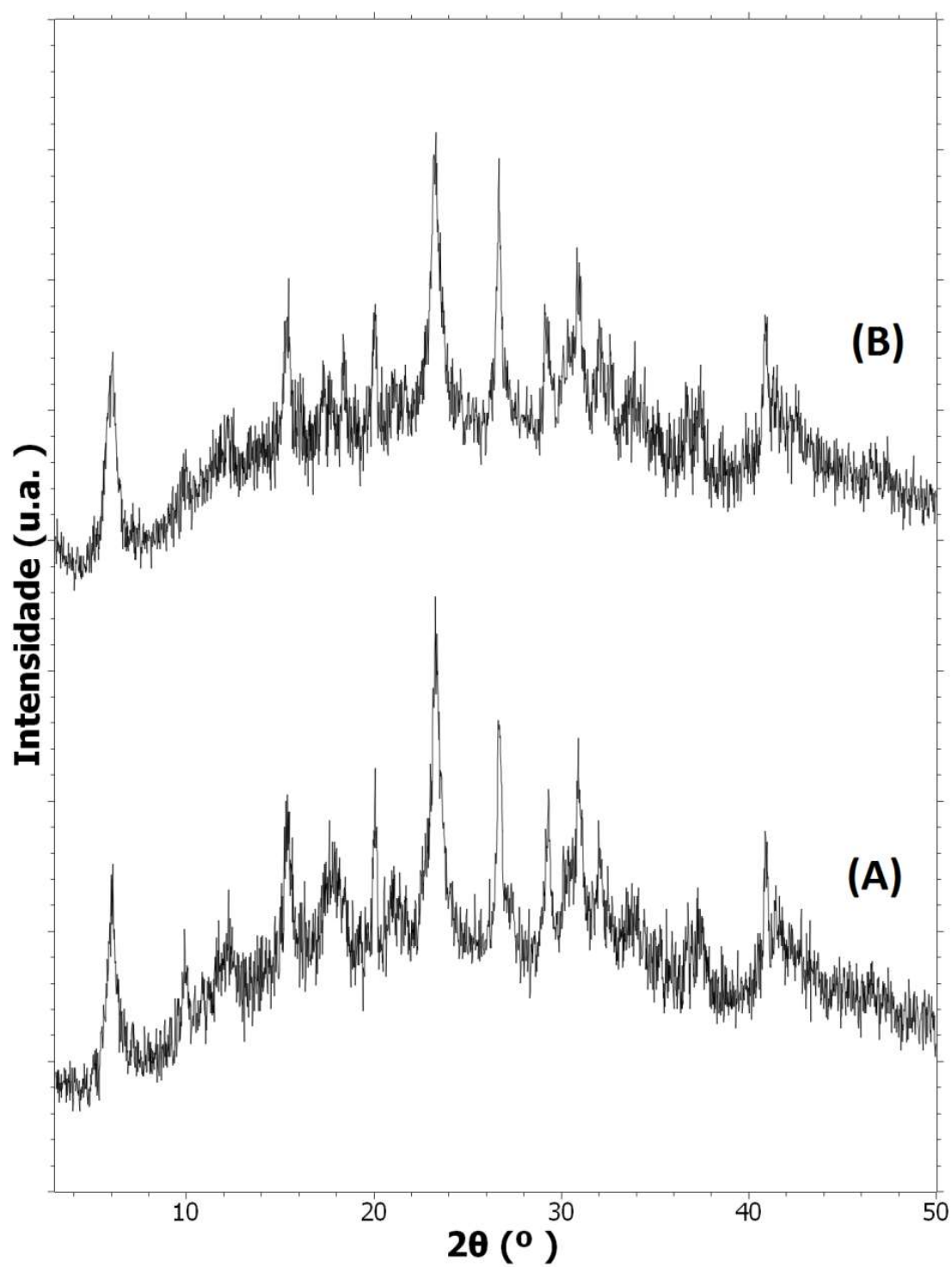
Fonte: Autoria própria

Figura 16: Difratogramas dos materiais de troca iônica com Disprósio em concentração de: (A) 0,1M; (B) 0,5M



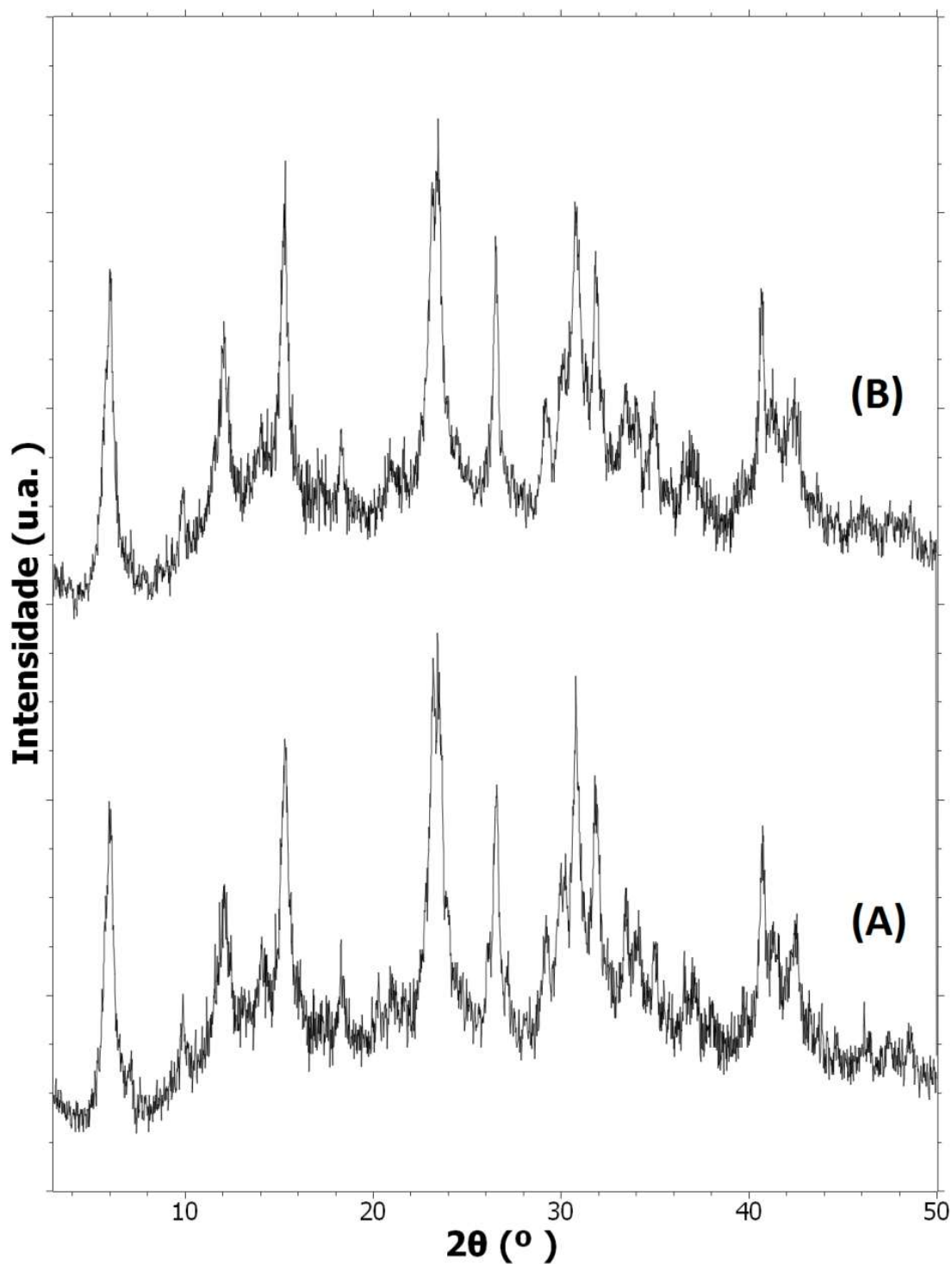
Fonte: Autoria própria

Figura 17: Difratogramas dos materiais de troca iônica com Gadolínio em concentração de: (A) 0,1M; (B) 0,5M



