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

ROBERTO ANTONIO LUIZON FILHO

SINTESES E CARACTERIZAÇÃO DE ZEÓLITAS PARA IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE DE *Thermomyces lanuginosus* APLICADA A PRODUÇÃO DE BIODIESEL A PARTIR DE ÓLEO DE PALMA VIA ROTA ETILICA

SÃO JOSÉ DO RIO PRETO
2012

ROBERTO ANTONIO LUIZON FILHO

SINTESES E CARACTERIZAÇÃO DE ZEÓLITAS PARA IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE DE *Thermomyces lanuginosus* APLICADA A PRODUÇÃO DE BIODIESEL A PARTIR DE ÓLEO DE PALMA VIA ROTA ETILICA

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Microbiologia, área de Microbiologia Aplicada junto ao programa de Pós-graduação em Microbiologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" Campus de São José do Rio Preto.

Orientador: Prof. Dr. José Geraldo Nery

SÃO JOSÉ DO RIO PRETO

2012

Luizon Filho, Roberto Antonio
Sinteses e caracterização de zeólitas para imobilização da lipase de *Thermomyces lanuginosus* aplicada a produção de biodiesel a partir de óleo de palma via rota etilica / Roberto Antonio Luizon Filho. - São José do Rio Preto: [s.n.], 2012.
81 f. : 35 il. ; 30 cm.

Orientador: José Geraldo Nery
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Zeolitas. 2. Biodiesel. 3. *Thermomyces lanuginosus*. I. Nery, José Geraldo. III. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 620.91

ROBERTO ANTONIO LUIZON FILHO

SINTESES E CARACTERIZAÇÃO DE ZEÓLITAS PARA IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE DE *Thermomyces lanuginosus* APLICADA A PRODUÇÃO DE BIODIESEL A PARTIR DE ÓLEO DE PALMA VIA ROTA ETÍLICA

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Microbiologia, área de Microbiologia Aplicada junto ao programa de Pós-graduação em Microbiologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" Campus de São José do Rio Preto.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Geraldo Nery
Professor Assisitente Doutor
UNESP – São José do Rio Preto
Orientador

Profa. Dra. Eleni Gomes
Professora Assistente Doutora
UNESP – São José do Rio Preto

Prof. Dr. Leandro Martins
Professor Assistente Doutor
UNESP – Araraquara

São José do Rio Preto, 23 de novembro de 2012

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. José Geraldo Nery pelos ensinamentos, pela oportunidade e pela confiança em meu trabalho.

Aos amigos do laboratório pelo apoio e agradáveis momentos de descontração: Adriano de Vasconcellos, Alex Silva Paula, Danilo Antonio Silva, Glaucia Basso, Juliana Bergamasco, Marcelo Valdemir de Araujo, Rafael Aguiar e Vinícius Ladeia Semenzim.

À minha família pelo apoio, incentivo, compreensão e confiança.

Ao CNPQ e à FAPESP, pelo incentivo à pesquisa.

RESUMO

O termo zeólitas abrange a classe dos alumino silicatos hidratados de metais alcalinos ou alcalino-terrosos. A enzima lipase de *Thermomyces lanuginosus* foi imobilizada em zeolitas, produzindo um catalisador heterogêneo com potencial aplicação para a produção de biodiesel. Dois tipos de zeolita foram sintetizados: zeolita gismondina (GIS/Na) e um novo material zeolitico com topologia faujasítica (FAU/Co e FAU/Cu). A zeolita gismondina foi submetida ao processo de troca iônica com os cátions divalentes Ni^{2+}, Co^{2+}, Mg^{2+}, Sr^{2+}, Mn^{2+} e Ca^{2+} (GIS/Ni, GIS/Co, GIS/Mg, GIS/Sr, GIS/Mn e GIS/Ca) e a zeólita com topologia faujasítica foi submetida ao processo de troca iônica com NH_4^+ (FAU/Co.NH_4 e FAU/Cu.NH_4) e posteriormente calcinada a 500°C (FAU/Co.H^+ e FAU/Cu.H^+). Estes materiais foram utilizados como suporte sólido para a imobilização enzimática, dando origem aos complexos zeolita-enzima: GIS/Ni/ENZ, GIS/Co/ENZ e FAU/Co.NH_4/ENZ por exemplo. Foram utilizados dois métodos diferentes de imobilização. Em um deles, foi feito um pré-tratamento da lipase com o substrato (óleo de soja) e em outro a enzima foi imobilizada sem o pré-tratamento com o substrato. Foram feitos experimentos de transesterificação de triglicerídeos para a produção de biodiesel utilizando como catalisador da reação as zeolitas puras, a enzima pura e os complexos zeolita-enzima. Os catalisadores com topologia faujasitica (FAU/Co e FAU/Cu) atuando em condições experimentais de 100°C, razão molar óleo:álcool de 1:50 por 12 horas fornecem bons rendimentos de ésteres (90%). Os catalisadores GIS/Ni/ENZ e FAU/Co.NH_4/ENZ (imobilização com pré tratamento da enzima) apresentaram os maiores valores de atividade enzimática e bons rendimentos de ésteres etílicos. A mesma quantidade de enzima (0,4 mg) foi utilizada em sua forma livre e imobilizada na reação de transesterificação (45°C, relação molar óleo:álcool 1:5 por 48 horas). Comparando os rendimentos de ésteres das reações de transesterificação para a enzima livre (51,9%) e para os catalisadores GIS/Ni/ENZ (70,3%) e FAU/Co.NH_4/ENZ (58,4%), foi possível observar a sinergia do complexo zeolita-enzima.

Palavras-chave: zeolitas, biodiesel, lipase, transesterificação, *Thermomyces lanuginosus*.

ABSTRACT

The term zeolites comprehend the class of hydrated alkaline or earth alkaline metals alumino silicates. *Thermomyces lanuginosus* lipase enzyme was immobilized on zeolites, producing a heterogeneous catalyst with potential application on biodiesel production. Two types of zeolite were synthesized: gismondina zeolite (GIS/Na) and a new faujasite like zeolitic material: (FAU/Co e FAU/Cu). Gismondine zeolite was ion exchanged with divalent cations Ni^{2+}, Co^{2+}, Mg^{2+}, Sr^{2+}, Mn^{2+} e Ca^{2+} (GIS/Ni, GIS/Co, GIS/Mg, GIS/Sr, GIS/Mn e GIS/Ca) and the faujasite like zeolite was ion exchanged with NH_4^+ (FAU/Co.NH_4 e FAU/Cu.NH_4) and after this it was calcined at 500°C (FAU/Co.H^+ e FAU/Cu.H^+). These materials were used as solid support for enzymatic immobilization originating the zeolite-enzyme complexes: GIS/Ni/ENZ, GIS/Co/ENZ and FAU/Co.NH_4/ENZ for example. Two different methods of immobilization were used. In one of them the lipase was pretreated with the substrate (soybean oil) and in the other one the enzyme was immobilized without the pretreatment with substrate. Triglycerides transesterification experiments to biodiesel production were carried out using pure zeolite, pure enzyme and the zeolite-enzyme complexes as reaction catalyst. When used with experimental conditions of 100°C, oil:alcohol molar ratio of 1:50 faujasite like catalyst performed good ester yield (90%). GIS/Ni/ENZ and FAU/Co.NH_4/ENZ catalysts (immobilization with pretreated enzyme) showed higher enzymatic activity values and good ethylic esters yield. The same amount of enzyme (0,4 mg) was used in its free and immobilized form in the transesterification reaction (45°C, oil:alcohol molar ratio of 1:5 for 48 hours). Comparing transesterification reaction esters yield for the free enzyme (51,9%) and for the GIS/Ni/ENZ (70,3%) and FAU/Co.NH_4/ENZ (58,4%) catalysts, was possible to observe the synergy of zeolite-enzyme complexes.

Keywords: zeolites, biodiesel, lipase, transesterification, *Thermomyces lanuginosus.*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Produção de combustíveis líquidos a partir de ácidos graxos e triacilglicerídeos por (i) craqueamento de óleos ou gorduras; (ii) craqueamento de ácidos graxos; (iii) transesterificação de óleos ou gorduras e (iv) esterificação de ácidos graxos 18

Figura 2. Representação da reação de transesterificação do triglicerídeo na presença de um álcool qualquer 19

Figura 3. Representação da estrutura de um triglicerídeo 21

Figura 4. Ácido Palmítico ou ácido hexadecanóico, fórmula molecular: $C_{16}H_{32}O_2$ 22

Figura 5. Ácido Esteárico ou Ácido Octadecanóico, fórmula molecular: $C_{18}H_{36}O_2$ 22

Figura 6. Ácido Oléico ou Ácido-9-octadecenóico, fórmula molecular: $C_{18}H_{34}O_2$ 22

Figura 7. Ácido Linoleico ou ácido 9-12-octadecadienóico, fórmula molecular: $C_{18}H_{32}O_2$ 22

Figura 8. Ácido Linolênico (Ácido 9,12,15-octadecatrienóico), fórmula molecular: $C_{18}H_{30}O_2$ 22

Figura 9. Equação da formação de sabões a partir de ácidos graxos 25

Figura 10. Mecanismo da reação de transesterificação de triacilglicerídeos utilizando catalisador básico em um processo catalítico homogêneo, onde: B – catalisador básico; R_1, R_2 e R_3 – cadeia carbônica de ácidos graxos; R – grupo alquil do álcool (LOTERO *et al*., 2005) 26

Figura 11. Mecanismo da reação de transesterificação de triglicerídeos utilizando catalisador ácido em um processo catalítico homogêneo, onde: R_1, R_2 e R_3 – cadeia carbônica de ácidos graxos; R_4 – grupo alquil do álcool (LOTERO et al, 2005). 27

Figura 12. Mecanismo geral de um catalisador heterogêneo básico durante a transesterificação (CHOUHAN; SARMA, 2011) 29

Figura 13. Mecanismo geral de um catalisador heterogêneo ácido durante a transesterificação (CHOUHAN; SARMA, 2011) 30

Figura 14. Mecanismo básico da catálise enzimática 31

Figura 15. Métodos de Imobilização (JEGANNATHAN et al 2008) 32

Figura 16. Aminoácidos que compõem a tríade catalítica das lipases(FERSHT, 1995) 34

Figura 17. Mecanismo reacional das lipases (JEGANNATHAN et al 2008) 34

Figura 18. Estrutura tridimensional da lipase de *Thermomyces lanuginosus*. (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010) 36

Figura 19. Migração do grupo acila da posição 2 para a posição 1 ou 3 da molécula de triacilglicerídeo. (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010) 36

Figura 20. Unidades primárias de construção 37

Figura 21. Unidades secundárias de construção 38

Figura 22. Unidades poliédricas de construção 38

Figura 23. Formação estrutural das zeólitas: (a) Zeólita A (LTA); (b) Zeólita X ou Y (FAU) 39

Figura 24. Difratograma de raios-X das zeolitas FAU/Cu e FAU/Co 52

Figura 25. Difratograma de raios-X das zeolitas GIS/Na e GIS/Ca 54

Figura 26. Difratograma de raios-X das zeolitas GIS/Na e GIS/Sr 55

Figura 27. Difratograma de raios-X das zeolitas GIS/Na e GIS/Mn 55

Figura 28. Difratograma de raios-X das zeolitas GIS/Na e GIS/Co 56

Figura 29. Difratograma de raios-X das zeolitas GIS/Na e GIS/Mg 56

Figura 30. Difratograma de raios-X das zeolitas GIS/Na e GIS/Ni 57

Figura 31. Microscopia Eletrônica de Varredura da zeolita GIS/Na 58

Figura 32. Microscopia Eletrônica de Varredura das zeolitas FAU/Cu (A) e FAU/Co (B) 59

Figura 33. Temperatura ótima de operação da enzima 60

Figura 34. Óleo de palma refinado fornecido por Triangulo Alimentos LTDA mostrando sua fase líquida e sólida. 60

Figura 35. Estabilidade térmica da lipase a 30°C e 45°C 61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Reduções percentuais das emissões de poluentes devido à incorporação de biodiesel ao petrodiesel. 16
Tabela 2. Principais ácidos graxos de diferentes matérias-primas para produção de biodiesel 21
Tabela 3. Propriedades físicas dos óleos de soja e palma 22
Tabela 4. Comparativo de área, produtividade e produção de soja por região do Brasil na safra 2011/2012. 23
Tabela 5. Composição química das zeolitas FAU/Co e FAU/Cu em porcentagem dos óxidos dos elementos químicos presentes em sua estrutura....53
Tabela 6. Dados da zeolita FAU/Co 54
Tabela 7. Dados da zeolita FAU/Cu 54
Tabela 8. Composição química das zeolitas GIS/Na e GIS/Ni em porcentagem dos óxidos dos elementos químicos presentes em sua estrutura....58
Tabela 9. Quantidade de proteína imobilizada no suporte sólido e atividade enzimática dos complexos zeolita-enzima....63
Tabela 10. Efeito dos íons metálicos na atividade da lipase 64
Tabela 11. Reações de transesterificação de óleo de soja com metanol anidro e catalisador heterogêneo FAU/Co....66
Tabela 12. Reações de transesterificação de óleo de soja com metanol anidro e catalisador FAU/Cu 66
Tabela 13. Reações de transesterificação de óleo de soja via rota etílica com catalisador FAU/Co 67
Tabela 14. Reações de transesterificação de óleo de soja via rota etílica com catalisador FAU/Cu 67
Tabela 15. Reações de transesterificação de óleo de palma via rota metílica e etílica com o catalisador FAU/Cu 68
Tabela 16. Condições experimentais da reação de transesterificação com catálise enzimática usando lipase de *Thermomyces lanuginosus* (TLL). Tabela 8....69
Tabela 17. Condições das reações de transesterificação do óleo de palma utilizando etanol anidro e os complexos zeolita-enzima....70

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 11
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 13
2.1 HISTÓRIA DO BIODIESEL 13
2.1.2 A história do biodiesel no mundo 13
2.1.3 A história do biodiesel no Brasil 13
2.2 O BIODIESEL 15
2.2.1 Importância e vantagens do biodiesel 15
2.3 QUÍMICA DO BIODIESEL 17
2.3.1 A reação de transesterificação para a formação de biodiesel 18
2.3.2 Alcoóis para a produção de biodiesel 20
2.3.3 Óleos para a produção de biodiesel 20
2.3.3.1 Soja 23
2.3.3.2 Palma (Dendê) 23
2.3.4 Catalisadores 24
2.3.4.1 Catálise Homogênea 24
2.3.4.2 Catálise Heterogênea 27
2.3.4.3 Catálise Enzimática 30
2.3.4.3.1 Imobilização Enzimática 31
2.3.4.3.2 Lipases 33
2.3.4.3.3 Lipase de *Thermomyces lanuginosus* 35
2.4 ZEOLITAS 36
2.4.1 Importância das zeolitas 40
2.4.2 Produção de biodiesel a partir de catalisadores zeolíticos 40
3 MATERIAIS E MÉTODOS 42
3.1 SÍNTESES DOS MATERIAIS ZEOLÍTICOS 42
3.1.1 Sinteses de zeolitas Gismondina Sódica (GIS/Na) 42
3.1.1.2 Troca iônica da zeólita GIS/Na com diferentes cátions 42
3.1.2 Sínteses de zeolitas com topologia faujasitica (FAU/Co e FAU/Cu) 42
3.1.2.1 Troca iônica das zeólitas FAU/Co e FAU/Cu 42
3.1.2.2 Calcinação da zeólita FAU/Co.NH_4 e FAU/Cu.NH_4 43
3.1.3 Caracterização dos materiais zeoliticos 44
3.2 ENSAIOS ENZIMÁTICOS 44

3.2.1 Imobilização enzimática nos materiais zeolíticos 44
3.2.2 Pré-tratamento da lipase antes da imobilização enzimática 45
3.2.3 Determinação da quantidade de enzima adsorvida sobre o suporte 45
3.2.4 Determinação da atividade enzimática 46
3.2.5 Influência dos íons metálicos na atividade enzimática 47
3.3 REAÇÕES DE TRANSESTERIFICAÇÃO DOS ÓLEOS DE SOJA E PALMA 47
3.3.1 Reações utilizando zeolita gismondina pura como catalisador 48
3.3.2 Reações utilizando complexos zeolita gismondina-enzima como catalisador 48
3.3.3 Reações utilizando zeolita faujasita pura como catalisador 49
3.3.4 Reações utilizando complexos zeolita faujasita-enzima como catalisador 50
3.3.5 Reações utilizando a enzima livre (TLL) como catalisador 50
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 52
4.1. SINTESES E CARACTERIZAÇÃO DAS MATRIZES ZEOLITICAS 52
4.1.1 Difração de raios-X dos materiais zeoliticos 52
4.1.2 Miscrocopia Eletrônica de Varredura (MEV) 58
4.2 ENSAIOS ENZIMÁTICOS 59
4.2.1 Temperatura ótima de operação e estabilidade térmica da enzima 59
4.2.2 Imobilização e Atividade Enzimática 62
4.3. REAÇÕES DE TRANSESTERIFICAÇÃO 65
4.3.1 Transesterificação catalisada por zeólitas FAU 65
4.3.2 Transesterificação catalisada por zeólitas GIS 68
4.3.3 Transesterificação catalisada por enzima livre 69
4.3.4 Transesterificação catalisada por enzima imobilizada (complexos zeólita-enzima) 70
5 CONCLUSÕES 71
6 PERSPECTIVAS FUTURAS 72
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 73
ANEXO

1 INTRODUÇÃO

Em meados do século XX, houve um aumento considerável da industrialização, gerando um crescimento da demanda mundial por combustíveis líquidos. Devido ao aumento do consumo destes combustíveis, vários problemas ambientais surgiram e foram se agravando ao longo do tempo, tal fato provocou o início da conscientização ambiental em todo o mundo. Aliado à conscientização, iniciaram-se as preocupações com os problemas ambientais gerados pela industrialização, dentre eles, principalmente o efeito estufa e o aquecimento global. Tais problemas unidos à busca pela independência energética de alguns países influenciaram o desenvolvimento de novas fontes de energia limpas e renováveis. Nesse contexto surgiram os biocombustíveis, dos quais se destacam o álcool etílico e o biodiesel. (PASQUALINO et al, 2006; LEUNG, 2001).

É nesse cenário de busca por novas fontes de energia que o Brasil passa a ter uma posição de destaque mundial. O território de proporções continentais propicia ao Brasil o desenvolvimento de diferentes tipos de matérias-primas. Além disso, devido a sua diversidade climática pode-se cultivar diversas oleaginosas. Tais características no modo de produção proporcionam um leque de fontes alternativas que podem ser utilizadas para a produção dos biocombustíveis, demonstrando assim, que o Brasil é um país com grande potencial para a produção de combustíveis alternativos.

O biodiesel pode ser produzido a partir de diferentes matérias primas, tais como cana de açúcar como fonte de etanol e óleos vegetais ou gordura animal como fonte de triacilglicerídeos. Devido a sua origem, estes novos combustíveis são considerados uma fonte energética renovável e biodegradável, fatores de extrema importância no atual contexto econômico-ambiental, pois sua utilização contribui para minimizar a emissão de gases prejudiciais ao meio ambiente, dentre estes o dióxido de carbono (CO_2), um dos principais precursores do efeito estufa (MOTA et al, 2009).

A reação tradicionalmente utilizada para produzir o biodiesel é a transesterificação, na qual ocorre a alcoólise dos triacilglicerídeos presentes nos óleos vegetais e gorduras animais. Após a reação de transesterificação os triacilglicerídeos são transformados em seus respectivos ésteres metílicos ou etílicos, e esses compostos apresentam características físico-químicas que

permitem a sua utilização como combustível em substituição ao petrodiesel ou sua incorporação parcial ao combustível de origem fóssil (BHAT et al, 2007).

Atualmente, novos estudos estão sendo realizados para aprimorar o processo de transesterificação, uma vez que este ainda apresenta alguns aspectos que afetam o preço do produto final. Uma das áreas de intensiva pesquisa é a busca de novos catalisadores para o processo de transesterificação, principalmente de catalisadores heterogêneos, uma vez que a maioria dos catalisadores usados atualmente para a produção de biodiesel em escala industrial são catalisadores homogêneos (HELWANI et al, 2009). Além da catalise heterogênea, reações enzimáticas envolvendo lipases, principalmente, lipases imobilizadas em suportes sólidos, apresentam-se como uma excelente alternativa para produzir biodiesel por transesterificação. Este processo de imobilização tem por objetivo unir os benefícios da catalise heterogênea e enzimática, sendo, desta forma, uma opção que precisa ser mais explorada para que possa ser utilizada na produção industrial de biodiesel (AKOH et al, 2007).

No presente trabalho são apresentados os resultados da síntese, caracterização físico-química e aplicação de novos catalisadores heterogêneos na reação de transesterificação de óleo de palma seguindo a rota etílica, sendo que, estes novos catalisadores são formados pela imobilização de lipase na superfície de zeolitas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 HISTÓRIA DO BIODIESEL

2.1.2 A história do biodiesel no mundo

A história do biodiesel teve início no final do século XIX, com o desenvolvimento dos motores de combustão interna a diesel, os quais receberam o nome em homenagem a seu inventor Rudolph Diesel. O engenheiro mecânico alemão utilizou em seus experimentos petróleo crú e óleo de amendoim dando grande contribuição, dessa forma, para o setor industrial.

Em 1937, na Bélgica, surgiu a primeira patente sobre a transesterificação cujo autor foi G. Chavanne. Tal reação transforma óleos vegetais em uma mistura de ésteres de ácidos graxos utilizando catalisadores básicos, como os hidróxidos de metais alcalinos. Outros países, também nesse mesmo período, fizeram estudos sobre essa reação. O Instituto Francês do Petróleo, por exemplo, em 1940, conseguiu resultados satisfatórios utilizando a tecnologia belga com a reação entre óleo de dendê e etanol. Na mesma época, pesquisadores americanos também desenvolveram um processo utilizando catalisadores ácidos seguidos de catalisadores básicos, que evitavam a formação de sabões e viabilizavam a transformação de óleos brutos com alto teor de acidez em biodiesel (SUAREZ, 2007).

A Segunda Guerra Mundial (1939-1945) fez com que o preço do petróleo subisse gerando insegurança em alguns países a respeito do abastecimento de petróleo, assim, estes começaram a utilizar óleos vegetais como suprimento energético. Com o final da guerra, em 1945, os preços começaram a voltar ao normal, fazendo com que houvesse um abandono nas pesquisas sobre biodiesel. No entanto, na década de 80, crises econômicas envolvendo o petróleo serviram como incentivo para que os governos buscassem e investissem em novas alternativas energéticas renováveis para substituí-lo (SUAREZ, 2007).

2.1.3 A história do biodiesel no Brasil

No Brasil, na década de 20, o Instituto Nacional de Tecnologia (INT) iniciou os estudos sobre biodiesel, mas esta iniciativa somente ganhou destaque nas décadas de 70 e 80. Neste período, o Governo Federal criou o Programa Nacional do Álcool (PRÓ-ÁLCOOL) (1975) e o Plano de Produção de Óleos Vegetais para fins Carburantes (PRÓ-ÓLEO) (1980). Tais medidas foram tomadas, pois o país passava por um processo de desabastecimento de combustíveis, devido à crise do petróleo (1973 e 1980). Esses projetos previam regulamentar a mistura de 30% de óleo vegetal, ou derivado, no óleo diesel e, em longo prazo, visava sua completa substituição. Em 1986, a queda do valor do barril de petróleo pôs fim ao projeto PRÓ-ÓLEO, mas mesmo assim, as pesquisas a respeito do biodiesel continuaram sendo desenvolvidas no país (POUSA, SANTOS E SUAREZ, 2007).

