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

Adriano de Vasconcellos

Nanozeólitas como suportes sólidos para imobilização enzimática: Síntese, caracterização de complexos nanozeólitas/enzimas e sua aplicação como catalisadores heterogêneos para produção de biodiesel via rota etílica

São José do Rio Preto
2015

Adriano de Vasconcellos

Nanozeólitas como suportes sólidos para imobilização enzimática: Síntese, caracterização de complexos nanozeólitas/enzimas e sua aplicação como catalisadores heterogêneos para produção de biodiesel via rota etílica

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

Orientador: Prof. Dr. José Geraldo Nery

São José do Rio Preto
2015

Vasconcellos, Adriano de.
Nanozeólitas como suportes sólidos para imobilização enzimática : síntese, caracterização de complexos nanozeólitas/enzimas e sua aplicação como catalisadores heterogêneos para produção de biodiesel via rota etílica / Adriano de Vasconcellos. – São José do Rio Preto, 2015
204 f. : il.

Orientador: José Geraldo Nery
Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Biotecnologia. 2. Enzimas imobilizadas. 3. Biodiesel. 4. Lipase. 5. Zeólitos. I. Nery, José Geraldo. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.
CDU – 577.15

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

Adriano de Vasconcellos

Nanozeólitas como suportes sólidos para imobilização enzimática: Síntese, caracterização de complexos nanozeólitas/enzimas e sua aplicação como catalisadores heterogêneos para produção de biodiesel via rota etílica

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

Comissão Examinadora

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

Prof. Dr. Adriano Aguiar Mendes
UNIFAL – MG

Profª. Drª. Yvonne Primerano Mascarenhas
USP – São Carlos

Profª. Drª. Eleni Gomes
UNESP – Rio Preto

Prof. Dr. Roberto da Silva
UNESP – Rio Preto

São José do Rio Preto
31 de março de 2015

Dedico este trabalho

Aos meus pais, Alvaro e Luzinete, à minha esposa Jhanaina, pelo constante apoio e pela ajuda nos momentos mais difíceis.
À minha filha Isabela pelo amor e carinho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me dado forças e iluminado meu caminho durante toda essa caminhada.

Ao meu orientador, Prof. Dr. José Geraldo Nery, quero expressar a minha sincera gratidão pela oportunidade de desenvolver este trabalho, pela dedicação, apoio e amizade. Agradeço também pelos conhecimentos científicos compartilhados que contribuíram diretamente para a minha formação acadêmica.

Aos meus pais, Alvaro e Luzinete, e aos meus irmãos Alvaro, Valdir e Diego pelo total apoio que tenho recebido durante meus anos acadêmicos.

À minha esposa, Jhanaina Ruedo de Almeida Vasconcellos, pelo carinho, dedicação, compreensão e incentivo nos estudos. Agradeço pela companhia e por estar ao meu lado em todos os momentos. Finalmente te agradeço pelo privilégio de ser pai, pela nossa filha Isabela que trouxe alegria e com apenas sorriso renova minhas energias.

Aos meus colegas de laboratório, Alex Miller, Alex Silva, Danilo, Davi, Gabriel, Glaucia, Janine, Juliana, Roberto, Thais e Vinicius, por todo apoio, pelos risos, companheirismo e pela amizade durante todo esse tempo que estamos trabalhando juntos; agradeço também aos outros colegas que seguiram novos caminhos, especialmente ao Gil pela ajuda prestada no início deste projeto.

Aos meus co-orientados, ex-alunos de iniciação científica do Prof. Dr. José Geraldo Nery, Alex Henrique Miller, Thais Cerqueira Silva e Willian Derek Ruiz pela incansável ajuda prestada para a realização deste trabalho.

Ao Dr. Fabio Rogério de Moraes, técnico responsável pelas análises de ressonância magnética nuclear (RMN) do Centro Multiusuário de Inovação Biomolecular (CMIB) do IBILCE/UNESP, pela ajuda nas análises das amostras de nanozeólitas por RMN-MAS de ^{29}Si e, principalmente, pela imprescindível ajuda nos cálculos de bioinformática que possibilitaram propor um modelo para a complexa interação dos diferentes suportes zeolíticos com as lipases exploradas neste trabalho.

Aos técnicos e responsáveis do *Electron Microscopy Laboratory* do Laboratório Nacional de Nanotecnologia (LNNano)-CNPEM que me auxiliaram nas análises de MEV e HR-TEM nos últimos dois anos através das propostas de pesquisa (TEM-HR-15428, TEM-17321 e SEM-16547).

Aos técnicos e responsáveis do *Laboratory for Surface Science* do LNNano-CNPEM que me auxiliaram nas análises de AFM nos últimos dois anos através das propostas de pesquisa (AFM1-15427 e AFM1-17323).

À Profª Drª. Eleni Gomes, o Prof. Dr. Roberto da Silva e a Rafaela Rodrigues de Brito, aluna de doutorado, do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada-IBILCE/UNESP pela ajuda nas análises de eletroforese e zimogramas de atividade, as quais foram importantes para a caracterização das enzimas utilizadas neste trabalho.

Ao Prof. Dr. Peter Hammer e a sua equipe do Laboratório de Espectroscopia de Fotoelétrons (LEFE) do Instituto de Química – UNESP/Araraquara, pelo auxílio nas análises de XPS.

Ao Prof. Dr. João Ruggiero Neto e a sua aluna de mestrado Taisa Giordano Viegas do Laboratório de Polímeros do IBILCE/UNESP pelo auxílio nas análises de potencial zeta.

Ao Prof. Dr. Maurício Boscolo e ao seu aluno Olavo Micali Perrone do Laboratório de Sucroquímica, Química Analítica e Bio-orgânica (LSQAB) do IBILCE/UNESP pelo auxílio nas análises de TGA e ATR-FTIR.

Ao Prof. Dr. Donato Alexandre Gomes Aranda e a sua equipe do Laboratório de Tecnologia Verdes Greentec/Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro pelo auxílio nas análises texturais das nanozeólitas por adsorção de nitrogênio.

A empresa Fertibom pelo fornecimento do óleo de palma e a empresa Solazyme Brasil, especialmente a Caroline Tafuri, pelo fornecimento do óleo de microalgas heterotróficas.

Aos membros da banca de qualificação, Profª Drª. Eleni Gomes e Prof. Dr. Adriano Aguiar Mendes, pelas valiosas contribuições na versão final deste trabalho.

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

Ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do IBILCE/UNESP.

À FAPESP, por meio do Programa de Bolsas de Doutorado, pelo apoio financeiro. Processo: 2011/10092-4.

"Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos".

Isaac Newton

RESUMO

Nanozeólitas têm sido exploradas como suporte para a imobilização de enzimas e proteínas devido as suas propriedades físico-químicas, tais como a grande área de superfície externa, a alta dispersibilidade e a facilidade de modulação das suas características de superfície, especialmente, em relação à carga da superfície e propriedades de hidrofilicidade/hidrofobicidade. O presente trabalho teve como objetivos principais as sínteses e caracterização das nanozeólitas (titanosilicalita (Nano-TS1), gismondina (Nano-GIS), A (Nano-LTA), beta (Nano-BEA) e faujasita (Nano-X)) e a modulação de suas propriedades físico-químicas por meio de experimentos de troca iônica com cátions de metais de transição (Mn^{2+}, Cu^{2+}, Co^{2+}, Zn^{2+} e Ni^{2+}) ou funcionalização de suas superfícies por agentes orgânicos como aminosilanos ou glutaraldeído. Na sequência, foi realizado o estudo desses suportes zeolíticos como matrizes sólidas para a imobilização de lipases e o estudo do potencial catalítico desses complexos nanozeólitas-enzimas na reação de transesterificação para a produção de biodiesel usando diferentes fontes de matérias primas, tais como o óleo de palma e o óleo de microalgas via rota etílica com o uso das lipases de *Rhizomucor miehei* (RML) e *Thermomyces lanuginosus* (TLL), os resultados indicaram que as espécies de cátions divalentes e a concentração molar da troca iônica dos suportes nanozeolíticos influenciaram na interação da enzima com a matriz de imobilização e, consequentemente, a atividade enzimática. Em termos catalíticos, os resultados mais relevantes foram obtidos para a enzima TLL, imobilizada no suporte Nano-X e trocada com 0,5 $mol.L^{-1}$ de sulfato de níquel (Nano-X/Ni/0.5M-TLL). Os rendimentos de ésteres etílicos de ácidos graxos (FAEE) foram acima de 94%, ao passo que, para a mesma quantidade de enzima na sua forma livre, o teor obtido foi de apenas 9,1%, apontando um forte efeito sinérgico. Análises de microscopia eletrônica de transmissão (MET) e espectroscopia de fotoelétrons induzida por raios-X (XPS) identificaram a presença de diferentes espécies de níquel depositadas na superfície do suporte zeolítico Nano-X/Ni/0.5M, enquanto que, com o uso da análise de bioinformática foi possível propor um modelo robusto que correlacionou o comportamento dinâmico das interações de regiões negativas da superfície da enzima TLL com o potencial zeta positivo do suporte (Nano-X/Ni/0.5M). Tais resultados, indicam que essas interações entre os resíduos de ácido aspártico 102 e

158 da lipase TLL e a superfície de suporte zeolítico carregada positivamente provocam um movimento de deslocamento harmônico da abertura da *lid*, o qual permite que a tríade catalítica esteja permanentemente exposta ao solvente, o que explica o efeito sinérgico. Finalmente, novos suportes nanozeolíticos, provenientes das nanozeólitas (Nano-TS1, Nano-GIS, Nano-LTA, Nano-BEA, Nano-X e Nano-X/Ni/0.5M) e funcionalizados com glutaraldeído (GA), foram usados para imobilizar a lipase de TLL por ligação covalente. Nas reações de transesterificação do óleo de microalgas a biodiesel, o complexo Nano-X/Ni/GA-TLL apresentou melhor estabilidade nos testes de reuso. Após três ciclos reacionais, a conversão do óleo de microalgas à FAEE foi de 86,7%, ou seja, manteve cerca de 93% da sua atividade catalítica inicial. Resumidamente, alguns dos novos complexos (nanozeólita/enzima) obtidos, caracterizados e catalíticamente testados neste trabalho apresentaram grande potencial para serem usados na produção de biodiesel com o uso de novas fontes viáveis de matéria-prima que não entram em conflito com a indústria de alimentos e o uso de etanol como solvente principal da reação. Considerando os desafios da matriz energética brasileira, especialmente, os relacionados com a produção de biocombustíveis oriundos de fontes limpas e renováveis, os resultados desta pesquisa podem contribuir positivamente para este assunto.

Palavras-chave: Biodiesel. Lipase. Imobilização. Nanozeólita. Funcionalização.

ABSTRACT

Nanozeolites have been used as solid supports for enzymes and proteins immobilization, mainly due to their physicochemical properties such as large external surface area, high dispersibility and easy adjustment of their tunable surface properties, especially regarding the surface charge and hydrophilicity/hydrophobicity properties. The main goals of this research work were the syntheses and physicochemical characterization using specific spectroscopic techniques of the nanozeolites (titanosilicalite (Nano-TS1), gismondine (Nano-GIS), (Nano-LTA), beta (Nano-BEA), and faujasite (Nano-X) and also the modulation of their surface physicochemical properties by ion exchange experiments with transition metal cations (Mn^{2+}, Cu^{2+}, Co^{2+}, Zn^{2+} e Ni^{2+}) and/or by functionalization of their surfaces with organic agents such as aminosilanes and glutaraldehyde. The zeolitic materials were used as a solid supports for the immobilization of fungal Rhizomucor miehei (RML) and Thermomyces lanuginosus (TLL) lipases and the catalytic potential of these nanozeolite-enzyme complexes were explored in the transesterification reactions of oil palm oil and microalgae aiming the biodiesel production for biodiesel production using ethanol as solvent. The results have indicated the nature and concentration of the divalent cations solutions have played a significant role and strongly affected the amount and the enzymatic activity of the immobilized enzymes. The best catalytic performance were obtained with the TLL enzyme immobilized on Nano-X supports ion exchanged with nickel sulfate 0.5 mol.L^{-1} (Nano-X/Ni/0.5M-TLL). The FAEE yields obtained with Nano-X/Ni/0.5M/TLL complexes were above 94% and a strong synergetic effect was detected for this system, since the equivalent amount of the TLL enzyme in its free form has yielded only 9.1% of ethyl esters. Physicochemical characterization of the zeolite–enzyme complexes by transmission electron microscopy analysis (TEM) and X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) has revealed the presence of different species of nickel deposited on the surface of the nanozeolite support ion exchanged with nickel. The synergistic effect was explained using a plausible and strong model proposed by bioinformatics calculations. The model that correlates the dynamic behavior of the interaction regions of negative surface potential TLL enzyme with positive

zeta of the support (Nano-X/Ni/0.5M). The origin of the synergistic effect could be explained through interactions between aspartic acid residues 102 and 158 of the Thermomyces lanuginosus lipase and the positively charged zeolitic support surface that cause a harmonic displacement movement of opening the lid, which leaves its catalytic triad permanently exposed to the reaction medium. Nano-TS1, Nano-GIS, Nano-LTA, Nano-BEA, Nano-X/Ni/0.5M and Nano-X/Ni/0.5M functionalized with glutaraldehyde (GA) were used as solid supports for the immobilization of TLL enzyme through covalent bonding. In the transesterification reactions of microalgae oils to biodiesel using ethanol as solvent , the complex Nano-X/Ni/GA-TLL have showed high stability in reuse tests. After three reaction cycles, the conversion of the FAEE microalgae oil was about 86.7%, and 93% of its initial catalytic activity was retained. Briefly, some of the nanozeolite-enzymes complexes prepared, characterized and catalytically tested in this study have revealed a great potential for being employed as catalysts in the biodiesel production using alternative sources of triglycerides which in principle do not conflict with food production and also employing using ethanol as the main reaction solvent. Considering the concerns or challenges of the Brazilian energetic matrix specially the ones related to the production of renewable and clean biofuels, the findings of this research can make a positive contribution to this matter.

Keywords: *Biodiesel. Lipase. Immobilization. Nanozeolite. Functionalization.*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Transesterificação de triglicerídeos com etanol. 37

Figura 2 Esquema geral de reações de lipases atuando sobre ligações ésteres: (a) hidrólise, (b) esterificação, (c) transesterificação por acidólise, (d) transesterificação por alcoólise, (e) interesterificação e (f) aminólise 40

Figura 3 Mecanismo de reação das lipases. 41

Figura 4 Distintas formas de RML. As estruturas 3D foram obtidas do banco de dados da proteína (PDB) usando Pymol. (a) forma fechada (PDB-3TGL); (b) forma aberta (PDB-4TGL) 42

Figura 5 Migração do grupo acila da posição 2 para a posição 1 ou 3 da molécula de triacilglicerídeo 44

Figura 6 Principais métodos de imobilização de enzimas 50

Figura 7 Zeólita Faujasita (a) e Zeólita ETS-10 (b), respectivamente, vistas ao longo do eixo [111] 52

Figura 8 Unidades primárias de construção. 53

Figura 9 Unidades secundárias de construção. 53

Figura 10 Unidades poliédricas de construção. A = 4-anéis, B = 6-anéis, C = gaiola δ, D = gaiola 4-4, E = 8-anéis, F = gaiola ε, G = gaiola γ, H = gaiola 6-6, I = gaiola sodalítica, J = gaiola levina, K = gaiola chabazita, L = gaiola α, M = gaiola erionita, N = supergaiola faujasita 54

Figura 11 Formação estrutural das zeólitas A e Y 55

Figura 12 Esquema da formação da zeólita sintética 56

Figura 13 Matérias-primas utilizadas no estudo. A) óleo refinado de palma (temperatura ambiente), B) óleo refinado de palma (40ºC) e C) óleo refinado de microalgas heterotróficas. 73

Figura 14 Efeito da temperatura na atividade enzimática da lipase livre. (a) *Rhizomucor miehei* (□), (b) *Thermomyces lanuginosus* (○), (c) *Burkholderia cepacia* (▽) e (d) *Candida antarctica* (Δ). 84

Figura 15 Estabilidade térmica das lipases na temperatura crítica (a) *R. miehei* 44ºC (□), (b) *T. lanuginosus* 30ºC (○), (c) *T. lanuginosus* 45ºC (▽), (d) *B. cepacia* 50ºC (◊) e (e) *C. antarctica* 70º C (Δ). 87

Figura 16 Zimogramas obtidos a partir da atividade de hidrólise (H) e de esterificação (E) juntamente com o marcador molecular (M) para lipase de *R. miehei* (esquerda). Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (PM) e atividade de esterificação (E) para lipase de *T. lanuginosus* (direita). 90
Figura 17 Zimogramas obtidos a partir da atividade de esterificação para as lipases de *R. miehei* (RML), *C. antarctica* (CA) e *B. cepacia* (BC), a esquerda. Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida juntamente com o marcador molecular. 91
Figura 18 Padrões de difração de raios-X das diferentes famílias de nanozeólitas: a) Nano-X, b) Nano-GIS, c) Nano-LTA, d) Nano-BEA, e) Nano-TS1. 93
Figura 19 Espectro de infravermelho FTIR-ATR das diferentes nanozeólitas Nano-TS1, Nano-LTA, Nano-BEA e Nano-GIS. 94
Figura 20 Espectros de RMN-MAS de ^{29}Si das amostras de nanozeólitas. 97
Figura 21 Imagens da nanozeólita TS-1 sintetizada. (a) micrografia eletrônica e (b) superfície dos dados de altura obtida no modo de *Tapping Mode* AFM, área avaliada 2,5x2,5µm 99
Figura 22 Imagens da nanozeólita LTA sintetizada. (a) micrografia eletrônica e (b) Imagem de contraste de fase da superfície dos dados de altura obtida no modo *Tapping Mode* AFM, área avaliada 2x2µm. 100
Figura 23 Imagens da nanozeólita GIS sintetizada. (a) micrografia eletrônica (b) Imagem de contraste de fase da superfície dos dados de altura obtida no modo Tapping Mode AFM, área avaliada 500x500nm. 100
Figura 24 Imagens da nanozeólita BEA sintetizada. (a) micrografia eletrônica e (b) Imagem bidimensional da superfície dos dados de altura obtida no modo *Tapping Mode* AFM. 101
Figura 25 Imagens da nanozeólita Nano-X sintetizada. (a) micrografia eletrônica e (b) Imagem bidimensional da superfície dos dados de altura obtida no modo *Tapping Mode* AFM, área avaliada 5x5µm. 101
Figura 26 Imagem de HRTEM da nanozeólita TS-1.*Inset* mostra o modelo estrutural da zeólita com topologia MFI. Micrografia em alta resolução de uma única nanopartícula TS-1[(a) e (c)]. Difratograma de Fourier (b) e HRTEM em baixa magnificação (d)... 103
Figura 27 Nanozeólita LTA altamente cristalina obtida pelo método hidrotermal (duas formas diferentes de representação). (a) HRTEM imagem da nanozeólita microporosa LTA e (b) Imagem de campo escuro (*Dark Field).* 104

Figura 28 Imagens de HRTEM das diferentes nanozeólita. (a) Nano-BEA e (b) Nano-GIS. 105
Figura 29 Imagens de MET em campo escuro da nanozeólita Nano-X (a-c), espectros de raios-x de energia dispersiva (EDX) (d) e padrão de difração de elétrons (e). 106
Figura 30 Difratograma da nanozeólita faujasita (Nano-X) trocada com os cátions de manganês (0,1M), cobre (0,1M), cobalto(0,1M), zinco (0,1M) e níquel (0,1M) em comparação com a sua forma sódica (Nano-X/Na). 110
Figura 31 Difratograma da nanozeólita faujasita (Nano-X/Na) trocada com os cátions de níquel (0,1M) em diferentes tempos de exposição a solução a solução salina. 112
Figura 32 Difratograma da nanozeólita faujasita (Nano-X/Na) trocada com os cátions de níquel em diferentes concentrações molares. 113
Figura 33 Difratogramas dos derivados da nanozeólita X (Nano-X/Na) trocada com os diferentes cátions de metais de transição. Nano-X/Mn/0.5M, Nano-X/Cu/0.5M, Nano-X/Co/0.5M, Nano-X/Zn/0.5M, Nano-X/Ni/0.5M. 114
Figura 34 Padrões de DRX dos materiais zeolíticos formados por cátions inorgânicos de Cu^{2+} atuando como agente diretor de estrutura..... 116
Figura 35 Difratogramas dos derivados da nanozeólita A (Nano-LTA/Na) trocada com os diferentes cátions de metais de transição. Nano-LTA/Mn/0.1M, Nano-LTA/Cu/0.1M, Nano-LTA/Co/0.1M, Nano-LTA/Zn/0.1M, Nano-LTA/Ni/0.1M 118
Figura 36 Difratogramas da nanozeólita A (Nano-LTA/Na) trocada com os cátions de níquel em diferentes concentrações da solução de troca iônica 119
Figura 37 Espectro de infravermelho das amostras Nano-X/Na, Nano-X/Mn/0.5M, Nano-X/Cu/0.5M, Nano-X/Co/0.5M, Nano-X/Zn/0.5M, Nano-X/Ni/0.5M. 121
Figura 38 Espectros de RMN-MAS de 29Si das amostras derivadas da troca iônica com zinco, cobre e níquel comparada com a amostra pura Nano-X/Na. 124
Figura 39 MEV dos suportes nanozeolíticos com topologia faujasita: (a) Nano-X/Na, (b) Nano-X/Mn/0.5M, (c) Nano-X/Cu/0.5M, (d) Nano-X/Co/0.5M, (e) Nano-X/Zn/0.5M, (f) Nano-X/Ni/0.5M. 126
Figura 40 Imagens de MET em campo escuro dos suportes nanozeolíticos com topologia faujasita e as suas respectivas imagens dos padrões de difração de elétrons (DE) escala: (a) Nano-X/Na, (b) Nano-X/Mn/0.5M, (c) Nano-X/Cu/0.5M, (d) Nano-X/Co/0.5M, (e) Nano-X/Zn/0.5M, (f) Nano-X/Ni/0.5M. 127

Figura 41 Isotermas de adsorção de N_2 a 77 K das amostras (a) Nano-X/Mn/0.5M, (b) Nano-X/Co/0.5M, (c) Nano-X/Zn/0.5M, (d) Nano-X/Ni/0.5M, (e) Nano-X/Na e (f) Nano-X/Cu/0.5M. 129
Figura 42 Área externa do cristal calculado a partir dos dados da análise textural por adsorção de N_2. 130
Figura 43 Rendimentos de ésteres etílicos produzidos com os complexos Nano-X/Na-RML, Nano-X/Mn/0.5M-RML, Nano-X/Cu/0.5M-RML, Nano-X/Co/0.5M-RML, Nano-X/Zn/0.5M-RML, Nano-X/Ni/0.5M-RML e os respectivos equivalente da enzima em sua forma livre 142
Figura 44 Gráficos de Contorno obtidos a partir do modelo previsto, mantendo constantes Tempo em 30 horas (a), Razão molar O:E em 1:5 (b), Quantidade do catalisador em 3% (massa em relação ao óleo de palma) (c) 147
Figura 45 Produção de biodiesel em função do tempo utilizando a lipase de *Rhizomucor miehei* imobilizada sobre o suporte nanozeolíticos Nano-X/Ni/0.5M 148
Figura 46 Rendimentos de ésteres etílicos produzidos com os complexos Nano-X/Na-TLL, Nano-X/Mn/0.5M-TLL, Nano-X/Cu/0.5M-TLL, Nano-X/Co/0.5M-TLL, Nano-X/Zn/0.5M-TLL, Nano-X/Ni/0.5M-TLL e os respectivos equivalentes da enzima em sua forma livre 150
Figura 47 Testes de reuso para o complexo Nano-X/Ni/0.5M-TLL 151
Figura 48 Porcentagem de ésteres etílicos produzidos com os complexos Nano-X/Na-TLL, Nano-LTA/Na-TLL, Nano-X/Ni/0.5M-TLL, Nano-LTA/Ni/0.5M-TLL e os respectivos equivalente da enzima em sua forma livre. 153
Figura 49 Imagens da nanozeólita NaX/Ni/0.5M sintetizada. (a) Micrografia eletrônica de varredura e (b) Imagem bidimensional da superfície dos dados de altura obtida no modo *Tapping Mode* AFM, área avaliada 500x500nm, com contraste de variação de altura de 0 a 150nm. 154
Figura 50 Micrografia de MET em campo escuro da nanozeólita Nano-X/Ni/0.5M sintetizada. (a) baixa magnificação e (b) alta resolução. 155
Figura 51 XPS dados globais, $Ni2p_{3/2}$ e Al2pNi3p para a amostra Nano-X/Ni/0.5M. 156
Figura 52 Imagens de AFM: (a) e (b) Nanozeólita Nano-X/Ni/0.5M; (c) e (d) Nanozeólita Nano-X/Ni/0.5M/TLL. A-C (coluna da esquerda) são as imagens bidimensionais da superfície e B-D (coluna da esquerda) imagens de contraste de fase da superfície do

dados de altura obtida no modo Tapping Mode AFM, área avaliada 3x3µm, *insert* 500x500nm. 158