Fonte: Autoria própria

Figura 18: Difratogramas dos materiais de troca iônica com Lantânio em concentração de: (A) 0,1M; (B) 0,5M



Fonte: Autoria própria

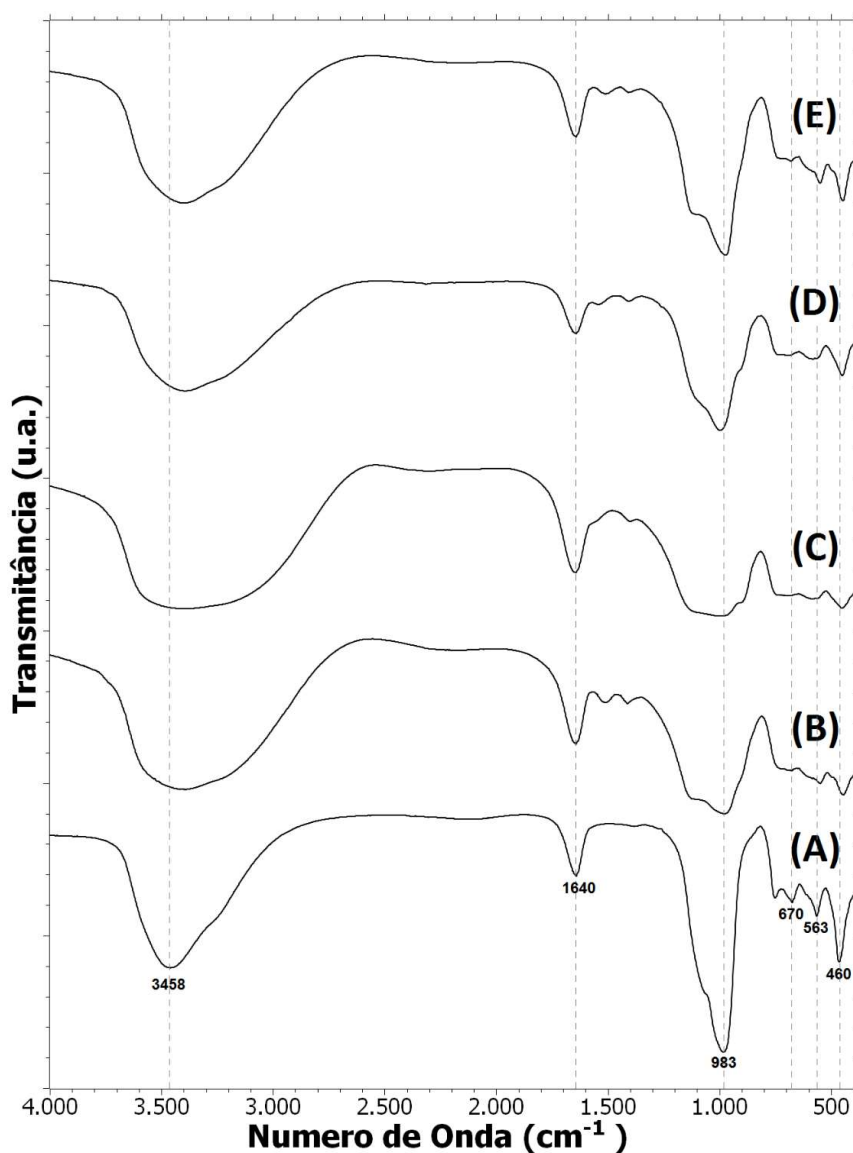
Os difratogramas evidenciam que a concentração (0,1M ou 0,5M) na qual a troca iônica é realizada com os cátions lantanídeos não influencia de forma significativa a estrutura

crystalina das zeólitas, já que nesses casos a maior parte dos picos de difração se mantém inalterados com apenas poucas leves alterações de intensidade.

5.2. Caracterização dos materiais por Espectroscopia de Infravermelho (FT-IR)

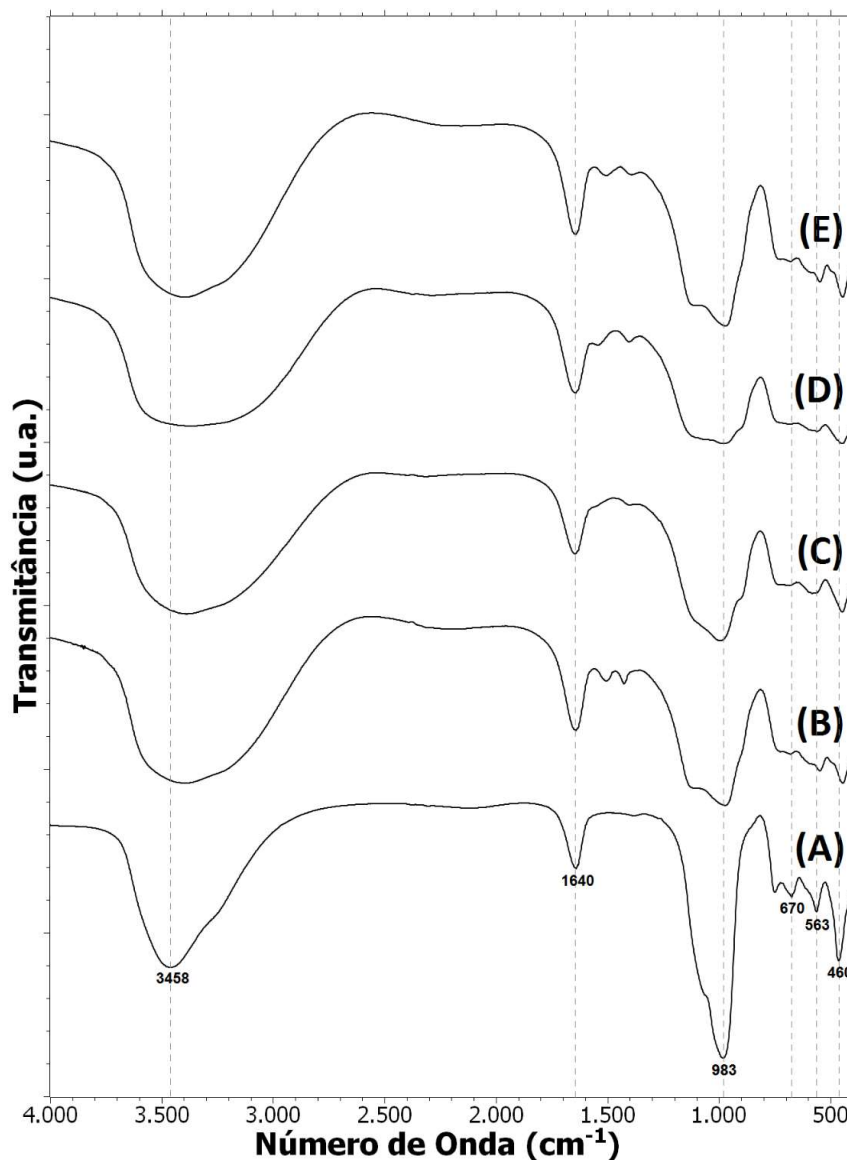
Os materiais foram caracterizados por FT-IR para o entendimento do impacto da incorporação dos cátions lantanídeos nas ligações químicas que compõem a estrutura do material zeolítico. Os espectros obtidos se encontram na Figura 19 e na Figura 20.