No final do século XX, o governo federal retomou a discussão sobre o uso de biodiesel em larga escala. Em 2002, o programa PRÓ-BIODIESEL, propôs substituir até 2005 todo o diesel consumido no país por B5, uma mistura de 5% de biodiesel com 95% de diesel, e após 15 anos o substituir pelo B20, uma mistura composta de 20% de biodiesel com 80% de diesel (POUSA, SANTOS E SUAREZ, 2007).

Para a produção desse combustível renovável, duas são as rotas mais usuais a serem seguidas, a rota metílica e a rota etílica. Com isso, o Brasil apesar de estar ciente das limitações tecnológicas envolvidas no processo com o etanol, preferiu a utilização da rota etílica para a produção do biodiesel, devido à grande produção dessa matéria-prima no país. Por exemplo, em novembro de 2000, no Estado do Mato Grosso, ocorreu a instalação da primeira usina de biodiesel seguindo rota etílica, que produzia cerca de 1.400 t/mês de éster etílico de óleo de soja. Assim, o biodiesel deixou de ser produzido apenas experimentalmente e passou a ser produzido em escala industrial (SUAREZ, 2007).

Nas últimas décadas, houve um crescente interesse no desenvolvimento de pesquisas que visam à produção de biodiesel. Vários fatores contribuíram para tal fenômeno, como, por exemplo, crises econômicas ocorridas durante esse período, a possível finitude das reservas de petróleo e o fato das novas jazidas de petróleo estarem situadas em áreas de elevado custo de extração e de grandes conflitos políticos, gerando impacto no preço e na regularidade do fornecimento. Além disso, a conscientização ambiental, lapidada a partir da década de 90, aprova a utilização do biodiesel, já que este diminui a emissão de gases relacionados a graves

problemas ambientais, como o efeito estufa e o aquecimento global (POUSA, SANTOS E SUAREZ, 2007).

2.2 O BIODIESEL

Existem várias definições tanto técnicas como legais para o biodiesel. Tecnicamente o biodiesel é um combustível obtido a partir de matérias-primas de origem vegetal ou animal, o que o torna biodegradável e originado de fontes renováveis. As fontes de origem vegetal são principalmente óleos, tais como soja, mamona, colza (canola), palma, girassol, amendoim, entre outras, e as de origem animal são obtidas através de sebo bovino, suíno e de aves. Além destas, inclui-se também como matéria-prima a utilização de óleos de fritura (cocção) e óleos de algas (YUSUF, YAAKUB, 2011).

A Lei nº 11.097, de 13 de janeiro de 2005, que dispõe sobre a introdução do biodiesel na matriz energética brasileira, define o biodiesel como um biocombustível derivado de biomassa renovável para uso em motores a combustão interna com ignição por compressão ou, conforme regulamento para geração de outro tipo de energia, que possa substituir parcial ou totalmente combustíveis de origem fóssil. Há outras definições nas quais podemos enquadrar o biodiesel, dentre elas temos:

- **Definição geral -** Combustível natural usado em motores a diesel, produzido através de fontes renováveis, que atende as especificações da ANP.
- **Definição técnica -** Combustível composto de monoalquil ésteres de ácidos graxos de cadeia longa, derivado de óleos vegetais ou de gorduras animais e designado como B100.

2.2.1 Importância e vantagens do biodiesel

Muitos são os problemas ambientais causados pela ação direta ou indireta do homem no meio ambiente. Atualmente, um dos problemas mais discutidos é o aquecimento global, causado principalmente pela emissão de gases que provocam o efeito estufa resultando em um aumento da temperatura terrestre (PASQUALINO et al, 2006; LEUNG, 2001).

Uma das alternativas para ajudar a reduzir essas emissões gasosas é a busca por novas fontes energéticas mais limpas, capazes de substituir os combustíveis fósseis atualmente utilizados. O biodiesel preenche os requisitos para ser este combustível alternativo por ser biodegradável e renovável, como pode ser visto na Tabela 1 (PASQUALINO et al, 2006).

Quando incorporado ao petrodiesel, o biodiesel confere à mistura características que a tornam menos prejudicial ao meio ambiente. De acordo com a tabela 1, a mistura de 20% de biodiesel no diesel mineral (B20) reduz em 15% a emissão de dióxido de carbono (CO_2) e em 20% à emissão de dióxido de enxofre (SO_2), por exemplo. No caso do CO_2 podemos considerar também o fato de que as plantas oleaginosas, fonte de óleos vegetais para produção do biodiesel, atuam no seqüestro do CO_2 atmosférico. Essas melhorias se dão por uma série de vantagens que o biocombustível apresenta sobre o diesel de origem fóssil. (SUAREZ, 2007; PINTO *et al.*,2005).

Tabela 1. Reduções percentuais das emissões de poluentes devido à incorporação de biodiesel ao petrodiesel.

Poluente	**B100 (100% de biodiesel)**	**B20 (20% de biodiesel)**	**B10 (10% de biodiesel)**	**B5 (5% de biodiesel)**
Dióxido de Carbono (CO_2)	-78	-15	-8	-4
Monóxido de Carbono (CO)	-48	-12	-6	-3
Dióxido de Enxofre (SO_2)	-100	-20	-10	-5
Óxidos de Nitrogênio (NO_x)	+10	+2	+1	+0,5
Hidrocarbonetos (HC)	-67	-20	-11	-5
Material Particulado (MP)	-47	-12	-6	-3

Fonte: (EMISSIONS CALCULATOR; LOTERO, et al, 2005).

Além do fato de ser renovável, o biodiesel apresenta outras vantagens, como:

- É biodegradável e não tóxico, pois se origina de biomassa vegetal e/ou animal (LÓPEZ et al, 2005);
- Quando for produzido por fonte vegetal, é um produto originário de energia limpa, pois é um produto da fotossíntese (PINTO et al, 2005);

- Não contêm enxofre e compostos aromáticos na sua composição, evitando que em sua queima ocorra a formação e liberação dos indesejáveis óxidos de enxofre (SOx) e de compostos carcinogênicos (PINTO et al, 2005);
- Apresenta melhores condições de combustão, já que contém oxigênio em sua composição, implicando em menores emissões de material particulado, hidrocarbonetos e monóxido de carbono (CO) (LÓPEZ et al, 2005);
- Proporciona uma melhoria no desenvolvimento e fechamento do ciclo do carbono, já que as plantas que o originam agem no seqüestro do dióxido de carbono (CO_2) atmosférico emitido, auxiliando assim, na redução do efeito estufa (LÓPEZ et al, 2005);

Além destas vantagens, a síntese de biodiesel resulta em ésteres de ácidos graxos (biodiesel) e glicerol e esses compostos são amplamente requisitados pelas indústrias. O glicerol, um co-produto da reação, possui aplicações nas indústrias farmacêutica, cosmética, alimentícia e produtoras de plásticos. Já os ésteres de ácidos graxos são utilizados na síntese de surfactantes, de óleos químicos, polímeros e na produção de lubrificantes (SHUMAKER, 2007).

Sendo assim, o biodiesel é uma boa alternativa de nova fonte energética, sendo ainda uma ferramenta importante no auxílio ao combate dos problemas ambientais discutidos mundialmente.

2.3 QUÍMICA DO BIODIESEL

Como mostrado na Figura 1, para a produção de combustíveis líquidos a partir de óleos, gorduras ou ácidos graxos, são empregados processos químicos nos quais podem ocorrer três tipos de reações químicas. Estas reações são: craqueamento ou pirólise (reações (i) e (ii)), na qual ocorre a formação de uma mistura de hidrocarbonetos e compostos oxigenados a partir de triglicerídeos ou ácidos graxos; transesterificação (reação (iii)), que envolve a reação de triglicerídeos com alcoóis de cadeia curta, dando origem a ésteres de ácidos graxos; e esterificação (reação (iv)), na qual um ácido graxo reage com um álcool de cadeia curta formando ésteres. Note que as equações não estão balanceadas. Tais reações transformam os ácidos graxos e triacilglicerídeos em espécies químicas que podem ser utilizadas como combustíveis por apresentarem características físico-químicas (como, por exemplo, viscosidade e densidade) apropriadas para esta aplicação. O método mais comumente utilizado na conversão

de óleos e gorduras em biodiesel é a reação de transesterificação (LEUNG, 2010; SUAREZ, 2007).

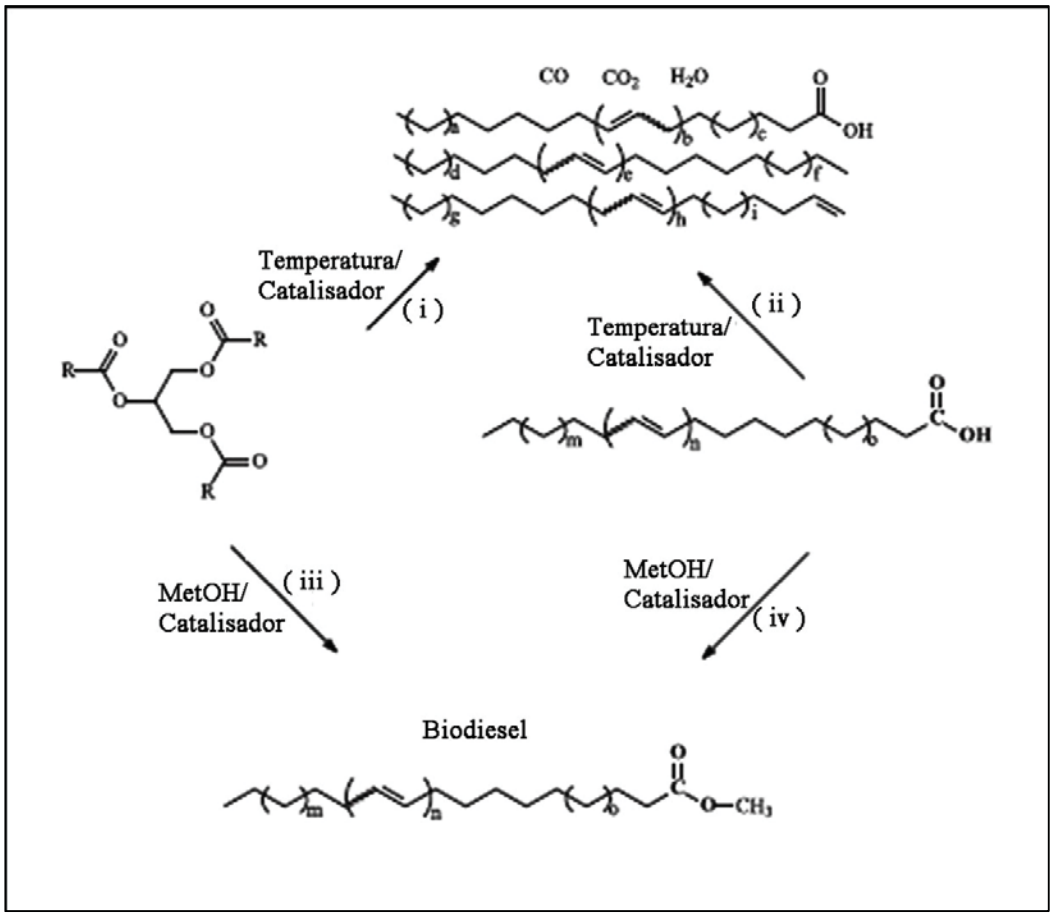

Figura 1. Produção de combustíveis líquidos a partir de ácidos graxos e triacilglicerídeos por (i) craqueamento de óleos ou gorduras; (ii) craqueamento de ácidos graxos; (iii) transesterificação de óleos ou gorduras e (iv) esterificação de ácidos graxos (SUAREZ, 2007).

2.3.1 A reação de transesterificação para a formação de biodiesel

A transesterificação de óleos e gorduras é um processo de transformação dos triglicerídeos em ésteres alquílicos através da troca do grupo **RCO-** (da parte de ácidos graxos) do triglicerídeo original, por um grupo hidroxila proveniente de um álcool. Tal reação pode ocorrer ou não na presença de um catalisador, originando, dessa forma, glicerina e uma mistura de alquil ésteres (DABDOUB et al, 2009).

A reação de transesterificação é explicada na Figura 2, que apresenta a primeira reação que representa todas as etapas e a segunda reação que é a equação geral. Os compostos intermediários da reação são monoglicerídeos e diglicerídeos, oriundos da substituição de um ou dois ácidos graxos do triglicerídeo pelo grupo hidroxila do álcool.

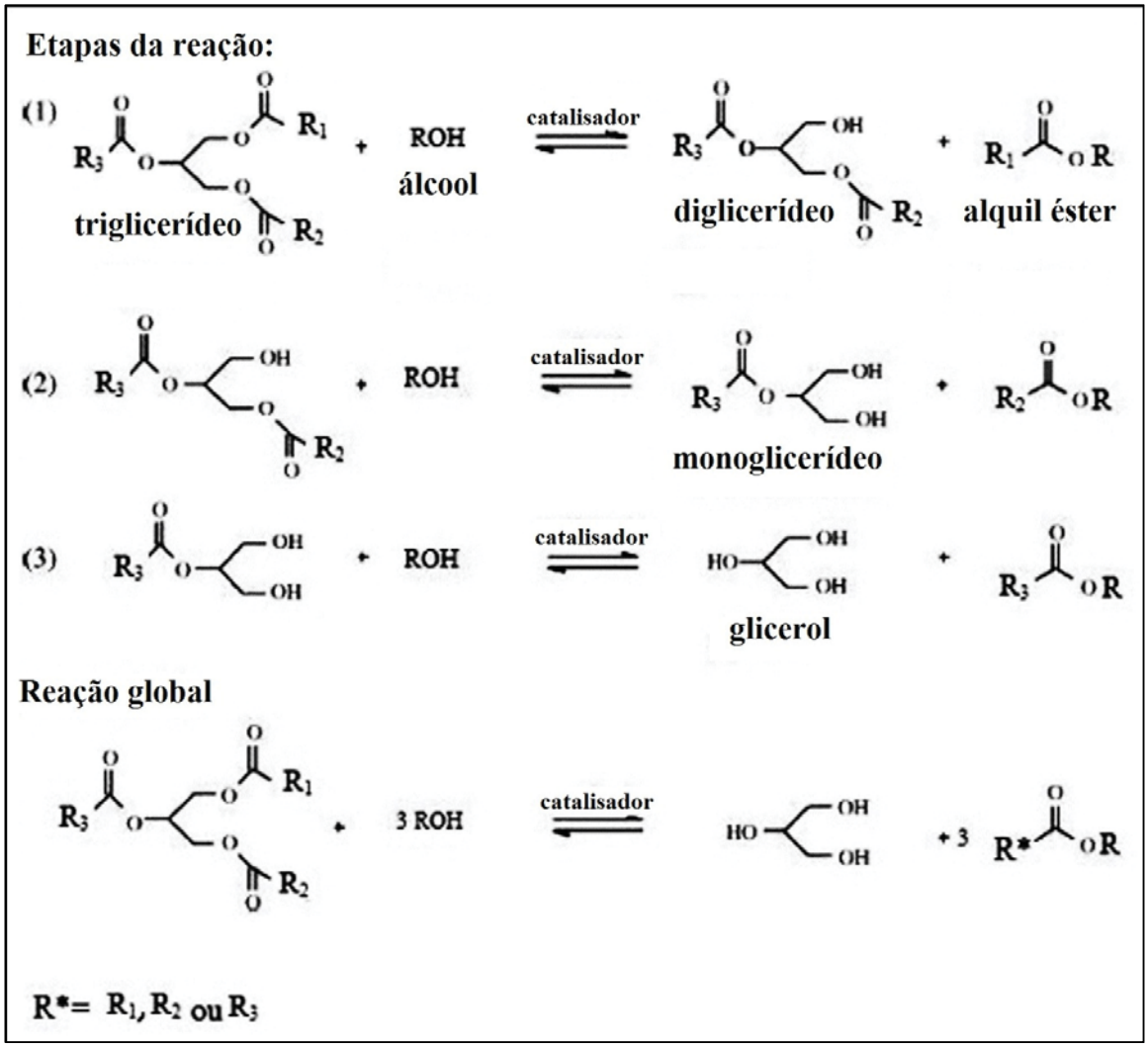

Figura 2. Representação da reação de transesterificação do triglicerídeo na presença de um álcool qualquer (LÓPEZ et al, 2005).

Cabe salientar que a reação de transesterificação, de acordo com sua estequiometria, seria uma reação que na teoria envolveria 1 mol de óleo para 3 mols de álcool. Na prática, ao analisar os resultados, nota-se que a relação molar utilizada para que ocorra a reação é sempre

superior a esta, atingindo valores maiores que 3 mols de álcool. Tal fato ocorre porque esta é uma reação de equilíbrio, em que o excesso de álcool deslocará o equilíbrio, favorecendo a reação para a formação de produtos (biodiesel) (HOYDONCKX et al, 2004).

2.3.2 Alcoóis para a produção de biodiesel

Os alcoóis mais utilizados para a produção de biodiesel são os de cadeia curta, principalmente metanol e etanol. Há algumas usinas que funcionam a partir de etanol, mas na Europa, nos Estados Unidos e no Brasil a principal rota utilizada para a transesterificação é a metílica (BRANDIN, 1996).

A problemática de se trabalhar com etanol na síntese de biodiesel é que este torna o processo de produção mais complexo. Isso ocorre devido à necessidade de utilização de um etanol com pureza de 99% ou mais, já que a presença de água pode causar reações indesejáveis, tornando-se necessário fazer uma purificação elevada do álcool para sua utilização, o que gera maiores gastos na produção. Outro problema importante está relacionado à separação do biodiesel, da glicerina e do excesso de álcool na mistura. Com isso, quando se utiliza etanol como álcool da reação, o procedimento de separação se torna mais complexo (STAMENKOVIC et al, 2011).

No entanto, para o Brasil, a rota etílica seria a mais viável, pois o país é um grande produtor mundial de cana-de-açúcar, matéria prima para a produção de etanol, propiciando um grande potencial para a produção de biodiesel a partir de etanol. Além desta vantagem para o Brasil, o etanol ainda apresenta outros benefícios como, por exemplo, o fato de ser um produto menos tóxico, o que o torna mais seguro de se trabalhar que o metanol, além disso, o etanol é produzido a partir de biomassa, uma fonte renovável, como a cana-de-açúcar no Brasil, e o amido de milho nos Estados Unidos. Já o metanol é de origem fóssil não renovável (BRANDIN, 1996).

2.3.3 Óleos para a produção de biodiesel

Os principais constituintes dos óleos e gorduras são os triacilglicerídeos, um tri-éster do glicerol, composto por um glicerol ligado a três ácidos graxos de cadeia longa (figura 3). Os

óleos também apresentam, em alguns casos, ácidos graxos livres em quantidades que podem atingir até 20% da sua composição (BHAT, 2007). A Tabela 2 mostra os principais ácidos graxos presentes em alguns óleos vegetais e gordura de animais.

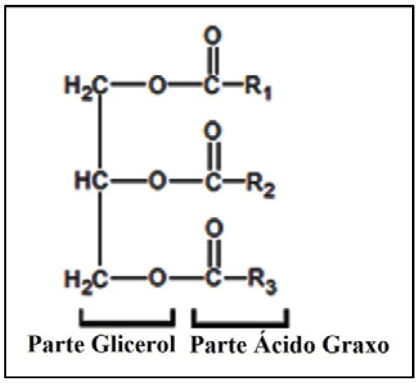

Figura 3. Representação da estrutura de um triglicerídeo.

Tabela 2. Principais ácidos graxos de diferentes matérias-primas para produção de biodiesel.

Óleo ou Gordura	**Composição em ácidos graxos (% em massa)**				
	16:0 Palmítico	**18:0 Esteárico**	**18:1 Oléico**	**18:2 Linoléico**	**18:3 Linolênico**
Óleo de amendoim	11	2	48	32	1
Óleo de girassol	6	3	17	74	0
Óleo de palma	**42,6**	**4,4**	**40,5**	**10,1**	**0,2**
Óleo de soja	**13,9**	**2,1**	**23,2**	**56,2**	**4,3**
Sebo bovino	22,99	19,44	41,6	3,91	0,49
Óleo de frango	25,35	5,6	39,95	20,6	--

Fonte: (LEUNG, 2009).

A notação 18:1 para o ácido oléico, por exemplo, representa o número de átomos de carbono (18) e quantas ligações duplas (1) estão presentes na cadeia carbônica do ácido graxo. As estruturas moleculares dos ácidos graxos apresentados na Tabela 2 são mostradas nas figuras 4 a 8 e a Tabela 3 traz algumas propriedades físicas dos óleos de soja e de palma.

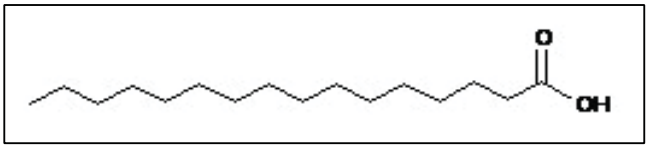

Figura 4: Ácido Palmítico ou ácido hexadecanóico, fórmula molecular: $C_{16}H_{32}O_2$ (BARBOSA, 2004).

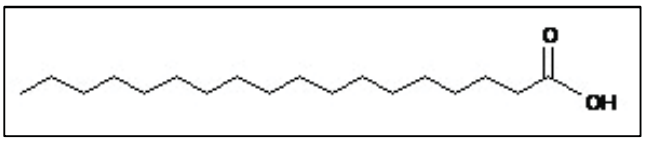

Figura 5: Ácido Esteárico ou Ácido Octadecanóico, fórmula molecular: $C_{18}H_{36}O_2$ (BARBOSA, 2004).

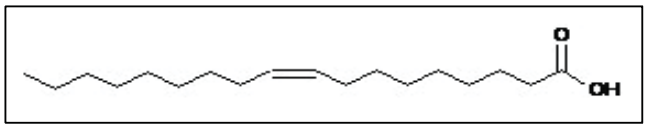

Figura 6: Ácido Oléico ou Ácido-9-octadecenóico, fórmula molecular: $C_{18}H_{34}O_2$ (BARBOSA, 2004).

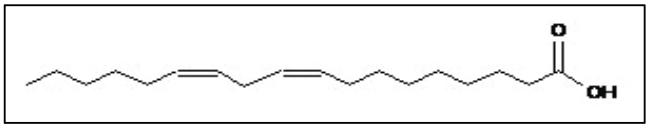

Figura 7: Ácido Linoleico ou ácido 9-12-octadecadienóico, fórmula molecular: $C_{18}H_{32}O_2$ (BARBOSA, 2004).

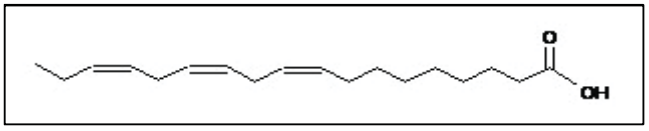

Figura 8: Ácido Linolênico (Ácido 9,12,15-octadecatrienóico), fórmula molecular: $C_{18}H_{30}O_2$ (BARBOSA, 2004).