Figura 53 Estrutura tridimensional da lipase de *Rhizomucor miehei*, exibindo oito folhas β, conectadas com regiões de α-hélices (a). Lid α-hélice curta cobrindo a entrada do sítio catalítico (b). A tríade catalítica é formada por Ser-146, Asp-201 e His-258 (c). Alinhamento da sequência de aminoácidos entre as lipases de *T. lanuginosus* e *R. miehei* (d). 160

Figura 54 Superfície de potencial eletrostático gerada pela solução da equação de *Poisson-Boltzmann* com base na distribuição de carga associada ao campo de força *Amber*. Os círculos tracejados mostram a localização das *lids* 161

Figura 55 A análise no modo normal indica uma correlação no movimento da enzima negativamente carregada na região em torno de resíduos de Asp-102 e Asp-158 (a) e a abertura da *lid* (b). O resíduo de aminoácido Asp-102 é uma extensão da estrutura de *lid*, resultando na sua abertura. 163

Figura 56 Curvas de TGA e a primeira derivada DTG das amostras de (a) Nano TS1, (b) Nano-GIS, (c) Nano-LTA, (d) Nano-BEA, (e) Nano-NaX e (f) Nano-NaX/Ni. 168

Figura 57 ATR-FTIR das amostras funcionalizadas em comparação com as amostras puras (a) Nano TS1, (b)Nano-GIS, (c) Nano-LTA, (d) Nano-BEA, (e) Nano-NaX e (f) Nano-NaX/Ni. 169

Figura 58 Potencial zeta para as diferentes amostras funcionalizadas em comparação com as amostras puras (a) Nano TS1, (b)Nano-GIS, (c) Nano-LTA, (d) Nano-BEA, (e) Nano-NaX e (f) Nano-NaX/Ni. 171

Figura 59 Potencial zeta, após a imobilização, das amostras funcionalizadas exemplificadas pelas seguintes amostras: (a) Nano TS1, (b) Nano-BEA, (e) Nano-NaX e (f) Nano-NaX/Ni..... 172

Figura 60 Porcentagem de ésteres etílicos produzidos para os diferentes complexos nanozeólita-enzima de *Thermomyces lanuginosus* imobilizada..... 176

Figura 61 Reuso da lipase de *Thermomyces lanuginosus* imobilizada nas diferentes formas da nanozeólita Nano-X trocada com níquel. 179

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Peneiras moleculares sintetizadas na escala nanométrica, condições de síntese e tamanho de cristal. 58

Tabela 2 Variáveis para o planejamento experimental do tipo Box-Behnken. 75

Tabela 3 Composições químicas dos suportes nanozeolíticos obtidas por ICP-OES. .. 98

Tabela 4 Porcentagem de imobilização e atividade enzimática para as diferentes nanozeólitas na forma pura (sódica), conforme descrito no *item 3.3.2* 108

Tabela 5 Composições químicas dos suportes nanozeolíticos obtidas por ICP-OES. 123

Tabela 6 Porcentagem de imobilização e atividade enzimática da lipase de *Rhizomucor miehei* em função das condições de troca iônica: concentração molar dos íons em solução (0,1M), tempo (16h) e temperatura (60ºC) 131

Tabela 7 Porcentagem de imobilização e atividade enzimática da lipase de *Rhizomucor miehei* em função do tempo da troca iônica de $NiSO_4$ no processo de troca iônica: Nano-Ni/0,1M/4-36h 133

Tabela 8 Porcentagem de imobilização e atividade enzimática da lipase de *R. miehei* em função da concentração molar de $NiSO_4$ no processo de troca iônica: Nano-X/Ni/0,1M-0,5M/36h 134

Tabela 9 Porcentagem de imobilização e atividade enzimática da lipase de *Rhizomucor miehei* em função das condições de troca iônica: Nano-X/0,5M/36h. Carga enzimática oferecida de 10mg proteína/ g de suporte..... 136

Tabela 10 Porcentagem de imobilização e atividade enzimática da lipase de *T. lanuginosus* em função das condições de troca iônica: Nano-X/0,5M/36h 137

Tabela 11 Porcentagem de imobilização e atividade enzimática da lipase de *Thermomyces lanuginosus* em função das condições de troca iônica: Nano-LTA/0,1M/16h..... 139

Tabela 12 Porcentagem de imobilização e atividade enzimática em função da concentração molar de $NiSO_4$ no processo de troca iônica: Nano-LTA/0,1M-0,5M/36h. 140

Tabela 13 Matriz de planejamento experimental com os rendimentos de ésteres etílicos. 143

Tabela 14 Valores de p do modelo quadrático completo para as variáveis. 145

Tabela 15 Potencial zeta dos suportes nanozeolíticos obtidos por troca iônica. 162

Tabela 16 Efeito da funcionalização no processo de imobilização 174

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 Modificação química da superfície nanozeólita TS-1 70

Esquema 2 Imobilização covalente da enzima: Nanozeólita modificada com aminossilano reage com o glutaraldeído e o grupo N-terminal da enzima 71

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1 Determinação da atividade para a enzima livre por espectrofotometria..... 63

Equação 2 Determinação da quantidade de proteína total..... 71

Equação 3 Determinação da atividade enzimática para enzima imobilizada por titulação 72

Equação 4 Fórmula do modelo experimental do tipo *Box-Behnken* 74

Equação 5 Determinação do teor de ésteres 76

Equação 6 Equação de Helmholtz-Smoluchowski para determinação do potencial zeta. 82

Equação 7 Equação polinomial de segunda ordem para o modelo quadrático 146

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABS	Albumina de Soro Bovino
AFM	Microscopia de força atômica
APTMS	3-aminopropiltrimetoxisilano
ATR-FTIR	Infravermelho com transformada de Fourier no modo de reflexão total atenuada
BC	Lipase de *Burkholderia cepacia*
CA	Lipase de *Candida antarctica*
DRX	Difração de Raios-X
EDX	Espectros de raios-x de energia dispersiva
GA	Glutaraldeído
ICP OES	Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente Acoplado
IZA	*International Zeolite Association*
LTA	*Linde Type A*
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
Nano-BEA	Nanozeólita beta
Nano-GIS	Nanozeólita gismondina
Nano-LTA	Nanozeólita A
Nano-TS1	Nanozeólita titanossilicalita
Nano-X	Nanozeólita X
pNPP	Palmitato de *p*-nitrofenila
RML	Lipase de *Rhizomucor miehei*
RMN-MAS	Ressonância Magnética Nuclear do Estado Sólido-Ângulo Mágico
SDS-PAGE	*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*
Si:Al	Razão silício:alumínio
TGA	Análises termogravimétricas
TLC	*Thin Cromatography Layer*
TLL	Lipase de *Thermomyces lanuginosus*
$U.mg^{-1}$-suporte	Unidade de atividade enzimática por miligrama de suporte
$U.mL^{-1}$	Unidade de atividade enzimática por mililitros
XPS	Espectroscopia de fotoelétrons induzida por raios-X

SUMÁRIO

Dedicatória.....i

Agradecimentos ii

Epígrafe v

Resumo vi

Abstract.....viii

Lista de Figuras x

Lista de Tabelas xv

Lista de Esquemas e Equações..... xvi

Lista de Siglas e Abreviaturas xvii

Introdução 28

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA ---------- 31

1.1 Biodiesel ---------- 31

1.1.1 Matérias primas para produção de biodiesel ---------- 32

1.1.1.1 Primeira geração de substratos para a produção de biodiesel _____ 32

1.1.1.2 Segunda geração de substratos para a produção de biodiesel _____ 33

1.1.1.3 Terceira geração de substratos para a produção de biodiesel _____ 34

1.1.2 Álcoois usados na produção de biodiesel ---------- 36

1.1.3 Produção do biodiesel ---------- 37

1.2 Produção Enzimática de biodiesel mediada por lipases ---------- 39

1.2.1 Aspectos gerais das lipases ---------- 39

1.2.2 Lipases: Mecanismo de Catálise ---------- 40

1.2.3 Ativação Interfacial das Lipases ---------- 42

1.2.4 Lipases na produção de biodiesel ---------- 43

1.2.4.1 Especificidade das lipases _____ 43

1.2.4.2 Lipases imobilizadas na produção de biodiesel _____ 45

1.2.4.3 O efeito dos parâmetros fisico-químicos na reação transesterificação enzimática para obtenção de biodiesel _____ 46

1.2.4.4 Métodos de imobilização de enzimas para produção de biodiesel _ 49

1.3 Zeólitas ---------- 51

1.3.1 Propriedades Estruturais das Zeólitas ---------- 52

1.3.2 Síntese das Zeólitas ---------- 55

1.3.3 Usos de Zeólitas ---------- 57

1.3.4 Nanozeólitas---------- 57

1.3.5 Imobilização de enzimas em materiais zeolíticos---------- 58

2 OBJETIVOS ---------- 61

2.1 Objetivos gerais do projeto ---------- 61

2.2 Objetivos específicos ---------- 61

3 MATERIAL E MÉTODOS ---------- 63

3.1 Métodos de caracterização das enzimas livres e dos testes enzimáticos ------- 63

3.1.1 Ensaio enzimático para medida de atividade das enzimas livres ---------- 63

3.1.2 Eletroforese e zimogramas de atividade ---------- 63

3.1.2.1 Eletroforese desnaturante _____ 64

3.1.2.2 Zimograma na atividade de hidrólise _____ 64

3.1.2.3 Zimograma baseado na atividade de esterificação _____ 64

3.2 Preparação dos suportes zeolíticos ---------- 65

3.2.1 Sínteses das nanozeólitas puras ---------- 65

3.2.1.1 Nanozeólita Gismondina (Nano-GIS)_____ 65

3.2.1.2 Nanozeólitas FAU (Nano-X) _____ 66

3.2.1.3 Nanozeólita LTA_____ 66

3.2.1.4 Nanozeólita Beta _____ 67

3.2.1.5 Nanozeólita TS-1_____ 67

3.2.2 Sínteses das nanozeólitas modificadas com cátions de metais de transição através do processo de troca iônica---------- 68

3.2.2.1 Troca iônica Nano-X/Na _____ 68

3.2.2.2 Troca iônica Nano-LTA/Na _____ 69

3.2.3 Modificação química da superfície e ativação das nanozeólitas---------- 69

3.2.3.1 Preparação das nanozeólitas com aminossilano _____ 69

3.2.3.2 Preparação dos suportes glutaraldeído/nanozeólita_____ 70

3.3 Sínteses e caracterização dos complexos nanozeólita-enzima ---------- 71

3.3.1 Adsorção de Enzimas sobre as Nanozeólitas---------- 71

3.3.2 Ensaios para medida de atividade pelo método titulométrico---------- 72

3.4 Síntese de biodiesel---------- 73

3.4.1 Otimização da produção de biodiesel pelo método de Box Behnken----- 74

3.4.2 Reuso do biocatalisador ---------- 75

3.4.3 Análises por cromatografia gasosa do teor dos ésteres etílicos---------- 75

3.5 Potencial Eletrostático da Superfície das lipases ---------- 76

3.5.1 Análises de modos normais em proteínas---------- 77

3.6 Caracterização das nanozeólitas e dos complexos nanozeólitas-enzimas ----- 77

3.6.1 Difração de raios X (DRX) ---------- 77

3.6.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) ---------- 78

3.6.3 Microscopia de força atômica (AFM)---------- 78

3.6.4 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)---------- 79

3.6.5 Análises de infravermelho ---------- 79

3.6.6 Ressonância magnética nuclear do estado sólido de ^{29}Si ---------- 79

3.6.7 Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado- 80

3.6.8 Espectroscopia de fotoelétrons induzida por raios-X (XPS) ---------- 80

3.6.9 Análise textural por adsorção de nitrogênio ---------- 81

3.6.10 Análises termogravimétricas (TGA)---------- 81

3.6.11 Análises espectrofotométricas ---------- 82

3.6.12 Potencial zeta (ζ) ---------- 82

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES---------- 83

4.1 Caracterização das enzimas livres dos testes enzimáticos relevantes ---------- 83

4.1.1 Temperatura Ótima das Enzimas---------- 83

4.1.2 Estabilidade Térmica das Enzimas---------- 86

4.1.3 Estudos de eletroforese e zimografia para a determinação da atividade de hidrólise e esterificação ---------- 89

4.1.4 Zimogramas de atividade de hidrólise e de esterificação das lipases ----- 89

4.2 Caracterização físico-química das nanozeólitas puras e comparação dos diferentes suportes zeolíticos/enzima no desempenho catalítico---------- 91

4.2.1 Sínteses e caracterização das nanozeólitas puras ---------- 91

4.2.1.1 Difração de raios-X das nanozeólitas puras _____ 92

4.2.1.2 Espectroscopia na região do infravermelho _____ 93

4.2.1.3 Ressonância Magnética Nuclear (RMN-MAS) de ^{29}Si_____ 95

4.2.1.4 Microscopia eletrônica de varredura e de força atômica_____ 98

4.2.1.5 Microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução _____ 102

4.2.1.6 Resultados da caracterização dos complexos nanozeólitas/enzima-RML _____ 107

4.3 Caracterização das nanozeólitas trocadas com cátions de transição e o efeito no desempenho catalítico dos complexos (nanozeólita/enzima) na transesterificação enzimática de óleo palma ----------109

4.3.1 Troca iônicas das nanozeólitas ----------109

4.3.1.1 DRX dos derivados da troca iônica obtidos a partir da nanozeólita Nano-X/Na trocada com cátions de transição _____ 109

4.3.1.2 DRX dos derivados da troca iônica obtidos a partir da nanozeólita Nano-LTA/Na trocada com cátions de transição _____ 116

4.3.2 Espectroscopia da região do infravermelho dos derivados da troca-iônica com nanozeólita Nano-X/Na ----------120

4.3.3 ICP-OES dos derivados da troca-iônica obtidos a partir da nanozeólita Nano-X/Na trocada com cátions de transição----------122

4.3.4 RMN-MAS de ^{29}Si dos derivados da troca iônica obtidos a partir da nanozeólita Nano-X/Na trocada com cátions de transição----------123

4.3.5 Caracterização dos materiais nanozeolítico da nanozeólita Nano-X/Na e seus derivados por troca iônica por MEV e MET ---------- 125

4.3.5.1 Microscopia eletrônica de varredura _____ 125

4.3.5.2 Microscopia eletrônica de transmissão _____ 126

4.3.6 Análise textural por adsorção de nitrogênio ---------- 128

4.3.7 Imobilização das enzimas e caracterização dos complexos nanozeólitas/ enzimas 130

4.3.7.1 Imobilização e atividade enzimática dos derivados obtidos por troca iônica da Nano-X/Na em baixa concentração molar _____ 130

4.3.7.2 Imobilização e atividade enzimática para o suporte Nano-X/Ni/0.1M obtido em diferentes tempos de troca iônica _____ 132

4.3.7.3 Imobilização e atividade enzimática para o suporte Nano-X/Ni/36h obtido em diferentes concentrações molares _____ 133

4.3.7.4 Imobilização e atividade enzimática dos derivados obtidos por troca iônica da amostra Nano-X/Na em alta concentração molar _____ 134

4.3.7.5 Imobilização e atividade enzimática para nanozeólita Nano-LTA trocada com diferentes cátions _____ 138

4.3.7.6 Imobilização e atividade enzimática para suporte (Nano-LTA/Ni) em função da concentração molar na troca iônica _____ 140

4.3.8 Produção de biodiesel com os complexos nanozeólitas-enzimas -------- 141

4.3.8.1 Produção de biodiesel usando óleo de palma com os complexos de Nano-X/ lipase *R. miehei* (RML) _____ 141

4.3.8.2 Otimização e Produção de Biodiesel usando complexo Nano-X/Ni/0.5M-RML _____ 143

4.3.8.3 Produção de Biodiesel usando óleo de palma com os complexos de Nano-X/ lipase *T. lanuginosus* (TLL) _____ 149

4.3.8.4 Produção de biodiesel com os complexos Nano- LTA/TLL e Nano-X /TLL _____ 152

4.3.9 Caracterização do suporte Nano-X/Ni/0.5M e do complexo Nano-X/Ni/0.5M-TLL ---------- 153

4.3.9.1 Análises de MEV, AFM, MET e XPS do suporte Nano-X/Ni/0.5M _ _____ 153

4.3.9.2 Análises de AFM do suporte Nano-X/Ni/0.5M antes e depois da imobilização da lipase de *T. lanuginosus* _____ 157

4.3.10 Cálculos de bioinformática do comportamento dinâmico das enzimas para explicar os fenômenos da interação com os suportes nanozeolíticos ---------- 159

4.4 Caracterização das nanozeólitas modificadas com agentes orgânicos e o efeito no desempenho catalíticos dos complexos (nanozeólita/enzima) na transesterificação enzimática do óleo microalgas ---------- 166

4.4.1 Análises termogravimétricas das nanozeólita antes da funcionalização- 166

4.4.2 Potencial Zeta ---------- 170

4.4.3 Imobilização e atividade da lipase em função do potencial eletrostático 172

4.4.4 Produção de biodiesel com uso do óleo de microalgas ---------- 175

4.4.5 Reutilização ---------- 178

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES ---------- 181

5.1 Caracterização das enzimas livres dos testes enzimáticos relevantes --------- 181

5.2 Caracterização físico-química das nanozeólitas puras e comparação dos diferentes suportes zeolíticos/enzima no desempenho catalítico ---------- 181

5.3 Caracterização das nanozeólitas trocadas com cátions de transição e o efeito no desempenho catalítico dos complexos (nanozeólita/enzima) na transesterificação enzimática de óleo palma ---------- 182

5.4 Caracterização das nanozeólitas modificadas com agentes orgânicos e o efeito no desempenho catalíticos dos complexos (nanozeólita/enzima) na transesterificação enzimática do óleo microalgas ---------- 183

6 PERSPECTIVAS FUTURAS ---------- 185

7 REFERÊNCIAS ---------- 186

Introdução

O biodiesel é uma das fontes renováveis de energia mais importantes no cenário mundial. É visto por muitos como o principal substituinte do diesel de origem fóssil, por ser menos tóxico e biodegradável, proporcionando um grande benefício ambiental. A transesterificação de óleos vegetais ou de gorduras animais é a tecnologia predominante na produção de biodiesel, na qual as moléculas de triacilgliceróis reagem com álcool de cadeia curta, metanol e etanol, na presença de um catalisador. Os principais produtos dessa reação são uma mistura de ésteres alquílicos (biodiesel) e glicerol (Ma e Hanna, 1999).

As reações de transesterificação podem ser realizadas via catálise homogênea, heterogênea e enzimática (Zheng *et al.*, 2006; Di Serio *et al.*, 2008; Lee, Park e Lee, 2009; Soriano, Venditti e Argyropoulos, 2009). O biodiesel produzido por catalisadores alternativos, tais como as enzimas (em particular as lipases) é bastante atraente. Suas vantagens estão no fato da transesterificação enzimática ser realizada em condições amenas e elevada especificidade para a produção de ésteres metílicos ou etílicos de ácidos graxos (EMAG ou EEAG) em comparação com os outros catalisadores químicos convencionais, atualmente utilizados na produção industrial de biodiesel. Além disso, as lipases são adequadas para diversas fontes de matérias-primas com altos teores de ácidos graxos livres ou conteúdo de água, tais enzimas se destacam, assim, por serem capazes de realizar, simultaneamente, a esterificação de ácidos graxos livres e transesterificação de triacilglicerídeos (Shimada *et al.*, 1999; Du *et al.*, 2008; Bajaj *et al.*, 2010). Todavia, o uso de enzimas em escala industrial para a produção de biodiesel apresenta como principais desvantagens seu alto custo e sua difícil separação e recuperação após a reação e possível inativação dos seus centros ativos pelo glicerol, um subproduto da reação (Szczesna-Antczak *et al.*, 2009).

A imobilização, que consiste num acoplamento de enzimas a uma matriz sólida e inerte de origem orgânica ou inorgânica, é uma das maneiras encontradas para facilitar a separação e a recuperação da enzima de seu meio reacional e de sua posterior reutilização (Macario *et al.*, 2007). Com o uso de enzimas imobilizadas, é possível combinar as vantagens da transesterificação enzimática com aquelas da catálise heterogênea.

Diferentes classes de enzimas foram imobilizadas em vários tipos de suportes sólidos desde 1960 e, consequentemente, o uso de enzimas imobilizadas em indústrias alimentares, farmacêuticas e químicas tem aumentado constantemente (Bornscheuer,

2003). Entre vários suportes sólidos inorgânicos disponíveis para a imobilização de enzimas, zeólitas micrométricas com diferentes estruturas têm sido objeto sistemático de estudos (Diaz e Balkus, 1996; Gimon-Kinsel *et al.*, 1998; Han, Stucky e Butler, 1999; Corma, Fornes e Rey, 2002; Macario, *et al.*, 2008) e exploradas como matrizes de imobilização enzimática para diferentes aplicações. Recentemente, o uso de zeólitas nanométricas como um suporte sólido para imobilização de enzimas ou proteínas tem atraído o interesse dos cientistas tanto na academia, quanto na indústria.

Em princípio, a redução do tamanho das partículas de zeólita da escala micrométrica para a nanométrica acarreta mudanças substanciais nas propriedades físico-químicas desses materiais, tais como: o aumento da sua área de superfície, o que permite um melhor acesso e exposição dos seus sítios ativos; a alta dispersibilidade em ambas as soluções aquosas e orgânicas; e a facilidade de modulação das suas características de superfície, especialmente, em relação à carga da superfície e propriedades de hidrofilicidade/hidrofobicidade**.** Essas propriedades, juntamente com a alta capacidade de adsorção, podem criar um microambiente favorável para a imobilização de enzimas, portanto, fazendo das nanozeólitas materiais promissores para aplicações industriais (Tosheva e Valtchev, 2005).

Na literatura, nota-se a ausência de estudos dos biocatalisadores (nanozeólita/enzima) aplicados na catálise da reação de transesterificação para a produção de biodiesel. Uma possível explicação para isso está relacionada com as dificuldades da separação dos produtos e dos biocatalisadores. Embora esta seja uma preocupação legítima do ponto de vista industrial, a partir do ponto de vista científico, o estudo das interações entre suportes nanozeolítico pode, em princípio, solucionar algumas questões importantes. Por exemplo, a) a natureza dos cátions extra-rede pode influenciar no potencial catalítico do biocatalisador (nanozeólita/enzima)? b) a interação entre a superfície ativa da nanozeólita com a enzima pode induzir a um efeito sinergético? c) a estrutura cristalográfica e a sequência de aminoácidos das lipases podem desempenhar um papel na conformação final e na estabilização da enzima imobilizada no suporte zeolítico? E como essa interação pode afetar os sítios catalíticos da enzima imobilizada? d) nanozeólitas com a superfície modificada por moléculas orgânicas, as quais podem interagir com a enzima por uma ligação química covalente, podem aumentar o número de ciclos contínuos de reuso e a estabilidade do biocatalisador?

A fim de responder tais questionamentos e dada ainda a importância do processo catalítico de produção de biodiesel, da necessidade de obter processos mais eficientes, este trabalho investigou a síntese e a caracterização de diferentes nanozeólitas: faujasita (Nano-X), beta (Nano-BEA), A (Nano-LTA), titanosilicalita (Nano-TS1) e gismondina (Nano-GIS) e a modulação de suas propriedades físico-químicas por meio de experimentos de troca iônica com cátions de metais de transição (Mn^{2+}, Cu^{2+}, Co^{2+}, Zn^{2+} e Ni^{2+}) ou funcionalização de suas superfícies por agentes orgânicos como aminosilanos ou glutaraldeído. Esses suportes zeolíticos foram utilizados como matrizes para a imobilização das lipases de *R. miehei* e *T. lanuginosus* com o intuito de, posteriormente, empregar o conjugado enzima/zeólita na reação de transesterificação do óleo de palma e do óleo de microalgas heterotróficas a biodiesel usando etanol como reagente da reação.