Figura 19: Espectros de infravermelho com transformada de Fourier dos materiais de troca iônica em concentração de 0,1M com: (A) Forma sódica; (B) Cério; (C) Disprósio; (D) Gadolínio; (E) Lantânio.



Fonte: Autoria própria

Figura 20: Espectros de infravermelho com transformada de Fourier dos materiais de troca iônica em concentração de 0,5M com: (A) Forma sódica; (B) Cério; (C) Disprósio; (D) Gadolínio; (E) Lantânio.



Fonte: Autoria própria

As bandas que se localizam na região de 450-1200 cm^{-1} são referentes aos estiramentos das ligações entre Si-O-Al, Si-O-Si, Si-O e Al-O, ou seja, as ligações que formam a base da estrutura cristalina dos materiais zeolíticos (FLANIGEN; KHATAMI; SZYMANSKI, 1974). Pequenas alterações nessa região do espectro podem acarretar em mudanças estruturais significativas. É visível que todos os materiais trocados com os lantanídeos sofreram alterações (mesmo que pequenas) nessa região com relação ao material original, o que indica que todos sofreram um nível de alteração estrutural. Esses dados juntamente aos difratogramas apresentados na seção 5.1 corroboram a hipótese de que a estrutura cristalina sofreu certa

amorfização ao acomodar os cátions lantanídeos, mas ainda manteve parcialmente a estrutura cristalográfica do material original.

A banda localizada em aproximadamente 660 cm^{-1} pode ser atribuída ao estiramento das ligações Ln-O-Si-O, onde Ln representa os cátions lantanídeos.

A banda em torno de 1600 cm^{-1} corresponde a fase adsorvida dos materiais, consistida basicamente de água, não tendo muita relevância para a análise estrutural.

Assim como as caracterizações por DRX, as análises de infravermelho sugerem que a concentração de troca iônica (0,1M ou 0,5M) não é um fator muito relevante no âmbito das alterações estruturais.

5.3. Caracterização dos materiais por Potencial Zeta

As análises de potencial zeta dos suportes nanozeolíticos foram realizadas pois a densidade de carga superficial é um fator relevante dada a aplicação dos materiais como suportes de imobilização. Ainda que essas medidas não forneçam diretamente informações a respeito da carga superficial dos materiais, o potencial zeta surge como consequência dessas cargas. As medidas foram realizadas como descritas na seção 4.5 e se encontram na Tabela 4.

Tabela 4: Potencial zeta dos materiais zeolíticos

Materiais	Potencial Zeta (mV)
Nano-X/Na	$-34,9 \pm 1,4$
Nano-X/Ce/0,1M	$-31,7 \pm 1,1$
Nano-X/Ce/0,5M	$-28,7 \pm 0,7$
Nano-X/Dy/0,1M	$-21,7 \pm 0,9$
Nano-X/Dy/0,5M	$-23,6 \pm 0,9$
Nano-X/Gd/0,1M	$-25,8 \pm 1,1$
Nano-X/Gd/0,5M	$-25,2 \pm 1,2$
Nano-X/La/0,1M	$-27,2 \pm 0,7$
Nano-X/La/0,5M	$-24,2 \pm 1,1$

Fonte: Autoria própria

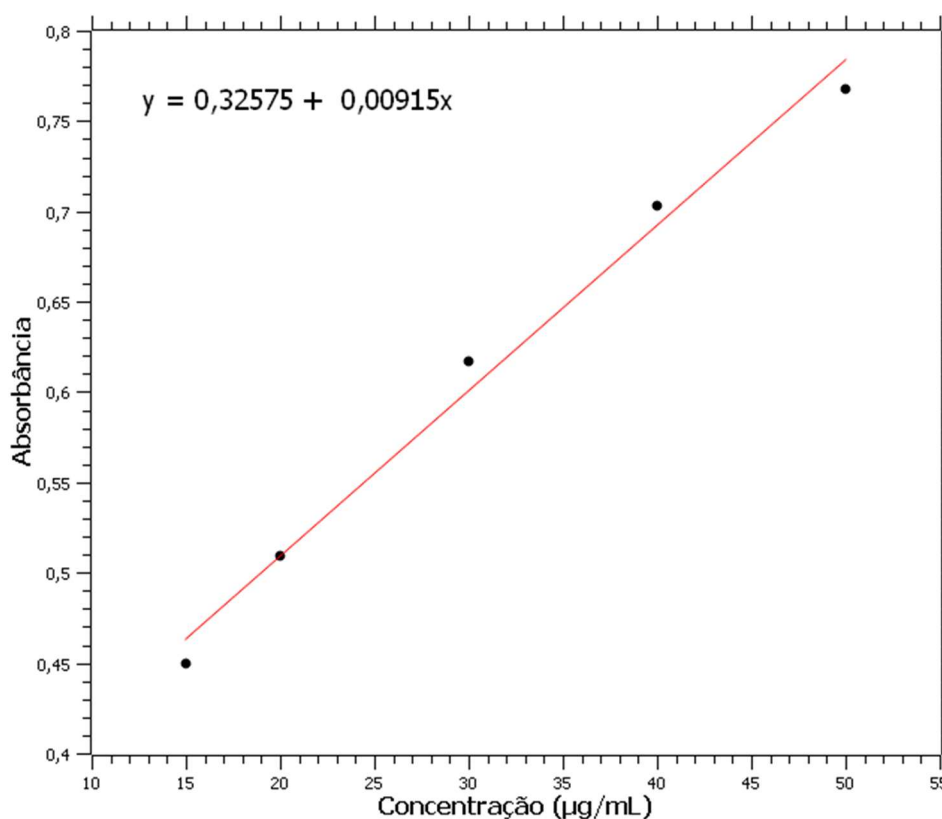
Os valores negativos do potencial zeta indicam que para todos os suportes há uma prevalência de cargas negativas em suas superfícies. No entanto, a troca iônica com os cátions lantanídeos acarretou em uma queda (em módulo) dos potenciais negativos de todos os suportes. Embora a troca iônica, a princípio, não altere a carga líquida global do material, os íons adicionados podem se ligar a pontos diferentes da estrutura devido às suas características particulares. Os dados de potencial zeta indicam que parte dos cátions lantanídeos incorporados

ao sistema podem ter permanecido na superfície dos materiais, consequentemente deslocando a carga **superficial** líquida para valores mais positivos.

5.4. Determinação da concentração de proteínas das soluções de enzimas

A concentração de proteínas das soluções de enzimas foi determinada utilizando-se o padrão albumina de soro bovino como referência, como exposto na seção 4.6. Os dados de absorvância obtidos foram utilizados na produção do gráfico de “Concentração x Absorvância” que se encontra na Figura 21.

Figura 21: Gráfico de “Concentração x Absorvância” para as diferentes concentrações do padrão albumina de soro bovino



Fonte: Autoria própria

Os valores de absorvância das diluições das soluções de enzimas em tampão fosfato e reagente Bradford foram obtidos de acordo com a seção 4.6, assim como os cálculos para conversão da concentração de proteínas das diluições para a concentração real das soluções de enzimas. Os resultados se encontram na Tabela 5.