Tabela 03 – Propriedades físicas dos óleos de soja e palma.

Propriedades	**Óleo de Soja**	**Óleo de Palma**
Massa Molecular (g/mol)	874,8	857,7
Densidade (g/cm^3)	0,9100	0,9180
Viscosidade Cinemática (40^oC, mm^2/s)	32,9	31,45

([1]KANSEDO, LEE, BHATIA, 2009)(LEUNG, 2010)

2.3.3.1 *Soja*

A soja é um grão muito versátil que dá origem a produtos e subprodutos muito usados pela agroindústria, indústria química e de alimentos. A proteína de soja é muito usada na preparação de cereais, bebidas, alimentos para bebês e alimentos dietéticos. O produto mais conhecido obtido da soja, no entanto, é o óleo refinado utilizado na alimentação humana. Recentemente, a soja vem crescendo também como fonte de matéria prima para a produção de bio-combustível. O biodiesel de soja já é uma realidade no Brasil, sendo empregado em várias cidades brasileiras. O rendimento médio de óleo da semente é de 20%. O Brasil é o segundo maior produtor mundial de soja, ficando atrás apenas dos Estados Unidos (EMBRAPA). A Tabela 4 mostra dados da safra brasileira de soja 2011/2012.

Tabela 4. Comparativo de área, produtividade e produção de soja por região do Brasil na safra 2011/2012.

Região	**Área (10^3 ha)**	**Produtividade (Kg/ha)**	**Produção (10^3 t)**
Norte	695,2	3.022	2.107,1
Nordeste	2.141,5	3.000	6.424,5
Centro-Oeste	11.445,1	3.047	34.868,0
Sudeste	1.622,9	2.852	4.629,0
Sul	9.091,4	1.933	17.574,4
Brasil	24.998,1	2.624	65.603,0

Fonte: (CONAB).

2.3.3.2 *Palma (Dendê)*

O dendezeiro é uma cultura permanente com produção contínua ao longo do ano, que pode ser explorada até a idade de 25 anos e apresenta produtividade superior entre todas as oleaginosas, podendo produzir dez vezes mais óleo do que a soja na mesma área. Dos frutos do dendê são extraídos dois tipos de óleo: o de palma, retirado da polpa ou mesocarpo e o de palmiste (rico em ácido láurico), obtido da amêndoa ou endosperma (similar ao óleo de coco). O termo óleo de dendê é mais comumente utilizado para o óleo bruto e o termo Óleo de Palma

para o óleo refinado. Ambos têm diversos usos, seja na alimentação humana e animal, ou em finalidades não comestíveis (NUNES, AKATSU, ANGELIS, 2007).

Com uma área plantada de 88,7 mil hectares, o Brasil produziu em 2005 aproximadamente 185 mil toneladas de óleo de dendê. Tanto área cultivada quanto a produção de dendê aumentaram cerca de 30% entre 1995 e 2005. O óleo de palma ocupa a segunda posição entre os óleos vegetais mais consumidos no mundo, logo após o de soja. A Malásia e a Indonésia são os principais produtores mundiais, respondendo por mais de 80% da produção mundial e se caracterizando como os maiores exportadores mundiais do produto (NUNES, AKATSU, ANGELIS, 2007).

Atualmente a produção brasileira está localizada nos Estados do Pará, Amazonas, Amapá e Bahia. O Pará é responsável pela maior parte da produção brasileira de dendê. A área cultivada em 2007 foi estimada em 60 mil hectares, o que resultou em uma produção de 65 mil toneladas de óleo (95% do total de óleo produzido no Brasil). A empresa Agropalma é a empresa líder do setor e responde por 60% do total da área plantada e por 75% do óleo total produzido (FARIAS et al, 2009).

2.3.4 Catalisadores

Para que ocorra a reação de transesterificação pode, ou não, ser necessária a presença de um catalisador que pode ser ácido, básico ou enzimático, sendo que esses catalisadores podem ser homogêneos ou heterogêneos (PINTO et al,2005).

2.3.4.1 Catálise homogênea

Os catalisadores homogêneos são tradicionalmente utilizados nas indústrias para a produção de biodiesel. São catalisadores líquidos, relativamente baratos que proporcionam reações mais rápidas, com melhores índices de conversão dos triacilglicerídeos e a temperaturas mais amenas, entre 40 e 65^{0}C. Porém, sua remoção do meio reacional é tecnicamente complexa, dificultando sua reciclagem e gerando grande quantidade de resíduos, aumentando os gastos na produção e conseqüentemente o custo do produto final, tornando esses tradicionais catalisadores menos favoráveis (PINTO et al,2005).

Na catálise básica homogênea utilizam-se bases fortes como hidróxidos, carbonatos ou metóxidos de sódio ou potássio, entre outros (SUAREZ et al, 2007). Tais catalisadores alcalinos, não são resistentes à presença de água no meio reacional e a óleos vegetais que apresentam altos teores de ácidos graxos livres em sua composição. Com a sua utilização sob estas condições, ocorre à formação de sabões (Figura 9), um produto indesejável originado a partir da neutralização dos ácidos graxos livres no óleo e também pela saponificação do triacilglicerídeo. Esta formação de sabões é prejudicial, pois consome o catalisador e diminui a produção de biodiesel, além disso, torna a separação do produto bem mais difícil, sendo necessária a purificação (neutralização) do produto final (PINTO et al, 2005; BAYENSE et al, 1996).

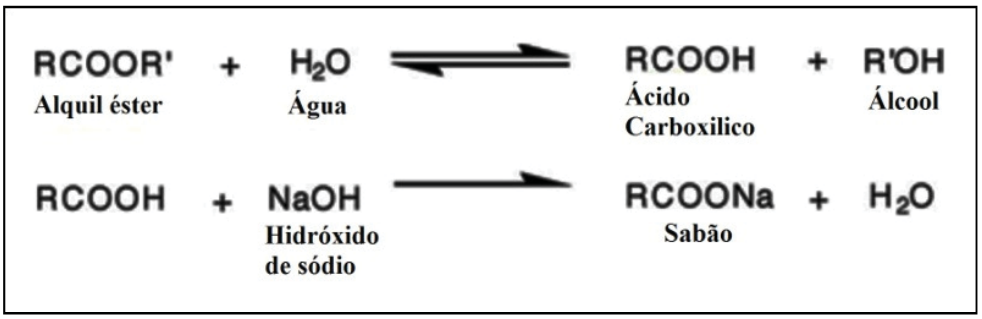

Figura 9. Equação da formação de sabões a partir de ácidos graxos (PINTO et al,2005).

Uma das alternativas para evitar a formação de sabões pode ser a utilização de um catalisador ácido. Os catalisadores ácidos mais utilizados são ácido sulfúrico, ácido sulfônico, ácido fosfórico e ácido clorídrico. Nesta catálise, a taxa de conversão de triacilglicerídeos em comparação com a catálise básica é muito inferior, e a demanda de catalisador e a relação álcool/óleo são mais altas. No que diz respeito ao tempo de reação e consumo energético, os valores também são altos comparados à catálise básica, visto que, a maioria dos processos de catálise ácida demanda aquecimento para ativação da reação. Entretanto, esta rota ácida permite a utilização de óleos com um alto teor de ácidos graxos livres tais como, óleos vegetais não refinados, óleos provenientes de fritura e resíduos industriais ricos em triglicerídeos (LOFRANO, 2008).

O mecanismo da reação de transesterificação de triacilglicerídeos utilizando catalisador básico em um processo catalítico homogêneo está demonstrado na Figura 10: (1) produção de

espécies ativas, RO^-; (2) ataque nucleofílico do RO^- sobre o grupo carbonila do triacilglicerídeo, formando um intermediário tetraédrico; (3) quebra do intermediário; (4) regeneração das espécies ativas RO^-. A sequência se repete por duas vezes.

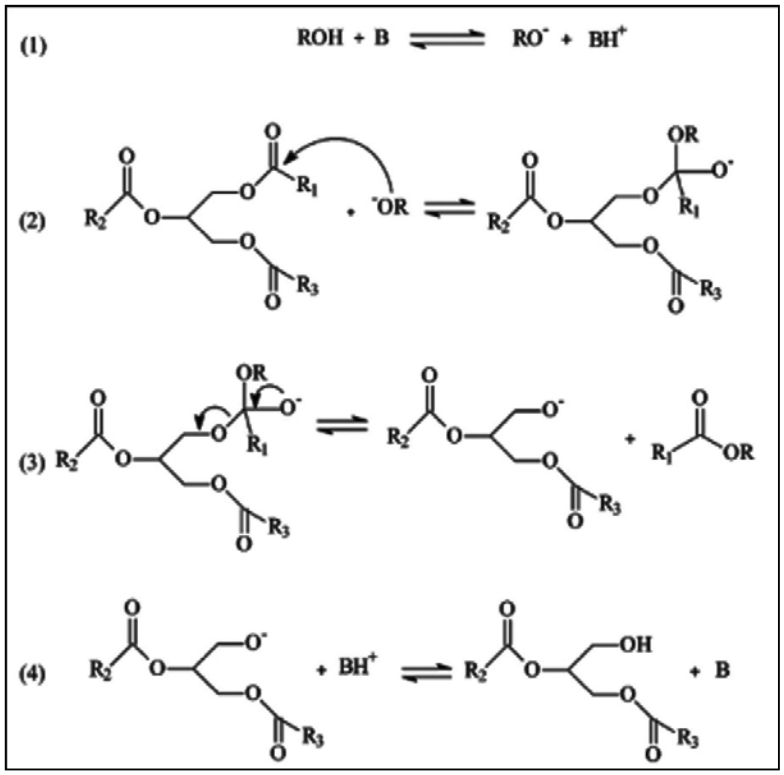

Figura 10. Mecanismo da reação de transesterificação de triacilglicerídeos utilizando catalisador básico em um processo catalítico homogêneo, onde: B – catalisador básico; R_1, R_2 e R_3 – cadeia carbônica de ácidos graxos; R – grupo alquil do álcool (LOTERO *et al.*, 2005).

O mecanismo da reação de transesterificação de triacilglicerídeos com catalisador ácido em um processo catalítico homogêneo está demonstrado na Figura 11: (1) protonação do grupo carbonila pelo catalisador ácido; (2) ataque nucleofílico do álcool, formando um intermediário tetraédrico; (3) migração do próton e quebra do intermediário. A sequência se repete por duas vezes.

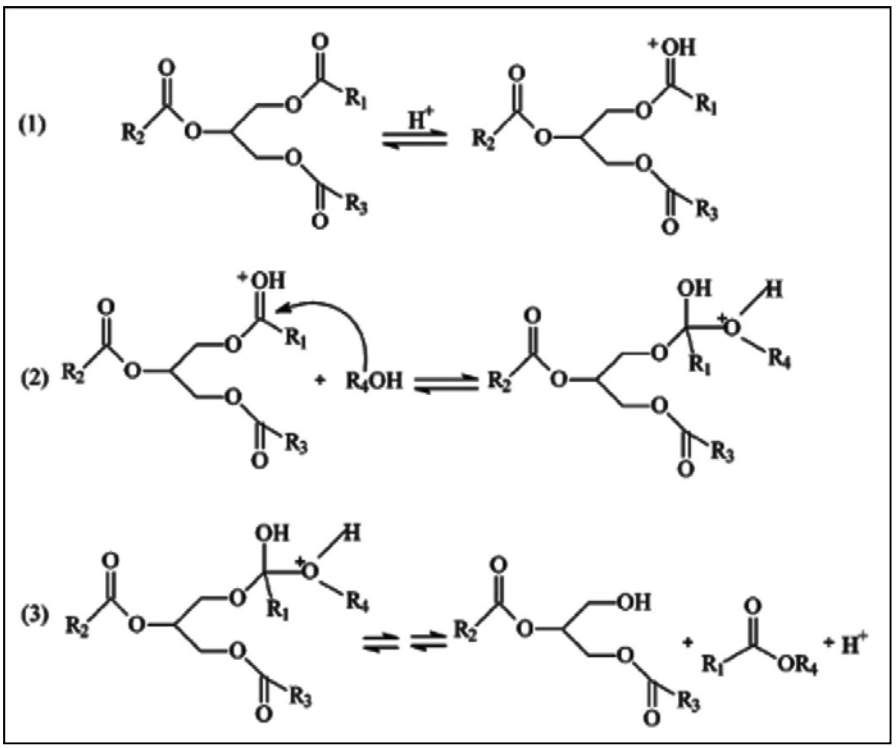

Figura 11. Mecanismo da reação de transesterificação de triglicerídeos utilizando catalisador ácido em um processo catalítico homogêneo, onde: R_1, R_2 e R_3 – cadeia carbônica de ácidos graxos; R_4 – grupo alquil do álcool (LOTERO et al, 2005).

2.3.4.2 Catálise heterogênea

Os catalisadores heterogêneos mais citados na literatura incluem zeólitas, enzimas imobilizadas em suportes sólidos, argilas, resinas de troca-iônica, óxidos de metais de transição, entre outros. Os catalisadores heterogêneos podem ter propriedades ácidas ou básicas e podem ser extraídos do meio reacional por uma simples filtração podendo ser reutilizados. Além disso, sua utilização no processo de produção do biodiesel torna mais simples a separação, purificação e lavagem do produto (DABDOUB et al, 2009).

Este tipo de catalisador não provoca a produção de sabões através da saponificação dos triacilglicerídeos ou da neutralização dos ácidos graxos livres. Além disso, apresentam alta eficiência e atividade tanto via transesterificação de triacilglicerídeos quanto esterificação de ácidos graxos livres. Entretanto, ocorre um menor rendimento de ésteres alquilícos e a reação

necessita de altos valores de temperatura e pressão e elevado tempo, possuindo, assim, pouca aplicabilidade industrial (DABDOUB et al, 2009).

Portanto, para que estes catalisadores sejam considerados economicamente competitivos frente aos catalisadores atualmente utilizados, torna-se necessário que atuem eficientemente a temperaturas abaixo de 120^0C e com, no máximo, de 2 a 3 kg/cm^2 de pressão. Apesar destes empecilhos, os catalisadores heterogêneos são a esperança na evolução dos processos de produção de biodiesel (PINTO et al,2005; DABDOUB et al, 2009).

Alguns dos catalisadores heterogêneos básicos mais comumente utilizados são K/ɣ-Al_2O_3, $HTiO_2$ hydrotalcite, óxidos mistos de Ca e Zn, CaO e MgO suportados em Al_2O_3, óxidos de metais alcalino-terrosos, zeolitas básicas, entre outros. O mecanismo da reação de transesterificação utilizando-se um catalisador heterogêneo básico é mostrado na figura 12. (CHOUHAN; SARMA, 2011).

A partir da observação da figura 12, nota-se a semelhança deste mecanismo com catalisador básico heterogêneo com o mecanismo do processo catalítico básico homogêneo (figura 10). O primeiro passo leva a formação de um grupo alcóxido (espécies ativas RO^-) e a protonação da base (óxido metálico). O grupo alcóxido ataca uma carbonila do triglicerídeo, formando o intermediário tetraédrico, que após sua quebra, origina o diglicerídeo e uma molécula de éster de ácido graxo (biodiesel). A sequência se repete por duas vezes. (FARIA et al, 2008).

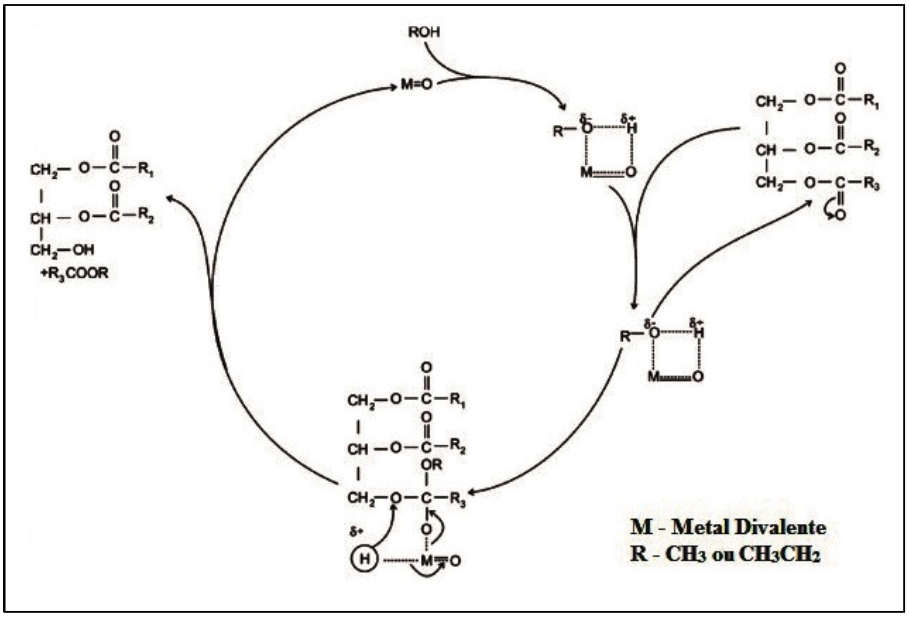

Figura 12 – Mecanismo geral de um catalisador heterogêneo básico durante a transesterificação (CHOUHAN; SARMA, 2011).

Atualmente, as pesquisas na área de biodiesel estão focadas em explorar novos catalisadores sólidos ácidos para a reação de transesterificação. Estes catalisadores apresentam vantagens em relação aos catalisadores ácidos homogêneos, como, (1) eles eliminam a necessidade de lavagem do biodiesel, (2) fácil separação do catalisador do meio reacional, resultando em menor nível de contaminação do produto, (3) fácil regeneração e reutilização do catalisador e (4) reduz problemas de corrosão.

O catalisador sólido ácido ideal para a reação de transesterificação deve possuir características como um sistema interconectado de poros largos, uma concentração moderada a elevada de sítios ácidos fortes, e superfície hidrofóbica. Entretanto, pesquisas envolvendo o uso direto de catalisadores sólidos ácidos para produção de biodiesel não tem sido amplamente exploradas. Isso se deve, em parte, às limitações deste sistema, como baixa taxa reacional e reações paralelas indesejáveis. O mecanismo da reação de transesterificação de triglicerídeos, ou de um éster simples, catalisada por sólidos ácidos ainda não foi completamente elucidado, porém, um mecanismo proposto para a reação é mostrado na figura 13. A partir da observação da figura 13, nota-se a semelhança deste mecanismo com catalisador ácido heterogêneo com o mecanismo do processo catalítico ácido homogêneo (figura 11).

Alguns dos catalisadores heterogêneos ácidos mais utilizados são ZrO_2, ZrO_2 sulfatada (SO_4^{2-}/ZrO_2), óxidos mistos de alumínio e zircônio modificados com tungstênio (WZA), peneiras moleculares mesoporosas (Al-MCM-41), resinas ácidas (Amberlist 15), sílica mesoporosa funcionalizada com ácido organosulfônico, heteropoliácidos, (HPA), entre outros (CHOUHAN; SARMA, 2011).

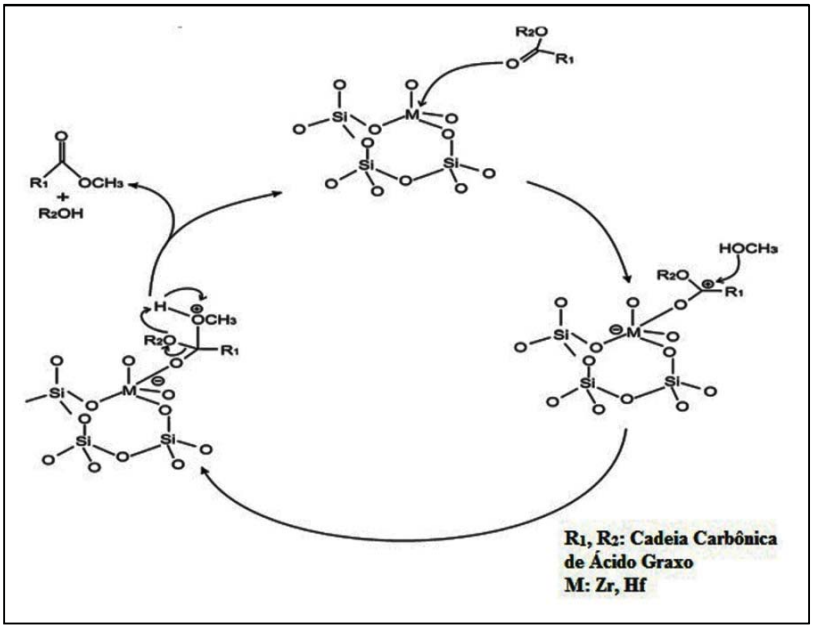

Figura 13. Mecanismo geral de um catalisador heterogêneo ácido durante a transesterificação (CHOUHAN; SARMA, 2011).

2.3.4.3 Catálise enzimática

A partir de meados do século XX as enzimas passaram a ser extraídas das células produtoras e ocuparam papel importante em processos industriais. Este fato intensificou a atenção destinada às enzimas, o que permitiu sua comercialização e utilização em larga escala. As principais vantagens do uso de catalisadores enzimáticos em relação ao uso de catalisadores químicos em processos industriais são (1) às condições brandas de pH e temperatura, (2) benefícios econômicos devido a redução de tempo e energia elétrica gastos, além da preservação de tanques reacionais, os quais não são mais submetidos a altas pressões, temperaturas e agentes corrosivos e (3) diminuição de rejeitos industriais.

Atualmente a disponibilidade de catalisadores biológicos tem modificado inúmeros setores industriais, bem como acrescentado benefícios e melhoria da qualidade de vida humana. Pelo exposto, pode-se estabelecer que enzimas são macromoléculas catalisadoras de reações químicas, presentes em todos os seres vivos, dos quais podem ser extraídas e aplicadas, livres ou imobilizadas, em sistemas diferentes daquele que as originou. Um esquema do mecanismo da atuação catalítica das enzimas em seus substratos é representado na figura 14 (SAID, PIETRO, 2004).

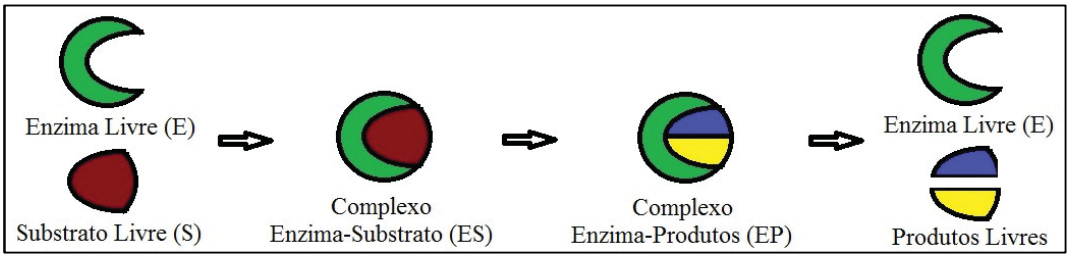

Figura 14. Mecanismo básico da catálise enzimática.