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Biodiesel

Nas últimas décadas, os problemas relacionados com a segurança energética, como o aquecimento global, os gases causadores do efeito estufa e os problemas ambientais, juntamente às previsões futuras que apontam para a possível finitude das reservas de petróleo (devido ao rápido aumento da população, da industrialização em todo o mundo e ao intenso consumo), incentivaram a sociedade a buscar substitutos para os derivados de petróleo (Ma e Hanna, 1999). Essa constante busca por combustíveis alternativos tem estimulado e intensificado o esforço da comunidade científica em criar novas tecnologias para fazer uso da biomassa de baixo custo, disponível como matéria-prima para a produção de energia limpa e renovável. Neste sentido, o biodiesel tem um papel importante dada a sua abundância de matéria-prima e por ser uma forma de energia renovável e biodegradável, bem como o seu vasto potencial para a produção em larga escala, especialmente nos países em desenvolvimento. Essa é uma tendência que se fortalece a cada ano (Demirbaş, 2003; Demirbas, 2009).

O crescimento significativo da indústria de biodiesel, na última década, tem sido promovido por várias partes interessadas, tais como governos, usuários finais, produtores de biodiesel e produtores de oleaginosas (matéria-prima). Alguns dos principais fatores por trás desse enorme crescimento são a redução da dependência de petróleo importado, alternativas ecológicas ao combustível diesel, a capacidade de usar biodiesel combustível misturado nos motores diesel existentes, sem (ou com poucas) modificações e compatibilidade com infraestrutura de distribuição de combustíveis existente, bem como o próprio protocolo de Kyoto (que problematiza a questão da emissão de gases causadores do efeito estufa e sua consequente necessidade de redução) (Ma e Hanna, 1999; Mata, Martins e Caetano, 2010).

O mercado de biodiesel global deverá produzir 45.219 milhões de litros de biodiesel em 2020. A União Europeia é tida como o principal mercado de biodiesel para a próxima década, seguida de perto pelo mercado norte-americano. Nos últimos anos, é esperado um maior desenvolvimento dos mercados emergentes (China, Índia e Brasil) na questão energética relacionada ao biodiesel (Ma, Zhang e Chen, 2014). No Brasil, espera-se para os próximos 10 anos, um aumento de 5,3% na demanda nacional de energia por ano, chegando a 372 milhões de toneladas até 2020 (Tolmasquim, 2012).

1.1.1 Matérias primas para produção de biodiesel

Diversas oleaginosas podem ser utilizadas como matéria-prima renovável para a obtenção de biodiesel, tais como: a palma (*Elaeis guineensis*), a mamona (*Ricinus communis*), a soja (*Glycine max*), o algodão (*Gossypium spp*), o amendoim (*Arachis hypogaea*), o pinhão-manso (*Jatropha curcas*), o girassol (*Helianthus annuus*), dentre outras, e também gorduras animais, óleos residuais e óleos de microalgas. Contudo, vários setores da sociedade questionam o uso das atuais oleaginosas, principalmente a soja, usadas para a produção de biodiesel, devido ao seu impacto sobre os preços e a escassez de alimentos (Hossain *et al.*, 2008). Apesar dos vários avanços nas pesquisas, observa-se que cerca de 95% do biodiesel é produzido a partir de óleos comestíveis e o custo estimado do óleo como matéria-prima é muito elevado — 70% a 80% do custo total da produção de biodiesel (Lim e Teong, 2010; Ahmad *et al.*, 2011). Analisando essa grande diversidade de matéria-prima, podemos classificá-las em três grupos: a primeira, a segunda e terceira geração.

1.1.1.1 Primeira geração de substratos para a produção de biodiesel

A primeira geração de matéria-prima para a produção de biodiesel é proveniente das seguintes oleaginosas: a canola (*Brassica napus*), a soja, a palma e o girassol, pois essas foram as primeiras culturas a serem utilizadas para a produção de biodiesel (Abbaszaadeh *et al.*, 2012).

O uso desse tipo de matéria-prima tem ocasionado muitos problemas, haja vista, principalmente, o seu impacto sobre os mercados globais de alimentos e segurança alimentar (Brennan e Owende, 2010). O desvio dessas culturas alimentares para a produção de óleo em grande escala de biodiesel pode trazer desequilíbrio para o mercado global de alimentos (Gui, Lee e Bhatia, 2008) e, como consequência, pode levar a uma crise "alimentos *versus* combustível". Ademais, a produção de biodiesel a partir de óleo comestível também tem um impacto ambiental negativo, pois exige grande parte da terra de boa qualidade disponível, causando um desequilíbrio ecológico inevitável, com a derrubada de florestas para fins de cultivo. Assim, as novas linhas de pesquisa têm voltado, atualmente, suas atenções para matérias-primas que não sejam cultivadas em áreas destinadas à agricultura alimentar. Nesse sentido, pesquisadores buscam fontes alternativas de matérias-primas vegetais que possam ser cultivadas em regiões degradadas

e com maior rendimento de produção por hectare, como por exemplo o óleo de palma (Janaun e Ellis, 2010).

Embora o óleo proveniente da palma seja considerado matéria-prima de primeira geração, no caso do Brasil, principalmente nas regiões do norte e nordeste, existe uma vasta produção de óleo de palma (dendê) com baixo custo e de boa qualidade, o que tem motivado a realização de pesquisas nesta área visando à redução dos custos da produção do biodiesel de óleo de palma e à obtenção de benefícios ambientais, energéticos e econômicos. Do ponto de vista ambiental, mesmo que apresente a desvantagem do cultivo, por ser produzido unicamente em algumas regiões, a palma se destaca como uma boa opção de matéria-prima, pois há mais de 50 milhões de hectares de áreas desmatadas nas regiões norte e nordeste do país e grande parte pode ser explorada para o seu plantio (Ferreira e Cristo, 2006).

Além disso, embora, entre as matrizes vegetais, a soja seja a principal fonte de matéria-prima para produção de biodiesel no Brasil, sua produtividade é baixa, cerca de 0,5 toneladas de óleo/hectares/ano. De maneira similar, a mamona pode produzir aproximadamente 0,6 toneladas/hectares/ano, enquanto a cultura de palma, por outro lado, apresenta maior produtividade, com um rendimento de 4 a 6 toneladas de óleo/hectare/ano e produção distribuída durante todo o ano (Ferreira e Cristo, 2006).

1.1.1.2 Segunda geração de substratos para a produção de biodiesel

A segunda geração de matéria-prima para obtenção de biodiesel consiste de fontes alternativas que não entram em conflito com a indústria de alimentos. No Brasil, o óleo de pinhão-manso, o óleo de babaçu (*Orbignya phalerata* ou *Orbignya oleifera*) e o óleo da semente de mamona são três exemplos de matéria-prima de segunda geração provenientes de oleaginosas. As matérias-primas de origem animal, tais como o sebo bovino, a banha suína, a gordura de aves, entre outras matérias graxas de origem animal também enquadram-se nesse grupo. Outro tipo de matéria-prima que também é considerada importante para a obtenção de biodiesel são os óleos de descarte, gorduras animais e óleos já utilizados em frituras de alimentos, resultantes de processamentos domésticos, comerciais e industriais (Pinzi *et al.*, 2009).

A produção de biodiesel a partir de oleaginosas não comestíveis tem sido amplamente investigada ao longo dos últimos anos. As vantagens deste tipo de matéria-prima são: a) não adequação de óleos utilizados para a alimentação humana, devido à

presença de compostos indesejáveis ou tóxicos; b) em termos de produção e qualidade, o biodiesel pode ser equiparado à conversão dos óleos comestíveis; c) baixa demanda de terra requerida, possibilidade de mistura de culturas e possibilidade de cultivo em terrenos menos favoráveis para agricultura; e d) subprodutos úteis são gerados, que podem ser usados em outros processos químicos ou queimados para gerar calor e energia (Pinzi *et al.*, 2009; Leung, Wu e Leung, 2010).

Contudo, as principais desvantagens do biodiesel estão associadas à produção e o desempenho, no qual a produção pode não ser abundante para suprir a demanda e o biodiesel derivado de óleos vegetais de segunda geração e gorduras animais podem ser instáveis em temperaturas frias, uma vez que contêm elevada quantidade de ácidos graxos, o que torna difícil a transesterificação (Singh e Singh, 2010). Por essas razões, matérias-primas de segunda geração são pouco exploradas, principalmente, para a utilização na produção de biodiesel.

1.1.1.3 Terceira geração de substratos para a produção de biodiesel

O óleo obtido de microalgas é outra fonte alternativa de triglicerídeos, sendo considerada por especialistas como a terceira geração de matéria-prima para obtenção de biodiesel. Microalgas são microrganismos fotossintéticos que convertem luz solar, água e dióxido de carbono em biomassa. As pesquisas revelam que as microalgas apresentam um rendimento extremamente superior por hectare em comparação com as oleaginosas, porém o principal obstáculo para a comercialização do biodiesel de óleo de microalgas é o alto custo de produção que requer alto rendimento e efetiva produção em larga escala em biorreatores (Mata, Martins e Caetano, 2010).

Embora a comercialização desse biocombustível ainda não seja viável, as algas têm diversas vantagens em comparação às culturas vegetais. Do ponto de vista prático, elas são fáceis de cultivar, não necessitam crescer em solos agricultáveis e também podem crescer em corpos de água, tais como lagos, mares, oceanos e ainda podem ser cultivadas no solo pobre com água salobra do semi-árido brasileiro. É relevante que essas algas cresçam mais rápido do que qualquer planta.

Com relação aos benefícios ambientais, o biodiesel derivado do óleo de microalgas libera menos gás carbônico na atmosfera do que combustíveis fósseis, não é tóxico (ausência de enxofre), é altamente biodegradável e promove a redução dos gases do efeito estufa. Além das vantagens mencionadas acima, as algas capturam uma elevada

quantidade de energia solar e conseguem converter substrato facilmente em biomassa de algas por ação da luz proporcionando, desta forma, uma redução do uso de fertilizantes e nutrientes (Janaun e Ellis, 2010; Mata, Martins e Caetano, 2010).

A maior parte dos estudos com microalgas são realizados com uso de microalgas autotróficas (consumindo CO_2 e energia solar) em sistemas abertos (lagoas de rolamento) por terem todas as vantagens acima mencionadas. Entretanto, o cultivo de microalgas em sistemas abertos apresenta alguns problemas para o processo, principalmente em termos de contaminação e produtividade (Mata, Martins e Caetano, 2010). Por outro lado, o cultivo de microalgas em fotobiorreatores tem grandes vantagens no processo, sobretudo pelo fato de serem controlados (menor índice de contaminação). Porém, existe uma problemática dos fotobiorreatores, que está relacionada com algumas falhas técnicas de processo, baixa produtividade, dificuldade para *scale-up* e alto custo do processo, ocasionando uma baixa aplicabilidade no setor industrial (Molina Grima *et al.*, 1999; Sánchez Mirón *et al.*, 1999).

As microalgas também podem ser do tipo heterotróficas, ou seja, desenvolvem-se na ausência de luz e armazenam energia convertendo açúcares em óleos por meio da fermentação. Contudo, embora não seja possível capturar CO_2, o processo heterotrófico é cíclico porque a fonte orgânica inicial é produzida por meio de um processo fotossintético (Brennan e Owende, 2010). Normalmente, a engenharia genética é usada para obter linhagens de microalgas melhoradas geneticamente para maximizar a produção de óleos. Por exemplo, a plataforma biotecnológica patenteada pela empresa Solazyme-Brasil, descreve uma linhagem de microalgas com elevada produção de lipídeos de até 80% (Trimbur *et al.*, 2013), enquanto as culturas autotróficas de algas nativas fornecem uma porcentagem de lipídios de 15% (Xu, Miao e Wu, 2006). A utilização de microalgas heterotróficas em escala industrial apresenta diversas vantagens se comparada à utilização de microalgas autotróficas. Entre as vantagens da utilização de enzimas pode-se citar: elevado grau de crescimento, controle de produtividade de lipídeos, baixo custo de instalação e menor contaminação. Além disso, para o cultivo das microalgas heterotróficas podem ser usados substratos de baixo preço, tais como cana de açúcar, milho, palhada de milho e resíduos florestais (Brennan e Owende, 2010; Shen *et al.*, 2010).

Nesse contexto, fermentadores industriais conseguem reduzir o tempo necessário para as algas converterem açúcares em óleos em apenas alguns dias. O óleo de microalgas

heterotróficas é uma fonte promissora de lipídeos para uso na produção de biodiesel devido à eficiência dessas microalgas para produzir óleo de alta qualidade e elevada produtividade em relação a culturas tradicionais, garantindo a produção em escala comercial (Minowa *et al.*, 1995; McGinnis, Dempster e Sommerfeld, 1997; Danquah *et al.*, 2009).

1.1.2 Álcoois usados na produção de biodiesel

O biodiesel pode ser produzido principalmente com dois tipos de álcool: o metanol, proveniente do petróleo, ou o etanol, proveniente da cana-de-açúcar (Brasil) ou milho (Estados Unidos). O uso de metanol em relação ao etanol, na maioria dos países, deve-se principalmente ao baixo custo e à alta reatividade do metanol. No entanto, o uso da rota metílica para a produção de biodiesel a partir de óleos vegetais apresenta algumas desvantagens, dentre as quais destacamos: elevada toxicidade e volatilidade e sua origem fóssil, pois é produzido a partir de gás natural. A rota metílica também é utilizada para a produção de biodiesel em nosso país, porém, a rota etílica seria a mais viável, devido à abundância de etanol produzido nacionalmente, proveniente da cana-de-açúcar com baixo custo. Dessa forma o biodiesel seria um combustível 100% renovável (Bradin, 1996).

No Brasil, o uso do etanol como reagente para a produção de biodiesel é uma opção viável, visto que o país é o segundo maior produtor mundial de etanol. Todavia, a maior parte das usinas de biodiesel não possuem tecnologia para isso, pois a produção de biodiesel via rota etílica apresenta alguns empecilhos, tais como o elevado consumo de álcool e dificuldade de separação do produto final da glicerina, o que gera maiores gastos energéticos e econômicos. Ademais, o caráter azeotrópico do etanol dificulta a recuperação e separação da mistura etanol–água por destilação, sendo esta uma das maiores dificuldades da implementação da rota etílica para produção de biodiesel, uma vez que, nas usinas de biodiesel, as reações de transesterificação são realizadas por catalisadores homogêneos alcalinos e o excesso de umidade no meio reacional provoca a saponificação (Ching, 2007).

Por conseguinte, vários estudos estão sendo realizados no Brasil a respeito do uso dessa rota tecnológica para a produção de biodiesel. Esta é uma área de intensa atividade científica nas universidades e nos grandes centros de pesquisas e, tão logo, as pesquisas apontarem para a melhor viabilidade do uso de etanol como solvente para a produção de

biodiesel, não haverá nenhuma restrição ao seu uso, mas uma ampliação do seu uso, na medida em que o Brasil é grande produtor de etanol.

1.1.3 Produção do biodiesel

O biodiesel pode ser sintetizado a partir da transesterificação de óleos vegetais, gorduras animais ou óleo de microalgas com álcoois de cadeia curta como o metanol e o etanol, na presença de um catalisador. O processo de transesterificação consiste em uma sequência de três reações consecutivas e reversíveis, que incluem a conversão de triglicerídeos em uma mistura de ésteres alquílicos (biodiesel) e glicerol, podendo ter como produtos intermediários diglicerídeos e monoglicerídeos. Um mol de éster é liberado em cada etapa e as reações globais, podem ser representadas pela Figura 1 (Demirbas, 2009).

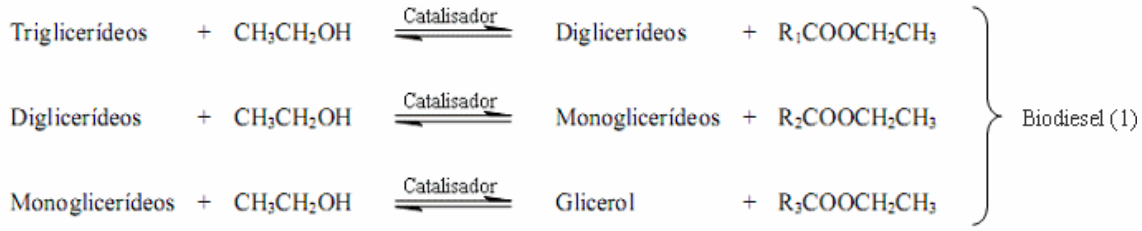


Figura 1 Transesterificação de triglicerídeos com etanol.

O processo de transesterificação para a produção de biodiesel pode ser: (i) via catálise básica, (ii) via catálise ácida, (iii) via catálise enzimática ou (iv) via álcool supercrítico (Dabdoub, Bronze e Rampin, 2009). Embora existam vários estudos mostrando que a transesterificação de biodiesel pode ser realizada por meio de catálise homogênea ácida ou básica, por catalisadores heterogêneos ácidos ou básicos, atualmente, a maior parte da produção de biodiesel é feita por catalisadores homogêneos básicos, como hidróxido de sódio (NaOH), hidróxido de potássio (KOH), metóxido de sódio ($NaOCH_3$) e etóxido de sódio ($NaOCH_2CH_3$), comumente denominado biodiesel de primeira geração (Demirbas, 2009).

Em geral, as reações de transesterificação realizadas com catalisadores alcalinos homogêneos apresentam curto tempo reacional. As unidades industriais que trabalham com esses catalisadores necessitam, para operar, de alta conversão com mínimas reações indesejadas e condições de operação relativamente moderadas. No entanto, embora a produção de biodiesel com catalisadores alcalinos homogêneos apresentem todas as

vantagens citadas acima, existem algumas desvantagens desse processo que o torna pouco competitivo em relação ao diesel de petróleo (Dabdoub, Bronze e Rampin, 2009).

As principais desvantagens desse processo são: a) o catalisador não pode ser recuperado e deve ser neutralizado no final das reações; b) geração de grandes quantidades de resíduos químicos, devido à neutralização do catalisador básico (NaOH, KOH); c) o processo é muito sensível à presença de água e ácidos graxos livres, portanto, a fim de sintetizar o biodiesel de boa qualidade e evitar reações indesejáveis (hidrólise e saponificação), é necessário o uso de matéria-prima de alta qualidade (óleo refinado) (Dabdoub, Bronze e Rampin, 2009; Demirbas, 2009).

A reação de transesterificação para a obtenção de biodiesel também pode ser realizada por catalisadores homogêneos ácidos, como o ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido clorídrico ou ácido sulfônico. Esses catalisadores são adequados para matérias-primas com altos teores de ácidos graxos livres ou conteúdo de água, uma vez que esses catalisadores são capazes de realizar a esterificação e transesterificação de triglicerídeos simultaneamente. No entanto, este processo exige uma alta relação molar de álcool/óleo e um longo tempo de reação nessas condições pode causar a corrosão dos equipamentos devido ao ambiente ácido (Vyas, Verma e Subrahmanyam, 2010).

Além do processo industrial de produção do biodiesel, utilizando catalisadores sintéticos (homogêneos e heterogêneos), o biodiesel também pode ser produzido por catalisadores alternativos, tais como as enzimas, em particular as lipases. Embora os processos de transesterificação catalisados por enzimas ainda não sejam comercialmente desenvolvidos no Brasil, a transesterificação enzimática é uma rota promissora, ambientalmente menos agressiva, para a produção de biodiesel e as enzimas apresentam várias vantagens em comparação aos catalisadores homogêneos, como alta atividade catalítica em condições de reação moderadas (Macario *et al.*, 2007; Yagiz, Kazan e Akin, 2007; Balat e Balat, 2010).

As enzimas têm a capacidade de tolerar e catalisar reações com o emprego de óleos vegetais com elevado teor de ácidos graxos livres e alto teor de água, portanto, a possibilidade de formação de reações indesejadas e emulsão são bastante reduzidas, usando o processo de transesterificação enzimática (Fukuda, Kondo e Noda, 2001; Balat e Balat, 2010). Embora as vantagens catalíticas das enzimas sejam muitas, há algumas limitações para seu uso em processos industriais devido, principalmente, ao elevado

custo, a separação e a impossibilidade de reutilização da enzima na sua forma livre (Helwani *et al.*, 2009; Szczesna-Antczak *et al.*, 2009).

Algumas das desvantagens do processo enzimático para a produção de biodiesel podem ser minimizadas ou eliminadas pela imobilização das enzimas em matrizes sólidas. Em geral, a imobilização de enzimas em suportes sólidos resulta em várias vantagens, entre elas podem ser citadas: a) melhoria da estabilidade operacional da enzima; b) recuperação do produto sem contaminação do mesmo pelo catalisador; c) diminuição da inibição da enzima pelo glicerol (sub-produto reacional); d) seletividade para um maior número de substratos; e e) melhores propriedades funcionais em comparação às enzimas livres (Zanin, 2004; Rodrigues *et al.*, 2013; Yücel, Terzioğlu e Özçimen, 2013).

Os principais desafios para a obtenção de biodiesel em escala industrial com o uso de lipases estão relacionados ao alto custo e à baixa disponibilidade de suportes eficientes para a imobilização das enzimas que requerem estabilidade, alta capacidade de reuso e elevado potencial catalítico com a enzima imobilizada em larga escala e, sobretudo, à redução dos custos de produção de bons biocatalisadores (especialmente com lipases imobilizadas). No entanto, atualmente, alguns países como China, Estados Unidos, Tailândia, Singapura, Coreia e Israel detêm a tecnologia do processo de produção enzimática de biodiesel em escala industriais, conscientes de que os processos catalíticos atuais não são eficientes para o uso de matérias-primas promissoras para a produção de biodiesel.

1.2 Produção Enzimática de biodiesel mediada por lipases

1.2.1 Aspectos gerais das lipases

Lipases são enzimas hidrolases que catalisam a hidrólise de triacilglicerídeos em diglicerídeos, monoglicerídeos, ácidos graxos e glicerol na interface lipídio-água. Uma característica particular de sua ação é o fato de serem mais ativas com os substratos insolúveis em água do que solúveis. Elas são únicas em catalisar reações na interface água-lipídio e revertê-las em meio não-aquoso e sua conformação muda em contato com um substrato insolúvel em água (Trevisan; Saxena *et al.*, 2003).

O papel natural das lipases é a hidrólise de triacilglicerídeos, porém, além da hidrólise, elas também são capazes de catalisar as biotransformações de gorduras e de óleos através de reações de esterificações, transesterificações (acidólise,

interesterificação, alcoólise) e aminólise em meio não aquoso (Sotoft *et al.*, 2010). Quando ésteres são utilizados como substratos as possíveis reações são mostradas na Figura 2.