Tabela 5: Valores de absorbância medidas e concentrações calculadas para as diluições das soluções de enzimas e para as soluções de enzimas

Amostra	Absorbância Média	Concentração da diluição da solução de enzimas ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração da solução de enzimas (mg/mL)
TLL	0,676	38,89	7,78
RML	0,446	13,33	2,67

Fonte: Autoria própria

5.5. Determinação das taxas de imobilização pelo Ensaio de Bradford

O ensaio de Bradford foi realizado de acordo com a seção 4.8 para mensuração da quantidade de enzima (*Thermomyces lanuginosus* e *Rhizomucor miehei*) adsorvida sobre os suportes zeolíticos após os experimentos de imobilização enzimática descritos na seção 4.7. Dessa forma, os dados de absorbância já processados forneceram os resultados que se encontram na Tabela 6, para as imobilizações realizadas em tampão fosfato 100mM, e na Tabela 7, para as imobilizações realizadas em tampão fosfato 10mM. A massa de enzima imobilizada por grama do suporte foi calculada de acordo com a seção 4.8 (concentrações das soluções de enzimas na Tabela 5).

Tabela 6: Taxas de imobilização obtidas pelo Ensaio de Bradford e massa de enzima imobilizada em cada suporte (tampão fosfato 100mM)

Materiais	Imobilização Média (%)		Massa de enzima imobilizada por grama do suporte (mg)	
	TLL	RML	TLL	RML
Nano-X/Na	$14,5 \pm 1,6$	$12,2 \pm 2,4$	$2,2 \pm 0,2$	$0,6 \pm 0,1$
Nano-X/Ce/0,1M	$14,6 \pm 1,1$	$6,1 \pm 2,6$	$2,3 \pm 0,2$	$0,3 \pm 0,1$
Nano-X/Ce/0,5M	$2,1 \pm 0,8$	$11,0 \pm 1,8$	$0,3 \pm 0,1$	$0,6 \pm 0,1$
Nano-X/Dy/0,1M	$6,7 \pm 1,0$	$19,7 \pm 1,3$	$1,0 \pm 0,1$	$1,0 \pm 0,1$
Nano-X/Dy/0,5M	$16,4 \pm 1,2$	$18,1 \pm 2,1$	$2,6 \pm 0,2$	$1,0 \pm 0,1$
Nano-X/Gd/0,1M	$7,3 \pm 1,0$	$27,2 \pm 1,6$	$1,1 \pm 0,1$	$1,4 \pm 0,1$
Nano-X/Gd/0,5M	$9,2 \pm 0,8$	$8,9 \pm 1,6$	$1,4 \pm 0,1$	$0,5 \pm 0,1$
Nano-X/La/0,1M	$3,3 \pm 0,9$	$1,7 \pm 1,4$	$0,5 \pm 0,1$	$0,1 \pm 0,1$
Nano-X/La/0,5M	$6,1 \pm 0,8$	$13,9 \pm 2,5$	$1,0 \pm 0,1$	$0,7 \pm 0,1$

Fonte: Autoria própria

Tabela 7: Taxas de imobilização obtidas pelo Ensaio de Bradford e massa de enzima imobilizada em cada suporte (tampão fosfato 10mM)

Materiais	Imobilização Média (%)		Massa de enzima imobilizada por grama do suporte (mg)	
	TLL	RML	TLL	RML
Nano-X/Ce/0,5M	99,2 ± 0,3	-	15,4 ± 0,1	-
Nano-X/Dy/0,1M	100,0 ± 0,2	82,7 ± 0,3	15,6 ± 0,1	4,4 ± 0,1
Nano-X/Gd/0,1M	94,4 ± 0,2	-	14,7 ± 0,1	-
Nano-X/Gd/0,5M	99,9 ± 0,2	98,7 ± 0,2	15,6 ± 0,1	5,3 ± 0,1

Fonte: Autoria própria

Em tampão fosfato 100mM os dados da Tabela 6 mostram que para a TLL a maioria das trocas iônicas diminuiu a capacidade de imobilização dos suportes zeolíticos, com exceção dos materiais nano-X/Ce/0,1M e nano-X/Dy/0,5M. Para a RML resultados semelhantes foram obtidos, com apenas os materiais nano-X/Dy/0,1M, nano-X/Dy/0,5M e nano-X/Gd/0,1M apresentando melhora na capacidade de imobilização com relação ao suporte em sua forma sódica. A concentração da troca iônica não apresenta consequência clara para todos os suportes. Em maior força iônica é esperado que as interações eletrostáticas entre os suportes e as enzimas sejam atenuadas devido à maior quantidade de íons presente em solução e, portanto, o direcionamento da imobilização enzimática talvez tenha uma componente entrópica (como apontado na seção 2.2) mais relevante.

As imobilizações realizadas em menor força iônica apresentaram melhores taxas de imobilização de acordo com a Tabela 7, com todas as imobilizações acima de 90%, exceto pela imobilização de RML sobre o suporte nano-X/Dy/0,1M que apresentou imobilização de 82,7%. Essas melhores taxas de imobilização ocorrem devido à menor competitividade com os íons do meio durante o processo de adsorção iônica. Nesse caso é provável que as interações eletrostáticas entre os suportes e as enzimas sejam dominantes no sistema e estejam direcionando a imobilização. Ainda que as enzimas lipases em pH 7,0 apresentem carga superficial líquida negativa e os suportes nanozeolíticos também (como sugerido pelos dados de potencial Zeta na Tabela 4), é importante notar que assim como as enzimas, esses suportes possuem caráter heterofuncional, apresentando regiões com maior densidade de cargas positivas e regiões com maior densidade de cargas negativas em suas superfícies. Isso é fundamental para que a imobilização por forças eletrostáticas seja possível.

Algumas imobilizações de TLL apresentaram maior massa de enzimas imobilizadas do que algumas imobilizações de RML que apresentaram melhores taxas de imobilização. Isso ocorre devido a maior carga enzimática de TLL oferecida no processo de imobilização, pois

ainda que o volume das soluções de enzimas adicionadas ao sistema tenha sido o mesmo para ambas enzimas, a solução de TLL é mais concentrada, como observado na Tabela 5.

Apesar dos difratogramas expostos na Figura 13 e na Figura 14 indicarem que a estrutura cristalina geral da nano-X/Na foi mantida ao menos parcialmente nos materiais de troca iônica, os resultados obtidos de imobilização (em ambas concentrações de tampão) variaram significativamente em relação ao material original, sugerindo que a natureza do cátion utilizado tem um papel fundamental na interação zeólita-enzima.

Em tampão fosfato 100mM, o suporte que apresentou melhor resultado para a TLL foi o nano-X/Dy/0,5M com 16,4% de imobilização (2,6mg de enzimas por grama do suporte) e para a RML foi o material nano-X/Gd/0,1M, com 27,2% de imobilização (1,4mg de enzimas por grama do suporte), representando aumentos de aproximadamente 13% e 123% respectivamente com relação às imobilizações sobre nano-X/Na.

Em tampão fosfato 10mM, os materiais que apresentaram melhores resultados para a TLL foram: nano-X/Ce/0,5M, nano-X/Dy/0,1M e nano-X/Gd/0,5M, todos com aproximadamente 100,0% de imobilização (aproximadamente 15,6mg de enzimas por grama de suporte). Para a RML o suporte nano-X/Gd/0,5M apresentou melhor capacidade de imobilização, com 98,7% da carga enzimática fornecida imobilizada (5,3mg de enzimas por grama do suporte).