Podem ser utilizadas enzimas na forma extracelular ou intracelular (célula integral), imobilizadas em suportes que possibilitem a reciclagem do catalisador (RANGANATHAN et al, 2008). Entretanto, este tipo de catálise ainda possui problemas quanto à aplicação em escala industrial, tais quais, custo elevado da enzima, baixa taxa reacional e desativação da enzima (LAM et al, 2010)

2.3.4.3.1 <u>Imobilização enzimática</u>

Com a finalidade de aproveitar o potencial catalítico das enzimas, e reunir as vantagens dessas proteínas sobre os catalisadores químicos, tem-se estudado formas de torná-las insolúveis ao meio reacional. Uma forma de fazer isso é ligar as enzimas em suportes sólidos insolúveis ao meio reacional, sendo estas conhecidas como enzimas imobilizadas. Ao se obter uma enzima imobilizada ativa e estável, e com boa especificidade ao substrato, as enzimas podem ser utilizadas nos processos industriais de forma similar aos catalisadores químicos heterogêneos. O complexo enzima-suporte mantém as características físicas do suporte e ao mesmo tempo, retém a atividade biológica da enzima na forma solúvel (SAID, PIETRO, 2004).

Pode-se dizer então que uma enzima imobilizada é uma enzima fisicamente confinada ou localizada em uma região definida do espaço que mantém sua atividade catalítica podendo ser utilizada repetidamente. Em geral, os métodos de imobilização podem ser classificados em duas categorias, os baseados em retenção química e os baseados em retenção física da enzima ao suporte, como mostrado na Figura 15.

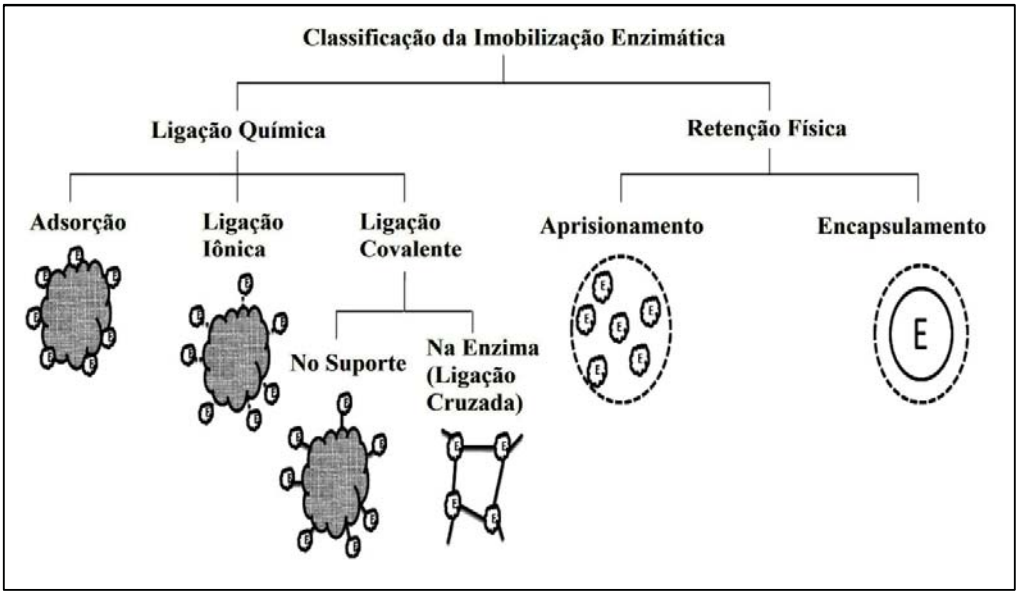

Figura 15. Métodos de Imobilização. (JEGANNATHAN et al 2008).

A imobilização por adsorção consiste em prender a enzima na superfície do suporte por meio de forças de interação fracas, como, por exemplo, forças de van der Waals ou de dispersão. O procedimento para este método é fácil, de baixo custo, não envolve substâncias químicas tóxicas e apresenta alta atividade para produção de biodiesel, além disso, a enzima imobilizada não sofre limitações de transferência de massa. Porém, a enzima pode ser facilmente removida do suporte durante a reação devido as forças fracas de interação enzima-suporte. Essa remoção pode ocorrer, por exemplo, pelo contato do material com o sistema de agitação da reação. Neste caso ocorre perda de atividade enzimática pela lixiviação da enzima e não pela desativação da mesma. A intensidade da força de interação enzima-suporte pode causar distorções na estrutura da proteína, as quais são mais pronunciadas em baixas cargas de enzima imobilizadas. Deste modo, a estabilidade da enzima imobilizada por adsorção é muito baixa, tornando a reutilização imprópria para aplicação industrial. (JEGANNATHAN et al 2008)

2.3.4.3.2 Lipases

Atualmente existe um interesse na utilização de lipases como catalisadores para produção de biodiesel, devido a sua maior eficiência, alta seletividade, menor consumo energético (condições brandas de reação), e menor geração de resíduos (ambientalmente favorável) (AKOH et al., 2007).

Lipases são enzimas importantes na natureza, responsáveis pela reciclagem de lipídeos. Elas também estão envolvidas na quebra e mobilização de lipídeos nas células de diferentes seres vivos assim como na transferência de lipídeos entre diferentes organismos. Estas enzimas são classificadas como hidrolases (triacilglicerol acil hidrolases, E.C. 3.1.1.3) e possuem tanto atividade sintética como hidrolítica. Elas são biocatalisadores efetivos que atuam na interface entre um substrato insolúvel (triacilglicerídeos) e uma fase aquosa (álcool), na qual elas são solúveis, o que torna estas enzimas apropriadas para aplicação na reação de transesterificação. Muito trabalho vem sendo realizado na área de transesterificação de triacilglicerídeos catalisada por lipases com o intuito de superar as limitações que impedem o uso das enzimas em larga escala (BAJAJ et al, 2010).

Como detalhado abaixo, seu sítio ativo é constituído por uma tríade catalítica composta pelos aminoácidos Ser-His-Asp (Figura 16) e o mecanismo reacional das lipases (Figura 17) ocorre da seguinte maneira, [1] ocorre a ligação do lipídeo, ativação do resíduo nucleofílico de serina pela histidina vizinha e ataque nucleofílico da carbonila do substrato por Ser O^-. [2] Ocorre a formação do intermediário tetraédrico transitório, com O^- estabilizado por interações com dois grupos NH de peptídeos, a histidina doa um próton para o grupo de saída do substrato (álcool). [3] Há formação de um intermediário covalente (enzima + grupo acila), no qual o componente ácido do substrato é esterificado para o resíduo serina da enzima. A molécula de água que entra é ativada pelo resíduo de histidina vizinho, e o íon hidroxila resultante realiza um ataque nucleofílico na carbonila do intermediário covalente. [4] O resíduo de histidina doa um próton para o átomo de oxigênio do resíduo ativado de serina, a ligação éster entre serina e componente acila é quebrada, e o produto acila é liberado. Lipases de fontes diferentes possuem propriedades diferentes, assim, lipases provenientes de diferentes microorganismos tem sido

estudadas quanto a sua atividade frente à transesterificacão de triacilglicerídeos em busca da enzima ideal (GONÇALVES et al, 2006; JAEGER, 1999; JEGANNATHAN et al, 2008).

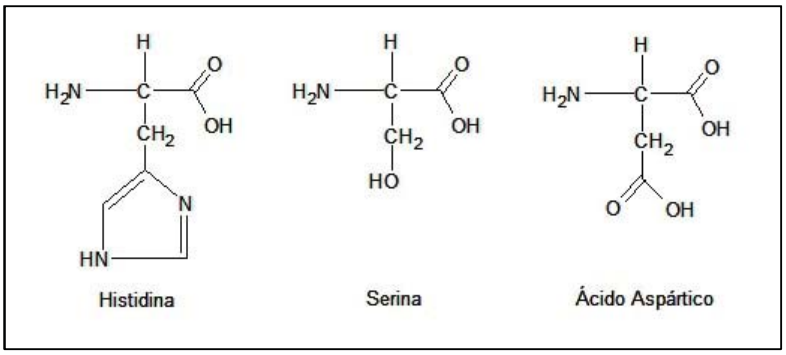

Figura 16 – Aminoácidos que compõem a tríade catalítica das lipases. (FERSHT, 1995).

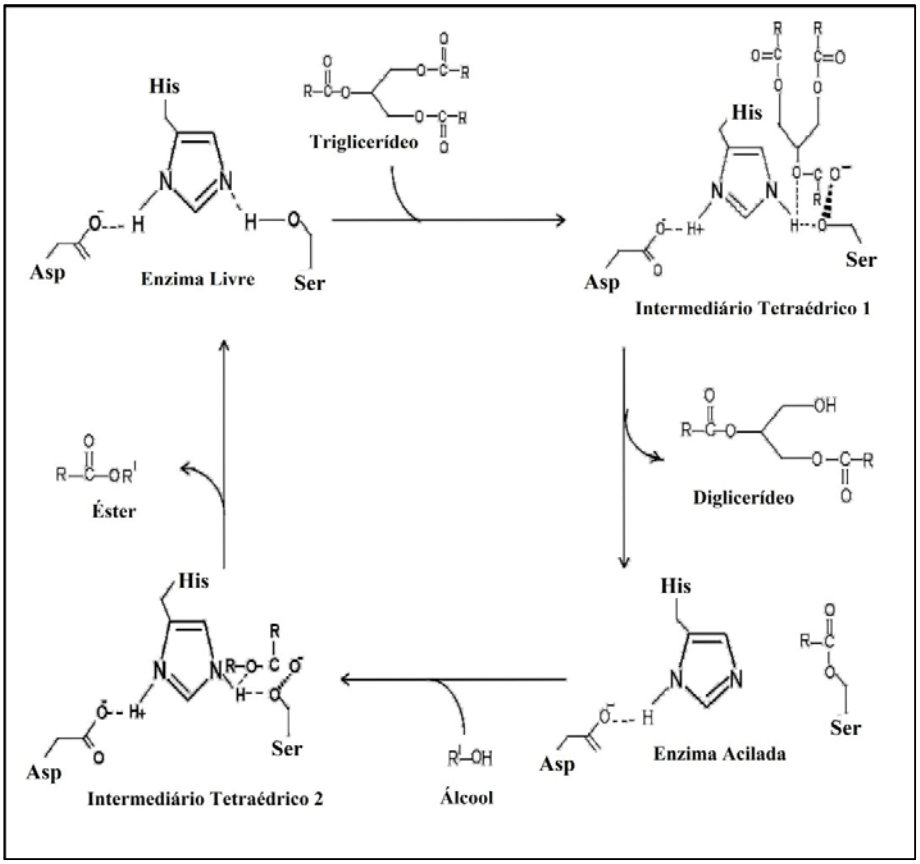

Figura 17. Mecanismo reacional das lipases na transesterificação (JEGANNATHAN et al, 2008).

O uso de enzimas livres torna praticamente impossível a recuperação e reuso das mesmas, o que incrementa os custos econômicos do processo, além de promover a contaminação do produto com atividade enzimática residual. Essas dificuldades podem ser superadas pelo uso dessas enzimas na sua forma imobilizada, permitindo o reuso desse biocatalisador várias vezes, reduzindo custos e ainda melhorando a qualidade do produto obtido (DABDOUB, BRONZEL, RAMPIM, 2009).

2.3.4.3.3 Lipase de *Thermomyces lanuginosus*

A enzima lipase do fungo *Thermomyces lanuginosus* (chamado antigamente de *Humicola lanuginosa*) é uma proteína constituída de 269 resíduos de aminoácidos. Seu peso molecular é de 31.700 g/mol e seu ponto isoelétrico é 4,4. Sua forma é grosseiramente esférica com tamanho de 35 Å x 45 Å x 50 Å (neste ponto, é relevante observar que a molécula de enzima não é capaz de entrar nas cavidades das zeolitas). A Figura 18 mostra as estruturas da enzima em sua forma aberta e fechada. A estrutura da maioria das lipases, incluindo a lipase em questão, possui o *lid*, que é uma estrutura móvel composta por uma alfa-hélice que cobre o sítio ativo tornando-o inacessível para o substrato. Esta conformação da molécula da enzima é chamada de fechada e ocorre quando a enzima está em solução aquosa onde não existe um solvente orgânico hidrofóbico que formaria a interface onde as lipases atuam. Assim, esta conformação fechada possui uma baixa atividade lipolítica. Na presença de um substrato hidrofóbico ocorre um rearranjo do *lid* de modo que o sítio ativo da enzima torna-se acessível ao substrato, sendo esta conformação da molécula chamada de conformação aberta. Esta conformação ocorre na interface entre o lipídeo (molécula hidrofóbica) e a água e neste caso a enzima exibe maior atividade lipolítica. (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010; CAJAL, 2000; ZHENG et al, 2011; LI, ZONG, MA, 2009).

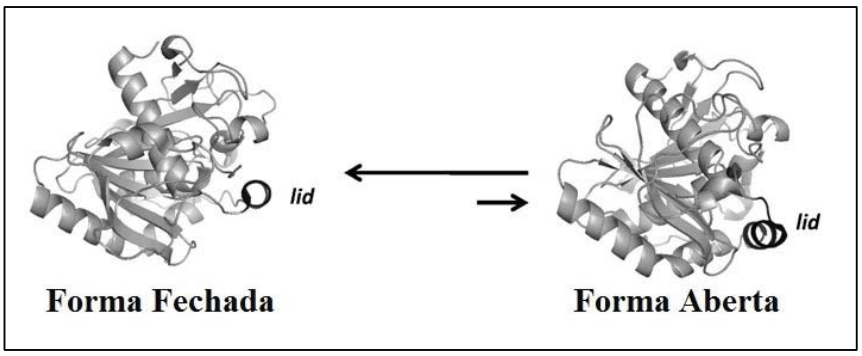

Figura 18. Estrutura tridimensional da lipase de *Thermomyces lanuginosus*. (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010)

Em se tratando do uso da lipase de *Thermomyces lanuginosus* para produção de biodiesel, um problema que deve ser superado é a sua régio especificidade para as posições 1 e 3 da molécula de triacilglicerídeo. Os rendimentos da reação devem ser próximos de 100 % para tornar o uso da catalise enzimática competitivo quando comparado com a catálise química. Assim, uma migração do grupo acila da posição 2 para a posição 1 ou 3 da molécula de triacilglicerídeo deve ocorrer durante a reação (Figura 19). Na verdade, esta migração ocorre espontaneamente em muitos casos e diferentes fatores podem influenciar esta migração do grupo acila. Du et al (2005) reportaram que o uso de sílica, que foi utilizada como suporte sólido para imobilizar a lipase de *Thermomyces lanuginosus*, contribuiu de maneira significativa para promoção desta migração no processo de transesterificação. (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010)

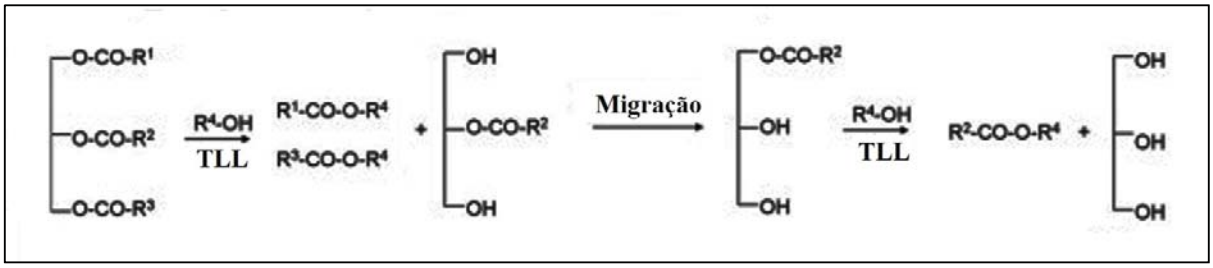

Figura 19. Migração do grupo acila da posição 2 para a posição 1 ou 3 da molécula de triacilglicerídeo. (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010)

2.4 ZEÓLITAS

O termo zeólitas abrange a classe dos alumino silicatos hidratados de metais alcalinos ou alcalinos terrosos, principalmente sódio, potássio, cálcio e magnésio. Estão estruturadas em redes cristalinas tridimensionais compostas de unidades primárias e unidades secundárias, ambas de construção. As unidades primárias de construção são compostas de tetraedros do tipo TO_4 (T = Si, Al, B, Ge, Fe, P, Co) unidos nos vértices pelo átomo de oxigênio como demonstrado na Figura 20 (LUNA & SCHUCHARDT, 2001).

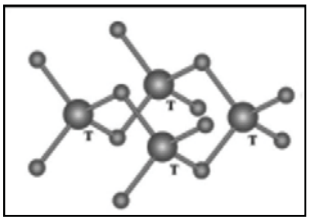

Figura 20. Unidades primárias de construção.

As unidades secundárias de construção, apresentadas na Figura 21, são 16 unidades que consistem de 4 a 16 átomos T e, quando ligadas, podem formar diversos tipos de redes cristalinas (BAERLOCHER et al, 2001; GHOBARKAR et al, 1999). A união dessas unidades secundárias de construção, forma estruturas mais complexas chamadas de unidades poliédricas de construção. Uma das unidades poliédricas mais importantes é a gaiola sodalita (Figura 22, item I)

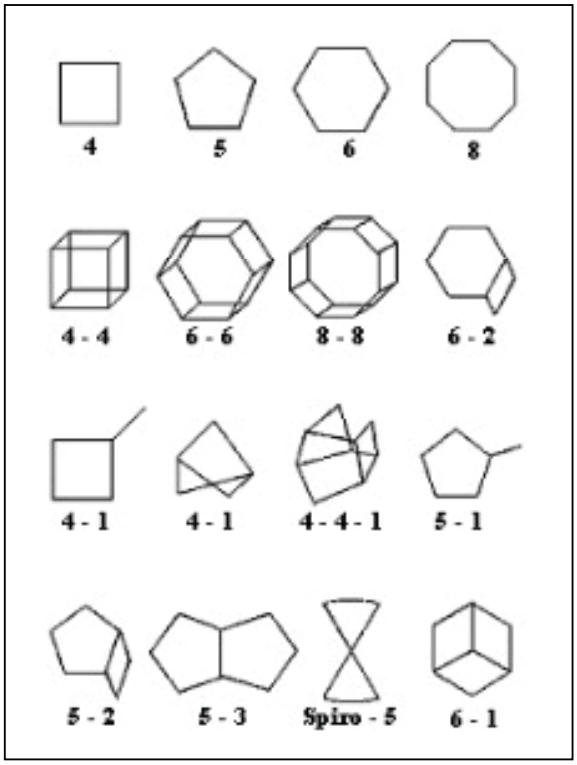

Figura 21. Unidades secundárias de construção.

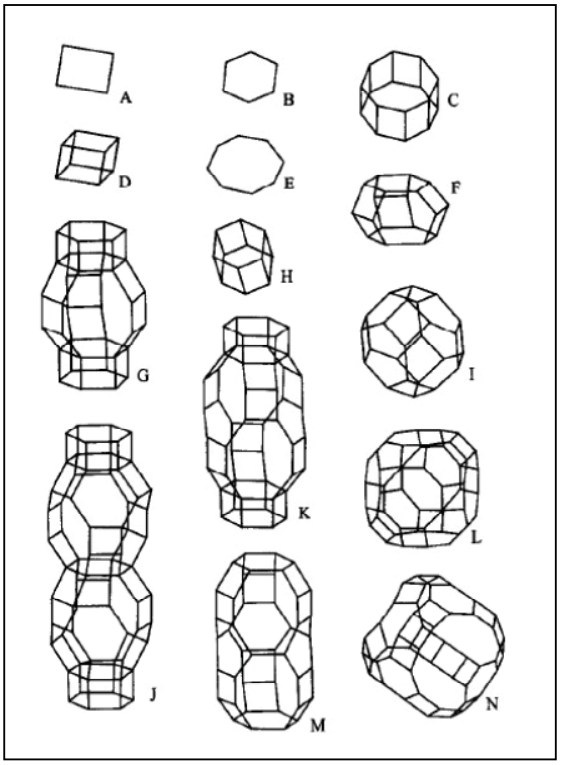

Figura 22. Unidades poliédricas de construção.

A Gaiola Sodalita, consiste em um octaedro formado por 4 e 6 tetraedros e é usada para descrever as complexas estruturas das zeólitas A e Faujasita, sendo esta isoestrutural das zeólitas sintéticas X e Y, como demonstradas na Figura 23.

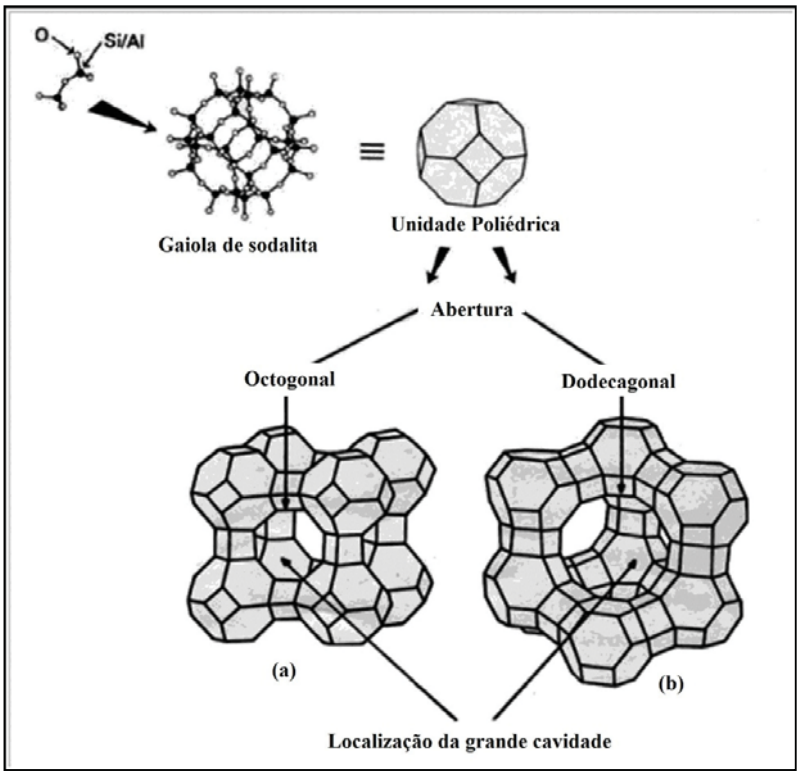

Figura 23. Formação estrutural das zeólitas: (a) Zeólita A (LTA); (b) Zeólita X ou Y (FAU).

As zeólitas apresentam esses canais e cavidades interconectadas de dimensões moleculares (geralmente inferiores a 10 Å) (LUNA & SCHUCHARDT, 2001) que podem ser preenchidas por água, sais e íons de compensação, possibilitando-as a capacidade de troca iônica e seletividade catalítica. Essa estrutura microporosa confere as zeólitas uma superfície interna muito grande, quando comparada à sua superfície externa. Dessa maneira, quanto maior a estrutura microporosa, maior será a mobilidade dos reagentes em seu interior proporcionando uma maior atividade catalítica (SMART & MOORE, 1995).

A substituição de Si^{+4} por Al^{+3}, no caso da estrutura SiO_4 e AlO_4, gera uma densidade de carga negativa que é balanceada por cátions trocáveis de metais alcalinos

(Na^+, K^+) ou alcalino terrosos (Mg^{2+}, Ca^{2+}) assegurando a estabilidade do sólido, possibilitando assim variar suas funções catalíticas (CUNDY & COX, 2003).