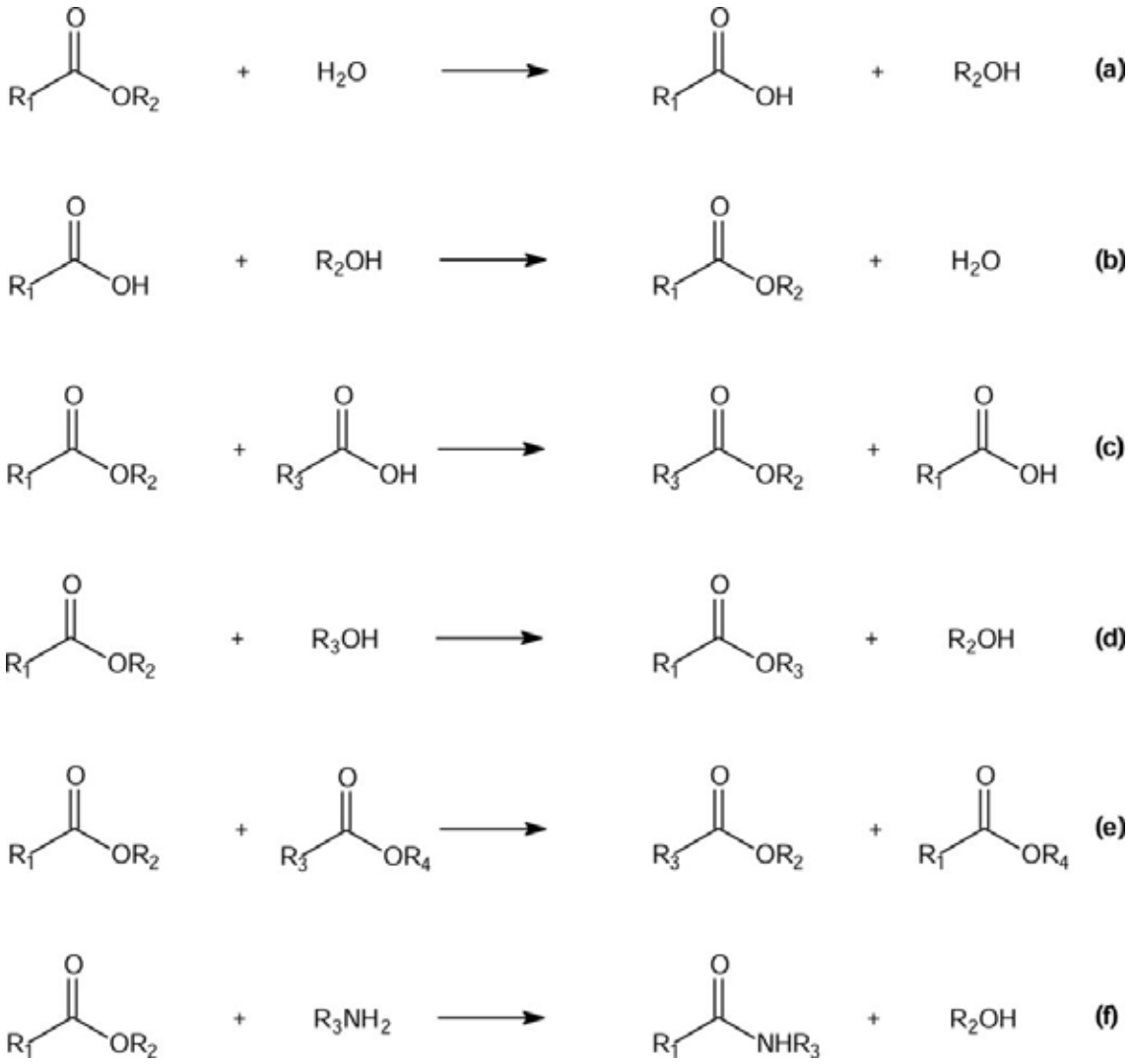


Figura 2 Esquema geral de reações de lipases atuando sobre ligações ésteres: (a) hidrólise, (b) esterificação, (c) transesterificação por acidólise, (d) transesterificação por alcoólise, (e) interesterificação e (f) aminólise. Fonte: Aouf *et al.* (2014).

1.2.2 Lipases: Mecanismo de Catálise

A partir dos estudos estruturais disponíveis na literatura entende-se que o sítio catalítico das lipases consiste de uma tríade catalítica Ser-His-Asp/Glu. A Figura 3 descreve o mecanismo de reação das lipases numa ligação éster. A hidrólise do substrato ocorre em duas etapas. Na primeira etapa ocorre à ativação do resíduo da serina nucleofílica pela histidina e, uma vez que essa serina é ativada ocorre um ataque do oxigênio do grupo hidroxila do resíduo nucleofílico da serina ao carbono da carbonila

ativado do éster lipídio (Figura 3A). Logo após ao ataque nucleofílico da serina, ocorre a formação de um intermediário tetraédrico, com o O^- estabilizado pela interação com dois grupos peptídicos NH. A histidina doa um próton ao componente álcool que está deixando o substrato (Figura 3B). Dessa forma, ocorre a formação de uma molécula intermediária covalente ("enzima acilada"); estando o componente ácido do substrato esterificado pelo resíduo serina da enzima. Na segunda etapa, uma molécula de água é ativada pelo resíduo histidina na vizinhança e o íon hidroxila resultante realiza um ataque nucleofílico ao átomo de carbono da cabonila do intermediário covalente (Figura 3C). O resíduo histidina doa um próton ao átomo de oxigênio do resíduo serina ativo, a ligação éster entre a serina e componente acilado é quebrada, liberando o produto acilado. A enzima está então pronta para receber uma nova molécula de substrato para o reinício do ciclo (Figura 3D) (Trevisan; Jaeger, Dijkstra e Reetz, 1999).

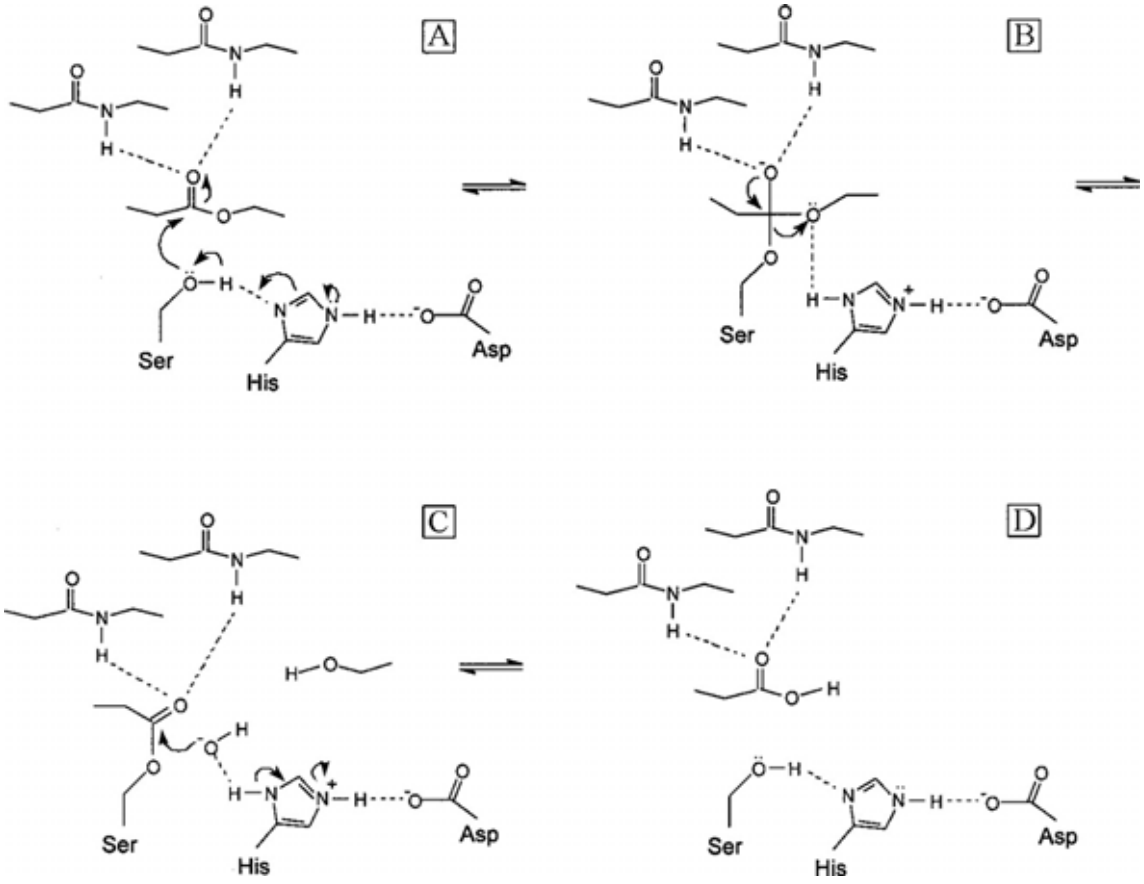


Figura 3 Mecanismo de reação das lipases. Fonte: Jaeger, Dijkstra e Reetz (1999).

1.2.3 Ativação Interfacial das Lipases

As estruturas cristalográficas de várias lipases foram determinadas por estudos cristalográficos de difração por raios-X e a determinação da estrutura tridimensional das lipases *Rhizomucor miehei* (Brady *et al.*, 1990), *Geotricum candidum* (Schrag et al., 1991) e da pancreática humana (Winkler, D'Arcy e Hunziker, 1990) propiciou uma explicação para o fenômeno da ativação interfacial. Este fenômeno é extremamente importante e as enzimas lipolíticas são caracterizadas por aumentar drasticamente a sua atividade quando agem na interface água-lipídio. Martinelle e Hult (1994) discutiram em detalhes os mecanismos envolvidos na catálise. Entre as possíveis explicações para a ativação do sítio catalítico das lipases na presença de interfaces água-lipídeo, existe a hipótese que aponta mudanças no rearranjo estrutural da região do sítio ativo das lipases, que apresentam tampas que cobrem o sítio ativo e se abrem para expô-lo na presença do substrato.

A Figura 4 apresenta o mecanismo geral de ativação interfacial das lipases, exemplificada pela lipase de lipase *Rhizomucor miehei* (RML), mostrando o equilíbrio de ambas as formas aberta e fechada. Na ausência da interface água-lipídio, o sítio ativo é recoberto por uma "tampa" hidrofóbica ou "*lid*". Contudo, na presença de substâncias hidrofóbicas, a tampa é aberta e uma grande superfície hidrofóbica dos sítios catalíticos é exposta, tornando os sítios ativos acessíveis ao substrato. É suposto que esta superfície hidrofóbica interage com a interface lipídica (Jaeger, Dijkstra e Reetz, 1999).

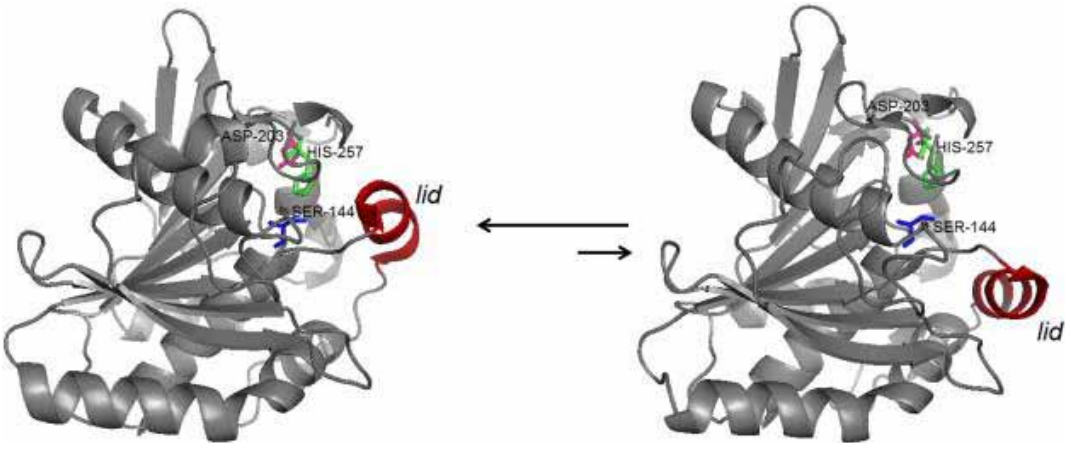


Figura 4 Distintas formas de RML. As estruturas 3D foram obtidas do banco de dados da proteína (PDB) usando Pymol. (a) forma fechada (PDB-3TGL); (b) forma aberta (PDB-4TGL). Fonte: Poppe *et al.* (2015).

Embora este mecanismo funcione bem para a lipase *R. miehei* existem, todavia, exceções. Para algumas lipases, observou-se que a presença da "tampa" não está

necessariamente correlacionada com a ativação interfacial (Thomas *et al.*, 2005), tendo sido descritas lipases como a de *Pseudomonas aeroginosa*, *Burkholderia glumae* e *Candida antarctica B*, que apresentam a "*lid*" em suas estruturas, mas não sofrem ativação interfacial (Jaeger, Dijkstra e Reetz, 1999). Por outro lado, algumas lipases embora atuem em reações contendo substratos de cadeia longa possuem uma "*lid*" incompleta ou não apresentam a "*lid*", e não precisam da interface para exercer sua atividade hidrolítica. São exemplos desse comportamento particular a cutinase de *Fusarium solani pisi* e as lipases de *C. antarctica*, *P.aeroginosa* e *Bacillus subtilis* (Baron, 2008).

1.2.4 Lipases na produção de biodiesel

A produção enzimática de biodiesel foi patenteada por Haas (1997), não obstante, o processo ainda não tenha sido implementado devido à certas restrições, como a inibição das enzimas por metanol, a perda da atividade enzimática e o alto custo das enzimas. Na literatura, vários artigos têm reportado possíveis soluções para esses problemas, visando a implementação da produção enzimática de biodiesel em um futuro próximo (Ranganathan, Narasimhan e Muthukumar, 2008).

Lipases são produzidas por muitos microrganismos (fungos e bactérias) e eucariontes superiores (vegetais e animais) (Trevisan, 2004). Do ponto de vista econômico e industrial, a maioria das lipases usadas para a produção de biodiesel são de origem microbiana, obtidas por meio de fermentação, pois são preferíveis com relação às de fontes de animais e de plantas por sua relativa facilidade e abundância de microrganismos capazes de sintetizá-las (Baron, 2008; Fjerbaek, Christensen e Norddahl, 2009). Apesar das lipases das diferentes fontes serem capazes de catalisar a transesterificação para a produção de biodiesel, as lipases obtidas de bactérias e fungos, tais como *Aspergillus niger*, *Candida antarctica*, *Candida rugosa*, *Chromobacterium viscosum*, *Mucor miehei*, *Pseudomonas cepacia*, *Pseudomonas fluorescens*, *Photobacterium lipolyticum*, *Rhizopus oryzae*, *Streptomyces sp.* e *T. lanuginosus* são mais usadas nesta reação (Ranganathan, Narasimhan e Muthukumar, 2008; Fjerbaek, Christensen e Norddahl, 2009; Bajaj *et al.*, 2010).

1.2.4.1 Especificidade das lipases

A especificidade das lipases é um parâmetro de grande importância na seleção do uso das lipases. Elas podem ser divididas em três grupos, de acordo com a sua

especificidade: lipases 1,3-específicos, lipases específicos de ácidos graxos e lipases não específicas. Em se tratando de lipases 1,3 específicas para a produção de biodiesel, um problema que deve ser superado, para que ocorra a conversão máxima é necessário uma migração do grupo acila da posição 2 para a posição 1 ou 3 da molécula de triacilglicerídeo durante a reação (Figura 19). Na verdade, essa migração ocorre espontaneamente em muitos casos e diferentes fatores podem influenciar esta migração do grupo acila. Esse grupo de lipases, tais como *Aspergillus niger*, *Rhizopus oryzae* e *Mucor miehei*, *T. lanuginosus* são bastante eficientes na catálise de reações de transesterificação para a produção de biodiesel (Szczesna-Antczak *et al.*, 2009; Ribeiro *et al.*, 2011).

Recentemente, na literatura, vários artigos têm sido publicados a respeito da produção de biodiesel envolvendo a utilização de lipases 1,3 específicas, principalmente imobilizadas. Entre eles, Du *et al.* (2005) demonstraram que o rendimento da transesterificação do óleo de soja foi acima de 90% com o uso da lipase específica *sn*-1,3 de *T. lanuginosus* imobilizada sobre gel de sílica (Lipozyme TL IM). Assim, mesmo a lipase sendo específica *sn*-1,3- é possível obter uma boa conversão do óleo a ésteres, acima de 90% sob condições adequadas (Szczesna-Antczak *et al.*, 2009).

A especificidade ao substrato é uma característica importante, sendo um fator decisivo para a produção de biodiesel. As lipases de *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas cepacia*, *Candida rugosa*, *Candida antarctica* e *Candida cylindracea* são adequadas para a reação de transesterificação, exibindo tanto a especificidade do substrato quanto de regioespecificidade (Szczesna-Antczak *et al.*, 2009). A Figura 5 ilustra a reação de transesterificação para a produção de biodiesel catalisada pela lipase *R. miehei* (RML).

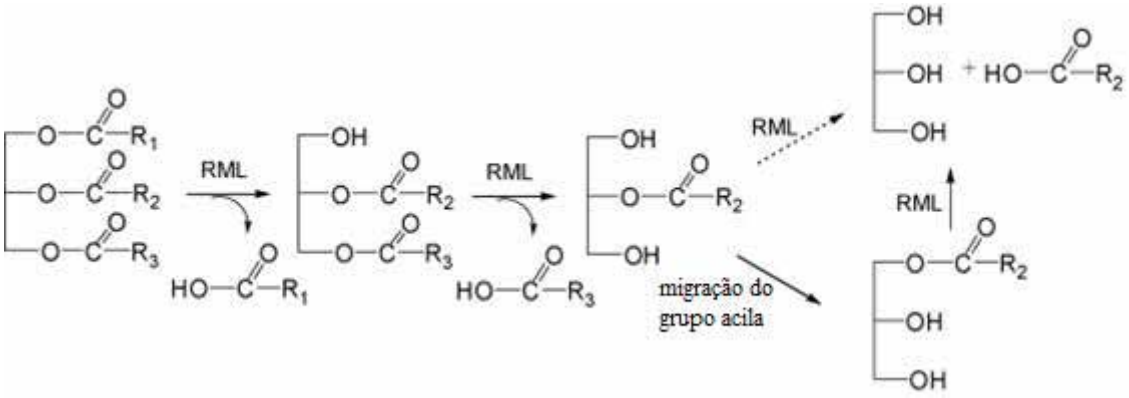


Figura 5 Migração do grupo acila da posição 2 para a posição 1 ou 3 da molécula de triacilglicerídeo. Fonte: Rodrigues e Fernandez-Lafuente (2010).

1.2.4.2 Lipases imobilizadas na produção de biodiesel

A maior parte das pesquisas sobre a transesterificação de óleos vegetais para a obtenção de biodiesel utiliza a enzima comercial pura, principalmente imobilizadas, como novas alternativas de catalisadores com um grande potencial quando comparado a métodos químicos tradicionais. Lipases isoladas de diferentes origens microbianas têm sido empregadas como biocatalisador na síntese de biodiesel, resultando em um produto de alta pureza. Entre elas, as lipases derivadas de *R. miehei* (Macario et al., 2008), *T. lanuginosus* (Du et al., 2005), *Candida antarctica* (Samukawa et al., 2000), *Burkholderia cepacia* (Noureddini, Gao e Philkana, 2005).

Macario e colaboradores (2007) estudaram a reação de transesterificação do óleo de oliva via rota metílica utilizando as lipases produzidas pelo fungo *R. miehei* imobilizadas em algumas zeólitas (Silicalita-1 e ITQ-2) como catalisador em condições amenas de reação a 40 ºC e conseguiram bons resultados de rendimento acima de 90% de ésteres metílicos para o melhor catalisador. No entanto, os autores relatam a dificuldade de reuso de enzimas na transesterificação para os suportes utilizados devido à possível dessorção da lipase imobilizada na matriz sólida durante o processo de operação.

Du e colaboradores (2005) utilizaram óleo de soja e a lipase de *T. lanuginosus* imobilizada em sílica gel como catalisador. As reações de alcoólise, via rota metílica, foram realizadas a 40 ºC e obtiveram 92% de rendimento de ésteres metílicos. Todavia, a principal dificuldade apontada pelos autores foi a inativação da enzima pelo metanol quando este foi adicionado em uma única etapa de acordo com a relação estequiométrica da reação. O problema só foi contornado com a adição gradual do álcool em várias etapas.

Samukawa e colaboradores (2000) avaliaram um sistema de metanólise realizado em 30 ºC com a lipase de *Candida antarctica* comercial, imobilizada (Novozym 435), e óleo de soja, com variação das proporções de enzima e metanol, obtendo rendimentos acima de 96% de biodiesel — rendimentos que foram mantidos mesmo após alguns ciclos de metanólise. No entanto, os dados mostraram que a enzima foi, aparentemente, inativada quando elevados equivalentes molares de metanol foram adicionados. Dessa forma, o metanol foi adicionado lentamente para mantê-lo no nível desejado.

Noureddini e colaboradores (2005) utilizaram a lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizada no interior de uma matriz polimérica, preparada por policondensação do tetrametoxisilano (TMOS) e iso-butiltrimetoxisilano (iso-BTMS). As reações de transesterificação de óleo de soja foram feitas com metanol e etanol na temperatura de

35ºC. Para as reações com metanol, a concentração de ésteres metílicos atingiu 41% e 65% para a lipase livre e imobilizada, respectivamente. Na reação com etanol, a conversão em ésteres etílicos obtidos foram 36% e 63 % para a lipase livre e imobilizada, respectivamente. Ao final da reação, após 11 ciclos, a concentração de triglicerídeos em ambos os sistemas atingiu níveis insignificantes, porém a formação de ácidos graxos, mono e diglicerídeos foi de 9%, 6%, 43% para a reação com a enzima livre, e, 9%, 22% e 6% para a enzima imobilizada, indicando uma elevada formação de intermediários da reação.

Outros estudos também mostraram que os rendimentos de ésteres alquílicos, derivados de várias oleaginosas, gordura animal ou óleo residual podem ser obtidos com uso de diversos álcoois catalisados por diferentes lipases imobilizadas em sistemas com ou sem solventes orgânicos. Além disso, esses estudos também discutiram parâmetros importantes a respeito dessa reação que afetam o rendimento de ésteres produzidos, tais como: temperatura, quantidade de água, aceptor de acila, solvente orgânico, razão molar óleo:álcool e o glicerol (Fukuda, Kondo e Noda, 2001; Ranganathan, Narasimhan e Muthukumar, 2008; Fjerbaek, Christensen e Norddahl, 2009).

1.2.4.3 O efeito dos parâmetros fisico-químicos na reação transesterificação enzimática para obtenção de biodiesel

O efeito da temperatura

O aumento da temperatura, geralmente, acarreta o aumento do rendimento da transesterificação, porque eleva as constantes de velocidade da reação e diminui as limitações de transferência de massa. No entanto, o aumento acima das condições ótimas pode inativar a enzima (Luković, Knežević-Jugović e Bezbradica, 2011).

A temperatura ótima para a transesterificação enzimática resulta da interação entre a estabilidade operacional do biocatalisador e a taxa de transesterificação. Ela também depende da razão molar álcool/óleo, tipo de solvente e termoestabilidade da preparação enzimática. A melhor temperatura para a atividade de várias lipases usadas para a transesterificação do óleo com diferentes álcoois em hexano está numa faixa de 30ºC e 55ºC. No caso de reações na ausência de solventes orgânicos, a faixa varia de 30ºC a 50ºC (Fjerbaek, Christensen e Norddahl, 2009; Szczesna-Antczak *et al.*, 2009). De acordo com estudos sobre o efeito da temperatura na produção de biodiesel com enzimas imobilizadas é evidente que o sistema apresenta maior resistência à temperatura em comparação com

as enzimas livres uma vez que na presença do suporte a enzima se torna mais rígida (Leca *et al.*, 2010; Yücel, Terzioğlu e Özçimen, 2013).

O efeito da quantidade de água

As lipases são únicas em catalisar reações na interface água—lipídeo e revertê-las em meio não-aquoso e sua atividade depende dessa interface. A presença de uma interface de um substrato insolúvel em água é necessária para proporcionar um ambiente adequado para a mudança conformacional da enzima, a qual proporciona o movimento abertura da *lid* e exposição dos sítios catalíticos para interagir com o substrato (Al-Zuhair, Hasan e Ramachandran, 2003; Al-Zuhair *et al.*, 2006). Com o aumento da quantidade de água disponível, verifica-se também que ocorre um aumento na área interfacial disponível e, consequentemente, o aumento do potencial catalítico (Al-Zuhair *et al.*, 2006; Yücel, Terzioğlu e Özçimen, 2013). Portanto, a atividade enzimática pode ser restringida num meio completamente anidro.

A atividade de água (a_w) define a quantidade de água que não está ligada no sistema e pode ser evaporada. Em quantidade ótima de água, a hidrólise de ligações ésteres permanece no nível mínimo, o que assegura o alto grau de transesterificação e rendimento da síntese de biodiesel. Vários estudos revelam que a adição de uma pequena alíquota de água à mistura reacional catalisada pela enzima não muda o equilíbrio reacional em favor da hidrólise e aumenta a taxa de produção dos ésteres alquílicos (Kaieda *et al.*, 2001; Nie *et al.*, 2006). No entanto, o excesso de água é uma condição não desejada, uma vez que muda o equilíbrio reacional em favor da hidrólise e diminui a taxa de produção dos ésteres. Desse modo, a quantidade de água é considerada um parâmetro importante nos processos enzimáticos de produção de biodiesel (Petersson, Adlercreutz e Mattiasson, 2007).

O efeito de aceptor de acila

Metanol e o etanol, álcoois de cadeia curta, habitualmente, são os mais usados como receptores de acila, devido ao baixo custo e disponibilidade. Insolúvel e uma quantidade relativamente elevada de metanol (se comparados, ao óleo) têm uma influência negativa sobre a estabilidade de lipases, o que pode ser resolvido por uma adição em *batelada alimentada* dos álcoois (Robles-Medina *et al.*, 2009; Fan, 2012).