5.6. Determinação da atividade enzimática dos complexos pelo método titulométrico

Os dados de atividade enzimática foram coletados através do método titulométrico descrito na seção 4.9 para cada um dos complexos preparados. Os resultados obtidos para as imobilizações realizadas em tampão fosfato 100mM se encontram na Tabela 8 para os complexos de TLL e na Tabela 9 para os complexos de RML. A atividade das enzimas livres, determinada como descrito na seção 4.9, também foi adicionada às tabelas para efeito comparativo, assim como as massas de enzimas imobilizadas calculadas na seção anterior.

Tabela 8: Valores de atividade catalítica para cada um dos complexos preparados com TLL em tampão fosfato 100mM

Materiais	Atividade por grama do complexo (U/g)	Massa de enzima imobilizada por grama do suporte (mg)	Atividade por mg de enzima imobilizada (U/mg)
<i>TLL Livre</i>	-	-	$469,1 \pm 57,8$
Nano-X/Na	$21,7 \pm 1,7$	$2,2 \pm 0,2$	$9,8 \pm 0,8$
Nano-X/Ce/0,1M	$65,0 \pm 6,7$	$2,3 \pm 0,2$	$29,2 \pm 2,9$
Nano-X/Ce/0,5M	$333,3 \pm 31,7$	$0,3 \pm 0,1$	$1214,3 \pm 119,0$
Nano-X/Dy/0,1M	$445,0 \pm 68,3$	$1,0 \pm 0,1$	$455,0 \pm 78,3$
Nano-X/Dy/0,5M	$260,0 \pm 11,7$	$2,6 \pm 0,2$	$102,6 \pm 5,1$
Nano-X/Gd/0,1M	$320,0 \pm 6,7$	$1,1 \pm 0,1$	$302,5 \pm 6,2$
Nano-X/Gd/0,5M	$463,3 \pm 11,7$	$1,4 \pm 0,1$	$339,3 \pm 8,3$
Nano-X/La/0,1M	$75,0 \pm 23,3$	$0,5 \pm 0,1$	$159,7 \pm 62,5$
Nano-X/La/0,5M	$41,7 \pm 3,3$	$1,0 \pm 0,1$	$43,3 \pm 3,3$

Fonte: Autoria própria

Tabela 9: Valores de atividade catalítica para cada um dos complexos preparados com RML em tampão fosfato 100mM

Materiais	Atividade por grama do complexo (U/g)	Massa de enzima imobilizada por grama do suporte (mg)	Atividade por mg de enzima imobilizada (U/mg)
<i>RML Livre</i>	-	-	$520,1 \pm 18,8$
Nano-X/Na	$15,0 \pm 1,7$	$0,6 \pm 0,1$	$25,0 \pm 2,8$
Nano-X/Ce/0,1M	$50,0 \pm 21,7$	$0,3 \pm 0,1$	$178,6 \pm 83,3$
Nano-X/Ce/0,5M	$31,7 \pm 1,7$	$0,6 \pm 0,1$	$52,8 \pm 2,8$
Nano-X/Dy/0,1M	$216,7 \pm 81,7$	$1,0 \pm 0,1$	$265,3 \pm 94,7$
Nano-X/Dy/0,5M	$75,0 \pm 6,7$	$1,0 \pm 0,1$	$75,0 \pm 5,0$
Nano-X/Gd/0,1M	$41,7 \pm 3,3$	$1,4 \pm 0,1$	$31,0 \pm 2,4$
Nano-X/Gd/0,5M	$88,3 \pm 3,3$	$0,5 \pm 0,1$	$187,5 \pm 6,9$
Nano-X/La/0,1M	$80,0 \pm 5,0$	$0,1 \pm 0,1$	$1020,8 \pm 62,5$
Nano-X/La/0,5M	$61,7 \pm 23,3$	$0,7 \pm 0,1$	$93,1 \pm 34,3$

Fonte: Autoria própria

Os catalisadores que apresentaram melhores atividades enzimáticas por massa de complexo para cada uma das enzimas foram o nano-X/Gd/0,5M para a TLL com 463,3U/g e o nano-X/Dy/0,1M para a RML com 216,7U/g, sendo que na média os complexos de TLL se mostraram mais ativos. Isso pode ser devido às maiores quantidades absolutas de enzimas adsorvidas (Tabela 6).

Na maioria dos casos a atividade por massa de enzima adsorvida ficou abaixo da atividade das enzimas livres, com exceção das enzimas TLL imobilizadas sobre o suporte nano-

X/Dy/0,1M, que mantiveram a atividade enzimática de sua forma livre, e das imobilizações de TLL sobre o suporte nano-X/Ce/0,5M e de RML sobre o suporte nano-X/La/0,1M, que se mostraram, respectivamente, 158,8% e 96,3% mais ativas do que suas respectivas formas livres.

Por mais que cada troca iônica tenha influenciado a atividade enzimática de forma diferente, todas elas geraram melhoria em relação às imobilizações sobre o material zeolítico na forma sódica.

Os resultados de atividade enzimática obtidos para as imobilizações realizadas em tampão fosfato 10mM se encontram na Tabela 10 para os complexos de TLL e na Tabela 11 para os complexos de RML. A atividade das enzimas livres, determinada como descrito na seção 4.9, foi novamente adicionada às tabelas para efeito comparativo, assim como as massas de enzimas imobilizadas calculadas na seção anterior.

Tabela 10: Valores de atividade catalítica para cada um dos complexos preparados com TLL em tampão fosfato 10mM

Materiais	Atividade por grama do complexo (U/g)	Massa de enzima imobilizada por grama do suporte (mg)	Atividade por mg de enzima imobilizada (U/mg)
<i>TLL Livre</i>	-	-	$469,1 \pm 57,8$
Nano-X/Ce/0,5M	$181,7 \pm 23,3$	$15,4 \pm 0,1$	$12,6 \pm 1,7$
Nano-X/Dy/0,1M	$348,3 \pm 11,7$	$15,6 \pm 0,1$	$23,5 \pm 0,9$
Nano-X/Gd/0,1M	$288,3 \pm 18,3$	$14,7 \pm 0,1$	$20,8 \pm 1,4$
Nano-X/Gd/0,5M	$510,0 \pm 31,7$	$15,6 \pm 0,1$	$35,0 \pm 2,1$

Fonte: Autoria própria

Tabela 11: Valores de atividade catalítica para cada um dos complexos preparados com RML em tampão fosfato 10mM

Materiais	Atividade por grama do complexo (U/g)	Massa de enzima imobilizada por grama do suporte (mg)	Atividade por mg de enzima imobilizada (U/mg)
<i>RML Livre</i>	-	-	$520,1 \pm 18,8$
Nano-X/Dy/0,1M	$143,3 \pm 23,3$	$4,4 \pm 0,1$	$34,8 \pm 6,1$
Nano-X/Gd/0,5M	$181,7 \pm 25,0$	$5,3 \pm 0,1$	$36,6 \pm 5,1$

Fonte: Autoria própria

Para as imobilizações realizadas em baixa força iônica, as melhores atividades enzimáticas por massa de complexo ocorreram para as imobilizações de ambas enzimas sobre o material nano-X/Gd/0,5M, com atividade de 510,0U/g para a imobilização de TLL e 181,7U/g

para a imobilização de RML. Novamente, os complexos de TLL se mostraram mais ativos devido às maiores quantidades absolutas de enzimas adsorvidas (Tabela 6). Apesar da maior massa de enzimas imobilizadas, de modo geral esses complexos não apresentaram melhoria significativa de atividade em relação às suas contrapartes preparadas em tampão fosfato 100mM. Isso provavelmente ocorre devido à aglomeração causada pela grande quantidade de enzima imobilizada, que pode resultar em um efeito de bloqueio dos sítios catalíticos que dificulta o acesso do substrato (ao menos nesses experimentos de hidrólise, onde a viscosidade do meio reacional é relativamente alta). Diferentemente dos complexos preparados em tampão fosfato 100mM, todas imobilizações resultaram em queda de atividade enzimática em comparação às enzimas livres.