2.4.1 Importância das zeólitas

As zeólitas são materiais de grande interesse econômico e, portanto, são objeto de intensa pesquisa tanto nos laboratórios acadêmicos quanto nos industriais. Tal fato ocorre, pois são eficientes catalisadores heterogêneos aplicados em inúmeras reações industriais.

Os fatores que as tornam eficientes e desejáveis são os seguintes:

- As zeólitas possuem uma grande área superficial para que ocorram as reações, devido a sua configuração da rede tetraédrica;
- Possuem uma estrutura bem definida, com um sistema micro-poroso e uma complexa rede de canais, fatores pelos quais também são consideradas excelentes peneiras moleculares;
- São catalisadores que apresentam uma alta estabilidade térmica. Dessa forma, podem ser utilizados em reações com elevadas temperaturas, mantendo a sua atividade e sem sofrer danos em sua estrutura cristalina;
- As zeólitas são facilmente regeneradas e recuperadas, já que são catalisadores sólidos que podem ser separadas por processos simples como, por exemplo, a filtração;
- Possuem poros uniformes, o que as tornam bem específicas para determinadas reações;
- Pode sofrer processos de troca iônica, o que lhes proporcionam novas atividades catalíticas (CUNDY & COX, 2003; LUNA & SCHUCHARDT, 2001);
- Apresentam diferentes tipos de seletividade perante diversos materiais, por causa da sua variedade de tamanho de poros. Tal característica é uma das que mais se destaca, pois, é através dela, que a estrutura da zeólita pode conduzir uma reação catalítica na direção de um produto específico, evitando, dessa maneira, reações paralelas indesejáveis (LUNA & SCHUCHARDT, 2001).

2.4.2 Produção de biodiesel a partir de catalisadores zeolíticos

A literatura apresenta diversas sínteses de transesterificação de óleo vegetal para produção de biodiesel utilizando zeólitas como catalisadores (YAGIZ, KAZAN, AKIN, 2007; RAMOS et al 2008; SUPAMATHANON, 2011; KANSEDO, LEE, BHATIA 2, 2009; XIE, HUANG, LEE, 2007; MACARIO et al, 2010). Suppes (2004) e colaboradores realizaram experimentos bastante detalhados com várias zeólitas de diferentes composições químicas e estruturais. As zeólitas estudadas por eles foram as zeólitas NaX faujasitica e o titanosilicato ETS-10. Os estudos foram conduzidos a uma temperatura de reação de 60ºC para a série de zeolita faujasitica NaX, 120ºC para a série de zeólita ETS-10 e 150º para a série de catalisadores metálicos.Os melhores resultados em termos de conversão ou percentagem de ésteres metílicos formados ocorreram para a zeólita ETS-10 (95,8% ésteres metílicos), NaO*x*/NaX (96,5% ésteres metílicos;) e K-ETS10 (93,8% de ésteres metílicos) em condições de reação de 150ºC e 24 horas e uma relação de óleo/metanol de 1:6. Os resultados obtidos nas mesmas condições reacionais anteriores com diminuição da temperatura para 60ºC foram: zeólitas NaO*x*/NaX (84,2% ésteres metílicos), ETS-10 (80,7% de ésteres metílicos) e Cs-ETS10 (71,9% de ésteres metílicos).

Embora o trabalho feito por Suppes (2004) tenha demonstrado o potencial dessas zeólitas tradicionais como possíveis catalisadores para a reação de transesterificação de óleos vegetais a biodiesel, a sua aplicação em escala industrial em substituição aos catalisadores homogêneos não foi viável em virtudes de sérios fatores, tais como o fato da infra-estrutura industrial estar montada para uso de catalisadores homogêneos, lixiviação dos cátions de compensação para o biodiesel e elevado tempo de reação. Todavia, o estudo motivou a busca de novas zeólitas, principalmente zeólitas que pudessem ter o potencial de catalisar a reação de transesterificação na via etílica, ou seja, usando etanol. (SUPPES et al, 2004). Dentro dessa proposta de busca de novos catalisadores para síntese de biodiesel usando a rota etílica, foram elaborados neste estudo os experimentos para a produção de biodiesel utilizando a rota etílica para a reação de transesterificação dos triacilglicerídeos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 SÍNTESES DOS MATERIAIS ZEOLÍTICOS

3.1.1 Sinteses de zeolitas gismondina sódica (GIS/Na).

Em uma síntese típica soluções de aluminato de sódio e hidróxido de sódio foram preparadas usando água destilada. Uma solução de hidróxido de tetrapropilamônio (20% TPAOH em H_2O) foi acrescentada a solução de aluminato de sódio e permaneceu em agitação por 30 minutos. Em seguida foi acrescentada a sílica amorfa (Cabosil Grade EH-5), em quantidade suficiente para que a composição molar da reação fosse: 1 SiO_2 : 1 Al_2O_3 : 4,5 Na_2O : 35,5 TPAOH : 500 H_2O. O gel final foi colocado em reator e a cristalização ocorreu por 5 dias a 100°C. O precipitado zeolitico foi filtrado, lavado com uma solução contendo NaOH (pH 10) e seco em mufla com a seguinte rampa de aquecimento: 25-100°C por 1 hora; 100-150°C por ½ hora; 150-200°C por ½ hora; 200°C por 1 hora. Esta amostra foi denominada de GIS/Na. A zeolita foi convertida para a forma GIS/Ca, GIS/Mg, GIS/Ni, GIS/Sr, GIS/Mn, e GIS/Co por troca iônica com a solução de sal apropriada.

3.1.1.2 Troca iônica da zeólita GIS/Na com diferentes cátions

No presente trabalho foram realizadas trocas iônicas da zeolita gismondina sódica (GIS/Na) com os seguintes cátions: Mg^{2+}, Ca^{2+}, Sr^{2+}, Co^{2+}, Mn^{2+} e Ni^{2+}, sendo que as zeolitas submetidas ao processo de troca iônica serão doravante denominadas como, GIS/Mg, GIS/Ca, GIS/Sr, GIS/Co, GIS/Mn e GIS/Ni. Um experimento típico de troca iônica foi realizado da seguinte maneira: 1g de zeolita gismondina (GIS/Na) foi adicionado a 30 mL de uma solução 0,5 Molar do respectivo cátion. A mistura foi agitada por 1 hora a temperatura ambiente e depois colocada em estufa a 80°C por 24 horas. Após este período a reação de troca iônica foi interrompida, a solução foi resfriada a temperatura ambiente e a amostra foi filtrada, lavada com excesso de água destilada e seca a temperatura ambiente. As amostras secas foram caracterizadas por raios-X.

3.1.2 Sínteses de zeolitas com topologia faujasitica (FAU/Co e FAU/Cu)

Materiais zeolíticos com topologia similar a da zeolita fajasita enriquecidas com alto teor de Co e Cu foram sintetizados no laboratório LACET do IBILCE-UNESP sob coordenação do Prof. Dr. José Geraldo Nery. Devido à possibilidade do pedido de patenteamento destes materiais junto a agencia de inovação da UNESP (AUIN – Agencia Unesp de Inovação), detalhes da síntese destes materiais não serão fornecidos neste momento. Todavia, os dados de caracterização estrutural e analise química, assim como os resultados das reações de transesterificação serão apresentados nas próximas seções. Estes materiais foram classificados em dois grupos: FAU/Co (enriquecida com Co^{2+}) e FAU/Cu (enriquecida com Cu^{2+}).

3.1.2.1 Troca iônica das zeólitas FAU/Co e FAU/Cu

No presente trabalho foram realizadas trocas iônicas da zeolita FAU/Co e FAU/Cu com NH_4Cl, sendo que as zeolitas submetidas ao processo de troca iônica serão doravante denominadas como, FAU/Co.NH_4 e FAU/Cu.NH_4. Um experimento típico de troca iônica foi realizado da seguinte maneira: 1g de zeolita com topologia similar a da zeolita faujasita (FAU/Co ou FAU/Cu) foi adicionando a 30 mL de uma solução 1 molar de cloreto de amônio (NH_4Cl). A mistura foi agitada por 1 hora a temperatura ambiente e depois colocada em estufa a 80°C por 24 horas. Após este período a reação de troca iônica foi interrompida, a solução foi resfriada a temperatura ambiente e a amostra foi filtrada, lavada com excesso de água destilada e seca a temperatura ambiente. As amostras secas foram submetidas a caracterização por raios-X. Depois de prontas, estas amostras foram calcinadas com o objetivo de formar sítios ácidos.

3.1.2.2 Calcinação da zeólita FAU/Co.NH_4 e FAU/Cu.NH_4

Após a troca iônica descrita no item anterior (3.1.4) foram realizados experimentos de calcinação de parte do material obtido, tanto para a zeolita FAU/Co.NH_4 quanto para a zeolita FAU/Cu.NH_4. A calcinação foi realizada com a seguinte rampa de aquecimento: 25–100°C (1hora), 100–150°C (1/2 hora), 150–200°C (1/2 hora) e 200–550 °C (3 horas). Após atingir 550°C a amostra permaneceu nesta temperatura durante 8 horas. Durante este processo ocorre a formação de sítios ácidos

devido à decomposição do íon amônio com liberação do amoníaco e geração do sítio ácido de Brønsted. Desta forma o material submetido à calcinação a 550°C foi denominado FAU/Co.H e FAU/Cu.H.

3.1.3 Caracterização dos materiais zeoliticos

As análises de raios-X foram realizadas no departamento de física da USP São Carlos- SP com o grupo da Professora Yvonne P. Mascarenhas. Os dados foram coletados utilizando um difratômetro RIGAKU RU200B provido de ânodo rotatório de cobre (Cu), filtro de níquel (Ni) e cristal monocromador de grafite. O ângulo de varredura para a coleta de dados variou de 5 a 80 graus (2 theta).

Os dados de microscopia eletrônica de varredura (SEM) foram obtidos através do microscópio eletrônico de varredura FEI Magellan 400 L. Tal aparelho operou com feixe de elétrons reguláveis para tensões de 5 a 25 kV. As análises foram realizadas na universidade federal de São Carlos-UFSCar junto ao departamento de Engenharia de Materiais no Laboratório de Caracterização Estrutural (LCE).

A análise química elementar das zeólitas GIS/Na, GIS/Ni, FAU/Co e FAU/Cu para Si, Al, Na, Ni, Co e Cu foram feitas na Central Analítica do Instituto de Química da USP - São Paulo, que possui um equipamento de espectrometria de emissão atômica com plasma induzido (ICP-AES) Spectro Ciros CCD.

3.2 ENSAIOS ENZIMÁTICOS

3.2.1 Imobilização enzimática nos materiais zeolíticos

A imobilização da enzima lipase de *Thermomyces lanuginosus* (Lipolase 100L Sigma) nos materiais zeolíticos preparados como descrito nos itens anteriores foi realizada seguindo procedimento adaptado da literatura (DE VASCONCELLOS et al, 2012). O procedimento experimental padrão para um experimento de imobilização enzimática foi feito da seguinte forma: 200 mg da zeolita foram adicionados a uma solução contendo 100 µL da enzima lipase de *Thermomyces lanuginosus* (Lipolase 100L Sigma) e 3900 µL de tampão fosfato pH 7 (diluição da enzima em tampão 1/40). A mistura foi agitada por 16 horas a temperatura ambiente. Após as 16 horas de reação, a mistura foi centrifugada para separar o material sólido (complexo zeolita-enzima) do

sobrenadante (água mãe). Esta solução sobrenadante (água mãe) foi utilizada para determinar a quantidade de enzima imobilizada, como será descrito adiante na seção 3.2.3. O complexo zeolita-enzima foi lavado com água destilada e posteriormente foi colocado em recipiente tampado por filme plástico e deixado a temperatura ambiente para secagem. Depois de seco o material foi estocado em freezer até o momento de sua utilização. Os experimentos de imobilização enzimática originaram os complexos zeolita-enzima utilizados neste trabalho (GIS/Na/ENZ, GIS/Ca/ENZ, GIS/Mg/ENZ, GIS/Sr/ENZ, GIS/Co/ENZ, GIS/Ni/ENZ, GIS/Mn/ENZ, FAU/Co/ENZ, FAU/Cu/ENZ, FAU/Co.NH_4/ENZ, FAU/Cu.NH_4/ENZ, FAU/Co.H/ENZ e FAU/Cu.H/ENZ).

3.2.2 Pré-tratamento da lipase antes da imobilização enzimática

Este procedimento foi adaptado da literatura (LEE et al, 2006). Como descrito anteriormente (seção 3.2.1), em um procedimental experimental de imobilização enzimática típico, foi preparada uma solução contendo a enzima Lipolase 100L, tampão fosfato e zeolita, a qual permaneceu em agitação durante 16 horas. O pré-tratamento da enzima antes da imobilização enzimática ocorreu da seguinte forma: adicionou-se 40 μL de óleo de soja à solução contendo enzima Lipolase 100L e tampão fosfato. Esta solução permaneceu em agitação durante 30 minutos, período no qual ocorreu a interação do substrato (óleo de soja) com o sítio ativo da enzima antes que o processo de imobilização no suporte sólido (zeolita) tivesse começado. Somente depois de passados esses 30 minutos de agitação a zeolita foi então adicionada. Portanto, espera-se que a interação entra a enzima e o suporte tenha ocorrido em uma região da molécula de enzima afastada de seu sítio ativo, devido ao impedimento estérico gerado pelo substrato (enzima foi imobilizada em sua forma aberta que apresenta maior atividade lipolítica).

3.2.3 Determinação da quantidade de enzima adsorvida sobre o suporte

A quantidade de enzima imobilizada no material sólido é equivalente à concentração inicial de enzima no inicio da imobilização (quantidade conhecida) menos a concentração de enzima presente na solução de água mãe. Assim, a concentração de enzima presente na solução de água mãe foi determinada pelo método de Bradford

(1976) e para determinação da quantidade de proteína adsorvida sobre o suporte sólido (P_g) foi utilizada a equação 1 (YAGIZ, 2007).

$$P_g = \frac{C_0 V_0 - C_f V_f}{w} \qquad (1)$$

Onde:

C_0 – concentração inicial de proteína (mg/mL).

C_f – concentração final de proteína, ou da solução de água mãe (mg/mL)

V_0 – volume inicial utilizado na imobilização (mL)

V_f – volume final após a imobilização (mL)

w – massa do suporte sólido utilizada na imobilização (g).

3.2.4 Determinação da atividade enzimática

A atividade enzimática da enzima livre e do complexo zeolita-enzima foram determinadas pelo método inicialmente descrito por Winker & Stuckman (1979) modificado por Krieger (1995) que mede a quantidade em micromoles de p-nitrofenol liberada através da hidrólise do p-nitrofenil palmitato. O p-nitrofenol liberado foi determinado por espectrofotometria (410 nm) utilizando a equação (2).

$$U = \left[\left(\frac{Abs \times V_t}{\varepsilon \times X_e \times T}\right) \times 10^3\right] \times D \quad (2)$$

Onde:

U – unidade de atividade enzimática expressa em U/mL, onde uma unidade de atividade é definida como a formação de 1 μmol de p-nitrofenol por minuto nas condições experimentais do teste.

Abs – absorbância da amostra medida a 410 nm.

V_t – voluma total da reação (mL)

X_e – massa de enzima (mg) ou volume de solução enzimática (mL) utilizada no teste.

ε – coeficiente de extinção molar (L/mol.cm).

T – tempo de incubação.

10^3 – fator de correção da unidade de ε.

D – diluição da amostra, se necessário.

Para esta medida foi necessário o preparo de duas soluções, que foram chamadas de *solução A* e *solução B*. A *solução A* consiste de palmitato de p-nitro fenila (Sigma) diluído em isopropanol, na concentração de 3 mg/mL. A *solução B* foi preparada com tampão fosfato pH 7 (0,05M) e triton X 100 (2%). Por fim, foi preparada uma solução final contendo 1 mL de *solução A* e 9 mL de *solução B*. Esta solução final foi chamada de solução de substrato.

A atividade da enzima livre foi medida de acordo com o seguinte procedimento: 100 µL de solução de enzima livre diluída em tampão foram adicionados a 900 µL de solução de substrato e a mistura foi incubada por 1 minuto a 37°C. A quantidade de p-nitrofenol formado foi determinada por espectrofotometria (410 nm) e uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima requerida para produzir 1 µmol de ,mkp-nitrofenol por minuto nas condições experimentais do teste. Em paralelo, foi feita uma reação nas mesmas condições, porém sem a enzima, para servir de branco.

As atividades dos complexos zeolita-enzima foram medidas de acordo com o seguinte procedimento: 2 a 5 mg do complexo zeolita-enzima foram misturados com 100 µL de tampão fosfato pH 7 e 900 µL de solução de substrato. Esta mistura foi incubada por 1 minuto a 37°C. A reação foi interrompida por resfriamento a temperatura de 3-5°C negativos, que foi obtida com um banho de etanol e gelo. Após a interrupção da reação, a mistura reacional foi centrifugada para separar o sólido e o sobrenadante. A medida espectrofotométrica a 410 nm do sobrenadante foi feita imediatamente após a centrifugação. Uma reação feita nas mesmas condições, porém sem a enzima, foi feita em paralelo para servir de branco

3.2.5 Influência dos íons metálicos na atividade enzimática

O efeito de vários íons metálicos (Mg^{2+}, Ca^{2+}, Sr^{2+}, Ni^{2+}, Mn^{2+}, Co^{2+} e Cu^{2+}) na atividade enzimática, foi estudado pela adição desses íons metálicos em diferentes concentrações (10mM, 1mM e 0,1mM) na reação de determinação da atividade enzimática da enzima livre (item 3.2.4.1).

3.3 REAÇÕES DE TRANSESTERIFICAÇÃO DOS ÓLEOS DE SOJA E PALMA

As reações de transesterificação foram catalisadas por zeolitas, a enzima livre e os complexos zeolita-enzima. Os reagentes utilizados para as reações de

transesterificação foram óleo de palma refinado (Triangulo Alimentos LTDA – Itápolis/SP), óleo de soja refinado (Cargill – São Paulo/SP) e álcool metílico ou etílico (Synth ou Vetec). A quantificação dos ésteres presentes no biodiesel obtido foi feita em colaboração com o CEMPEQC – Centro de Monitoramento e Pesquisa da Qualidade de Combustíveis, Biocombustíveis, Petróleo e Derivados, IQ-UNESP Araraquara. As analises foram realizadas em cromatógrafo gasoso Shimadzu GC2010 com detector de ionização de chama (GC-FID) contendo amostrador automático AOC 5000 para amostras líquidas. A separação cromatográfica foi realizada com uma coluna capilar Restek-Carbowax com 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 milímetros de espessura de fase estacionária (polietilenoglicol). Foi utilizado hélio como gás de arraste com fluxo constante, injeção direta das alíquotas das amostras com injetor em modo de divisão, temperatura do injetor e dector de 250°C e temperatura do forno de 210°C (isotérmica).

3.3.1 Reações utilizando zeolita gismondina pura como catalisador

As zeolitas gismondina preparadas neste trabalho (seção 3.1.1) foram utilizadas como catalisador na reação de transesterificação de óleo de palma. As reações foram realizadas com 5% de catalisador em relação à massa de óleo, relação molar óleo:álcool de 1:5 e temperatura de 45°C por 48 horas (DE VASCONCELLOS et al, 2012). O procedimento experimental padrão para um experimento de transesterificação foi feito da seguinte forma: em um balão de fundo redondo ou tubo de ensaio foi adicionado 2 g de óleo de palma, 700 µL de etanol (relação molar óleo:álcool de 1:5) e 100 mg da zeolita gismondina (5% em relação a massa de óleo). A reação foi realizada a temperatura de 45°C com agitação magnética por 48 horas. Após este período a reação foi interrompida. O catalisador foi separado por centrifugação e a fase líquida (produto da reação) foi armazeda em microtubo tipo eppendorf. O produto da reação foi analisado por cromatografia gasosa ou cromatografia de camada delgada.

3.3.2 Reações utilizando complexos zeolita gismondina-enzima como catalisador

Os complexos zeolitas gismondina-enzima preparados neste trabalho (seção 3.2.1) foram utilizados como catalisador na reação de transesterificação de óleo de palma. As reações foram realizadas com 5% de catalisador em relação à massa de óleo,

relação molar óleo:álcool de 1:5 e temperatura de 45°C por 48 horas (DE VASCONCELLOS et al, 2012). O procedimento experimental padrão para um experimento transesterificação foi feito da seguinte forma: em um balão de fundo redondo ou tubo de ensaio foi adicionado 2 g de óleo de palma, 700 µL de etanol (relação molar óleo:álcool de 1:5) e 100 mg da zeolita gismondina (5% em relação a massa de óleo). A adição de álcool foi feita em etapas para evitar a desnaturação da enzima, sendo a primeira adição no tempo zero de reação (150 µL), ou seja, logo após a adição da enzima, a segunda adição é feita após três horas de reação (150 µL), a terceira após seis horas de reação (200 µL) e a última adição de álcool é feita após 24 horas de reação (200 µL). A reação foi realizada em banho de óleo de silicone na temperatura de 45°C com agitação magnética por 48 horas. Após este período a reação foi interrompida. O catalisador foi separado por centrifugação e a fase líquida (produto da reação) foi armazeda em microtubo tipo eppendorf. O produto da reação foi analisado por cromatografia gasosa ou cromatografia de camada delgada.

3.3.3 Reações utilizando zeolita faujasita pura como catalisador

As zeolitas com topologia faujasitica preparadas neste trabalho (seção 3.1.2) foram utilizadas como catalisador heterogêneo na reação de transesterificação dos óleos de soja e de palma. Para estas reações dois procedimentos experimentais diferentes foram realizados.

Um dos procedimentos foi realizado com as seguintes condições experimentais: 5% de catalisador em relação à massa de óleo, relação molar óleo:álcool de 1:5 e temperatura de 45°C por 48 horas (DE VASCONCELLOS et al, 2012). O procedimento experimental padrão para este experimento de transesterificação foi feito da seguinte forma: em um balão de fundo redondo ou tubo de ensaio foi adicionado 2 g de óleo de palma, 700 µL de etanol (relação molar óleo:álcool de 1:5) e 100 mg da zeolita com topologia faujasitica (5% em relação a massa de óleo). A reação foi realizada em banho de óleo de silicone na temperatura de 45°C com agitação magnética por 48 horas. Após este período a reação foi interrompida. O catalisador foi separado por centrifugação e a fase líquida (produto da reação) foi armazeda em microtubo tipo eppendorf. O produto da reação foi analisado por cromatografia gasosa ou cromatografia de camada delgada.

Outro procedimento foi realizado com as seguintes condições experimentais: 3% de catalisador em relação à massa de óleo, relação molar óleo:álcool de 1:50 e

temperatura de 100°C por 12 horas (SHUMAKER, 2007; SUPPES, 2004). O procedimento experimental padrão para este experimento de transesterificação foi feito da seguinte forma: em um balão de fundo redondo foi adicionado 50 g de óleo de soja ou palma, 167 mL de etanol (relação molar óleo:álcool de 1:50) e 1,5 g da zeolita com topologia faujasitica (3% em relação a massa de óleo). A reação foi realizada em banho de óleo de silicone na temperatura de 100°C com agitação magnética por 12 horas. Após este período a reação foi interrompida. O catalisador foi separado por filtração a vácuo, o excesso de álcool foi recuperado por evaporação a baixa pressão e o glicerol formado na reação foi separado por decantação ou centrifugação. A fase líquida (produto da reação) foi armazenada em frasco de vidro. O produto da reação foi analisado por cromatografia gasosa ou cromatografia de camada delgada.