Outro receptor de acila utilizado é o acetato de metila, cujo uso, segundo Yücel, *et al.* (2013), na produção de biodiesel o qual apresenta como principais vantagens a

estabilidade e capacidade de reuso. Além disso, o subproduto obtido é o triacilglicerol que não interfere na qualidade do biodiesel e, ao contrário do que ocorre com o glicerol, o subproduto dessa reação não é adsorvido sobre o suporte com a enzima imobilizada (Xu *et al.*, 2003). Todavia, o uso limitado do acetato de metila como aceptor de acila, deve-se ao elevado custo quando comparado com os álcoois de cadeia curta, metanol e etanol (Robles-Medina *et al.*, 2009).

Efeito do solvente

Na catálise da reação de transesterificação com o uso de lipases, a quantidade de álcool e a baixa solubilidade do glicerol em biodiesel têm efeitos negativos sobre a atividade da enzima (livre ou imobilizada). A adsorção do glicerol sobre a superfície da enzima imobilizada é observada durante, a produção de biodiesel catalisada por lipases, o que reduz a atividade de enzimas (Dossat, Combes e Marty, 1999). A solubilidade de metanol e glicerol em solventes hidrofóbicos é, portanto, baixa.

Para contornar esse problema, pesquisadores propuseram a adição de solvente orgânico à mistura álcool/óleo para aumentar a solubilidade do álcool, podendo-se, assim, usar o álcool em altas concentrações. Portanto, o uso de solvente orgânico protege a enzima da inativação e garante a transesterificação em uma única etapa (Du, Xu e Liu, 2003). A solubilidade do álcool aumenta, consideravelmente, quando teores de ésteres formados aparecem na mistura reacional e, por consequência, melhoram a estabilidade da enzima (Fukuda, Kondo e Noda, 2001; Ranganathan, Narasimhan e Muthukumar, 2008).

Embora observem-se os efeitos positivos da utilização dos solventes na reação de transesterificação, as desvantagens de usar solvente são muitas, tais como: volume extra do reator, a toxicidade do solvente e custos adicionais nas etapas de recuperação e purificação do solvente (Nielsen, Brask e Fjerbaek, 2008).

Efeito da razão molar

O excesso de álcool em relação à quantidade de ácidos graxos no triacilgliceróis, em geral, aumenta o rendimento da transesterificação, mas pode inativar a enzima principalmente quando o álcool é insolúvel na mistura (Ganesan, Rajendran e Thangavelu, 2009; Szczesna-Antczak *et al.*, 2009). O meio de reação é um fator importante na determinação da razão molar ótima óleo/álcool. A inativação de lipases ocorre por meio do contato da enzima com álcool insolúvel no meio reacional, sendo este

altamente hidrofílico elimina a camada de hidratação essencial para a estabilidade da enzima (Vieira, Da Silva e Langone, 2006).

Pesquisadores propuseram algumas opções interessantes para contornar esse problema. As duas principais são: (i) a adição de álcool em batelada alimentada para evitar a inativação da enzima é uma proposta interessante para melhorar o rendimento de ésteres em sistemas livres de solventes (Fan, 2012); e (ii) adição de solvente orgânico à mistura álcool/óleo para aumentar a solubilidade do álcool. Assim, pode-se usar álcool em altas concentrações. Portanto, o uso de solvente orgânico protege a enzima da inativação e garante a transesterificação em uma única etapa (Du *et al.*, 2008).

Efeito do glicerol

Resultados de estudos sobre o efeito do glicerol, um dos produtos da reação, sobre a eficiência da transesterificação mostram que as enzimas podem ser inativadas por esse subproduto. O glicerol é hidrofílico e insolúvel no óleo, assim este é facilmente absorvido sobre a superfície da enzima imobilizada, levando a um efeito negativo sobre a atividade da enzima e a uma estabilidade operacional (Du *et al.*, 2008). Dossat, *et al.* (1999) observaram uma considerável queda da atividade das lipases imobilizadas em matrizes hidrofílicas quando expostas ao glicerol. Eles se fundamentaram no fato de que as moléculas de glicerol foram adsorvidas na superfície desses suportes, de modo que, uma camada hidrofílica fosse formada, o que torna a molécula de enzima inacessível a substratos hidrofóbicos. Para solucionar o problema Du, Xu e Liu (2003) propuseram a lavagem da lipase imobilizada com álcool isopropílico, restaurando a atividade e ocorrendo a remoção do glicerol.

1.2.4.4 Métodos de imobilização de enzimas para produção de biodiesel

Os métodos para a imobilização de enzimas mais conhecidos são divididos em duas formas: (a) imobilização de enzima no interior de um suporte (encapsulação e retenção por meio de membranas) e (b) a imobilização na superfície do suporte (adsorção, ligação covalente, ligação iônica). A deposição da enzima sobre um suporte sólido (adsorção) é o método mais simples de imobilização física de enzimas (Dalla-VECCHIA, Nascimento e Soldi, 2004). A Figura 6 apresenta um esquema dos principais métodos de imobilização de enzimas, tanto em suportes não-porosos, como em suportes porosos, e por encapsulação.

A imobilização no *interior do suporte* pode ser subdividida em: (1) separação por membranas – nesse método a enzima encontra-se fisicamente separada do meio de reação, através de uma película (membrana) semipermeável; ou (2) entrelaçadas em polímero ou matriz neste caso, as enzimas são aprisionadas entre as malhas de um polímero geleiforme (Dalla-Vecchia, Nascimento e Soldi, 2004).

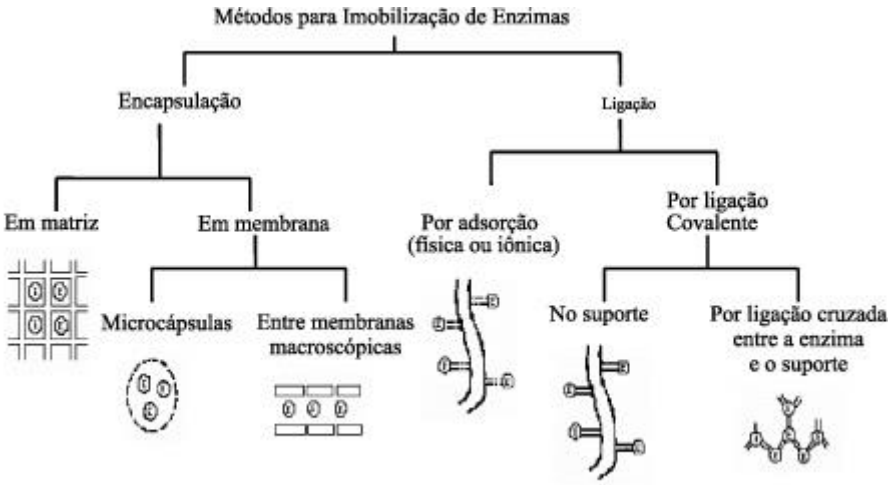


Figura 6 Principais métodos de imobilização de enzimas. Fonte: Dalla-Vecchia, Nascimento e Soldi (2004).

A imobilização na *superfície do suporte* pode ser dividida em: (1) imobilização por ligação covalente, como o próprio nome sugere, a enzima é ligada ao suporte mediante ligações químicas covalentes ou através de ligações cruzadas, que são normalmente estabelecidas entre os aminogrupos primários e os grupos hidroxila dos aminoácidos constituintes da enzima, com os grupos reativos do suporte. Como as interações são fortes, pode-se ocorrer perda da atividade causada por modificações na estrutura cataliticamente ativa; e (2) imobilização por adsorção consiste na adsorção da enzima em um suporte inerte, por meio de ligações eletrostáticas ou hidrofóbicas, tais como interações iônicas, força de Van der Walls, ligação de hidrogênio e interações dipolo-dipolo. Este tipo de imobilização causa uma pequena modificação na estrutura nativa da enzima, quando comparado aos outros tipos de imobilização e, por isso, geralmente não promove a perda da atividade catalítica (Macario *et al.*, 2007).

Estudos demonstram que diferentes suportes podem ser empregados para a imobilização de lipases em ambos os materiais hidrofóbicos e hidrofílicos, tais como partículas porosas de kaolinita, resinas macroporosas, zeólitas, esferas de SiO_2 funcionalizadas em nanoescala, etc (Macario, Anastasia *et al.*, 2008). Entre os vários

sólidos utilizados como matriz para a imobilização de enzima, as zeólitas apresentam algumas características físico-químicas peculiares que as tornam muito atraente para a imobilização de enzimas.

1.3 Zeólitas

Zeólitas constituem uma classe de aluminossilicatos cristalinos que é caracterizada por sua estrutura aberta. Elas são constituídas de tetraedros TO_4 (onde T é um átomo com coordenação tetraédrica, Si ou Al) que são unidos por átomos de oxigênio para formarem uma estrutura tridimensional contendo janelas, canais e gaiolas de dimensões moleculares. Os tetraedros TO_4 nas zeólitas são aproximadamente regulares, com os ângulos T-O-T em torno dos átomos de oxigênio no intervalo de 125º a 180º, sendo essa uma das razões da existência de tantas estruturas diferentes. Outros materiais microporosos próximos das zeólitas foram sintetizados. A estrutura do esqueleto desses materiais contém uma grande variedade de combinação de elementos, como por exemplo, Al e P (Wilson *et al.*, 1982), B e Si (Meyers *et al.*, 1985), Ga e Si (Newsam e Vaughan, 1986), Ga e Al (Parise, 1985), Si , Al e P (Lok *et al.*, 1984) ou outro átomo em combinação com Al e P (Flanigen *et al.*, 1986). A fórmula geral de uma zeólita à base de aluminossilicato pode ser escrita como:

$$\mathbf{M^{m+}\ [(SiO_2)_x\ (AlO_2)_y]\ .\ n\ H_2O}$$

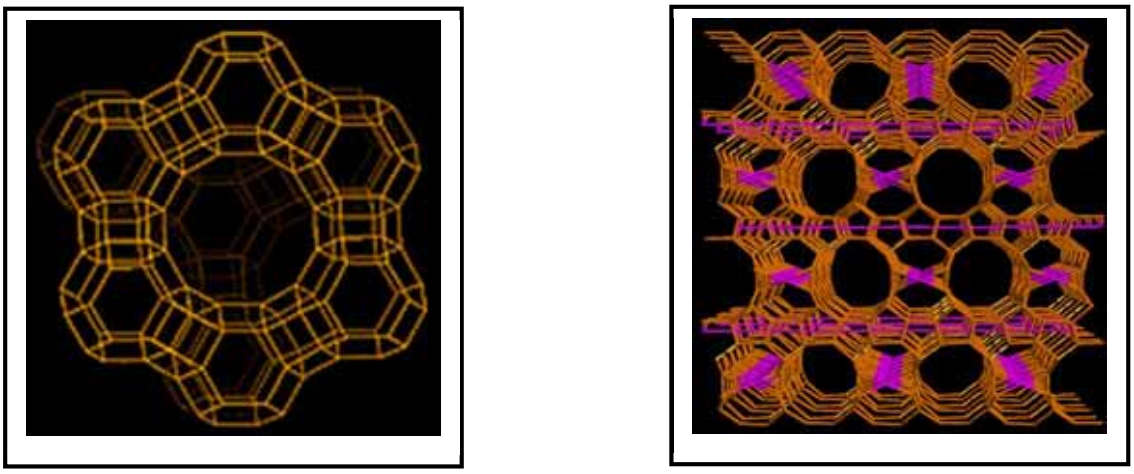
cátions extra-rede rede fase adsorvida

A relação entre o átomo T (T=Al, Si) e o átomo de oxigênio é de 1:2 e a presença dos átomos de alumínio na rede induz a uma carga líquida negativa que pode ser variada mudando a relação Si/Al. Essa carga negativa é neutralizada pela presença dos cátions metálicos ou orgânicos. Os cátions extra-rede estão geralmente localizados nos canais e cavidades, podendo ser trocados pelo tratamento de troca iônica com uma solução salina em condições físico-químicas apropriadas.

O terceiro componente da fórmula geral é a fase adsorvida. Esta é dada geralmente como água na fórmula acima, porém, pode ser também um componente orgânico como, por exemplo, o benzeno. O componente aquoso ou orgânico desempenha um importante papel durante a síntese das zeólitas, tornando-se uma parte integrante da estrutura em desenvolvimento. A fase adsorvida pode ser removida da zeólita cristalina por aquecimento ou sob pressão reduzida sem destruição da estrutura zeolítica. Os três componentes da estrutura das zeólitas (esqueleto cristalino, cátions extra-rede de

compensação e a fase adsorvida) são alvo de intenso interesse e desempenham um papel cujo grau de importância varia de acordo com a sua aplicação (Davis, 2002).

A Figura 7 mostra as estruturas cristalográficas das zeólitas faujasita Y e ETS-10. A zeólita faujasita Y é uma das zeólitas mais amplamente estudadas, tanto no âmbito acadêmico como no industrial (Nery *et al.*, 2000). Basicamente, a zeólita ETS-10 devido às suas características de grandes poros e estabilidade térmica é um dos mais importantes materiais microporosos sintéticos da atualidade que apresentam estrutura mista (octaédrica e tetraédrica) formada pelo compartilhamento de tetraedros de [SiO_4] e por octaedros de [TiO_6]. Sendo assim, para cada titânio da estrutura a carga resultante é de (-2) sendo compensada pelos cátions Na^+ e K^+ (Rocha e Anderson, 2000).



(a) **(b)**

Figura 7 Zeólita faujasita (a) e Zeólita ETS-10 (b), respectivamente, vistas ao longo do eixo [111]. Fontes: Rocha e Anderson (2000) e International Zeolite Association (IZA).

1.3.1 Propriedades Estruturais das Zeólitas

A maioria das propriedades físico-químicas das zeólitas estão diretamente relacionadas à sua estrutura cristalográfica, que é muito complexa. Por essa razão, a caracterização e a descrição estrutural dos materiais zeolíticos é muito importante. Para explicar as estruturas cristalográficas das zeólitas, utilizam-se recursos didáticos como a divisão em subunidades com o intuito de descrevê-las e classificá-las, sendo que as mais simples são as chamadas unidades de construção primárias e secundárias, até se chegar às unidades mais complexas, as unidades de construção poliédricas.

Nas zeólitas, a unidade estrutural básica (unidade primária de construção) é a configuração tetraédrica de quatro átomos de oxigênio ao redor de um átomo central, geralmente Si e Al. A Figura 8 ilustra as unidades primárias que são os tetraedros TO_4

(onde T é um átomo com coordenação tetraédrica Si, Al, P, Ga, B, Be, etc.), no qual cada átomo T possui 4 ligações, enquanto que o O possui 2, formando assim uma rede tridimensional (Ghobarkar e Schäf, 1999; Baerlocher, McCusker e Olson, 2007).

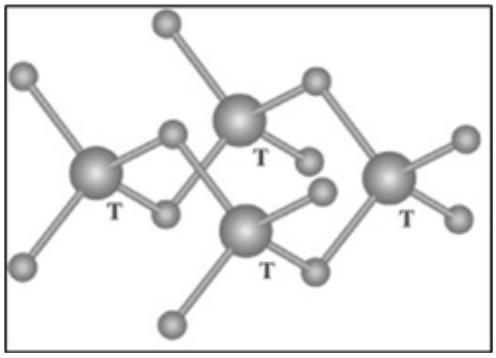


Figura 8 Unidades primárias de construção.

Embora seja difícil imaginar a construção de uma estrutura espacial contínua e complexa através de uma simples união de um pequeno número de tetraedros, a unidade de formação dessas estruturas pode ser facilmente visualizada por meio da existência de unidades secundárias de construção (*Secondary Bulding Units* ou SBU). As SBU são 16 unidades propostas por Meir (1968) e são formadas pelo agrupamento das unidades primárias, dessa forma os tetraedros formam unidades secundárias mais complexas que consistem de 4 a 16 átomos T e que podem ser ligadas para construir diferentes tipos de redes zeolíticas. Essas unidades estão representadas na Figura 9 e as ligações são ilustradas pelo desenho de linhas retas, que representam as pontes de oxigênios conectando duas unidades tetraédricas (Ghobarkar e Schäf, 1999; Baerlocher, McCusker e Olson, 2007; Smart e Moore, 2012).

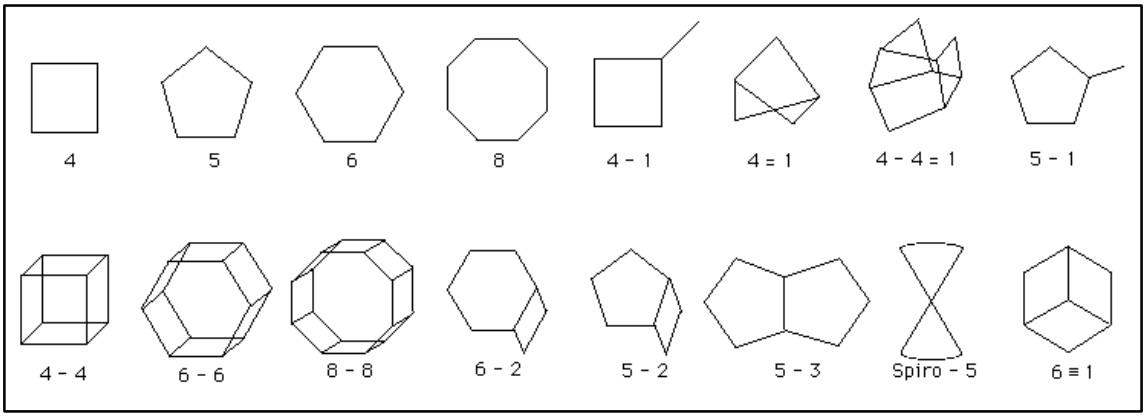


Figura 9 Unidades secundárias de construção.

A terceira e última ramificação é obtida através das várias maneiras com que as unidades secundárias de construção se unem para formar uma estrutura tridimensional, contendo canais e poros interconectados. Dessa forma, as estruturas das zeólitas podem ser mais facilmente visualizadas empregando-se o conceito de unidades poliédricas de construção (Ghobarkar e Schäf, 1999; Baerlocher, McCusker e Olson, 2007; Smart e Moore, 2012). A Figura 10 mostra as diferentes unidades poliédricas de construção existentes.

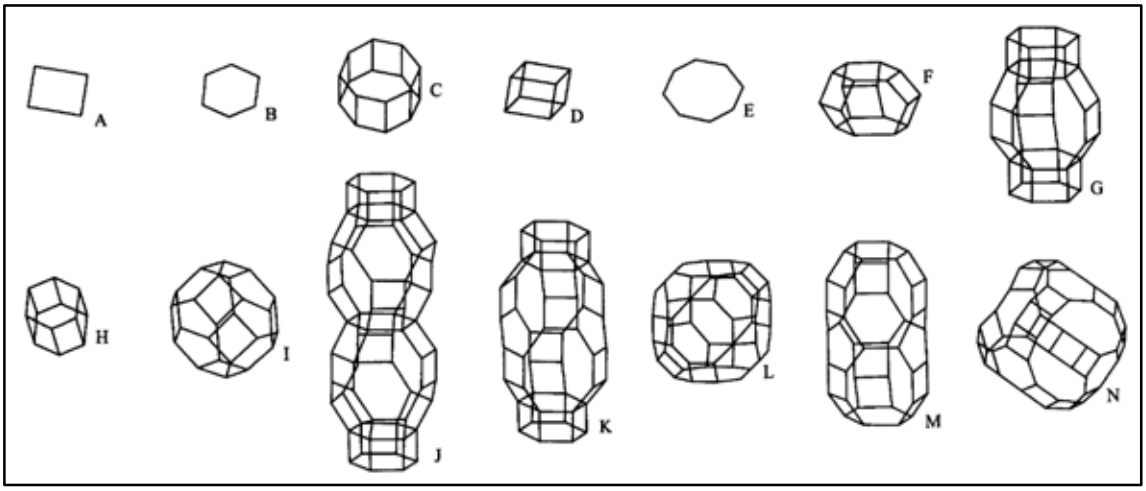


Figura 10 Unidades poliédricas de construção. A = 4-anéis, B = 6-anéis, C = gaiola δ, D = gaiola 4-4, E = 8-anéis, F = gaiola ε, G = gaiola γ, H = gaiola 6-6, I = gaiola sodalítica, J = gaiola levina, K = gaiola chabazita, L = gaiola α, M = gaiola erionita, N = supergaiola faujasita(Ghobarkar e Schäf, 1999).

Por exemplo, a gaiola sodalítica (Figura 10- I) consiste de um octaedro truncado formado por anéis de 4 e 6 tetraedros e que facilmente descreve a estrutura das zeólitas A e Faujasita, zeólita esta isoestrutural das zeólitas sintéticas X e Y, conforme mostrado na Figura 11. Embora a gaiola sodalítica possa ser usada para descrever tanto a zeólita A quanto a Y, podemos observar na Figura 11 que o tamanho do diâmetro da cavidade de entrada é diferente para cada uma delas. A estrutura da zeólita Y possui um sistema de poros tridimensionais formado por 12 átomos T com diâmetro de entrada de 7,4 Å, e apresenta dois sistemas de canais interconectados entre si, ilustrado na Figura 11, sendo um sistema formado pela união de supergaiolas α e outro sistema formado pela conexão alternada de sodalita e supergaiolas α. No caso da zeólita A o sistema de poros tridimensionais é formado pela conexão alternada de gaiolas sodalíticas e gaiolas 4-4,

resultando numa abertura de 8 átomos T com diâmetro de 4,2Å (Weitkamp, 2000; Smart e Moore, 2012).

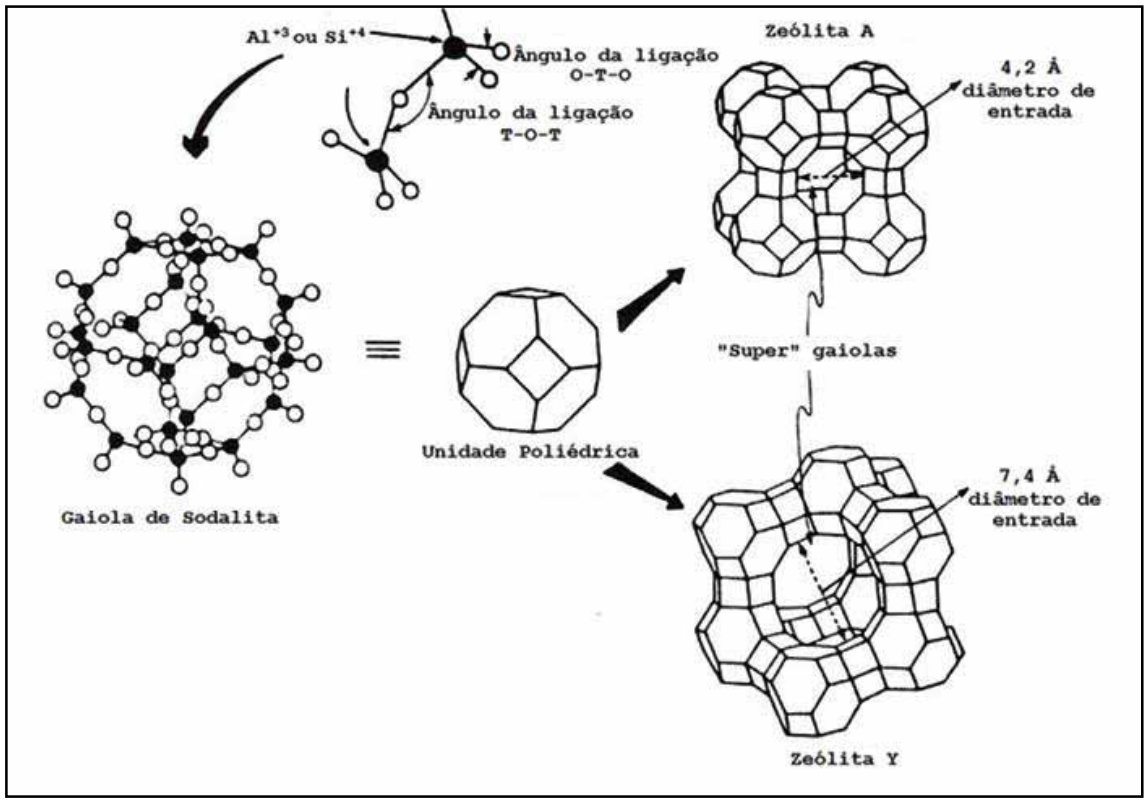


Figura 11 Formação estrutural das zeólitas A e Y. Fonte: Smart e Moore (2012).