Assim como observado nas seções 5.1 e 5.2, apesar da estrutura cristalina não ter sofrido grandes alterações dentre os materiais de troca iônica, os valores de atividade por carga enzimática não seguiram essa tendência e divergiram bastante para os diferentes materiais. Isso indica que os cátions lantanídeos incorporados no processo de troca iônica interagem com as enzimas não somente influenciando a capacidade de imobilização dos suportes zeolíticos, mas também modificando sua eficiência catalítica. A concentração de troca iônica não exerce influência na estrutura cristalina dos materiais zeolíticos (vide seção 5.1), mas teve grande impacto na capacidade de imobilização dos materiais e na atividade dos complexos.

A Tabela 8, Tabela 9, Tabela 10 e Tabela 11 indicam que a concentração do tampão utilizado durante o processo de imobilização é um fator de grande influência na capacidade de imobilização dos materiais e na atividade enzimática dos complexos.

5.7. Produção de Biodiesel pela reação de transesterificação

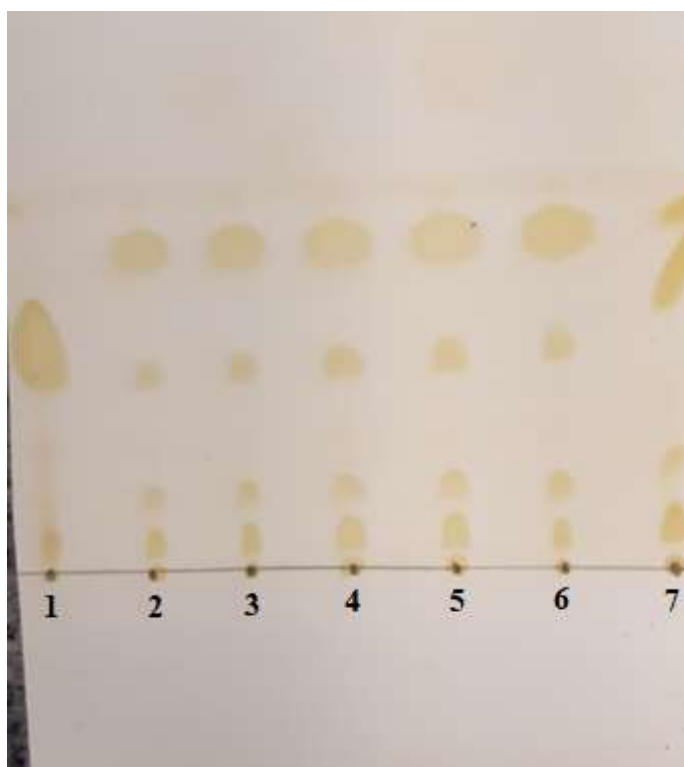
A transesterificação de óleo de microalgas via rota etílica foi realizada como descrito na seção 4.10. O procedimento foi realizado somente para os complexos preparados em tampão fosfato 100mM que apresentaram melhor atividade por massa de complexo nos testes de atividade enzimática, são eles:

- TLL sobre nano-X/Ce/0,5M
- TLL sobre nano-X/Dy/0,1M
- TLL sobre nano-X/Dy/0,5M
- TLL sobre nano-X/Gd/0,1M
- TLL sobre nano-X/Gd/0,5M
- RML sobre nano-X/Dy/0,1M

5.8. TLC – Verificação da produção de ésteres etílicos

O experimento de TLC foi realizado para os produtos de reação de todos os catalisadores que foram utilizados na reação de transesterificação expostos na seção 5.7. O resultado final observado na placa de sílica foi fotografado e se encontra na Figura 22.

Figura 22: Placa de sílica após finalização do experimento. **1:** Óleo; **2:** TLL sobre nano-X/Ce/0,5M; **3:** TLL sobre nano-X/Dy/0,1M; **4:** TLL sobre nano-X/Gd/0,1M; **5:** TLL sobre nano-X/Dy/0,5M; **6:** TLL sobre nano-X/Gd/0,5M; **7:** RML sobre nano-X/Dy/0,1M



Fonte: Autoria própria

As marcações que permaneceram no nível da gota de óleo (Gota 1) representam o óleo remanescente ao final da reação de transesterificação, enquanto as marcações que percorreram uma distância maior na placa são referentes aos ésteres etílicos produzidos.

Embora esse tipo de técnica possua caráter qualitativo já que não é possível aferir precisamente a respeito da atividade dos biocatalisadores e a taxa de conversão dos triglicerídeos em ésteres etílicos, é possível dizer pela Figura 22 que todos os catalisadores utilizados foram capazes de produzir quantidade significativa de ésteres etílicos.

5.9. Cromatografia gasosa (GC) – Quantização da taxa de conversão de triglicerídeos em ésteres etílicos

A técnica de cromatografia gasosa foi utilizada para a determinação da taxa de conversão de triglicerídeos em ésteres etílicos dos catalisadores empregados na reação de transesterificação do óleo de microalgas (vide seção 5.7). As análises foram realizadas como descrito na seção 4.12. As medidas obtidas para cada catalisador se encontram na Tabela 12 juntamente às suas respectivas atividades enzimáticas, para fins comparativos.

Tabela 12: Taxa de conversão de triglicerídeos em ésteres etílicos para cada complexo testado na transesterificação de óleo de microalgas via rota etílica

TLL		
Materiais	Atividade por grama do complexo (U/g)	FAEE (%)
Nano-X/Ce/0,5M	333,3 ± 31,7	78
Nano-X/Dy/0,1M	445,0 ± 68,3	75
Nano-X/Dy/0,5M	260,0 ± 11,7	70
Nano-X/Gd/0,1M	320,0 ± 6,7	65
Nano-X/Gd/0,5M	463,3 ± 11,7	75
RML		
Materiais	Atividade por grama do complexo (U/g)	FAEE (%)
Nano-X/Dy/0,1M	216,7 ± 81,7	20

Fonte: Autoria própria

Os complexos de TLL exibiram capacidade expressiva na transesterificação de triglicerídeos para produção de ésteres etílicos, com destaque para as imobilizações de TLL sobre os suportes nano-X/Ce/0,5M, nano-X/Dy/0,1M e nano-X/Gd/0,5M com rendimentos na faixa de 75%-78%. A imobilização de RML sobre o suporte nano-X/Dy/0,1M apresentou rendimento de 20%, muito abaixo dos rendimentos obtidos com as imobilizações de TLL. Além desse catalisador ter apresentado menor atividade enzimática nos testes catalíticos de hidrólise em comparação aos complexos de TLL aqui utilizados, as enzimas RML possuem melhor rendimento em reações de hidrólise do que em reações de transesterificação, o que pode ter contribuído para seu baixo rendimento de ésteres etílicos em relação ao esperado e aos outros complexos (RODRIGUES; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010). As imobilizações realizadas em tampão fosfato 10mM, que resultaram em maiores quantidades de enzimas imobilizadas, podem se beneficiar da mistura de álcool etílico com óleo de microalgas utilizada na reação de

transesterificação, pois essa contribui para a diminuição da viscosidade do meio reacional e, portanto, pode facilitar o acesso de substrato ao sítio catalítico das enzimas aglomeradas.