3.3.4 Reações utilizando complexos zeolita faujasita-enzima como catalisador.

Os complexos zeolitas faujasita-enzima preparados neste trabalho (seção 3.2.1) foram utilizados como catalisador na reação de transesterificação de óleo de palma. As reações foram realizadas com 5% de catalisador em relação à massa de óleo, relação molar óleo:álcool de 1:5 e temperatura de 45°C por 48 horas (DE VASCONCELLOS et al, 2012). O procedimento experimental padrão para um experimento transesterificação foi feito da seguinte forma: em um balão de fundo redondo ou tubo de ensaio foi adicionado 2 g de óleo de palma, 700 µL de etanol (relação molar óleo:álcool de 1:5) e 100 mg do complexo zeolita faujasita-enzima (5% em relação a massa de óleo). A adição de álcool foi feita em etapas para evitar a desnaturação da enzima, sendo a primeira adição no tempo zero de reação (150 µL), ou seja, logo após a adição da enzima, a segunda adição é feita após três horas de reação (150 µL), a terceira após seis horas de reação (200 µL) e a última adição de álcool é feita após 24 horas de reação (200 µL). A reação foi realizada em banho de óleo de silicone na temperatura de 45°C com agitação magnética por 48 horas. Após este período a reação foi interrompida. O catalisador foi separado por centrifugação e a fase líquida (produto da reação) foi armazeda em microtubo tipo eppendorf. O produto da reação foi analisado por cromatografia gasosa ou cromatografia de camada delgada.

3.3.5 Reações utilizando a enzima livre (TLL) como catalisador

As reações de transesterificação utilizando a solução comercial de lipase de *Thermomyces lanuginosus* (Lipolase 100L Sigma) em sua forma livre como catalisador foram realizadas de acordo com metodologia adaptada da literatura (WANG et al, 2010). O procedimento experimental padrão para um experimento transesterificação foi feito da seguinte forma: em um balão de fundo redondo ou tubo de ensaio foi adicionado 2 g de óleo de palma, 700 µL de etanol (relação molar óleo:álcool de 1:5) e 200 µL de Lipolase 100L (4 mg de enzima). A adição de álcool foi feita em etapas para evitar a desnaturação da enzima, sendo a primeira adição no tempo zero de reação (150 µL), ou seja, logo após a adição da enzima, a segunda adição é feita após três horas de reação (150 µL), a terceira após seis horas de reação (200 µL) e a última adição de álcool é feita após 24 horas de reação (200 µL). A reação foi realizada em banho de óleo de silicone na temperatura de 45°C com agitação magnética por 48 horas. Após este período a reação foi interrompida. O catalisador foi separado por centrifugação e a fase líquida (produto da reação) foi armazeda em microtubo tipo eppendorf. O produto da reação foi analisado por cromatografia gasosa ou cromatografia de camada delgada.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. SINTESES E CARACTERIZAÇÃO DAS MATRIZES ZEOLITICAS

4.1.1 Difração de raios-X dos materiais zeoliticos

Zeolitas em sua maioria apresentam-se em fases policristalinas e a análise por difração de raios X (DRX) é uma técnica essencial para a caracterização estrutural das mesmas. A difração de raios-X de materiais policristalinos é útil na identificação de um material, pois cada material policristalino apresenta um padrão de difração único. A determinação dos parâmetros de cela unitária, monitoração das transições de fase, avaliação de um tratamento pós-síntese na indução de mudanças estruturais, verificação da cristalinidade de uma amostra, são também possíveis de serem avaliadas usando esta técnica (McCUSKER; BAERLOCHER, 2007).

Seguindo as metodologias descritas anteriormente nas seções 3.1.1 e 3.1.2 foram realizadas as sínteses das zeolitas GIS/Na, FAU/Cu e FAU/Co. Na Figura 24 são apresentados os difratogramas de raios-X das zeolitas com topologia similar a da zeolita faujasita (FAU/Co e FAU/Cu). Os padrões de DRX das amostras de zeolita gismondina e de seus derivados de troca iônica com os diferentes cátions são apresentados nas Figuras 25 - 30. Os dados obtidos tanto para a zeolita faujasita como para zeolita gismondina estão de acordo com os padrões de difração calculados, conforme reportado na literatura (BAERLOCHER; MEIER, 1972, e BAUR, 1964).

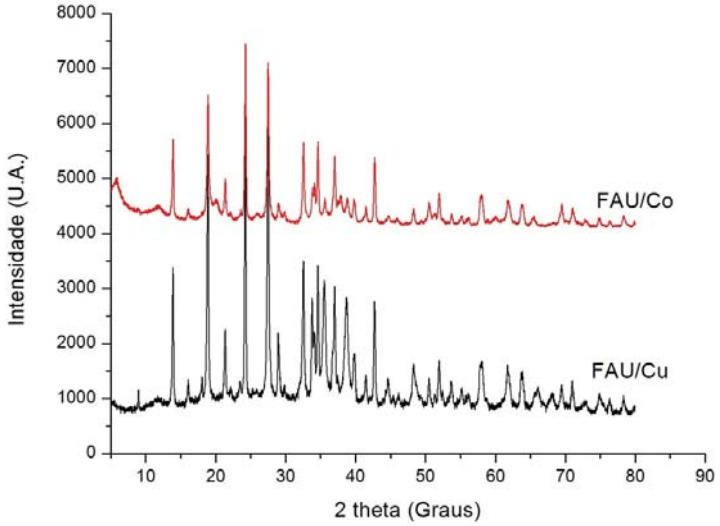

Figura 24. Difratograma de raios-X das zeolitas FAU/Cu e FAU/Co.

Os difratogramas de raios-X (figura 24) para os materiais denominados FAU/Co e FAU/Cu (figura 24) apresentam um padrão de difração bastante complexo devido à superposição dos picos, o que dificulta uma indexação precisa usando dados de difração obtidos de difratômetros comuns. Para uma melhor identificação estrutural deste material precisaríamos de dados de difração com mais alta precisão e resolução. Estes dados são obtidos com radiação sincrotrônica e com dados de microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução. Estes dados serão obtidos num futuro próximo. Todavia uma identificação mais rápida revela uma grande semelhança entre os principais picos de difração com a zeolita faujasita (International Zeolite Association - IZA). A zeolita faujasita tem composição química $Na_{28,8}Ca_{14,4}(H_2O)_{263}[Si_{134,4}Al_{57,6}O_{384}]$, e os parâmetros de cela unitária de a = 24,74 Å ($\alpha = 90^o$), b = 24,74 ($\beta = 90^o$) Å, c = 24,74 Å ($\gamma = 90^o$). A análise química dos materiais foi feita no Instituto de Química da USP com equipamento de espectrometria de emissão atômica com plasma induzido (ICP-AES) Spectro Ciros CCD. Na tabela 5, são mostrados os dados da analise química para os materiais FAU/Co e FAU/Cu em porcentagem de óxidos de alumínio, silício, sódio, cobalto e cobre.

Tabela 5. Composição química das zeolitas FAU/Co e FAU/Cu em porcentagem dos óxidos dos elementos químicos presentes em sua estrutura.

Amostra	Al_2O_3 (%)	SiO_2 (%)	Na_2O (%)	CoO (%)	CuO (%)	H_2O(%)
FAU/Co	21,16	26,14	17,64	14,75	-	20,31
FAU/Cu	21,52	30,96	20,97	-	15,53	11,02

Sua caracterização estrutural ainda se encontra em progresso e dados tais como isotermas de adsorção de nitrogênio (BET), análise de microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução (HTEM) ainda não foram coletados, porém, os dados preliminares de difração permitem antecipar que estes materiais talvez seja de topologia similar a da zeolita faujasita. Os valores de 2 theta reportados nas tabelas 6 e 7, são valores experimentais, obtidos a partir da observação dos principais picos de difração presentes nos difratogramas dos materiais sintetizados (FAU/Co e FAU/Cu). Os valores de distâncias interplanares (d_{hkl}) reportados nas referidas tabelas são os valores teóricos, reportados na literatura (*Atlas of Zeolite Framework Types*).

Tabela 6. Dados da zeolita FAU/Co.

2Θ	d_{hkl}	2Θ	d_{hkl}	2Θ	d_{hkl}
6,00	14,28	27,50	3,22	37,00	2,42
14,00	6,18	29,00	3,09	38,00	2,38
16,20	--	29,80	3,02	38,90	--
19,00	4,76	32,50	2,76	40,00	2,23
21,50	4,12	33,80	2,63	41,50	2,18
22,20	--	34,20	--	42,90	2,09
23,50	3,77	34,70	2,59	44,70	--
24,25	3,57	35,60	2,52	48,40	--

Tabela 7. Dados da zeolita FAU/Cu.

2Θ	d_{hkl}	2Θ	d_{hkl}	2Θ	d_{hkl}
9,00	--	27,50	3,22	37,50	2,38
14,00	6,18	29,00	3,09	38,70	--
18,00	--	29,70	3,02	39,80	--
19,00	--	32,50	2,76	41,50	2,18
18,90	4,76	33,90	2,63	42,70	2,12
21,40	4,12	34,00	--	44,50	--
22,20	--	34,70	2,59	46,20	--
23,40	3,77	35,50	2,52	48,40	--
24,20	--	37,00	2,38		

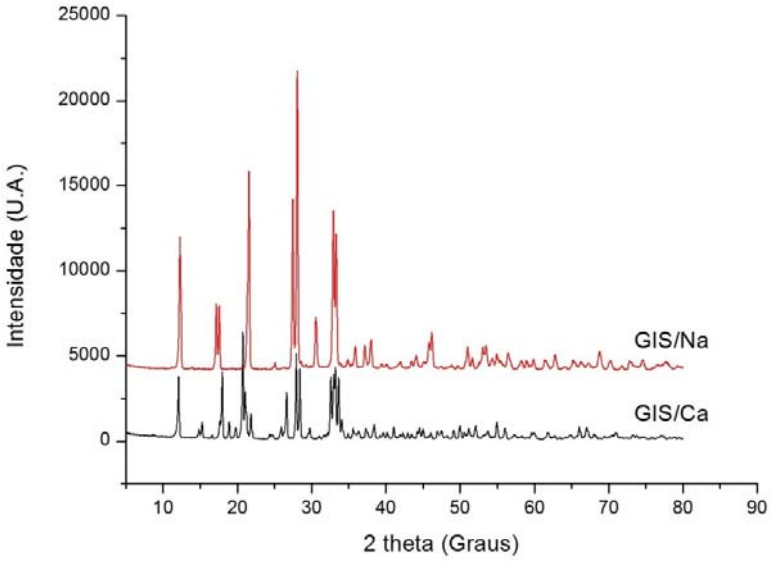

Figura 25. Difratograma de raios-X das zeolitas GIS/Na e GIS/Ca.

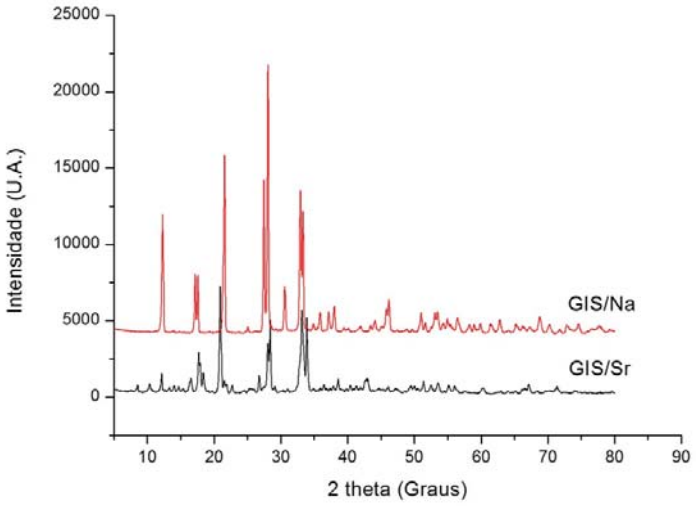

Figura 26. Difratograma de raios-X das zeolitas GIS/Na e GIS/Sr.

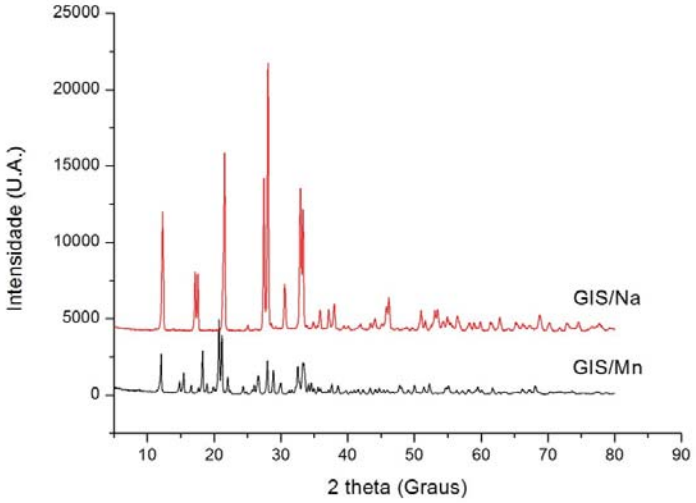

Figura 27. Difratograma de raios-X das zeolitas GIS/Na e GIS/Mn.

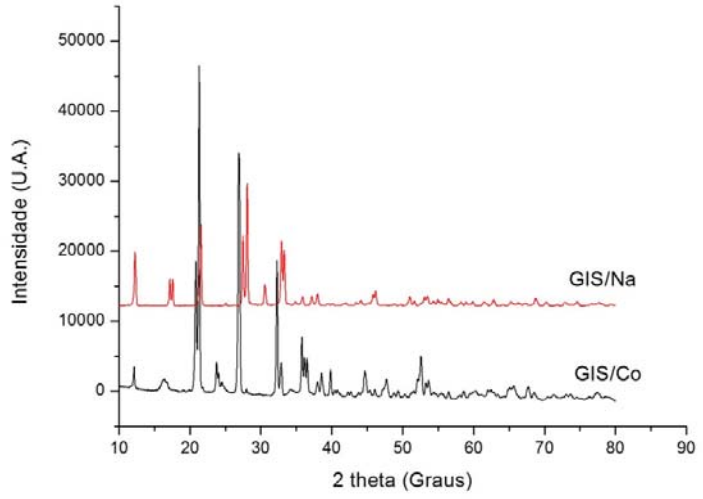

Figura 28. Difratograma de raios-X das zeolitas GIS/Na e GIS/Co.

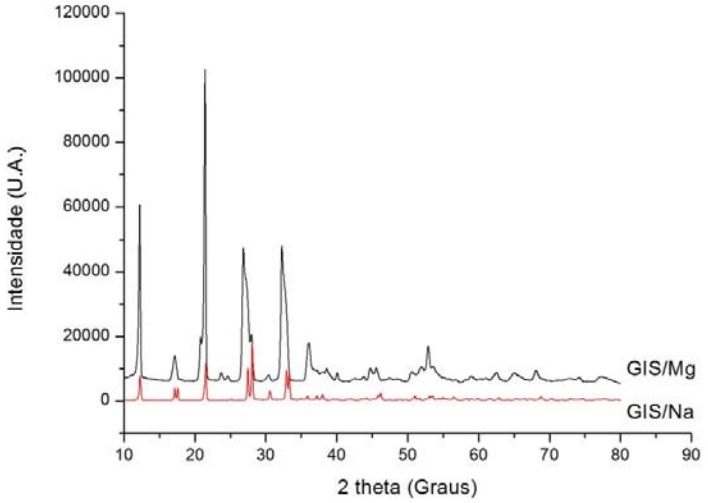

Figura 29. Difratograma de raios-X das zeolitas GIS/Na e GIS/Mg.

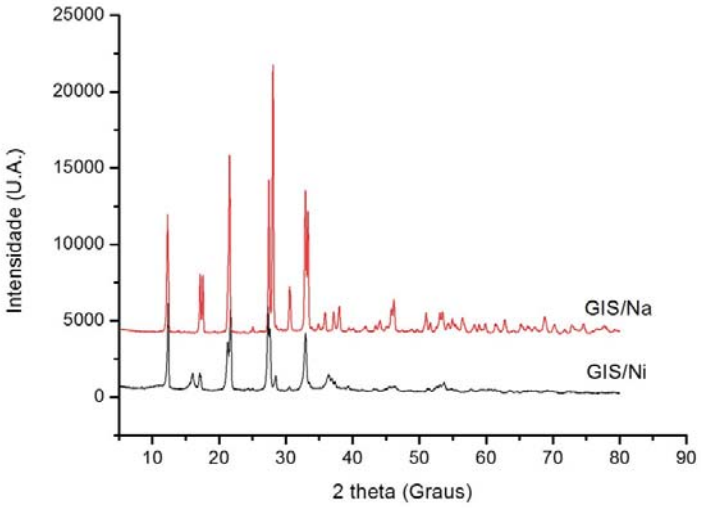

Figura 30. Difratograma de raios-X das zeolitas GIS/Na e GIS/Ni.

De acordo com metodologia descrita na seção 3.1.2 foi realizada a troca iônica da zeolita gismondina (GIS/Na) com seis diferentes cátions: cálcio (GIS/Ca), magnésio (GIS/Mg), estrôncio (GIS/Sr), manganês (GIS/Mn), cobalto (GIS/Co) e níquel (GIS/Ni). Após a troca iônica foram estudados os difratogramas de raios-X das amostras GIS/Ca, GIS/Mg, GIS/Sr, GIS/Co, GIS/Mn e GIS/Ni em comparação com o da zeolita gismondina em sua forma sódica GIS/Na, a fim de observar se ocorreu alguma mudança na estrutura cristalina da zeolita após a realização da troca iônica. Análises dos padrões de DRX das amostras submetidas ao processo de troca iônica revelam que houve mudanças estruturais significativas quando comparadas com a amostra original GIS/Na. Apesar da posição dos picos de difração não terem variado muito, houve variações nas intensidades e alargamento nas linhas.

A zeolita gismondina tem composição química Na_6 $(H_2O)_{12}[Si_{10}Al_6O_{32}]$, e parâmetros de cela unitária de a = 10,04 Å , b = 10,04 Å, c = 10,04 Å, β = 134,21^o (ALBERT, 1998) A análise química dos materiais foi feita no Instituto de Química da USP com equipamento de espectrometria de emissão atômica com plasma induzido (ICP-AES) Spectro Ciros CCD. Na tabela 8, são mostrados os dados da analise química para os materiais GIS/Na e GIS/Ni em porcentagem de óxidos de alumínio, silício, sódio e níquel.

Tabela 8. Composição química das zeolitas GIS/Na e GIS/Ni em porcentagem dos óxidos dos elementos químicos presentes em sua estrutura.

Amostra	Al_2O_3 (%)	SiO_2 (%)	Na_2O (%)	NiO (%)	H_2O(%)
GIS/Na	31,37	35,90	17,43	-	15,30
GIS/Ni	31,38	32,84	16,52	2,39	16,87

A estrutura da zeolita GIS/Ca já foi descrita na literatura, ela tem composição química $Ca_4Al_8Si_8O_{32} \cdot 18,9\ H_2O$ e parâmetros de cela unitária de a = 10,02 Å, b = 10,61 Å, c = 9,83 Å, $\beta = 92,29^o$ (ALBERT et al, 1998). As estruturas das zeolitas GIS/Mn e GIS/Sr também já foram descritas na literatura. A zeolita GIS/Mn tem composição química $Mn_{3,85}Al_8Si_8O_{32} \cdot 15,8\ H_2O$, grupo espacial $P2_1/C$ e parâmetros de cela unitária de a = 10,00 Å, b = 10,61 Å, c = 9,66 Å. A zeolita GIS/Sr tem composição química $Sr_{3,95}Al_8Si_8O_{32} \cdot 16,8\ H_2O$, grupo espacial $P2_1/C$ e tamanho de cela unitária de a = 9,84 Å, b = 10,55 Å, c = 9,99 Å (NERY et al, 2003).

4.1.2 Miscrocopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A Figura 31 mostra a microscopia eletrônica de varredura (MEV) obtida para a zeolita gismondina (GIS/Na). Em geral, as partículas da zeolita possuem morfologia cúbica ou piramidal. O processo de troca iônica ao qual esta zeolita foi submetida (seção 3.1.3) não deve afetar sua morfologia. Deste modo mostramos aqui apenas o MEV da gismondina pura (GIS/Na), que é representativo de todos os outros materiais gerados pela troca iônica.

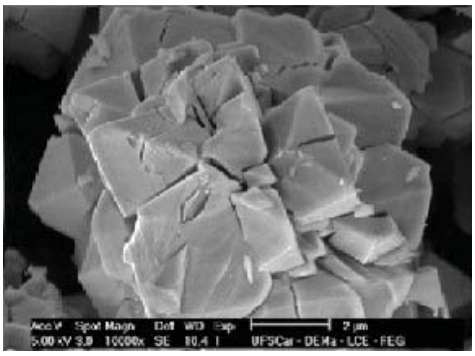

Figura 31. Microscopia Eletrônica de Varredura da zeolita GIS/Na.

A Figura 32 mostra a microscopia eletrônica de varredura (MEV) das zeólitas FAU/Cu e FAU/Co. Em geral, suas morfologias não são definidas geometricamente. A micrografia para a amostra FAU/Cu (Figura 32 A) revela nitidamente a presença de duas morfologias: alguns cristais na forma de bastonetes e outros com uma forma de difícil definição, lembrando a forma de "grãos quebrados" e esta morfologia de "grãos quebrados" é a predominante na amostra de zeólita FAU/Co (Figura 32 B).

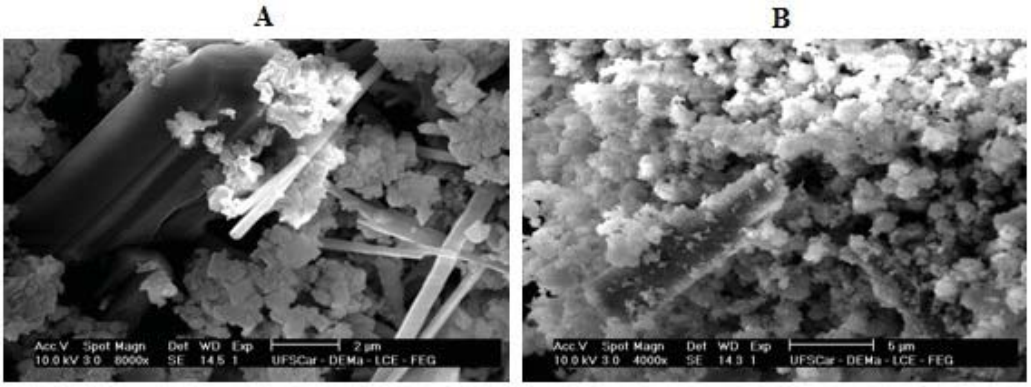

Figura 32. MEV das zeolitas FAU/Cu (A) e FAU/Co (B).