1.3.2 Síntese das Zeólitas

A síntese típica de zeólitas pode ser descrita pelo processo hidrotérmico, os reagentes utilizados são uma fonte de silício, uma fonte de alumínio, um agente mineralizante como OH^-, e, para zeólitas com alta razão Si/Al, moléculas orgânicas atuando como agente direcionador de estrutura ("*template*" orgânico ou SDA). Os cátions metálicos inorgânicos, como Na^+ ou K^+ têm um papel importante para a neutralização da carga da estrutura.

As fontes de sílica são numerosas e incluem sílica coloidal, sílica amorfa, sílica precipitada e fontes orgânicas de silício. As fontes de alumínio são Aluminato de Sódio, Boemita, Hidróxido de Alumínio, Nitrato de Alumínio e Alumina.

Normalmente, o agente mineralizador é um metal alcalino na forma de hidróxido, como por exemplo, o hidróxido de sódio ou o íon fluoreto (F^-). O template orgânico é uma espécie orgânica solúvel em água, como por exemplo, os sais quaternários de amônia (Figura 12).

Figura 12 Esquema da formação da zeólita sintética. Fonte: Cundy e Cox (2005).

Os processos físico-químicos que ocorrem durante as sínteses de zeólitas são bastante sensíveis ao tipo dos reagentes e à ordem de adição dos mesmos. Outros fatores críticos são a velocidade de agitação do sistema (homogeneização da mistura reacional), o "*envelhecimento*" do gel, a temperatura e o tempo de cristalização. Existem muitas reações químicas que ocorrem durante o processo de cristalização das zeólitas, na síntese as interações entre as espécies orgânicas e inorgânicas são muito complexas (Cundy e Cox, 2005). Sendo assim, fazendo variar a composição da solução (ou gel de síntese) e as condições operacionais, é possível sintetizar materiais com características estruturais e composições químicas diferentes.

As sínteses de novas estruturas zeolíticas, com propriedades características diferentes podem ser obtidas ajustando-se variáveis que participam do processo de síntese, como temperatura, pressão, pH, fontes de alumínio, silício e contra-íons catiônicos. Para formar diferentes espécies zeolíticas, usam-se direcionadores orgânicos e também cátions na interação com a rede negativa formada nas ligações tetraédricas entre silício e alumínio (Cundy e Cox, 2005). O tipo de cátion presente pode dirigir a estrutura a ser formada agindo como um molde ("*template*"). Assim, cátions orgânicos maiores podem levar a um aumento do volume dos canais (Braga e Morgon, 2007).

1.3.3 Usos de Zeólitas

Conforme mencionado anteriormente, a estrutura das zeólitas apresenta características especiais, tais como, sistemas de poros e cavidades de tamanho de ordem molecular. Além disso, sua estrutura pode apresentar um excesso de cargas negativas. Essas propriedades, juntamente com a sua capacidade de troca iônica e seletividade catalítica fazem das zeólitas materiais bastante utilizados em diversos setores industriais, principalmente na indústria química, petroquímica, indústria de química fina, tratamento de água potável, efluentes industriais e domésticos, e na agricultura moderna. A importância desses sólidos microporosos na sociedade atual, recentemente tem motivado a comunidade científica a realizar grandes esforços para sintetizar os mesmos materiais na escala nanométrica, ou seja, 10 a 1000 nm (Kecht *et al.*, 2004).

1.3.4 Nanozeólitas

As nanozeólitas têm um tamanho menor que 1000 nm e as suspensões coloidais de zeólitas com tamanho de partículas inferiores a 200 nm têm recebido uma atenção especial (Tosheva e Valtchev, 2005). A diminuição dos materiais zeolíticos da escala micrométrica para a escala nanométrica acarreta mudanças nas propriedades físico-químicas desses materiais. A proporção entre o número de átomos (externos/internos) aumenta rapidamente com a redução do tamanho das partículas, assim nanozeólitas possuem uma ampla área de superfície externa e alta atividade catalítica superficial. A acidez da superfície externa tem grande importância quando a zeólita é destinada a ser utilizada como catalisador em reações envolvendo moléculas grandes. Além disso, os nanocristais de zeólitas têm reduzida limitação de difusão em comparação com os cristais de zeólitas de tamanho micrométrico (Zhan *et al.*, 2002; Song *et al.*, 2004; Tosheva e Valtchev, 2005).

A síntese dos nanocristais de zeólita na forma de suspensões coloidais estáveis foi um dos desenvolvimentos mais importantes na ciência das zeólitas durante a década de 1990. Vários materiais microporosos das famílias *MFI*-, *LTA*-, *FAU*-, *BEA*- foram preparados na forma de suspensões coloidais com distribuição de tamanho na escala nanométrica, vide Tabela 1. Estudos indicam que a síntese desses materiais é direcionada pela composição química global da mistura dos reagentes e as variáveis termodinâmicas (Valtchev, Faust e Lézervant, 2004).

Tabela 1 Peneiras moleculares sintetizadas na escala nanométrica, condições de síntese e tamanho de cristal.

Composição molar da solução de síntese (S) ou gel (G)	**T/t (*) (nm/ºC)**	**Referência**
MFI 1 Al_2O_3:60 SiO_2: 21,4 TPAOH: 650 H_2O (S)	10-100/ 170	(Van Grieken *et al.*, 2000)
LTA 0,22 Na_2O:5,0 SiO_2: Al_2O_3: 8,0 $(TMA)_2O$: 400 H_2O (S)	130/63	(Hedlund, Schoeman e Sterte, 1997)
FAU 5,5 Na_2O: 1,0 Al_2O_3: 4,0 SiO_2: 190 H_2O (G)	20-100/60	(Zhan *et al.*, 2002)
BEA Al_2O_3:16-400 SiO_2: 5,16-105 $(TEA)_2O$: 240-6400 H_2O (G)	10-200/ 140	(Camblor *et al.*, 1997)

(*) T= tamanho do cristal (nm) e t= temperatura de síntese (ºC).

Nanozeólitas oferecem amplas vantagens em aplicações catalíticas e adsortivas. Entre suas utilizações, podemos citar seu uso em sensores, filmes, diagnósticos médicos e separação de materiais. Além disso, elas também podem ser utilizadas na construção de materiais estruturados e na síntese de sólidos porosos (Hincapie *et al.*, 2004; Tosheva e Valtchev, 2005). Considerando, principalmente, as modificações físico-químicas na superfície externa desses materiais na escala nanométrica outras aplicações podem ser exploradas, tais como o uso das nanozeólitas para a imobilização de enzimas (Ji *et al.*, 2008).

1.3.5 Imobilização de enzimas em materiais zeolíticos

O uso de zeólitas como suporte de imobilização enzimática é considerado a maneira mais apropriada de combinar as vantagens de ambos os catalisadores heterogêneos e enzimáticos. Este processo de imobilização de enzimas em suportes zeolíticos já vem sendo explorado, com sucesso, há cerca de duas décadas, principalmente para as zeólitas mais tradicionais (Lie e Molin, 1991; Gonçalves *et al.*, 1996; 1997; Serralha *et al.*, 1998).

As zeólitas em si apresentam propriedades bastante interessantes que permitem que essa imobilização possa ser feita. Dentre elas pode-se citar a sua facilidade de modulação, o comportamento hidrofílico/hidrofóbico, o caráter ácido/base, a resistência mecânica e química, a morfologia e o tamanho do cristal, a área da superfície externa e total e o diâmetro do poro. A fácil dispersão/recuperação das zeólitas em água representa uma vantagem adicional (Macario *et al.*, 2007). Um dos mais importantes parâmetros na

composição da estrutura da zeólita é a proporção Si:Al. De fato, a quantidade de alumínio da estrutura cristalina determinará o balanço de carga total da zeólita, além disso a quantidade e os diferentes tipos de cátions de compensação necessários para estabilizar a estrutura zeolítica influenciam drasticamente as características hidrofóbica/ hidrofílica e ácido/base da zeólita (Serralha *et al.*, 1998).

Na década de 1990, as nanozeólitas receberam considerável atenção devido ao seu elevado potencial em solucionar problemas de difusão na catálise de moléculas grandes e na preparação de materiais zeolíticos estruturados com uma porosidade hierárquica. Recentemente, as nanozeólitas têm sido usadas para algumas aplicações não convencionais devido às propriedades físico-químicas atrativas de sua superfície, por exemplo, para imobilização de enzimas (Kang *et al.*, 2006).

De maneira análoga às zeólitas na escala micrométrica, as nanozeólitas são capazes de imobilizar enzimas. Estudos sistemáticos da aplicação de nanozeólitas para imobilização enzimática são bastante recentes, datando da década de 2000. Os principais estudos reportados na literatura falam a respeito da imobilização de biomoléculas em nanozeólitas das famílias LTL (Citocromo C, Mioglobina e Transferrina) (Yu et al., 2006; Hu et al., 2009), Beta (Tripsina, Ferritina, Ovalbumina, Lisozima, Peptídeos e Tirosinase) (Zhang et al., 2005; Kang et al., 2006; Zhou et al., 2007; Ji et al., 2008), Silicalita-1 e ZSM-5 (Ferritina, Ovalbumina, Lisozima) (Kang et al., 2006; Hu et al., 2009).

Embora essas nanozeólitas sejam de estruturas cristalográficas diferentes, os dados desses estudos revelam um padrão de comportamento bastante semelhante à imobilização de proteínas ou enzimas, uma vez que a quantidade de biomoléculas imobilizadas aumenta com a diminuição do tamanho dos nanocristais de zeólitas. Além disso, a densidade de carga superficial e a topografia do nanomaterial (plano cristalográfico de crescimento e curvatura da superfície) são fatores importantes para a imobilização de biomoléculas na superfície das nanozeólitas. A alta eficiência catalítica dos biocatalisadores (complexo nanozeólita/enzima) foi atribuída à grande área superficial e à uniformidade da estrutura cristalina.

Outra observação importante é que por meio da análise da literatura disponível e citada no decorrer do texto, até o presente momento, não se encontram na literatura registros do uso de nanozeólitas como suporte sólido para imobilização de lipases, e principalmente o uso de tal complexo na reação de transesterificação para produção de biodiesel. Assim, o foco deste trabalho foi responder a várias questões, no que diz respeito ao mecanismo de imobilização de enzimas em substratos nanozeolíticos, que ainda não

tinham sido exploradas, e estudos experimentais nessa área são importantes para entender e dominar esta importante interação do complexo nanozeólita-enzima. Esses complexos (nanozeólitas/enzimas) apresentam boas perspectivas para o futuro da produção de biodiesel proveniente de matérias primas alternativas que não entram em conflito com a indústria de alimentos e o uso de etanol como solvente principal da reação.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais do projeto

O presente trabalho tem como principais objetivos: sintetizar e caracterizar nanozeólitas de estruturas diferentes; estudar parâmetros físico-químicos dos materiais zeolíticos, tais como morfologia, crescimento preferencial dos planos cristalinos, defeitos de superfícies e textura desses nanomateriais; estudar o uso dessas matrizes para a imobilização de lipases provenientes de diferentes microrganismos e avaliar a atividade catalítica da zeólita pura, da enzima livre e do complexo nanozeólita/enzima na catálise da reação de transesterificação do óleo de palma e do óleo de microalgas a biodiesel via rota etílica.

2.2 Objetivos específicos

- Caracterização das enzimas livres e realização de testes enzimáticos relevantes;
- Sínteses e caracterizações das nanozeólitas GIS, LTA, FAU, BETA e TS-1;
- Estudo de troca iônica com cátions de diferentes densidades eletrônicas com o objetivo de obter suportes eficientes para imobilização enzimática;
- Caracterização das nanozeólitas obtidas por técnicas físicas do estado sólido tais como Cristalografia de Raios-X de materiais policristalinos (DRX), Ressonância Magnética Nuclear do Estado Sólido-Ângulo Mágico (RMN-MAS), Microscopia Eletrônica de Varredura e Transmissão (MEV, TEM-HR), Microscopia de Força Atômica (AFM), Espectroscopia de Infravermelho, Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-OES), Espectroscopia de Fotoelétrons Induzida por Raios-X (XPS), Adsorção de nitrogênio, Análises termogravimétricas (TGA) e Potencial zeta.
- Avaliação da influência de cátions com diferente raio iônico na eficiência catalítica dos complexos nanozeólita-enzima, que foram obtidos através de troca iônica da nanozeólita com cátions de diferentes densidades eletrônicas, tais como Cu^{2+}, Zn^{2+}, Co^{2+}, Mn^{2+} e Ni^{2+};
- Avaliação dos diferentes tipos de imobilização da enzima: por adsorção ou por ligação covalente na matriz de imobilização (nanozeólitas funcionalizadas), que foram obtidas por meio da adição de grupos orgânicos (aminossilano e glutaraldeído) na sua superfície

- Estudo da imobilização de lipases de *R. miehei*, *T. lanuginosus*, *C. antarctica* e *B. cepacia* sobre os novos suportes nanozeolíticos;
- Caracterização da quantidade de proteína adsorvida no suporte zeolítico.
- Avaliação da atividade enzimática da enzima livre na hidrólise do éster palmitato de *p*-nitrofenila (*p*-NPP);
- Avaliação da atividade enzimática dos complexos (nanozeólita/enzima) na hidrólise do óleo de soja pela análise titulométrica;
- Testes catalíticos dos materiais imobilizados (nanozeólita-enzima), para a reação de transesterificação do óleo de palma e óleo de microalgas para produção de biodiesel usando etanol e avaliação e comparação dos resultados obtidos quando ambos os catalisadores são usados separadamente;
- Análise da qualidade do biodiesel obtido através de cromatografia gasosa de acordo com a norma europeia EN 14103;
- Análise de bioinformática estrutural da enzima para explicar o fenômeno interação das enzimas com as nanozeólitas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Métodos de caracterização das enzimas livres e dos testes enzimáticos relevantes

3.1.1 Ensaio enzimático para medida de atividade enzimática das enzimas livres

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

De acordo com esse método uma solução de *palmitato de p-nitrofenila* (p-NPP) (3mg/mL) foi preparada em álcool isopropílico (solução A), enquanto outra solução (solução B) foi preparada a partir de goma arábica (0,5%, m/v) e Triton X-100 (2%, m/v), ambas diluídas em tampão fosfato de sódio (pH 7, 0,05 M). Em seguida, 1mL de solução A foi adicionado a 9 mL de solução B. Esta mistura foi denominada de substrato.

A atividade da enzima livre foi medida de acordo com o seguinte procedimento: em 900 μL da solução final de substrato foram adicionados 100 μL de enzima livre diluída em tampão fosfato, em seguida, a mistura foi incubada por 1 minuto a 37ºC. A quantidade de *p*-nitrofenol liberada foi determinada espectrofotometricamente (410nm) e as medidas foram realizadas em triplicata. A atividade lipolítica da enzima livre, U, foi calculada de acordo com a Equação 1.

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

Equação 1 Determinação da atividade para a enzima livre por espectrofotometria.

Na qual **U**, unidade de atividade enzimática é expressa como U/mL, onde 1 unidade de atividade é definida como a formação de 1μmol de *p*-nitrofenol liberado de *p*-NPP por minuto dentro das condições do ensaio; **Abs**, absorvância da amostra em 410nm; **Vt**, volume total da reação (mL); **Xe**, volume da solução enzimática (mL) ou massa da enzima imobilizada; **ε**, coeficiente de extinção molar ($9{,}78.10^3$ $L.mol^{-1}.cm^{-1}$), pH 7,0; **T**, tempo de incubação; $\mathbf{10^3}$, fator correção do coeficiente (ε); **D**, diluição da amostra se necessário.

3.1.2 Eletroforese e zimogramas de atividade

Os ensaios de eletroforese e zimogramas de atividade foram realizados no Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada - IBILCE/UNESP.

3.1.2.1 Eletroforese desnaturante

O grau de pureza e a massa molecular aproximada da enzima em questão foram verificados por eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE), em cuba vertical Mini Proteaz II (Bio-Rad). Foi usado gel de poliacrilamida 12% e tampão de corrida Tris-glicina pH 8,3 com dodecil sulfato de sódio (SDS). Proteínas conhecidas de baixa massa molecular foram utilizadas como padrão. A coloração do gel foi feita utilizando-se nitrato de prata (Schagger, 2006).

3.1.2.2 Zimograma na atividade de hidrólise

A zimografia é uma técnica que permite detectar a atividade de uma determinada enzima diretamente no gel de separação eletroforética (Kwon *et al.*, 2011). O zimograma de atividade de hidrólise da lipase de *R. miehei* foi verificado por eletroforese em gel de poliacrilamida em condições não desnaturantes (Hama *et al.*, 2006). Foi usado um gel de poliacrilamida 13% (m/v) e um gel de empilhamento a 5% (v/v), e tampão de corrida Tris-glicina pH 8,8 (sem SDS). As amostras foram misturadas numa razão 1:1(v/v) com um tampão de amostra composto por tampão Tris/HCl a 0,1 M, pH 8,0, glicerol a 20% (v/v), azul de bromofenol e água ultrapura. Uma alíquota de 20µL dessa mistura foi aplicada no gel. Após a corrida, o gel foi lavado com tampão Tris/HCl 0,1 M, pH 8,0 contendo 2,5% (v/v) de triton X-100, por 30 minutos.

Para a detecção de lipases hidrolíticas o gel foi previamente equilibrado em tampão fosfato de sódio 0,1 M em pH 7 por 30 minutos, e posteriormente incubado na solução contendo α- e β acetato de naftila e corante *fast blue*, até o surgimento da banda referente a presença da enzima. Nesta reação, o substrato, acetato de α-naftila, sofre hidrólise catalisada pela enzima formando como produto o α-naftol, que reage com o agente colorimétrico (*fast blue*) para formar um complexo de coloração roxa.

3.1.2.3 Zimograma baseado na atividade de esterificação

A metodologia foi adaptada dos procedimentos experimentais reportados por Kwon *et al.* (2011) fazendo as modificações necessárias para as nossas condições experimentais. Em um gel de poliacrilamida SDS-PAGE a 13% (m/v) e gel de empilhamento a 5% (v/v) foram aplicadas as amostras das lipases de *R. miehei*, *T. lanuginosus, C. antarctica* e *B. cepacia* nas mesmas condições citadas no *item 3.1.2.2*. Após a corrida eletroforética em sistema não desnaturante (conforme descrito no *item 3.1.2.2*), o gel foi lavado com duas soluções tampão Tris/HCl a 25 mmol/L pH 8,0, uma

contendo 2,5% (v/v) e outra contendo 1% (v/v) de triton X-100. O gel também foi lavado com 2-propanol a 20% por 20 minutos e equilibrado no tampão Tris/HCl a 25 mmol/L por 10 minutos para identificar as lipases com atividade de esterificação, o gel foi incubado a 30°C em uma solução contendo ácido oleico (1,5% v/v) e dodecanol (1,5% v/v) emulsificados em tampão Tris/HCl a 25 mmol/L pH 8,0. A presença da enzima foi verificada pelo aparecimento de manchas escuras no gel decorrente da atividade da lipase.

3.2 Preparação dos suportes zeolíticos

Esta seção descreve a preparação dos suportes de imobilização de enzimas utilizados nesta tese. Neste caso, dividiu-se em três grupos de suportes: nanozeólitas puras (Nano-GIS, Nano-X, Nano-LTA, Nano-BEA e Nano-TS1); nanozeólitas ativadas por troca iônica com metais de transição (Me) (Nano-X/Me e Nano-LTA/Me); e nanozeólitas funcionalizadas com aminossilano (Nano-GIS/NH, Nano-X, Nano-LTA/NH, Nano-BEA/NH e Nano-TS1/NH, Nano-X/Ni/NH) e com glutaraldeído (Nano-GIS/GA, Nano-X/GA, Nano-LTA/GA, Nano-BEA/GA e Nano-TS1/GA, Nano-X/Ni/GA).

3.2.1 *Sínteses das nanozeólitas puras*

3.2.1.1 Nanozeólita Gismondina (Nano-GIS)

A nanozeólita GIS foi sintetizada em quantidade suficiente para que a composição molar da reação fosse a seguinte: 1 Al_2O_3: 4,17 SiO_2: 2,39 TMA_2O: 253 H_2O. Uma solução de isopropóxido de alumínio ($Al[OCH(CH_3)_2]_3$, 98%, Sigma-Aldrich), hidróxido de tetra metil amônio pentahidratado ($((CH_3)_4N(OH)\cdot 5H_2O$, 97%, Sigma-Aldrich), água destilada, e tetra etil ortosilicato ($Si(OC_2H_5)_4$, 98%, Sigma-Aldrich) foram misturados em um reator de polipropileno sob agitação vigorosa, resultando em uma solução clara após 30min. A solução clara foi tratada por 1h a 0ºC em um banho de ultra-som e agitada por 20h em agitador magnético à temperatura ambiente e um tratamento hidrotérmico adicional de 120°C por aproximadamente 30min foi realizado para garantir a dissolução de todas as partículas maiores restantes, seguido por 15min de resfriamento a 0°C em um banho de gelo. A mistura final foi colocada em um reator estático (*Parr Instrument Company*) e levada à estufa (*Lindberg/Blue* M MO1440) sob a própria pressão gerada pelo sistema por período de 13 dias em temperatura (100 °C). Em seguida, o sobrenadante nanozeolítico foi resfriado e centrifugado em alta velocidade (17.000 rpm). O processo de purificação e lavagem incluiu a remoção da água mãe e a redispersão em água destilada

(3X) utilizando um banho ultrassônico. Esta amostra foi denominada Nano-GIS (Kecht *et al.*, 2004).

Essa nanozeólita (Nano-GIS) mostrou ser sensível à calcinação em elevadas temperaturas, assim o cátion orgânico derivado de tetrametilamônio usado como direcionador de estrutura foi removido utilizando tratamento de troca iônica, adaptado de procedimentos experimentais descritos na literatura (Holmberg, Wang e Yan, 2004). A troca iônica foi realizada por meio da adição de 1g da nanozeólita NaX em 30 mL de uma solução de 1M de nitrato de sódio ($NaNO_3$). A solução foi colocada em um frasco de polipropileno e mantida em agitação magnética em temperatura de 90 ºC por 12 horas. Após a troca iônica, as amostras foram lavadas três vezes, incluindo etapas de centrifugação e redisperção em água. Esta amostra foi denominada Nano-GIS/Na.

3.2.1.2 Nanozeólitas FAU (Nano-X)

A nanozeólita faujasita (Nano-X) com alto teor de alumínio foi sintetizada da seguinte maneira: 5,34g de hidróxido de sódio (*pellets*, 98,5 %, Fluka), 2,42g de aluminato de sódio (Al_2O_3: 50-56% e Na_2O: 40-45%, Sigma-Aldrich) foram preparados em forma de solução usando água destilada (50,0g). À solução de aluminato de sódio, foi acrescentada 3,43g de silica *fumed* (SiO_2, 99,8%, Sigma-Aldrich) para que a composição molar da reação fosse: 5,5 Na_2O: 1,0 Al_2O_3: 4,0 SiO_2: 190 H_2O. O gel foi colocado em agitação magnética (250 rpm) e a cristalização ocorreu por 2 dias a 60ºC. O produto obtido, denominado Nano-X/Na, foi recuperado por centrifugação (12.000 rpm), lavado com água deionizada e seco à temperatura ambiente por 24h, em seguida, foi feita sua análise por difração de raios X (Zhan *et al.*, 2001; Zhan *et al.*, 2002).

3.2.1.3 Nanozeólita LTA

Os cristais da nanozeólita LTA foram sintetizados de acordo com a seguinte composição molar: 0,4 Na_2O:1,9 Al_2O_3:14,0 $(TMA)_2O$:11,9 SiO_2:700 H_2O. Em uma síntese típica, 2,29g de isopropóxido alumínio ($Al[OCH(CH_3)_2]_3$, 98%, Sigma-Aldrich), 15,04g de hidróxido de tetra metilamônio pentahidratado ($((CH_3)_4N(OH)\cdot 5H_2O$, 97%, Sigma-Aldrich) foram primeiro dissolvidos em solução de hidróxido de sódio (NaOH, 98,5 %, Fluka) (0,1g de NaOH em 27,2g de H_2O). Após agitar a mistura à temperatura ambiente durante 24h para obter uma solução clara, 7,04g de uma solução aquosa de sílica (Ludox HS-30, 30% SiO_2 em massa, Sigma-Aldrich) foi adicionada gota a gota sob agitação vigorosa. O gel foi mantido durante 72h à temperatura ambiente e, finalmente,

hidrotermicamente tratado a 60°C durante 24h. Posteriormente, o sobrenadante nanozeolítico foi resfriado e centrifugado em alta velocidade (17.000 rpm). O processo de purificação e lavagem incluiu a remoção da água mãe e a redispersão em água destilada (3X) utilizando um banho ultrassônico. O produto obtido foi denominado Nano-LTA (Biemmi e Bein, 2008).