6. Conclusões

As informações estruturais obtidas das análises por DRX e FTIR sugerem que todos os materiais de troca iônica, apesar de terem sofrido um grau de amorfização devido a incorporação dos cátions lantanídeos, mantiveram parcialmente a estrutura cristalina do material original. Além disso, análises dos difratogramas a partir da equação de Scherrer apontam que todos os materiais foram sintetizados em escala nanométrica.

Os materiais de troca iônica, de modo geral, não se mostraram boas modificações no quesito imobilização enzimática quando esta é realizada em tampão fosfato 100mM, resultando na maioria dos casos numa queda de capacidade de imobilização com relação à nano-X/Na, com exceção da imobilização de RML sobre nano-X/Gd/0,1M, que apresentou taxa de imobilização 123% superior em relação ao material original. As imobilizações sobre os suportes trocados com os cátions lantanídeos apresentaram maior atividade por grama de suporte do que os complexos de nano-X/Na para ambas enzimas nos testes de hidrólise de triglicerídeos. O complexo de TLL que apresentou melhor atividade hidrolítica foi a imobilização sobre o material nano-X/Gd/0,5M, com atividade de 463,3U/g. Para a RML foi a imobilização sobre o material nano-X/Dy/0,1M, com atividade de 216,7U/g. As enzimas imobilizadas apresentaram uma queda de atividade com relação às suas formas livres exceto pelas imobilizações de TLL sobre o material nano-X/Ce/0,5M e de RML sobre o material nano-X/La/0,1M, que, embora tenham apresentado baixíssimas taxas de imobilização, foram 158,8% e 96,3% mais ativas que suas formas livres nos testes de hidrólise, o que indica a existência de um efeito sinérgico entre as enzimas e as matrizes de imobilização.

As imobilizações em menor força iônica (tampão fosfato 10mM) foram mais efetivas e todas apresentaram taxa de imobilização superior a 80%. No entanto, as atividades enzimáticas (pelos testes de hidrólise de triglicerídeos) dos complexos preparados não seguiram a mesma tendência, apresentando (de modo geral) resultados similares ou inferiores aos mesmos complexos preparados em tampão fosfato 100mM, provavelmente devido à aglomeração causada pela grande quantidade de enzimas imobilizadas, que dificulta o acesso do substrato ao sítio catalítico das enzimas. Dessa forma, as atividades **hidrolíticas** por massa de enzima também não foram promissoras em comparação às enzimas livres e às enzimas que foram imobilizadas em tampão fosfato 100mM.

Dentre os catalisadores utilizados na transesterificação do óleo de microalgas, os complexos de TLL apresentaram bons rendimentos de FAEEs, especialmente as imobilizações sobre os materiais nano-X/Ce/0,5M, nano-X/Dy/0,1M e nano-X/Gd/0,5M, com taxas de

conversão de 78%, 75% e 75%, respectivamente. A imobilização de RML sobre o material nano-X/Dy/0,1M, única imobilização de RML testada, não foi eficiente na produção de FAEEs, com rendimento de 20%.

7. Perspectivas futuras

- I. Realizar estudos computacionais a fim de modelar as interações entre os materiais e as enzimas para o melhor entendimento da influência dos cátions lantanídeos nessa interação.
- II. Reutilizar os catalisadores na reação de transesterificação a fim de observar qual o potencial de reusabilidade dos complexos zeólita-enzima.
- III. Estudar o efeito da concentração do tampão utilizado no processo de imobilização para otimização do sistema.
- IV. Estudar a transesterificação do óleo de microalgas via rota etílica utilizando-se os biocatalisadores aqui sintetizados em tampão fosfato 10mM.
- V. Investigar a natureza das interações entre os suportes e as enzimas.

REFERÊNCIAS

- ALAM, F.; MOBIN, S.; CHOWDHURY, H. Third generation biofuel from Algae. **Procedia Engineering**, v. 105, n. 1, p. 763–768, 2015.
- ANDERSON, C. D.; TAYLOR, P. R.; ANDERSON, C. G. Rare Earth Flotation Fundamentals : A Review American Journal of Engineering Research (AJER) Rare Earth Flotation Fundamentals : A Review. n. December, 2017.
- BARRER, R. M.; DAVIES, J. A.; REES, L. V. C. Comparison of the ion exchange properties of zeolites X and Y. **Journal of Inorganic and Nuclear Chemistry**, v. 31, n. 8, p. 2599–2609, 1969.
- BASSO, A.; SERBAN, S. Industrial applications of immobilized enzymes—A review. **Molecular Catalysis**, v. 479, n. August, p. 110607, 2019.
- BHUIYA, M. M. K. et al. Second generation biodiesel: Potential alternative to-edible oil-derived biodiesel. **Energy Procedia**, v. 61, p. 1969–1972, 2014.
- BRECK, D. W. Zeolite Molecular Sieves: Structure, Chemistry, and Use. **Journal of Chromatographic Science**, v. 13, n. 4, 1974.
- BRENNAN, L.; OWENDE, P. Biofuels from microalgae-A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 2, p. 557–577, 2010.
- BURNS, N. L.; HOLMBERG, K.; BRINK, C. Influence of surface charge on protein adsorption at an amphoteric surface: Effects of varying acid to base ratio. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 178, n. 1, p. 116–122, 1996.
- CEDERQUIST, K. B.; KEATING, C. D. Curvature effects in DNA:Au nanoparticle conjugates. **ACS Nano**, v. 3, n. 2, p. 256–260, 2009.
- CHRISTOPHER, L. P.; HEMANATHAN KUMAR; ZAMBARE, V. P. Enzymatic biodiesel: Challenges and opportunities. **Applied Energy**, v. 119, p. 497–520, 2014.
- CLELAND, J. World Population Growth; Past, Present and Future. **Environmental and Resource Economics**, v. 55, n. 4, p. 543–554, 2013.
- DABDOUB, M. J.; BRONZE, J. L.; RAMPIN, M. A. Biodiesel: visao critica do status atual e perspectivas na academia e na industria. **Quimica Nova**, v. 32, n. 3, p. 776–792, 2009.
- DAVIS, M. E. Ordered porous materials for emerging applications. **Nature**, v. 417, n. 6891, p. 813–821, 2002.
- DE 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.

DERNER, R. B. et al. Microalgae, products and applications. **Ciencia Rural**, v. 36, n. 6, p. 1959–1967, 2006.

FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, M.; SANROMÁN, M. Á.; MOLDES, D. Recent developments and applications of immobilized laccase. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 8, p. 1808–1825, 2013.

FLANIGEN, E. M.; KHATAMI, H.; SZYMANSKI, H. A. Infrared Structural Studies of Zeolite Frameworks. **Molecular Sieve Zeolites-I**, v. 101, n. 16, p. 201–229, 1974.

FREEDMAN, B.; PRYDE, E. H.; MOUNTS, T. L. Variables affecting the yields of fatty esters from transesterified vegetable oils. v. 61, n. 10, p. 1638–1643, 1984.

FRUSCIANTE, J. A. One more of me. **The Empyrean**. [s.l.] Record Collection, 2009.

GERIS, R. et al. Biodiesel de soja: reação de transesterificação para aulas práticas de química orgânica. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1369–1373, 2007.