4.2 ENSAIOS ENZIMÁTICOS

4.2.1 Temperatura ótima de operação e estabilidade térmica da enzima

A temperatura ótima de operação da lipase (Lipolase 100L) livre e imobilizada foi avaliada a partir de medidas de atividade enzimática na faixa de temperatura de 20°C-70°C, realizadas como descrito anteriormente (seção 3.2.4). A figura 33 mostra o gráfico da variação da atividade enzimática pela temperatura. Observando a figura 33, notamos que a temperatura ótima de operação da enzima foi de 30°C e que a imobilização não causou mudança na temperatura ótima de operação da enzima, sendo esta, a temperatura ideal para realização das reações de transesterificação do óleo de palma utilizando como catalisadores as enzimas lipase livre e imobilizada. Podemos observar também, que em ambos os casos (enzima livre e imobilizada) houve uma perda da atividade enzimática devido ao aumento da temperatura, sendo que a enzima livre sofreu perda de atividade mais acentuada em relação a enzima imobilizada. Apesar de observarmos temperatura ótima de operação da enzima a 30°C, as reações de

transesterificação foram realizadas a 45°C devido ao ponto de fusão do óleo de palma utilizado.

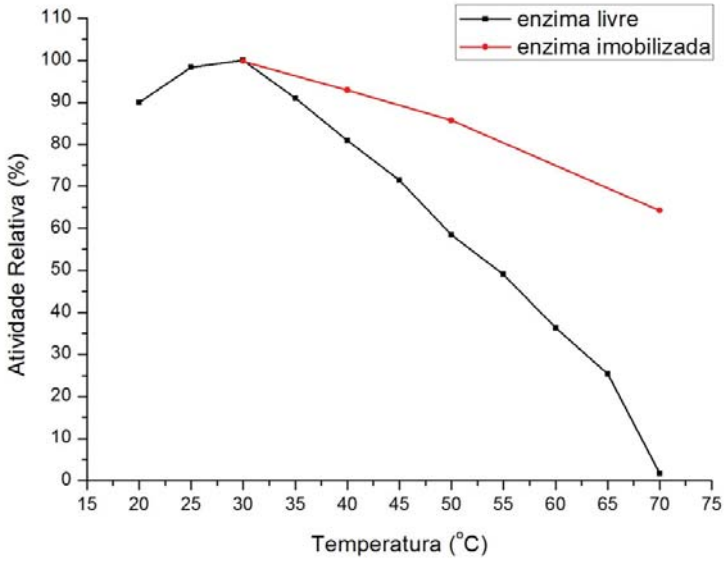

Figura 33– Temperatura ótima de operação da enzima.

O óleo de palma utilizado neste trabalho apresenta uma fase sólida (estearina de palma) e uma fase líquida (oleina de palma) (Figura 34) (NUNES, AKATSU, ANGELIS, 2007).

Figura 34. Óleo de palma refinado fornecido pela empresa Triangulo Alimentos LTDA mostrando sua fase líquida e sólida.

Este óleo foi aquecido a 45°C para homogeneizar estas duas fases. Após resfriamento, o óleo homogeneizado tornou-se sólido assumindo uma consistência cremosa, semelhante a da fase sólida da amostra original. Este foi o óleo utilizado nos experimentos de transesterificação do óleo de palma. Assim, para possibilitar uma boa agitação da mistura reacional, garantindo uma boa transferência de massa entre os reagentes líquidos e o catalisador sólido durante a reação de transesterificação, a temperatura reacional escolhida foi de 45°C. Analisando a figura 33, podemos observar que atuando nesta temperatura a enzima livre apresenta uma perda de 30 a 40% de sua atividade e a enzima imobilizada apresenta uma perda de 10 a 15% de sua atividade. No intuito de observar se a enzima sofreria perda de atividade enzimática devido a longa exposição à temperatura de 45°C, foram realizados estudos da estabilidade térmica da enzima (figura 35).

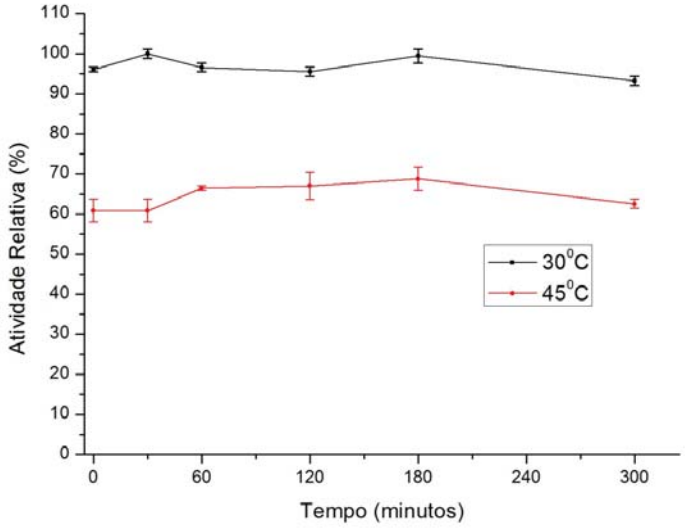

Figura 35. Estabilidade térmica da lipase a 30°C e 45°C.

Wannerberger et al (1997) reportaram temperatura ótima para a enzima lipase de *Humicola lanuginosa* (Novo Nordisk - Denmark) de 35-40°C. Moreira et al (2007) utilizaram a lipase de *Thermomyces lanuginosus* (Lipolase) da Novozymes (Brazil) e apesar de não reportar de maneira direta a temperatura ótima da enzima, estes autores reportaram que as reações de transesterificação do óleo de palma com catalise enzimática foram realizadas a 40°C. Cavalcanti-Oliveira et al (2011) reportaram o uso de lipase líquida de *Thermomyces lanuginosus* (Lipozyme TL 100L) da Novozymes na

reação de hidrólise de óleo de soja e o melhor resultado em rendimento de ácidos graxos foi obtido com temperatura de 55ºC. Podemos observar que existe uma variação na temperatura ótima de operação da enzima nos relatos da literatura.

4.2.2 Imobilização e Atividade Enzimática

A imobilização da lipase nos suportes sólidos foi realizada como descrito anteriormente (3.2.1). Não foi estudado até o momento a influencia da variação de parâmetros como a adição de solventes, variação de temperatura e tipo de tampão utilizado durante a imobilização enzimática, parâmetros esses que podem influenciar a quantidade de enzima imobilizada e a atividade destas enzimas (MATEO et al, 2007).

A zeolita gismondina foi escolhida como suporte sólido para a imobilização enzimática devido a resultados positivos de imobilização e atividade enzimática da enzima presente no complexo zeolita-enzima e utilização desse material como catalisador na reação de transesterificação de óleo de soja refinado a biodiesel (DE VASCONCELLOS, 2012). Os novos materiais sintetizados (FAU/Cu e FAU/Co) também foram testados como suporte para a imobilização enzimática. A Tabela 9 mostra a quantidade de enzima imobilizada nos suportes sólidos testados e a atividade enzimática das enzimas adsorvidas nestes materiais. Foram realizados experimentos de imobilização enzimática sem o pré-tratamento da enzima, como descrito anteriormente (item 3.2.1) e com o pré-tratamento da enzima (item 3.2.2).

Tabela 9. Quantidade de proteína imobilizada no suporte sólido e atividade enzimática dos complexos zeolita-enzima.

Exp.	Material	$\frac{Enzima}{Tampão}$	$\frac{mg\ enzima}{g\ de\ sólido}$	Sem pré-tratamento Atividade (U/mg enzima)	Com pré-tratamento Atividade (U/mg de enzima)
1	GIS/Na/ENZ	1/40	2,59	0,096	0,679
2	GIS/Ni/ENZ	1/40	3,06	0,488	7,730
3	GIS/Mg/ENZ	1/40	2,63	0,076	2,789
4	GIS/Co/ENZ	1/40	2,86	0,435	4,411
5	GIS/Ca/ENZ	1/40	3,07	0	-
6	GIS/Sr/ENZ	1/40	2,73	0	-
7	GIS/Mn/ENZ	1/40	2,82	0	-
8	FAU/Co/ENZ	1/40	1,26	0,471	1,976
9	FAU/Cu/ENZ	1/40	1,68	0	-
10	FAU/Co.NH_4/ENZ	1/40	5,72	0,226	10,702
11	FAU/Cu.NH_4/ENZ	1/40	6,57	0,152	0,760
12	FAU/Co.H^+/ENZ	1/40	1,80	0,193	4,791
13	FAU/Cu.H^+/ENZ	1/40	1,82	0	0,553

Todos os experimentos de imobilização (Tabela 9) foram realizados com uma solução de lipase diluída em tampão (diluição de 1/40). Observa-se que não houve grande variação na massa de enzima imobilizada (mg enzima/g de sólido) para os experimentos realizados com as zeólitas gismondina, experimentos de 1 a 7. Porém a atividade enzimática dos complexos zeolita-enzima variou. Nos experimentos 5, 6 e 7, a enzima não apresentou atividade. Já os experimentos 2 e 4 apresentaram atividade semelhante e no experimento 1 e 3 houve uma brusca queda na atividade enzimática.

A influência de cátions na atividade enzimática da lipase de *Thermomyces lanuginosus* foi investigada por Omar et al (1987). Neste estudo foi reportado que a atividade da enzima foi inibida, entre outros cátions, por Co^{2+} e Ni^{2+}. Em outro trabalho, Zheng et al (2011) reportaram que a atividade enzimática foi aumentada por Ca^{2+} e que Mg^{2+} não apresentou efeito. Entretanto, ao observar os dados da Tabela 9, notamos que os suportes que contem Co^{2+} e Ni^{2+} apresentaram as maiores atividades enzimáticas, seguidos pelo suporte que contem Mg^{2+} e o suporte que contem Ca^{2+} não apresentou atividade enzimática. Um estudo a respeito da influencia destes cátions que estão presentes nos materiais sólidos na atividade da enzima imobilizada foi realizado (Tabela 10).

Tabela 10. Efeito dos íons metálicos na atividade da lipase.

Cátion	**Atividade Relativa (%)**		
	Concentração da solução de cátion (mM)		
	0,1	**1**	**10**
Controle	100	100	100
Mg^{2+}	109,56	111,92	126,21
Ca^{2+}	101,59	123,02	204,08
Sr^{2+}	113,52	143,68	187,37
Ni^{2+}	102,36	116,71	119,07
Mn^{2+}	100,83	111,92	185,78
Co^{2+}	107,97	127,80	139,73
Cu^{2+}	104,01	100	21,36

Yagiz et al (2007) reportaram o uso de um óxido misto de magnésio e alumínio (hydrotalcite - $Mg(Al)O_x$) e quatro tipos de zeólitas (13-X (zeolita A), 5-A (zeolita X), FM-8 (mordenita) e AW-300 (mordenita)) como suporte sólido para imobilização da enzima lipase Lipozyme-TL IM (Novozymes, Denmark). O óxido utilizado foi mais eficiente do que todas as zeolitas, imobilizando 13 mg de enzima/g de material enquanto as zeolitas imobilizaram 9 mg de enzima/g de material. Após o quinto ciclo de utilização o complexo óxido-enzima manteve 55% da atividade enzimática a 45°C e 30 % a 55°C.

Macario et al (2007) utilizaram a enzima PALATASE 20000L (Novo), uma lipase de *Rhizomucor miehei* (RmL) imobilizada nas zeolitas ITQ-6 e MCM-41 entre outros suportes sólidos. A quantidade de enzima imobilizada na zeolita ITQ-6 foi 84 mg de proteína por grama de suporte, enquanto que na zeolita MCM-41 foi de 166 mg de proteína por grama de suporte. O complexo enzimático formado com o suporte ITQ-6 não apresentou atividade enzimática, e o complexo enzimático formado com o suporte MCM-41 apresentou atividade enzimática de 1,10 mg de ésteres metílicos de ácidos graxos por mg de enzima.

A quantidade de proteína imobilizada no suporte sólido depende de suas características estruturais. Quanto maior a área superficial do material sólido utilizado como suporte para a imobilização enzimática, maior será a massa de enzima que sua superfície será capaz de adsorver. Além da área superficial, outra característica do

suporte que pode influenciar na massa de enzima imobilizada é o tamanho dos poros desse material. Isso irá determinar se a enzima ficará adsorvida somente na superfície do material ou então se ela será capaz de entrar por estes poros, ficando aprisionada no interior das partículas do suporte sólido (JEGANNATHAN et al 2008).

Outro dado apresentado na Tabela 9, a atividade enzimática, também dependerá das características do material. Além do material, outros fatores que podem interferir na atividade enzimática da enzima imobilizada são a região da enzima na qual as ligações covalentes entre enzima e suporte irão se formar e os cátions presentes no meio reacional. Quanto a ligação covalente, se estas se formarem em uma região da enzima afastada do sítio ativo, este pode tornar-se mais disponível ao seu substrato, com conseqüente aumento da atividade enzimática. No caso dos cátions, alguns deles podem inibir ou melhorar a atividade enzimática, de acordo com o tipo de enzima. Além disso, a enzima pode sofrer lixiviação, ou a intensidade da força de interação enzima-suporte pode causar distorções na estrutura da proteína afetando sua especificidade ao substrato (LEE et al 2006; JEGANNATHAN et al 2008).

4.3. REAÇÕES DE TRANSESTERIFICAÇÃO

4.3.1 Transesterificação catalisada por zeólitas FAU

São apresentados a seguir os resultados dos experimentos de transesterificação dos óleos de soja e de palma com as zeolitas puras FAU/Co e FAU/Cu. Nestes experimentos foram exploradas as rotas metílica e etílica utilizando um excesso de álcool para deslocar o equilíbrio da reação no sentido da formação do produto (biodiesel). As condições experimentais foram: relação molar óleo:álcool de 1:50, temperatura de 90°C, 12 horas e 3% de catalisador em relação a massa de óleo. Os experimentos realizados com o óleo de soja serviram como parâmetro para os experimentos realizados com óleo de palma, uma vez que reações com óleo de soja são mais tradicionais e com óleo de palma são mais raras. (RODRIGUES, 2011).

As tabelas 11 e 12 apresentam os experimentos realizados com os catalisadores FAU/Co e FAU/Cu via rota metílica. Foram realizadas dez reações de transesterificação com o catalisador FAU/Co e seis reações com o catalisador FAU/Cu, nas mesmas condições experimentais. Os rendimentos para o catalisador FAU/Co, reportados na tabela 11, variam de 89% a 94% indicando um alto teor de conversão e a potencialidade

desse catalisador heterogêneo para a reação de biodiesel via rota metílica. Os rendimentos observados para o catalisador FAU/Cu variam de 75,50% a 94,40%, indicando que estes catalisadores são também eficazes na reação de transesterificação. Estes resultados estão condizentes com outros resultados reportados na literatura. (LAM, LEE, MOHAMED, 2010; DABDOUB, BRONZEL, RAMPIN, 2009; XIE, 2007).

Tabela 11. Reações de transesterificação de óleo de soja com metanol anidro e catalisador heterogêneo FAU/Co.

Experimento	Relação molar inicial Óleo / álcool	Relação molar óleo/álcool consumida	Teor de éster (% m/m)
01	1 : 50,6	1 : 8,52	93,5
02	1 : 52,0	1 : 7,45	94,0
03	1 : 50,3	1 : 7,31	94,1
04	1 : 48,9	1 : 9,69	88,7
05	1 : 54,0	1 : 11,22	93,8
06	1 : 51,3	1 : 9,58	92,2
07	1 : 46,8	1 : 6,87	94,2
08	1 : 48,8	1 : 6,10	93,2
09	1 : 51,5	1 : 8,86	92,7
10	1 : 39,7	1 : 7,36	91,9

Tabela 12. Reações de transesterificação de óleo de soja com metanol anidro e catalisador FAU/Cu.

Experimento	Relação molar inicial Óleo / álcool	Relação molar óleo/álcool consumida	Teor de éster (% m/m)
01	1 : 49,2	1 : 6,86	89,3
02	1 : 51,2	1 : 8,46	93,6
03	1 : 48,9	1 : 7,99	91,8
04	1 : 48,5	1 : 7,96	93,4
05	1 : 52,4	1 : 7,38	94,4
06	1 : 50,7	1 : 7,47	75,5

Nas tabelas 13 e 14 são mostrados os resultados de rendimento de ésteres etílicos da reação de transesterificação do óleo de soja utilizando os catalisadores FAU/Co e FAU/Cu. Para estes experimentos foram utilizados etanol 99,8% (0,2% de água), etanol 99,5% (0,5% de água) e etanol 95% (5% de água). Para os experimentos com o etanol anidro (99,8%) os rendimentos observados variam de 84% a 94% para o catalisador FAU/Co e de 93% a 94% para o catalisador FAU/Cu, indicando a eficácia destes

catalisadores na reação de transesterificação realizada nas condições experimentais descritas (entradas 1 e 2 tabela 13 e entradas 1e 2 da tabela 14). Todavia, experimentos com etanol não anidro tiveram rendimentos significativamente inferiores quando comparados com o etanol anidro. Para o etanol 99,5% (0,5% de água) o rendimento de ésteres foi de 42% (queda de cerca de 50%) para o catalisador contendo Co e 78,4% para o catalisador contendo Cu. A reação com etanol contendo 5% de água teve rendimento de ésteres de 7,7% para o catalisador FAU/Co e 45,3% para o catalisador FAU/Cu. Deste modo, podemos dizer que o catalisador FAU/Cu é mais tolerante a presença de água no meio reacional.

Tabela 13. Reações de transesterificação de óleo de soja via rota etílica com catalisador FAU/Co.

Experimento	Álcool	Relação molar inicial Óleo / álcool	Relação molar óleo/álcool consumida	Teor de éster (% m/m)
1	Etanol[a]	1 : 52,6	1 : 6,88	94,7
2	Etanol[a]	1 : 52,8	1 : 7,36	83,9
3	Etanol[b]	1 : 49,6	1 : 5,69	42,0
4	Etanol[c]	1 : 50,2	1 : 4,75	07,7

[a] Etanol 99,8% [c] Etanol 95%.
[b] Etanol 99,5%

Tabela 14. Reações de transesterificação de óleo de soja via rota etílica com catalisador FAU/Cu.

Experimento	Álcool	Relação molar inicial Óleo / álcool	Relação molar óleo/álcool consumida	Teor de éster (% m/m)
1	Etanol[a]	1 : 50,2	1 : 7,78	94,4
2	Etanol[a]	1 : 49,8	1 : 5,35	93,3
3	Etanol[b]	1 : 48,7	1 : 6,16	78,4
4	Etanol[c]	1 : 50,3	1 : 5,81	45,3

[a] Etanol 99,8% [c] Etanol 95%
[b] Etanol 99,5%

Devido ao fato do catalisador FAU/Cu ter apresentado maior tolerância a presença de água no meio reacional, este catalisador foi selecionado para os experimentos com o óleo de palma. Na tabela 15 são apresentados os resultados das reações de transesterificação de óleo de palma, usando o catalisador FAU/Cu via rota metílica e rota etílica.

Tabela 15. Reações de transesterificação de óleo de palma via rota metílica e etílica com o catalisador FAU/Cu.

Experimento	Álcool	Relação molar inicial Óleo / álcool	Relação molar óleo/álcool consumida	Teor de éster (% m/m)
1	Metanol[a]	1 : 47,9	1 : 10,84	96,6
2	Etanol[b]	1 : 46,2	1 : 9,77	95,5
3	Etanol[b]	1 : 47,7	1 : 13,17	95,7
4	Etanol[c]	1 : 48,4	1 : 5,50	79,8
5	Etanol[c]	1 : 49,1	1 : 16,96	88,0

[a] Metanol com pureza 99.8% [c] Etanol com pureza 99,5%
[b] Etanol com pureza 99,8%

De acordo com os rendimentos de ésteres metílicos e etílicos obtidos com os experimentos descritos na tabela 15, podemos observar que o catalisador FAU/Cu também foi eficiente na transesterificação do óleo de palma a biodiesel. Comparando os resultados dos experimentos com o etanol anidro (entrada 2 e 3 da tabela 15), com os resultados dos experimentos com etanol não anidro (entradas 4 e 5 da tabela 15), podemos observar que a presença de água no meio reacional não ocasionou uma queda brusca no rendimento de ésteres.

Kansedo et al (2009) reportaram o uso da argila montmorilonita para a transesterificação de óleo de palma. As condições reacionais foram: temperatura de 190°C, 3 horas de reação, relação molar óleo:metanol de 1:8 e 3% de catalisador em relação a massa de óleo utilizada na reação, o rendimento de ésteres metílicos foi de 79,6%, resultado muito inferior aos resultados obtidos neste trabalho (tabela 15).

Os catalisadores FAU/Cu e FAU/Co na sua forma pura foram também avaliados nas condições experimentais usadas para as reações de transesterificação com os complexos zeolita-enzima: relação molar óleo:álcool de 1:5, temperatura de 45°C, 48 horas de reação e 3% de catalisador em relação a massa de óleo. Os resultados foram negativos e não houve formação de biodiesel nestas condições experimentais.

4.3.2 Transesterificação catalisada por zeólitas GIS

As reações de produção de biodiesel por transesterificação de óleo de palma utilizando como catalisadores as zeólitas GIS/Na, GIS/Ca, GIS/Mg, GIS/Sr, GIS/Mn, GIS/Co e GIS/Ni, foram também realizadas nas condições experimentais de relação molar óleo:álcool de 1:5, temperatura de 45°C, 48 horas e 3% de catalisador em relação

a massa de óleo. Os resultados para este grupo de zeolitas foram também negativos e nenhum biodiesel foi formado.

4.3.3 Transesterificação catalisada por enzima livre

A tabela 16 mostra os experimentos de transesterificação de óleo de palma refinado utilizando a enzima lipase de *Thermomyces lanuginosus* como catalisador, foram realizados experimentos seguindo a rota metílica e etílica, como descrito anteriormente (seção 3.4.2) O óleo de palma refinado foi fornecido pela empresa Triângulo Alimentos LTDA localizada em Itápolis/SP.

O objetivo dos experimentos da tabela 16 foi de testar a especificidade da enzima lipase de *Thermomyces lanuginosus* para catalisar a transesterificação do óleo de palma via rota metílica e etílica. De acordo com os bons rendimentos de ésteres dos experimentos 1, 2, 3 e 4 da tabela 16, cerca de 90%, pode-se dizer que a enzima em questão é eficiente na quebra deste substrato e que o uso desta enzima na reação de transesterificação de óleo de palma para produção de biodiesel, utilizando metanol ou etanol, é viável. O experimento 5 da tabela 16, foi realizado com uma quantidade menor de enzima (0,4 mg) e devido a este fato o rendimento de ésteres apresentou uma queda considerável (51,9%). Este resultado será comparado com os rendimentos de ésteres das reações realizadas com os complexos zeolita-enzima (enzima imobilizada).

Tabela 16. Condições experimentais da reação de transesterificação com catálise enzimática usando lipase de *Thermomyces lanuginosus* (TLL).

Experimento	Álcool	Óleo:Álcool (mol:mol)	Enzima (mg)	Teor de éster (% m/m)
1	Metanol	1:5	4,15	93,2
2	Metanol	1:5	4,15	89,7
3	Etanol 99,8%	1:5	4,15	92,3
4	Etanol 99,8%	1:5	4,15	90,8
5	Etanol 99,8%	1:5	0,40	51,9

Não há muitos relatos na literatura no que diz respeito a reação de transesterificação de óleo de palma a biodiesel utilizando a enzima *Thermomyces lanuginosus* em sua forma livre como catalisador. Na maioria dos casos ela é utilizada imobilizada, por exemplo, Moreira et al (2007) relataram a reação de transesterificação do óleo de palma com etanol com a enzima lipase de *Thermomyces lanuginosus* imobilizada em compósitos de sílica-PVA obtendo rendimento de ésteres de 55%.