3.2.1.4 Nanozeólita Beta

A nanozeólita beta foi sintetizada de acordo com a seguinte composição molar: 1SiO_2: 0,01 Al_2O_3: 0,50 TEAOH: 16 H_2O. Em uma síntese típica de nanozeólita 15 g de H_2O foi adicionada a 21,0 g de TEAOH ($(C_2H_5)_4N(OH)$ ~ 40% em H_2O). Em seguida, 0,51 g de isopropóxido alumínio ($Al[OCH(CH_3)_2]_3$, 98%, Sigma-Aldrich) foi dissolvido na solução e a mistura foi mantida em agitação em temperatura ambiente durante 1h e, após esse período, foi adicionado 6,05 g de tetraetilortosilicato (TEOS) ($Si(OC_2H_5)_4$, ≥99,0%, Sigma-Aldrich).

O gel foi misturado e mantido durante 24h à temperatura ambiente para evaporar o etanol proveniente da reação de hidrólise do TEOS e, finalmente, hidrotermicamente tratado a 140°C durante 5 dias. Os cristais nanométricos resultantes do tratamento hidrotérmico de soluções coloidais foram purificados por separação da água mãe em três etapas de centrifugação. Após cada etapa, as nanopartículas foram redispersas em água destilada num banho ultrassônico por 2h. O produto obtido foi denominado Nano-BEA (Larlus *et al.*, 2011).

3.2.1.5 Nanozeólita TS-1

As sínteses das nanozeólitas TS-1 foram adaptadas dos procedimentos experimentais descritos na literatura (Cundy, Forrest e Plaisted, 2003; Cundy e Forrest, 2004) da seguinte maneira: 13,2 g de Tetraetilortosilicato (≥99,0 %, Sigma-Aldrich) e 1,26 g de Tetrabutil ortotitanato ($Ti[O(CH_2)_3CH_3]_4$, 99%, ACROS Organics) foram transferidos para um frasco de polipropileno e agitados à temperatura ambiente (≈10min) até a formação de uma mistura homogênea. Em um recipiente separado, uma solução (22,1g, 1M em H_2O) de hidróxido de tetrapropilamônio $(CH_3CH_2CH_2)4N(OH)$ foi misturada completamente com cerca da metade da quantidade de água adicional necessária (3,5 g no total) para garantir que uma quantidade de água suficiente estivesse presente na hidrólise eficientes dos ésteres para formar uma mistura de silicato e titanato.

A solução de base orgânica diluída foi, então, cuidadosamente adicionada à mistura de ésteres (sob agitação vigorosa) à taxa de cerca de 1mL/minuto. A mistura rapidamente apresentou uma aparência turva que desapareceu durante a adição da solução de base para a formação de uma solução clara de duas fases. Depois que toda solução de base foi adicionada, a mistura resultante foi agitada por cerca de 1h até tornar-se homogênea. A água restante foi acrescentada neste ponto para atingir a composição final molar: 0,36TPAOH: 0,06TiO_2: 1,00SiO_2: 16,2H_2O: 4EtOH: 0,24 BuOH. A mistura foi mantida em agitação (*overnight*) para garantir a realização da hidrólise. O gel precursor resultante foi mantido em condições estáticas a 22ºC. Em seguida, o gel final foi colocado em reator e a cristalização por 24h em estufa convencional a 100ºC. O produto obtido foi denominado Nano-TS1.

3.2.2 Sínteses das nanozeólitas modificadas com cátions de metais de transição através do processo de troca iônica

Antes da imobilização de enzimas as nanozeólitas Nano-X/Na e Nano-LTA foram submetidas à troca iônica, a fim de substituir os cátions de sódio por cátion de metais de transição.

3.2.2.1 Troca iônica Nano-X/Na

Neste trabalho, foram avaliados três parâmetros de troca iônica da amostra da nanozeólita (Nano-X/Na). O primeiro deles se refere ao estudo do efeito do cátion, o segundo o efeito da concentração molar, enquanto que o outro parâmetro do estudo foi a influência do tempo de troca iônica sobre as propriedades da nanozeólita (Nano-X/Na).

As amostras obtidas foram nomeadas como Nano-X/-*Me*/-*c*-/-*t* em que a letra -*Me* indica o cátion metálico (Mn^{2+}, Co^{2+}, Cu^{2+}, Zn^{2+} ou Ni^{2+}), a letra -*c* indica a concentração molar empregado e a letra –*t* indica o tempo na etapa de troca iônica. No caso do íon de níquel foi investigada a variação de dois parâmetros: tempo e concentração iônica da solução de $NiSO_4$. Todas as trocas de iônicas foram realizadas utilizando 1g da nanozeólita NaX em 30 mL das respectivas soluções de sais ($MnSO_4$, $CuSO_4$, $CoSO_4$, $ZnSO_4$ ou $NiSO_4$). Os produtos sólidos obtidos ao final da troca iônica foram centrifugados, lavados com água destilada por três vezes e secos à temperatura ambiente.

A nomenclatura e as condições de preparação das amostras variando os três parâmetros de troca iônica desse trabalho foram as seguintes:

i. Troca iônica em baixa concentração molar: As reações de troca iônica foram mantidas a 60°C durante 16 horas na concentração de 0,1M do sal correspondente.

Os derivados da troca iônica foram denominados Nano-X/Mn/0.1M, Nano-X/Cu/0.1M, Nano-X/Co/0.1M, Nano-X/Zn/0.1M e Nano-X/Ni/0.1M.

ii. Troca iônica em função do tempo: As reações de troca iônica foram realizadas a 60° C com uso de $NiSO_4$(0.1M) e tempo (4h, 16h, 24h e 36h). Os derivados da troca iônica foram denominados Nano-X/Ni/4h, Nano-X/Ni/16h, Nano-X/Ni/24h e Nano-X/Ni/36h.

iii. Troca iônica em função da concentração molar: As reações de troca iônica foram realizadas a 60° C durantes 36h com uso de $NiSO_4$(0,1M; 0,3M; 0,5M). As amostras obtidas foram denominadas Nano-X/Ni/0.1M, Nano-X/Ni/0.3M e Nano-X/Ni/0.5M.

iv. Troca iônica em alta concentração molar: As reações de troca iônica foram mantidas a 60° C durante 36 horas na concentração de 0,5M do sal correspondente. Os derivados da troca iônica foram denominados Nano-X/Mn/0.5M, Nano-X/Cu/0.5M, Nano-X/Co/0.5M, Nano-X/Zn/0.5M e Nano-X/Ni/0.5M.

3.2.2.2 Troca iônica Nano-LTA/Na

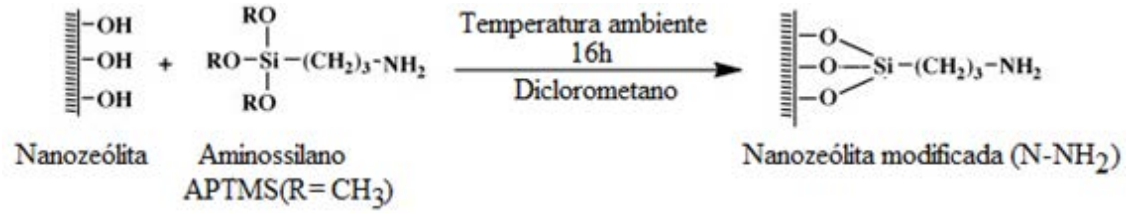
A nanozeólita Nano-LTA/Na também foi convertida para a forma Mn^{2+}, Co^{2+}, Cu^{2+}, Zn^{2+} e Ni^{2+} por troca iônica com a solução de sal apropriada. Os procedimentos de troca iônica foram feitos de forma semelhante ao descrito *no item anterior 3.2.2.1*. Após as reações, as amostras foram centrifugadas, os respectivos produtos sólidos foram lavados por três vezes com água destilada e secos à temperatura ambiente. As amostras obtidas foram denominadas de acordo com as condições de troca iônica: baixa concentração molar (Nano-LTA/Mn/0.1M, Nano-LTA/Cu/0.1M, Nano-LTA/Co/0.1M, Nano-LTA/Zn/0.1M e Nano-LTA/Ni/0.1M) e em função da concentração molar de $NiSO_4$ (Nano-LTA/Ni/0.1M, Nano-LTA/Ni/0.3M e Nano-LTA/Ni/0.5M).

3.2.3 *Modificação química da superfície e ativação das nanozeólitas*

3.2.3.1 Preparação das nanozeólitas com aminossilano (Nanozeólita/NH)

Para a modificação da superfície das nanozeólitas (Nano-TS1, Nano-GIS, Nano-LTA, Nano-BEA, Nano-NaX e Nano-NaX/Ni) o agente silano de acoplamento, o 3-aminopropiltrimetoxisilano [$H_2N(CH_2)_3Si(OCH_3)_3$] (APTMS) foi utilizado de acordo com a metodologia proposta por Plueddemann (1982) para ativar as superfícies das nanozeólitas para posterior funcionalização. Neste trabalho, APTMS que possui uma

extremidade amino foi selecionado como o agente de acoplamento para funcionalizar a nanozeólita, o grupo silano foi acoplado pelo método de refluxo da suspensão contendo a nanozeólita, APTMS e diclorometano. O fluxograma geral apresenta modificação química da superfície das nanozeólitas utilizadas neste estudo, Esquema 1. Inicialmente, 1 g da nanozeólita calcinada foi colocada em 30 mL de diclorometano (30 mL) e adicionado 2 mL do agente aminossilano (APTMS), permanecendo por 16h em agitação magnética. As nanozeólitas modificadas foram recuperadas por centrifugação (17.000 rpm), lavadas com álcool etílico absoluto três vezes para remover APTMS que não reagiu e em seguida, os produtos sólidos foram secos em estufa 60ºC/12 horas. As amostras resultantes deste procedimento foram identificadas com código Nano-TS1-NH, Nano-GIS-NH, Nano-LTA-NH, Nano-BEA-NH, Nano-NaX-NH e Nano-NaX/Ni-NH.

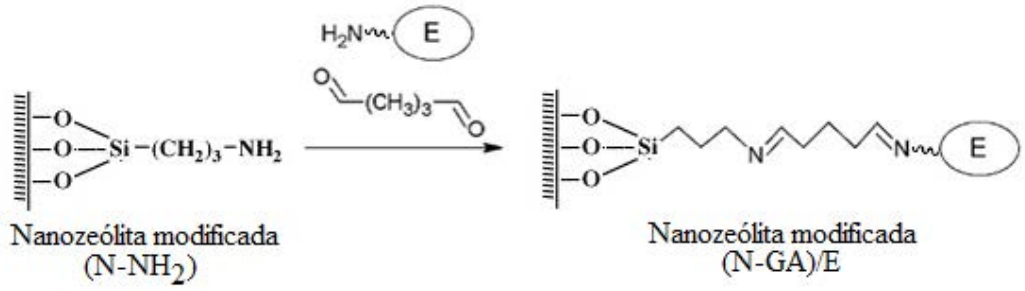


Esquema 1 Modificação química da superfície nanozeólita TS-1, adaptado de ref. Li *et al*. (2006).

3.2.3.2 Preparação dos suportes glutaraldeído/nanozeólita (Nanozeólita/GA)

Os APTMS ancorados nas nanozeólitas ainda não estavam completamente prontos para a fixação de proteínas, no entanto, um agente de ligação cruzada foi necessário entre a molécula de enzima e o amino grupo do APTMS. Assim, o radical amino das amostras com a superfície previamente modificadas, Nano-TS1-NH, Nano-GIS-NH, Nano-LTA-NH, Nano-BEA-NH, Nano-NaX-NH e Nano-NaX/Ni-NH foi colocado para reagir com glutaraldeído, que também pode reagir covalentemente com os grupos amino da lipase (Esquema 2). Neste procedimento, as amostras amino-funcionalizadas secas foram adicionadas em 20 mL de glutaraldeído (25 % (m/m) em água), e posteriormente colocadas em agitação por 24h à temperatura ambiente. As nanozeólitas-GA foram obtidas a partir do completo acoplamento das moléculas de Nanozeólita-NH e glutaraldeído, após esse procedimento os produtos sólidos foram lavados três vezes com água deionizada e recuperados por centrifugação (17.000 rpm), o produto foi seco e armazenado sob vácuo, a fim de evitar a oxidação. As amostras resultantes deste procedimento foram identificadas com os seguintes códigos: Nano-TS1/GA, Nano-GIS/GA, Nano-LTA/GA, Nano-BEA/GA, Nano-NaX/GA e Nano-

NaX/Ni/GA. As Nanozeólitas-GA funcionalizadas com glutaraldeído foram utilizadas para ligar covalentemente com a enzima, enquanto que as nanozeólita puras e a Nanozeólita-NH foram usadas de modo comparativo como suportes de imobilização por adsorção física.



Esquema 2 Imobilização covalente da enzima: Nanozeólita modificada com aminossilano reage com o glutaraldeído e o grupo N-terminal da enzima (Jung e Hartmann, 2008).

3.3 Sínteses e caracterização dos complexos nanozeólita-enzima

3.3.1 *Adsorção de Enzimas sobre as Nanozeólitas*

As lipases comerciais produzidas por *R. miehei*, *T. lanuginosus*, *C. antarctica* e *B. cepacia* foram imobilizadas sobre diferentes nanozeólitas sintetizadas e o procedimento de imobilização foi adaptado da referência (Hu *et al.*, 2009). A adsorção foi realizada à temperatura ambiente pela incubação das lipases (2mg/mL) e nanozeólita (200mg/mL) misturadas em solução tampão fosfato de sódio (20mM, 5mL) e agitada em 200rpm por 16h. O suporte com lipase imobilizada foi separado por centrifugação em 12.000rpm, lavado duas vezes com água deionizada e mantido a 25ºC "*overnight*" e armazenado em 4ºC antes da reação de transesterificação. As concentrações de enzimas imobilizadas foram determinadas através do método descrito por (Bradford, 1976) que utiliza Albumina de Soro Bovino (ASB) como um padrão. A quantidade de proteína adsorvida sobre a matriz Pg (mg/g) foi calculada de acordo com (Yagiz, Kazan e Akin, 2007) pela Equação 2.

$$P_g = \frac{C_0 V_0 - C_f V_f}{w}$$

Equação 2 Determinação da quantidade de proteína total.

Na qual, $\mathbf{C_0}$ é a concentração de proteína inicial (mg/ml), $\mathbf{C_f}$ a concentração final (mg/mL), $\mathbf{V_0}$ é o volume inicial da solução de lipase (mL), $\mathbf{V_f}$ é o volume final (ml) e **w** é a massa do suporte usado (g).

A quantidade de proteína imobilizada sobre o suporte foi determinada pela medida da concentração inicial e final de proteínas presentes nas soluções e convertida para porcentagem de enzima imobilizada. Posteriormente, o suporte com a lipase imobilizada foi seco a 25°C "*overnight*" e armazenado em 4ºC antes da reação de transesterificação.

3.3.2 Ensaios enzimáticos para medida de atividade enzimática pelo método titulométrico

As medidas de atividade enzimática dos complexos nanozeólitas/enzimas foram determinadas pelo método de titulação seguindo os procedimentos experimentais descritos nas especificações (ACS, 1993) e os protocolos de testes padrões da Sigma para ensaios enzimáticos de lipases (EC 3.1.1.3), com algumas modificações (Pinsirodom e Parkin, 2001; Gupta, Upadhyay e Shrivastava, 2011; Spera *et al.*, 2011).

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

A quantidade de ácidos graxos livres liberados presentes no sobrenadante foi determinada por titulação da amostra com NaOH 0,05 M, utilizando fenolftaleína como indicador. As medidas foram realizadas em duplicata e uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima requerida para produzir 1,0 micromol de ácido graxo liberado de um triacilglicerídeo em 1 hora dentro das condições do ensaio. No branco, foram utilizadas as respectivas amostras das nanozeólitas sem enzimas imobilizadas na mistura reacional. A atividade lipolítica da enzima imobilizada, U/mg sólido, foi calculada de acordo com a Equação 3.

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

Equação 3 Determinação da atividade enzimática para enzima imobilizada por titulação.

NaOH = Volume (em mililitros)

1000 = Fator de conversão de miliequivalentes para microequivalentes

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

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

3.4 Síntese de biodiesel

Para as reações transesterificação foram usados óleo de palma – 43% C16:0; 4,4% C18:0; 40,5% C18:1; 10,1% C18:2 e 0,2% C18:3 – (fornecido pela empresa Fertibom de Catanduva-SP) e óleo de microalgas – 8% C16:0; 3% C18:0; 71% C18:1; 15% C18:2 e 1% C18:3 – (fornecido pela empresa Solazyme de Campinas-SP), vide Figura 13. As condições para a obtenção de biodiesel foram semelhantes à da metodologia descrita por (Macario *et al.*, 2007) e (Yagiz, Kazan e Akin, 2007) fazendo as adaptações necessárias nas condições de sínteses para os novos catalisadores. As reações de transesterificação com o complexo nanozeólita/enzima foram realizadas com uma razão óleo/etanol de 1:4 em 40ºC (temperatura ideal para transformar o óleo de palma, semi-sólido em temperatura ambiente, em líquido e também nesta temperatura não inativa as enzimas), o etanol foi adicionado lentamente em *batelada alimentada* para não ocorrer a inativação da enzima. Após a reação, o excesso de etanol foi evaporado em pressão reduzida e o produto (biodiesel e glicerol) foram separados por centrifugação em 12.000rpm.

Figura 13 Matérias-primas utilizadas no estudo. A) óleo refinado de palma (temperatura ambiente), B) óleo refinado de palma (40ºC) e C) óleo refinado de microalgas heterotróficas.

O progresso da reação de transesterificação foi acompanhado pela análise por Cromatografia de Camada Delgada (TLC) seguindo a metodologia proposta por Yang et al, 2009. Em um intervalo de tempo pré-determinado, um pequeno volume (25μL) da mistura reacional foi retirado e misturado com 100μL de hexano. Após a separação por centrifugação (2min.), 1μL da camada superior da amostra foram aplicados a uma placa de sílica gel. Em seguida, a placa foi introduzida cuidadosamente em uma cuba de vidro fechada (câmara) contendo uma mistura de solvente hexano/acetato de etila/ácido acético

(90:10:1). Após a corrida do solvente, as placas foram secas e reveladas com iodo sublimável (Yang, Sohn e Kim, 2009).

3.4.1 Otimização da produção de biodiesel pelo método de Box Behnken

A otimização da reação foi realizada por um delineamento experimental *Box-Behnken* de superfície de resposta, este modelo estatístico exibe, como principal vantagem, a exigência de um número reduzido de experimentos quando comparado a outros métodos, tal como o método fatorial (Charoenchaitrakool e Thienmethangkoon, 2011). O emprego do modelo *Box-Behnken* consiste em um planejamento experimental utilizado para procedimentos de otimização. Para atingir esse propósito, é feita uma repetição do ponto central, para medir a variabilidade experimental e mais um conjunto de pontos fatoriais ancorados no ponto central definindo a região de interesse (Box e Behnken, 1960).

O método foi aplicado utilizando, como biocatalisador, o complexo Nano-X/Ni/0,5M com a lipase de *R. miehei* imobilizada. Este complexo demonstrou ser mais ativo quando comparado com os outros complexos entre lipase de *R. miehei* e a nanozeólita X. Na Tabela 2 estão apresentadas as variáveis investigadas para o planejamento experimental: (1) o efeito do tempo reacional (X_1), (2) a razão molar óleo: etanol (O:E) (X_2) e (3) a quantidade de catalisador (X_3) no rendimento de ésteres etílicos. As demais condições experimentais utilizadas foram as mesmas para as reações descritas no *item 3.4*. Um total de 15 experimentos foram necessários para estimar os coeficientes do modelo. O planejamento estatístico e a análise de dados foram realizados utilizando o *software Minitab* 16, obtendo, assim, os coeficientes de regressão, as variâncias e as curvas de contornos. Em um sistema envolvendo variáveis independentes, a relação matemática de resposta destas variáveis com a formação de ésteres pode ser aproximada pela equação polinomial quadrática. A fórmula do modelo é mostrada na Equação 4:

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^{k} \beta_i x_i + \sum_{i=1}^{k} \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=i+1}^{k} \beta_{ij} x_{ij} + \varepsilon$$

Equação 4 Fórmula do modelo experimental do tipo *Box-Behnken*.

Na qual, Y representa a resposta prevista para o rendimento de ésteres etílicos, x_i e x_{ij} são variáveis independentes, β_o é o modelo da constante e β_i, β_{ii}, β_{ij} são coeficientes de regressão e ε é o erro.

O delineamento experimental, ou seja, os limites superiores e inferiores do tempo (h), razão molar O:E (mol/mol) e quantidade de catalisador (% em peso em relação ao óleo) são mostrados na Tabela 2.

Tabela 2 Variáveis para o planejamento experimental do tipo Box-Behnken.

Variáveis	**Inferior**	**Mediana**	**Superior**
Tempo	12	30	48
Razão molar Óleo:Etanol	1:4	1:5	1:6
Quantidade de catalisador	3%	4%	5%

3.4.2 Reuso do biocatalisador

O reuso do biocatalisador é outra propriedade importante da enzima imobilizada que indica a estabilidade, a força e a eficiência da ligação entre os suportes e a enzima. Portanto, após as reações de produção de biodiesel, os principais complexos (nanozeólita/enzima) foram separados da reação por centrifugação 12.000 rpm e, sem tratamento específico, foram adicionados novamente nas mesmas condições reacionais para determinar o número de ciclos que biocatalisador se manteve estável e eficientes na reação transesterificação.

3.4.3 Análises por cromatografia gasosa do teor dos ésteres etílicos

As análises dos teores de ésteres etílicos foram realizadas por cromatografia gasosa baseadas na norma EN 14103 – método utilizado para a determinação da porcentagem de ésteres metílicos de ácidos graxos presentes em uma amostra por cromatografia gasosa com calibração interna (nonadecanoato de etila) que é adequado para o biodiesel com ésteres etílicos entre C_{14} e C_{24}. Os reagentes utilizados para a análise de determinação do teor dos ésteres etílicos foram: n-heptano 95% e nonadecanoato de etila com pureza conhecida (mínimo 99%). As análises foram realizadas utilizando um cromatógrafo gasoso (GC) CLARUS 580-Perkin equipado com detector de ionização de chama (GC-FID), utilizando uma coluna capilar *Restek-Carbowax* (30m de comprimento x 0,25mm de diâmetro interno). No procedimento usado para a determinação da concentração de ésteres etílicos, primeiramente foi pesado 100mg do éster etílico (amostra) em um *vial* de 10mL. Posteriormente, foram adicionados 10mL de uma solução

de nonadecanoato de etila (padrão interno). A amostra de ésteres foi injetada nas seguintes condições: hélio como gás de arraste a uma taxa de 2mL/min., as temperaturas do injetor e do detector foram 250ºC e a temperatura do forno iniciou em 50ºC e aumentou até 250ºC em uma taxa de 5ºC/min.

O teor de ésteres etílicos foi calculado conforme a Equação 5.

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

Equação 5 Determinação do teor de ésteres.

Na qual,

$\sum A$ = Soma da área total dos picos de ésteres etílicos de C_{14} até C_{24}

AEI = Área do pico correspondente ao nonadecanoato etila.