GORJI, A.; GHANEI, R. A review on catalytic biodiesel production. **Online**), v. 5, n. 4, p. 48–59, 2014.

GORJI, A. A review on the biodiesel production, key parameters in transesterification reaction, its effects on the environment and human health. **J. Bio. & Env. Sci**, v. 2015, n. 3, p. 150–185, 2015.

GUPTA, R. et al. Molecular and functional diversity of yeast and fungal lipases: Their role in biotechnology and cellular physiology. **Progress in Lipid Research**, v. 57, n. January, p. 40–54, 2015.

HALIM, R.; DANQUAH, M. K.; WEBLEY, P. A. Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: A review. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 3, p. 709–732, 2012.

JAEGER, K. E.; REETZ, M. T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. **Trends in Biotechnology**, v. 16, n. 9, p. 396–403, 1998.

JEGANNATHAN, K. R. et al. Production of biodiesel using immobilized lipase - A critical review. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 28, n. 4, p. 253–264, 2008.

JESIONOWSKI, T.; ZDARTA, J.; KRAJEWSKA, B. Enzyme immobilization by adsorption: A review. **Adsorption**, v. 20, n. 5–6, p. 801–821, 2014.

KHAN, N.; WARITH, M. A.; LUK, G. A Comparison of Acute Toxicity of Biodiesel , Biodiesel Blends , and Diesel on Aquatic Organisms. **Journal of the Air & Waste Management**, n. May 2013, p. 37–41, 2012.

KHARLAMOVA, G. An Ecological-Economic Convergence: Transition To Sustainable Energy. **Bulletin of Taras Shevchenko National University of Kyiv Economics**, n. 150, p. 44–49, 2013.

KNÖZINGER, H.; KOCHLOEFL, K. Heterogeneous Catalysis and Solid Catalysts. **Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry**, 2003.

KRAWCZYK, T. **Biodiesel - Alternative fuel makes inroads but hurdles remain**. [s.l.] INFORM 7, 1996.

KUMAR, N.; VARUN; CHAUHAN, S. R. Performance and emission characteristics of biodiesel from different origins: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 21, p. 633–658, 2013.

LAM, M. K.; LEE, K. T.; MOHAMED, A. R. Homogeneous, heterogeneous and enzymatic catalysis for transesterification of high free fatty acid oil (waste cooking oil) to biodiesel: A review. **Biotechnology Advances**, v. 28, n. 4, p. 500–518, 2010.

LUNA, F. J.; SCHUCHARDT, U. Modificação de zeólitas para uso em catálise. **Quimica Nova**, v. 24, n. 6, p. 885–892, 2001.

MA, F.; HANNA, M. A. Biodiesel production: A review. **Bioresource Technology**, v. 70, n. 1, p. 1–15, 1999.

MADUKO, C. F.; AKURU, U. B. Future Trends on Global Energy Demand. **ES4PG Conference**, n. July 2013, 2013.

MAKAREVICIENE, V.; JANULIS, P. Environmental effect of rapeseed oil ethyl ester. **Renewable Energy**, v. 28, n. 15, p. 2395–2403, 2003.

MARIANO, A. P. et al. Biodegradability of diesel and biodiesel blends. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 9, p. 1323–1328, 2008.

MARTINS, T. S.; ISOLANI, P. C. Terras raras: Aplicações industriais e biológicas. **Quimica Nova**, v. 28, n. 1, p. 111–117, 2005.

MCCUSKER, L. B.; BAERLOCHER, C. Zeolite structures. **Studies in Surface Science and Catalysis**, v. 137, p. 37–67, 2001.

MCCUSKER, L. B.; OLSON, D. H.; BAERLOCHER, C. **Atlas of Zeolite Framework Types**. [s.l.: s.n.].

MEHMOOD, M. Rare Earth Elements- A Review. **Journal of Ecology & Natural Resources**, v. 2, n. 2, 2018.

MESHRAM, D. et al. Algae Fuel Technology-Concept of Revolutionary Future. v. 3, n. 3, p. 15–28, 2013.

NAIK, S. N. et al. Production of first and second generation biofuels: A comprehensive review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 2, p. 578–597, 2010.

PEDRO, K. C. N. R. et al. ENZYMATIC BIODIESEL SYNTHESIS FROM ACID OIL USING A LIPASE MIXTURE. **Quimica Nova**, v. 41, n. 3, p. 284–291, 2018.

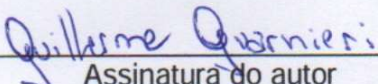
- PINTO, A. C. et al. Biodiesel: An overview. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 6 B, p. 1313–1330, 2005.
- PORTAL, D. B. Cartilha sobre Biodiesel. **Sebrae - Serviço Brasileiro De Apoio Às Micro E Pequenas Empresas**, p. 65, 2007.
- RODRIGUES, R. C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Lipase from *Rhizomucor miehei* as a biocatalyst in fats and oils modification. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 66, n. 1–2, p. 15–32, 2010.
- SCHUCHARDT, U.; SERCHELI, R.; MATHEUS, R. Transesterification of Vegetable Oils : a Review. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 9, n. 1, p. 199–210, 1998.
- SHAY, E. G. Diesel fuel from vegetable oils: Status and opportunities. **Biomass and Bioenergy**, v. 4, n. 4, p. 227–242, 1993.
- SHELDON, R. A. Enzyme immobilization: The quest for optimum performance. **Advanced Synthesis and Catalysis**, v. 349, n. 8–9, p. 1289–1307, 2007.
- SHERRY, H. S. The ion-exchange properties of zeolites. I. Univalent ion exchange in synthetic faujasite. **Journal of Physical Chemistry**, v. 70, n. 4, p. 1158–1168, 1966.
- SINGH, A. K.; MUKHOPADHYAY, M. Overview of fungal lipase: A review. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 166, n. 2, p. 486–520, 2012.
- SINGH, S. P.; SINGH, D. Biodiesel production through the use of different sources and characterization of oils and their esters as the substitute of diesel: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 1, p. 200–216, 2010.
- SIRISHA, V. L.; JAIN, A.; JAIN, A. **Enzyme Immobilization: An Overview on Methods, Support Material, and Applications of Immobilized Enzymes**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2016. v. 79
- SMART, L.; MOORE, E. **Solid State Chemistry - An Introduction**. 2. ed. Londres: Chapman & Hall, 1995.
- SMITH, J. V. Definition of a zeolite. **Zeolites**, v. 4, n. 4, p. 309–310, 1984.
- TOSHEVA, L.; VALTCHEV, V. P. Nanozeolites: Synthesis, crystallization mechanism, and applications. **Chemistry of Materials**, v. 17, n. 10, p. 2494–2513, 2005.
- TUFVESSON, P. et al. Process considerations for the scale-up and implementation of biocatalysis. **Food and Bioproducts Processing**, v. 88, n. 1, p. 3–11, 2010.
- VERBOEKEND, D. et al. Synthesis, characterisation, and catalytic evaluation of hierarchical faujasite zeolites: Milestones, challenges, and future directions. **Chemical Society Reviews**, v. 45, n. 12, p. 3331–3352, 2016.
- WEITKAMP, J. Zeolites and catalysis. **Solid State Ionics**, v. 131, p. 175–188, 2000.

ZHAN, B. Z. et al. Control of particle size and surface properties of crystals of NaX zeolite. **Chemistry of Materials**, v. 14, n. 9, p. 3636–3642, 2002.

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, 21/01/2021


Assinatura do autor