Yagiz et al (2007) reportaram dados de 95% de rendimento da transesterificação de óleo residual de fritura utilizando metanol, enzima lipase de *Thermomyces lanuginosus* livre, temperatura ambiente e aproximadamente duas horas de reação, 92,8% utilizando a enzima imobilizada em hidrotalcita e resultado negativo, ou seja, o catalisador não foi capaz de realizar a transesterificação, quando a mesma enzima foi imobilizada em zeolita mordenita. Du et al (2005) reportaram 90% de rendimento de biodiesel usando a lipase de *Thermomyces lanuginosus* imobilizada em sílica gel (Industras Novo – Dinamarca) para a transesterificação de óleo de soja usando metanol. As condições reacionais foram 40°C e relação molar óleo:álcool de 1:3.

Assim, observando os resultados relatados na tabela 16 e os relatos da literatura, é razoável esperar que com um processo de imobilização enzimática adequado, as enzimas lipase de *Thermomyces lanuginosus* imobilizadas, sejam capazes de realizar a transesterificação do óleo de palma a biodiesel, sendo desta forma um catalisador heterogêneo com potencial aplicação em processos de produção de biodiesel.

4.3.4 Reações de transesterificação catalisadas pelos complexos zeólita-enzima

A tabela 17 mostra os experimentos de transesterificação do óleo de palma com os catalisadores GIS/Ni/ENZ e FAU/Co.NH_4/ENZ, via rota etílica (45°C, 48 h). Os complexos zeolita-enzima em questão foram submetidos a dois processos distintos de imobilização enzimática, sendo um deles realizado com o pré tratamento da lipase com o substrato (óleo de soja) (seção 3.2.2) e o outro realizado sem este pré tratamento (seção 3.2.1). Estes dois catalisadores (GIS/Ni/ENZ e FAU/Co.NH_4/ENZ) foram selecionados por terem apresentado os maiores valores de atividade enzimática (seção 4.2.3, tabela 8).

Tabela 17. Condições das reações de transesterificação do óleo de palma utilizando etanol anidro e os complexos zeolita-enzima.

Exp.	Massa de catalisador	Catalisador	Massa de enzima (mg)	Pré-tratamento	Teor de éster (% m/m)
1	130 mg	GIS/Ni/ENZ	0,4	Não	22,7
2	130 mg	GIS/Ni/ENZ	0,4	Sim	70,3
3	70 mg	FAU/Co.NH_4/ENZ	0,4	Não	10,5
4	70 mg	FAU/Co.NH_4/ENZ	0,4	Sim	58,4

Os dados da tabela 16 (catalise enzimática - enzima livre), mais especificamente a entrada 5, e os dados da tabela 17 (catalise enzimática – enzima imobilizada) nos permitem comparar a atuação de uma determinada quantidade de enzima em sua forma livre e em sua forma imobilizada. De acordo com esses dados 0,4 mg de enzima livre, quando utilizada na reação de transesterificação, produziu 51,9% de biodiesel enquanto que essa mesma quantidade de enzima imobilizada nos materiais zeolíticos produziu no melhor dos casos 22,7% de biodiesel (GIS/Ni/ENZ).

Além disso, pela análise dos dados da tabela 17 também podemos observar o potencial do pré-tratamento da lipase com óleo de soja antes da imobilização. As reações utilizando complexos zeolita-enzima que foram produzidos com a utilização do pré-tratamento alcançaram rendimentos da reação de transesterificação com cerca de 50% a mais de conversão de óleo em ésteres etílicos.

5 CONCLUSÕES

As análises que nossos dados experimentais nos permitem fazer são:

a) zeolitas faujasiticas FAU/Co e FAU/Cu são altamente específicas para a reação de transesterificação, tanto do óleo de soja quanto do óleo de palma.

b) o catalisador FAU/Cu, quando utilizado na reação de transesterificação dos óleos de soja e de palma, apresenta uma maior tolerância a água no meio reacional (uso de etanol não anidro).

c) zeolita FAU/Cu não é um suporte adequado para imobilização da enzima lipase de *Thermomyces lanuginosus*, pois o alto teor de cobre presente neste material parece inativar a enzima.

d) zeolita FAU/Co demonstrou-se um suporte adequado para a imobilização da enzima lipase de *Thermomyces lanuginosus*, principalmente a zeolita FAU/Co.NH_4 que imobilizou 5,72 mg de enzima por grama de zeolita e apresentou a terceira melhor atividade enzimática entre os materiais testados.

e) zeolitas gismondina e gismondina trocadas com cátions divalentes Co^{2+}, Ca^{2+}, Sr^{2+}, Mg^{2+}, Ni^{2+} e Mn^{2+} não foram catalisadores eficazes para reação de transesterificação do olé de palma a biodiesel. Os complexos zeolita-enzima preparados com estes materiais também foram ineficientes para a produção de biodiesel.

f) zeolita gismondina trocada com Ni^{2+} (GIS/Ni) revelou-se um bom suporte para imobilização da enzima lipase de *Thermomyces lanuginosus* a quantida de enzima

imobilizada neste suporte foi de 3,06 mg/g e este foi o suporte que apresentou maior atividade enzimática.

g) não foi observado efeito sinergético para os complexos zeolita-enzima GIS/Ni/ENZ e FAU/Co.NH_4/ENZ, pois nas mesmas condições de reação, 0,4 mg de enzima livre foi capaz de produzir cerca de 50% de biodiesel ao passo que a mesma quantidade de enzima imobilizada nos materiais produziu cerca de 20% de biodiesel para o complexo GIS/Ni/ENZ e cerca de 10% de biodiesel para o complexo FAU/Co.NH_4/ENZ.

h) nossos dados nos levam a crer que uma melhor eficiência do complexo zeolita-enzima é alcançada quando é feito o pré tratamento da enzima com óleo de soja antes da imobilização, como pôde ser observado nos experimentos da tabela 17 (complexos zeolita-enzima).

6 PERSPECTIVAS FUTURAS

1 – Aperfeiçoar o desempenho dos catalisadores FAU/Co e FAU/Cu, procurando as melhores condições reacionais (T^{o}C, pressão, relação molar óleo:álcool, quantidade de catalisador e tempo de reação), visando utilizar estes catalisadores na reação de transesterificação com etanol hidratado e matérias primas menos nobres (óleo residual, óleos vegetais brutos, gordura animal, etc).

2 – Melhor caracterização estrutural dos materiais FAU/Co e FAU/Cu: radiação sincrotronica e dados de HTEM.

3 – Analise da interação entre a enzima e a superfície da zeólita, realizando para isso estudos de espectroscopia de infravermelho (FT-IR).

4 – Realizar estudos de reutilização (turnover), lixiviação dos cátions e lixiviação das enzimas para os catalisadores utilizados na reação de transesterificação dos óleos vegetais para produção de biodiesel.

5 – Realizar estudos de estabilidade térmica da enzima imobilizada em temperaturas de 45°C a 70°C, uma vez que a enzima Lipolase 100L (Sigma) imobilizada nos suportes zeoliticos apresentou atividade enzimática residual de 60-70% a temperatura de 70°C.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKOH, C. C.; CHAN, S-H.; LEE, G-C.; SHAW, J-F. Enzymatic Approach to Biodiesel Production. **J. Agric. Food Chem.**, v. 55, p. 8995–9005, 2007.

ALBERT, B. R.; CHEETHAM, A. K.; ADAMS, C. J. Investigations on P zeólitas: synthesis and structure of the gismondine analogue, highly crystalline low-silica CaP. **Microporous and Mesoporous Materials**, 21, 127-132, 1998.

ALBERT, B. R.; CHEETHAM, A. K.; ADAMS, C. J. Investigations on P zeólitas: synthesis and structure of the gismondine analogue, highly crystalline low-silica NaP. **Microporous and Mesoporous Materials**, 21, 133-142, 1998.

BAJAJ, A.; LOHAN, P.; JHA, P. N.; MEHROTRA, R. Biodiesel production through lipase catalyzed transesterification: An overview. **J. Mol. Catal. B-Enzym.,** v. 62, p. 9–14, 2010.

BARBOSA, L.C.A., **Introdução a Química Orgânica**, Editora UFV, 2004.

BAYENSE, C. R.; HINNKENS, H.; MARTENS, J. Esterification process; patente US005508457a, 1996

BHAT, R. N.; Integrated process for the manufacture of biodiesel; patente US 2007/0260078 A1, 2007.

BRADFORD, MARION, M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**. v.72, p.248-254, 1976.

BRANDIN, D. S.; Biodiesel fuel; patente US 5578090, 1996.

CAJAL, Y.; SVENDSEN,A.; GIRONA, V.; PATKAR, S. A.; ALSINA, M. A. Interfacial Control of Lid Opening in *Thermomyces lanuginosa* Lipase. **Biochemistry,** v. 39, p. 413-423, 2000.

CHOUHAN, A. P. S.; SARMA, A. K. Modern heterogeneous catalysts for biodiesel production: A comprehensive review. **Renew. Sust. Energ. Rev.**, v. 15, p. 4378– 4399, 2011.

CONAB, Acompanhamento de safra brasileira: grãos, sétimo levantamento, abril 2012 / Companhia Nacional de Abastecimento. – Brasília : Conab, 2012.

CUNDY, C. S.; COX, P. A. The Hydrothermal Synthesis of Zeolites: History and Development from the Earliest Days to the Present Time. **Chem. Rev.** v. 103, p. 663-701, 2003.

DABDOUB, M. J.; BRONZEL, J. L.; RAMPIM, M. A. Biodiesel: Visão Crítica do Status Atual e Perspectivas na Academia e na Indústria. **Química Nova**, v.32, n.3, p.776-792, 2009.

DIZGE, N.; AYDINER, C.; IMER, D. Y.; BAYRAMOGLU, M.; TANRISEVEN, A.;KESKINLER, B. Biodiesel production from sunflower, soybean, and waste cooking oils by transesterification using lipase immobilized onto a novel microporous polymer. **Bioresource Technology**, v.100, issue 6, p.1983-1991, 2009.

DU, W.; XU, Y-Y.; LIU, D-H.; LI, Z-B. Study on acyl migration in immobilized lipozyme TL-catalyzed transesterification of soybean oil for biodiesel production. **J. Mol. Catal. B-Enzym.**, v. 37, p. 68–71, 2005.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. In: <http://www.cnpso.embrapa.br/index.php?op_page=25&cod_pai=29>. Acesso em: 28 de maio de 2012.

EMISSIONS CALCULATOR. In: Biodiesel: America's Advanced Biofuel. Diponível em: <http://www.biodiesel.org/using-biodiesel/handling-use/emissions-calculator>. Acesso em: 28 de maio de 2012.

FARIAS, A. O.; FUSCALDI, K. C.; DA ROCHA, M. G.; PIERRI, M. C. Q. M.; PANTOJA, M. J. A Governança Na Aquisição De Sementes No Setor Produtivo De Óleo De Palma. In: **47º Congresso da Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural**, Porto Alegre, 26 a 30 de julho de 2009.

FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Lipase from Thermomyces lanuginosus: Uses and prospects as an industrial biocatalyst. **J. Mol. Catal. B-Enzym.**, v. 62, p. 197–212, 2010.

GHOBARKAR, H.; SCHAF, O.; GUTH, U. Zeolites- From Kitchen to Space Prog. **Solid State Chem,** v.27, p.29-73, 1999.

GONÇALVES, A. P. V.; LOPES, J. M.;LEMOS, F.;RIBEIRO, F. R.; PRAZERES, D. M. F.; CABRAL, J. M. S.; AIRES-BARROS, M.R. Zeolites as supports for enzymatic hydrolysis reactions. Comparative study of several zeolites. **J. Mol. Catal. B-Enzym.,** v.1, p.53-60, 1996.

HELWANI, Z.; OTHMAN, M. R.; AZIZ, N.; FERNANDO, W. J. N.; KIM, J. Technologies for production of biodiesel focusing on green catalytic techniques: A review. **Fuel Processing Technology**, v.90, p.1502-1514, 2009.

HOYDONCKX, H. E.; VOS, D. E.; CHAVAN, S. A.; JACOBS, P. A. Esterification and transesterification of renewable chemicals. **Topics in Catalysis**, v.27, n.1-4, p.83-96, 2004.

JAEGER, K-E.; DIJKSTRA, B. W.; REETZ, M. T. Bacterial Biocatalysts: Molecular Biology, Three-Dimensional Structures, And Biotechnological Applications Of Lipases. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 53, p. 315–51, 1999.

JEGANNATHAN, K. R.; ABANG, S.; PONCELET, D.; CHAN, E. S.; RAVINDRA, P. Production of Biodiesel Using Immobilized Lipase—A Critical Review. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 28, p. 253–264, 2008.

[1]KANSEDO, J.; LEE, K. T.; BHATIA, S. Cerbera odollam (sea mango) oil as a promising non-edible feedstock for biodiesel production. **Fuel**, v. 88, p. 1148–1150, 2009.

[2]KANSEDO, J.; LEE,K. T.; BHATIA, S. Biodiesel production from palm oil via heterogeneous transesterification. **Biomass and Bioenergy**, v. 33, p. 271–276, 2009.

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, p.500–518, 2010.

LEE, D. H.; KIM, J. M.; KANG, S. W.; LEE, J. W.; KIM, S. W. Pretreatment of lipase with soybean oil before immobilization to prevent loss of activity. **Biotechnol. Lett.**, v. 28, p. 1965–1969, 2006.

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

LEUNG, D Y. C. Development of a Clean Biodiesel Fuel in Hong Kong Using Recycled Oil. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 130, p. 277–282, 2001.

LI, N.; ZONG, M-H.; MA, D. Thermomyces lanuginosus lipase-catalyzed regioselective acylation of nucleosides: Enzyme substrate recognition. **Journal of Biotechnology**, v. 140, p. 250–253, 2009.

LOFRANO, R. C. Z. Uma revisão sobre biodiesel. **Pensamento Plural: Revista Científica do UNIFAE**, v.2, n.2, p.83-89, 2008.

LÓPEZ, D. E.; GOODWIN Jr., J. G.; BRUCE, D. A.; LOTERO, E. Transesterification of triacetin with methanol on solid acid and base catalysts. **Applied Catalysis A: General**, v. 295, p 97–105, 2005.

LOTERO, E., LIU, Y., LOPEZ, D.E., SUWANNAKARN, K., BRUCE, D.A., GOODWIN, J.G. Synthesis of Biodiesel via Acid Catalysis. **Ind. Eng. Chem. Res.**, 2005.

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

MACARIO, A.; GIORDANO, G.; SETTI, L.; PARISE, A.; CAMPELO, J. M.; MARINAS, J. M.; LUNA, D. Study of lipase immobilization on zeolitic support and transesterification reaction in a solvent free-system. **Biocatalysis and Biotransformation**, v.25, n.2, p.328-335, 2007.

MACARIO, A.; MOLINER, M.; DIAZ, U.; LORDA, J. L.; CORMA, A.; GIORDANO, G. Biodiesel production by immobilized lipase on zeolites and related materials. In: **Zeolites and Related Materials: Trends, Targets and Challenges Proceedings of 4th International FEZA Conference**, 2008.

MACARIO, A.; GIORDANO, G.; ONIDA, B.; COCINA, D.; TAGARELLI, A.; GIUFFRE, A. M. Biodiesel production process by homogeneous/heterogeneous catalytic system using an acid–base catalyst. **Applied Catalysis A: General**, v. 378, p. 160–168, 2010.

MATEO, C.; PALOMO, J. M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUISAN, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 1451–1463, 2007.

MOREIRA, A. B. R.; PEREZ, V. H.; ZANIN, G. M.; CASTRO, H. F. Biodiesel Synthesis by Enzymatic Transesterification of Palm Oil with Ethanol Using Lipases from Several Sources Immobilized on Silica–PVA Composite. **Energy & Fuels**, v. 21, p. 3689–3694, 2007.

MOTA, C. J. A.; DA SILVA, C. X. A.; GONÇALVES, V. L. C. Gliceroquímica: novos produtos e processos a partir da glicerina de produção de biodiesel. **Quim. Nova**, v. 32, n. 3, p. 639-648, 2009.

NERY, J. G.; MASCARENHAS, Y. P.; CHEETHAN, A. K. A study of the highly crystalline, low-silica, fully hydrated zeolite P ion exchanged with (Mn^{2+}, Cd^{2+}, Pb^{2+}, Sr^{2+}, Ba^{2+}) cations. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 57, p. 229–248, 2003.

NUNES, S. P.; AKATSU, T. H.; ANGELIS, T. A Cadeia Produtiva do Dendê: Estudo Esploratório, **Departamento de Estudos Sócio-Econômicos Rurais – DESER**, Curitiba, maio de 2007.

PASQUALINO, J. C.; MONTANÉ, D.; SALVADÓ, J. Synergic effects of biodiesel in the biodegradability of fossil-derived fuels. **Biomass and Bioenergy**, Tarragona, v. 30, p. 874–879, 2006.

PINTO, A. C.; GUARIEIRO L. L. N.; REZENDE, M. J. C.; RIBEIRO, N. M.; TORRES, E. A.; LOPES, W. A.; PEREIRA, P. A.; ANDRADE, J. B. Biodiesel: An Overview. **J. Braz. Chem. Soc,** v.16, n.6B, p.1313-1330, 2005.

RAMOS, M. J., CASAS A., RODRÍGUEZ L., ROMERO R., PÉREZ A. Transesterification of sunflower oil over zeolites using different metal loading: A case of leaching and agglomeration studies**. Applied Catalysis A: General**, v.346, p.79–85, 2008.

RANGANATHAN, S. V.; NARASIMHAN, S. L. MUTHUKUMAR, K. An overview of enzymatic production of biodiesel. **Bioresource Technology**, v.99, p.3975–3981, 2008.

RODRIGUES, R. C.; AYUB, M. A. Z. Effects of the combined use of Thermomyces lanuginosus and Rhizomucor miehei lipases for the transesterification and hydrolysis of soybean oil. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 682–688, 2011.

RODRIGUES, R. C.; VOLPATO, G.; WADA, K.; AYUB, M. A. Z. Enzymatic Synthesis of Biodiesel from Transesterification Reactions of Vegetable Oils and Short Chain Alcohols. **J Am Oil Chem Soc**, v. 85, p. 925–930, 2008.

SAID, S.; PIETRO, R.C.L.R. **Enzimas Como Agentes Biotecnológicos.** Ribeirão Preto: Ed. Legis Summa, 2004.

SHUMAKER, J. L.; CROFCHECK, C.; TACKETT, S. A.; SANTILLAN-JIMENEZ, E.; CROCKER, M. Biodiesel production from soybean oil using calcined Li–Al layered double hydroxide catalysts. **Catalysis Letters**, v. 115, n. 1–2, 2007.

STAMENKOVIC, O. S.; VELICKOVIC, A. V.; VELJKOVIC, V. B. The production of biodiesel from vegetable oils by ethanolysis: Current state and perspectives. **Fuel**, v. 90, p. 3141–3155, 2011.

SUAREZ, P.A.Z.; MENEGHETTI, S.M.P. 70º aniversario do biodiesel em 2007: evolução histórica e situação atual no Brasil. **Química Nova**, v.30, n.8, p.2068-2071, 2007.

SUPAMATHANON, N.; WITTAYAKUN, J.; PRAYOONPOKARACH, S. Properties of Jatropha seed oil from Northeastern Thailand and its transesterification catalyzed by potassium supported on NaY zeolite. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 17, p. 182–185, 2011.

SUPPES, G. J.; DASARI, M. A.; DOSKOCIL, E. J.; MANKIDY, P. J.; GOFF, M. J. Transesterification of soybean oil with zeolite and metal catalysts. Applied **Catalysis A: General,** v.257, p.213–223, 2004.

VASCONCELLOS, A.D.; PAULA, A.S.; LUIZON FILHO, R.A.; FARIAS, L.A.; GOMES, E.; ARANDA, D.A.G.; NERY, J.G. Synergistic effect in the catalytic activity of lipase Rhizomucor miehei immobilized on zeolites for the production of biodiesel, Microporous and Mesoporous Materials (2012)

WANG, Y-d.; SHEN, X-y.; LI, Z-l.; LI, X.; WANG, F.; NIE, X-a. Immobilized recombinant Rhizopus oryzae lipase for the production of biodiesel in solvent free system. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 67, p. 45–51, 2010.

WANNERBERGER, K.; WELIN-KLINTSTROM, S.; ARNEBRANT, T. Activity and Adsorption of Lipase from *Humicola lanuginosa* on Surfaces with Different Wettabilities. **Langmuir**, v. 13, p. 784-790, 1997.

XIE, W.; HUANG, X.; LI, H. Soybean oil methyl esters preparation using NaX zeolites loaded with KOH as a heterogeneous catalyst. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 936–939, 2007.

YAGIZ, F.; KAZAN, D.; AKIN, A. N. Biodiesel production from waste oils by using lipase immobilized on hydrotalcite and zeólitas. **Chemical Engineering Journal,** v.134, p.262–267, 2007.

ZHENG, Y-Y.; GUO,X-H.; SONG, N-N.; LI, D-C. Thermophilic lipase from Thermomyces lanuginosus: Gene cloning, expression and characterization. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 69, p. 127–132, 2011.

ANEXO

1 Trabalhos apresentados em congressos:

Trabalho apresentado na forma de pôster, com o título **"Influência da composição iônica da zeolita gismondina na imobilização e atividade enzimática de lipase de *Rhizomucor miehei*"** de autoria de **Roberto Antonio Luizon Filho**, Adriano de Vasconcellos, Alex Silva Paula, Marcelo Valdemir de Araujo e José Geraldo Nery, apresentado no 26º Congresso Brasileiro de Microbiologia.

Trabalho apresentado na forma de pôster, com o título **"Transesterificação de óleo de palma para a produção de biodiesel via rota etílica utilizando novos catalisadores zeolíticos"** de autoria de **Roberto Antonio Luizon Filho**, Lívia Maria Vargas, Rafael Rodrigues Hatanaka e José Geraldo Nery, apresentado no 18º Encontro da Sociedade Brasileira de Química Regional Interior Paulista "Waldemar Saffioti".

Trabalho apresentado na forma de pôster , com o título **"Pretreatment of lipase enzymes before immobilization on zeolitic solid supports: an efficient method to improve enzymatic activity"** de autoria de **Roberto Antonio Luizon Filho** e José Geraldo Nery, apresentado no XI Encontro da Sociedade Brasileira de Pesquisa em Materiais.

2 Publicação

A.d. Vasconcellos, A.S. Paula, **R.A. Luizon Filho**, L.A. Farias, E. Gomes, D.A.G. Aranda, J.G. Nery, **Synergistic effect in the catalytic activity of lipase Rhizomucor miehei immobilized on zeolites for the production of biodiesel**, Microporous and Mesoporous Materials (2012), doi: http://dx.doi.org/10.1016/ j.micromeso.2012.07.043

Autorizo a reprodução xerográfica para fins de pesquisa.

São José do Rio Preto,_____/_____/_____

_____

Roberto Antonio Luizon Filho