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

VEI = Volume do nonadecanoato de etila (mL)

m = Massa da amostra (mg)

3.5 Potencial Eletrostático da Superfície das lipases

O potencial eletrostático é um componente importante na interação proteína-zeólita, portanto é necessário verificar a existência de cargas complementares que mostram a evidência de possíveis sítios de ligação. Para calcular o potencial eletrostático da superfície das lipases de *T. lanuginosus* e *R. miehei*, foi usado o programa PDB2PQR server 1.8 (Dolinsky *et al.*, 2004) que converte um arquivo originalmente no formato PDB em um arquivo PQR para obter as cargas e raio atômico, como mostra o *Amber force field* (Lindorff-Larsen *et al.*, 2010). Na sequência foi utilizado o software APBS (*Adaptive Poisson-Boltzmann Solver*, versão 1.3) (Baker *et al.*, 2001) para resolver a equação de *Poisson-Boltzmann* com base no arquivo PQR gerado anteriormente. As proteínas foram centradas numa caixa cúbica e em uma única condição de Debye Huckel, a qual depende da temperatura absoluta, da concentração de sal, da carga líquida e da constante dielétrica usada. Íons móveis de cargas positivas e negativas foram colocados numa concentração de 10,0 mM. A constante dielétrica da proteína foi ajustada para 2,00, enquanto o solvente foi ajustado para 78,54. A sonda esférica com raio de 1,4 Å e a temperatura foi ajustada para 298,15K. Os resultados foram executados em PyMOL Versão 1.5.0.4 (Schrödinger, LLC.).

3.5.1 Análises de modos normais em proteínas

Na ausência de um campo de força unificado para descrever completamente esta complexa interação proteína-zeólita, decidiu-se realizar uma simulação usando a própria proteína, mais especificamente, a dinâmica e as ações relacionadas com a abertura da *lid* e exposição dos sítios catalíticos das lipases. A análise de modo normal foi aplicada com sucesso para compreender melhor a dinâmica das proteínas e sua função (Bahar *et al.*, 2010). Neste estudo, a dinâmica intrínseca das enzimas foi analisada associando as constantes de mola para cada ligação química na proteína. Assim, foi possível relacionar a ativação da lipase com a abertura da *lid*.

Para atingir esse propósito, as análises foram feitas no modo normal pelo *vibrate command* no programa de modelagem molecular TINKER (Ponder, 2003). Antes da análise do modo normal foi necessário minimizar a energia da estrutura da proteína, utilizando o módulo de minimizar do software TINKER. O critério de convergência de energia foi ajustado para 0,1 kcal/mol. Os primeiros 15 modos normais foram selecionados para obter um maior detalhe da análise, ou seja, as menores frequências de vibração da estrutura da proteína.

3.6 Caracterização físico-química das nanozeólitas e dos complexos nanozeólitas-enzimas

Os métodos de identificação e os equipamentos que foram usados na realização deste trabalho, estão descritos nesta seção.

3.6.1 Difração de raios X (DRX)

A técnica de DRX é essencial para a caracterização estrutural das amostras de zeólitas. Por meio dos padrões de difração de raios-X dos materiais zeolíticos é possível realizar a identificação, o grau de cristalinidade, a monitoração das transições de fase, a avaliação do tratamento de troca iônica suas mudanças estruturais. Cada sólido cristalino, tal como a zeólita, apresenta um padrão de difração único, que é tipicamente utilizado como uma "*Impressão digital*" para a sua identificação e classificação (Baerlocher, McCusker e Olson, 2007). Os dados de DRX das amostras de nanozeólitas foram coletados com um Rigaku MiniFlex II em uma fonte ânodo rotativo com uma placa plana de geometria Bragg-Brentano, operando com radiação Cu Kα (comprimento de onda = 1,5418 Å) em 40 kV e 40mA e equipado com um monocromador de grafite. Os padrões de difração em pó foram registrados na faixa de 2α = 3-50º com um goniômetro e taxa de

scan de 2º/min. A amostra foi previamente macerada para manter a superfície da amostra lisa e uniforme e colocada num porta-amostra para a análise.

3.6.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A técnica de MEV é uma das mais importantes para a determinação da morfologia e determinação do tamanho dos materiais zeolíticos de dimensões na escala micrométrica e nanométrica. Os dados de MEV foram obtidos em dois grandes centros de caracterização de materiais no Laboratório de Caracterização Estrutural (LCE) – UFSCar usando Philips XL-30 FEG e no Laboratório Nacional de Nanotecnologia (LNNano)-CNPEM usando um FEI Inspect F50 – *High Resolution SEM*.

Nesta análise, as amostras devem ser eletricamente condutoras pelo menos na superfície. No entanto, como a amostra de zeólita não é condutora, antes da análise em sistema de vácuo, as amostras foram revestidas com uma fina camada de ouro para aumentar sua condutividade e protegê-las da excessiva carga de elétrons que podem provocar danos na superfície da amostra.

3.6.3 Microscopia de força atômica (AFM)

A técnica de AFM é uma ferramenta usada para caracterizar a morfologia, o tamanho, a topografia, os defeitos de superfícies e a textura de nanomateriais. A análise de AFM consiste na varredura da superfície utilizando uma agulha, de modo a determinar a topografia da amostra em análise (Binning *et al.*, 1982). As imagens de AFM nesse trabalho foram utilizadas de forma a complementar as informações obtidas por MEV e também para avaliar as propriedades da superfície das nanozeólitas, tal como a rugosidade antes e após a imobilização das enzimas. Os dados de AFM foram coletados no *Laboratory for Surface Science* do Laboratório Nacional de Nanotecnologia (LNNano-CNPEM) utilizando um microscópio de varredura por sonda (SPM), equipado com um controlador Nano-ScopeIIIa (*Digital Instruments Inc.*). Antes de realizar as medidas, as amostras foram dispersadas em água destilada e em seguida foram depositadas sobre mica crivada e secas em alto vácuo. As imagens AFM foram adquiridas com uma sonda de silício com diâmetro de 5nm com coleta utilizando "*Tapping mode*", varredura de 256 à 512 linhas. Os resultados foram analisados no software Gwyddion (32bit).

3.6.4 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

A técnica de MET é importante para realizar caracterizações estruturais e a maior parte dos estudos que utilizam essa técnica estão relacionados com a obtenção de imagens em alta resolução do ordenamento estrutural do material cristalino (Williams e Carter, 1996). As imagens de MET nesse trabalho foram utilizadas para determinar o ordenamento estrutural e o tamanho das partículas das amostras de nanozeólitas aglomeradas, as quais necessitam de técnicas de microscopia com maior resolução para a completa caracterização. Os dados de MET também foram obtidos em dois grandes centros de caracterização de materiais no Laboratório de Caracterização Estrutural (LCE) – UFSCar usando FEI Model Tecnai G2 F20, operado em uma voltagem de aceleração 200 kV e no Laboratório Nacional de Nanotecnologia (LNNano)-CNPEM usando um microscópio em alta resolução TEM-HR -JEOL 3010, operado em uma voltagem de aceleração (300kV). Antes de realizar as medidas, as amostras foram dispersadas em isopropanol e em seguida foram depositas numa grade de cobre e secas em alto vácuo.

3.6.5 Análises de infravermelho

A análise de infravermelho foi usada para identificar as vibrações das ligações químicas das nanozeólitas puras. Além de verificar se houve mudança nessas vibrações após serem ativadas por troca iônica e confirmar a efetividade da incorporação dos agentes de funcionalização (aminossilano e glutaraldeído). As análises de infravermelho com transformada de Fourier no modo de reflexão total atenuada (ATR-FTIR) foram realizadas no Laboratório de Sucroquímica, Química Analítica e Bio-orgânica (LSQAB) - IBILCE/UNESP, utilizando um equipamento com um acessório de diamante ATR (*Perkin Elmer Frontier*) e um espectrômetro FTIR. As análises foram feitas no intervalo de 400 a 4000cm^{-1}, utilizando 64 varreduras com 4cm^{-1} de resolução nos espectros.

3.6.6 Ressonância magnética nuclear do estado sólido de ^{29}Si

A técnica de RMN-MAS de ^{29}Si foi usada para verificar as espécies de silício na estrutura das amostras de nanozeólitas, a partir dos deslocamentos químicos (ppm) que fornecem informações úteis sobre o tipo, o número de átomos na vizinhança e a geometria da ligação. Os espectros obtidos são constituídos de cinco possíveis ambientes químicos nas unidades de Si(nAl) na estrutura das zeólitas: $Si(OAl)_4$, $Si(OAl)_3(OSi)$, $Si(OAl)_2(OSi)_2$, $Si(OAl)\text{-}(OSi)_3$ e $Si(OSi)_4$. As análises foram realizadas no Centro

Multiusuário de Inovação Biomolecular - IBILCE/UNESP. Os espectros de ressonância magnética nuclear foram coletados num espectrômetro Bruker Avance III 400MHz.

3.6.7 Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP OES)

A análise química elementar quantitativa para Si, Al, Na, Mn, Cu, Co, Zn e Ni da composição em massa dos suportes zeolíticos foi efetuada utilizando-se a técnica de espectroscopia de emissão óptica na Central Analítica da Universidade de São Paulo (USP-SP). Essa técnica é comumente usada para detectar os traços de metais presentes na composição da zeólita, permitindo determinar cada elemento e seu respectivo comprimento de onda. Os dados foram coletados em um espectrofotômetro com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES).

Como as zeólitas não são facilmente solúveis, as amostras do presente trabalho foram tratadas por digestão ácida para destruir a sua estrutura e liberar o metal em solução - numa mistura de ácido nítrico "HNO_3", ácido clorídrico "HCl" e ácido fluorídrico "HF". Para as medidas e abertura das amostras, 0,05 g das amostras sólidas em triplicata, foram adicionados 1,0 mL de HNO_3 65 % (m/v), 1,0 mL de HCl 37 % (m/v) e 1,0 mL de HF 48 % (m/v). Após a digestão, as amostras foram colocadas em tubos fechados e foram aquecidas a 60ºC por 30 minutos. Finalmente, as amostras foram resfriadas, transferidas para frascos volumétricos para preparação de uma série de soluções-padrão e, seguida, analisadas por ICP.

3.6.8 Espectroscopia de fotoelétrons induzida por raios-X (XPS)

A técnica de XPS permite obter informações químicas da região próxima à superfície dos materiais, normalmente as informações superficiais da amostra são limitadas em uma profundidade de análise < 5 nm, contudo, a precisão da região analisada é alta. As energias de ligação de elétrons são características de cada elemento, assim esta técnica foi utilizada para determinar as espécies presentes na região superficial da nanozeólita modificas com cátions de Níquel (Smith, 1994). A análise de XPS foi realizada no Laboratório de Espectroscopia de Fotoelétrons - Instituto de Química UNESP/Araraquara utilizando-se um espectrômetro comercial UNI-SPECS UHV com pressão de base abaixo de $5x10^{-7}$ Pa. A linha Mg Kα foi utilizada ($h\nu$ = 1253,6 eV) como fonte de ionização e a energia de passagem do analisador foi ajustada para 10 eV. O ruído dos espectros de alta resolução O 1s, Si 1p, Al 2p e Ni 2p3/2 foi subtraído utilizando o

método de Shirley(Shirley, 1972). A composição foi determinada pelas proporções relativas das áreas de picos corrigidas pelos fatores de sensitividade atômica de *Scofield* com uma precisão de ±5%. O efeito de carregamento das amostras na escala da energia de ligação foi corrigido pela componente C-H do pico C 1s, fixa a 285,0 eV. Os espectros foram deconvoluidos utilizando uma função do tipo Voigtiana, com combinações Gaussianas (70%) e Lorentzianas (30%). A largura à meia altura variou entre 0,9 e 2,0 eV, e a posição dos picos foi determinada com uma precisão de ±0,1 eV.

3.6.9 Análise textural por adsorção de nitrogênio

A adsorção de nitrogênio à temperatura de ebulição (77 K) representa a técnica mais utilizada para determinar a área de superfície de um catalisador e para caracterizar a sua textura porosa (Leofanti et al., 1998). As isotermas de adsorção das nanozeólitas foram determinadas pelo volume de átomos de gás N_2 adsorvidos em função da pressão relativa e as áreas da superfície externa das nanozeólitas foram calculadas empregando-se o método *t-plot*. Antes da análise, aproximadamente 0,2g da amostra de nanozeólita foi aquecida a 300ºC, sob vácuo, para remover as impurezas gasosas fisiossorvidas e eliminar a água de hidratação da zeólita. As medidas de adsorção de nitrogênio e os cálculos da área de superfície externa foram realizadas no Centro de Pesquisas e Desenvolvimento da Petrobras (CENPES) utilizando-se o equipamento da marca TriStar II, modelo 3020.

3.6.10 Análises termogravimétricas (TGA)

A análise termogravimétrica é altamente sensível a alterações de massa em função da temperatura e/ou tempo. As análises de TGA foram usadas para determinar o conteúdo de água ligada ou coordenada nos materiais nanozeolíticos e também para determinar a faixa de temperatura da degradação das espécies orgânicas derivadas dos agentes direcionadores de estruturas, tais como: tetrametiamônio e tetrapropilamônio. As análises termogravimétricas foram realizadas no Laboratório de Sucroquímica, Química Analítica e Bio-orgânica (LSQAB) - IBILCE/UNESP, utilizando um equipamento TGA 4000 (*PerkinElmer*). As amostras foram analisadas em recipientes de cerâmica a uma taxa de aquecimento de 10 °C/min ao longo do intervalo de temperatura 25-900 °C numa atmosfera de ar com um fluxo de 180 mL/min. Aproximadamente 10 a 15 mg de amostras

foi utilizado para cada experimento, a quantidade de massa é pequena porque a microbalança utilizada pode detectar alterações de massa com alta sensibilidade.

3.6.11 Análises espectrofotométricas

As atividades enzimáticas da enzima livre e a quantidade de enzima imobilizada no suporte foram medidas por absorvância, nas regiões de 410nm e 595nm, respectivamente utilizando um espectrofotômetro UV-Vís S-2000 – BEL PHOTONICS que opera na faixa de 200 à 1000nm.

3.6.12 Potencial zeta (ζ)

O potencial zeta das amostra de nanozeólitas, na ausência e presença de enzimas imobilizadas, foram determinados por meio da mobilidade eletroforética usando Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments, Worcestershire, U.K.), em pH 7,0 a 25°C ± 0,2, de acordo com (Schultz *et al.*, 2008). Esta técnica foi usada para avaliar a importância da carga dos diferentes suportes nanozeolíticos nas interações com as enzimas estudadas durante o processo de imobilização. As análises foram realizadas no Laboratório de Polímeros - IBILCE/UNESP. As amostras dos diferentes suportes foram colocadas em tubos fechado com a mesma concentração (1mg/mL) em tampão fosfato de sódio pH 7 (20mM), e antes de realizar as medidas foram dispersadas com o auxílio de um sonicador. Finalmente, as amostras foram transferidas para celas capilares em forma de U com eletrodo de ouro e volume de 1,0 mL (DTS1060) e, em seguida foram analisadas. O potencial Zeta, δ, foi calculado automaticamente pelo programa do equipamento a partir da mobilidade elétroforética, μE, de acordo com a Equação 6.

$$\zeta = \frac{\eta}{\varepsilon}\mu_e$$

Equação 6 Equação de Helmholtz-Smoluchowski para determinação do potencial zeta. Onde η é a viscosidade do meio de dispersão e ε é a constante dielétrica de permissividade do meio aquoso. Para água a 25ºC (ε=79 e η=8,95x$10^{-4}$$Nm^{-2}$s), que relaciona a mobilidade eletroforética (μms^{-1}/ ν.cm^{-1}) com o potencial zeta (mV).

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

A discussão dos resultados foi dividida em quatro partes, visando facilitar a sua compreensão e correlação:

(1) Caracterização das enzimas livres dos testes enzimáticos relevantes;

(2) Caracterização das nanozeólitas puras e estudos de desempenho catalítico dos diferentes complexos (nanozeólita/enzima);

(3) Caracterização das nanozeólitas trocadas com cátions de transição e o efeito no desempenho catalítico dos complexos (nanozeólita/enzima) na transesterificação enzimática de óleo palma;

(4) Caracterização das nanozeólitas modificadas com agentes orgânicos e o efeito no desempenho catalítico dos complexos (nanozeólita/enzima) na transesterificação enzimática do óleo microalgas.

4.1 Caracterização das enzimas livres dos testes enzimáticos relevantes

Em paralelo aos procedimentos de preparação dos materiais nanozeolíticos buscou-se também compreender melhor as características das enzimas na sua forma pura antes dessas serem imobilizadas nos suportes nanozeolíticos. Assim como proposto no projeto de pesquisa de doutorado, descreve-se abaixo os resultados da caracterização das quatro lipases estudadas: *R. miehei*, *T. lanuginosus*, *B. cepacia*, *C. antarctica*. Foram avaliados os parâmetros experimentais importantes para um trabalho experimental envolvendo enzimas: temperatura ótima e a estabilidade térmica dessas enzimas.

4.1.1 Temperatura Ótima das Enzimas

A atividade catalítica das enzimas é altamente dependente da temperatura, contudo, à medida que a temperatura se eleva, dois efeitos ocorrem: a taxa de reação aumenta e a estabilidade da enzima diminui devido à inativação térmica. Assim sendo, as enzimas exibem uma temperatura ideal, o que, na prática, seria uma temperatura na qual elas apresentariam sua atividade catalítica ótima. Nota-se, na Figura 14, que as atividades de hidrólise na temperatura ótima das amostras de enzimas mostraram o seguinte comportamento: *R. miehei* (153,6 U/mL) > *T. lanuginosus* (115,1 U/mL) > *B. cepacia* (88,2 U/mL) > *C. antarctica* (28,1 U/mL).

A temperatura ótima encontrada para a lipase de *R. miehei* foi 44ºC (Figura 14, curva (a)). Foi observado que quando se eleva a temperatura acima de 44ºC, a atividade

enzimática diminui e aumenta a inativação da enzima. Na temperatura de 46ºC, observa-se uma diminuição de 10% da atividade catalítica da enzima e, quando foi alcançada a temperatura de 53ºC, a enzima está praticamente inativa, mantendo-se apenas 10% de sua atividade catalítica na temperatura ótima, indicando, portanto, a sua completa inativação. Os resultados encontrados nesse estudo estão semelhantes aos resultados descritos na literatura para temperatura ótima da lipase *R. miehei*, os quais reportam a faixa de temperatura entre de 30–50ºC e pH de 8,0 (Han *et al.*, 2009).

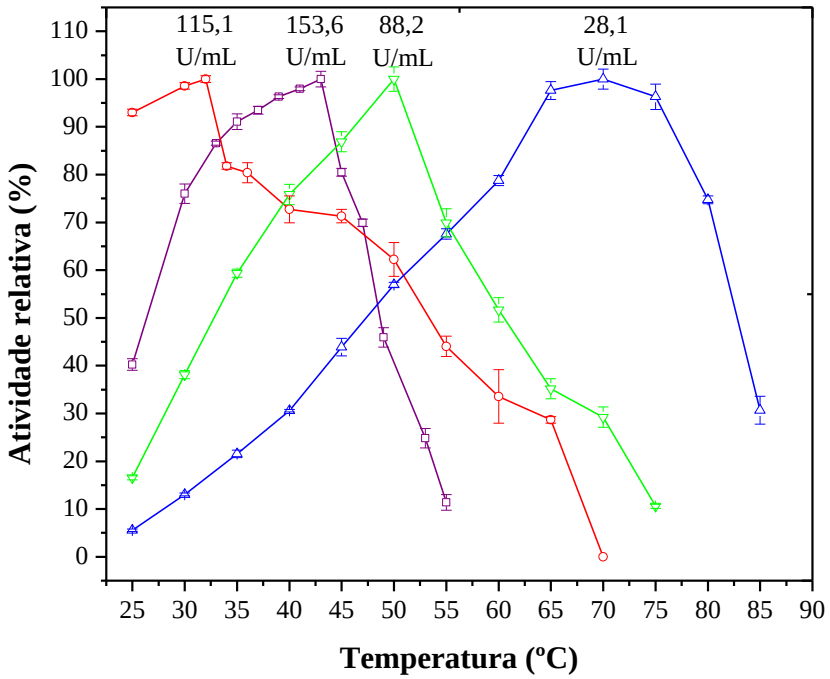


Figura 14 Efeito da temperatura na atividade enzimática da lipase livre. (a) *Rhizomucor miehei* (□), (b) *Thermomyces lanuginosus* (○), (c) *Burkholderia cepacia* (▽) e (d) *Candida antarctica* (Δ).

Por outro lado, para a lipase *T. lanuginosus*, a temperatura ótima experimentalmente encontrada foi de 30ºC (Figura 14, curva (b)), o que é uma temperatura relativamente baixa. Foi observada uma diminuição considerável na sua atividade de hidrólise — aproximadamente 70% de sua atividade ótima obtida em 30ºC — quando a temperatura atingiu a faixa de 45ºC. Na temperatura acima de 60ºC, ocorreu uma rápida desnaturação da enzima, a qual foi praticamente inativada a 70ºC.

Na literatura, não há um consenso sobre qual a melhor temperatura ótima de reação para a lipase de *T. lanuginosus*, uma vez que os valores de temperatura ótima pode ser influenciado por alguns fatores, tais como tipo de substrato e condições reacionais

como pH, força iônica, aditivos, entre outros. Enquanto alguns estudos encontram valores de 37ºC (Fernandes *et al.*, 2004) e 40ºC (Crooks *et al.*, 1995), outros autores encontraram valores na faixa entre 50 a 55 ºC (Jurado *et al.*, 2006; Alim *et al.*, 2008; Chew *et al.*, 2008), logo, o valor obtido em nosso estudo está coerente com vários desses resultados, especialmente, porque na faixa de 30–35ºC não houve variação significativa no comportamento da enzima (Figura 14b).

O efeito da temperatura na taxa de hidrólise do palmitato de *p*-nitrofenila (*p*-NPP) para lipase de *B. cepacia* foi avaliada na faixa de 25–75ºC e pH 7. Foi observado que a enzima apresenta sua temperatura ótima em torno de 50ºC (Figura 14, curva (c)). Quando comparam-se as atividades obtidas na faixa de temperatura de 50 a 55ºC, observa-se um decréscimo de 30% em relação à sua atividade catalítica na temperatura ótima (50ºC) e, acima de 60ºC, ocorreu uma perda de atividade de 50% (Figura 14, curva (c)). Nesse caso, acima da temperatura ótima (50ºC), a enzima *B. cepacia* não perde rapidamente sua atividade catalítica em temperaturas elevadas. Isso é bastante incomum em se tratando de lipases em geral, pois elas não suportam temperaturas elevadas, com exceção das lipases termofílicas (Gupta, Gupta e Rathi, 2004; Hasan, Shah e Hameed, 2009).

Em relação à enzima *B. cepacia* (citada na literatura também como *Pseudomonas cepacia*), pode-se observar, por meio dos dados reportados na literatura, que também não há um consenso a respeito de qual seria a temperatura ótima para essa enzima, devido à influência de fatores que interferem na determinação da temperatura ótima como tipo de substrato, pH, força iônica, aditivos, entre outros. Kojima, *et al.* (2003) caracterizaram lipases de *Pseudomonas fluorecens* HU380 e obtiveram 45ºC como temperatura ótima, enquanto (Nawani, Singh e Kaur, 2006) encontraram como temperatura ótima a faixa de 60–65ºC para as lipases *B. cepacia*, em sua forma imobilizada, e 60ºC quando essas se apresentavam em sua forma livre. Pencreac'h e Baratti (1996), trabalhando com expressão e purificação da enzima *Pseudomonas cepacia*, reportaram 45ºC como a temperatura ótima para essa enzima. Assim, considerando os dados reportados na literatura para a temperatura ótima (45-60ºC) para a enzima *B. cepacia*, verificou-se que o valor experimental de 50ºC obtido em nosso estudo coincide com os dados reportados na literatura.

A lipase de *C. antarctica* merece destaque pelo seu comportamento termoestável quando comparada às outras lipases testadas nesse estudo, conforme pode ser visto na Figura 14, curva (d). De acordo como nossos dados experimentais, inicialmente, a taxa

de atividade enzimática aumentou gradualmente quando variou-se a temperatura de 25ºC a 65ºC. Então foi observado que a atividade enzimática permaneceu ligeiramente constante entre 65–75ºC, sendo, portanto, essa faixa considerada a temperatura ótima para essa enzima. Observou-se que ocorre uma diminuição de 70% de sua atividade catalítica observada na temperatura ótima (65-75ºC), quando se atinge a temperatura de 80ºC. O caráter termoestável observado para a lipase de *C. antarctica*, com base nos resultados experimentais obtidos neste estudo, está acima dos valores obtidos na literatura com os dados reportados na literatura para essa enzima, que em geral também reportam a faixa de temperatura de 40ºC a 60ºC como a faixa de temperatura ótima para se trabalhar com essa enzima (Bourg-Garros, Razafindramboa e Pavia, 1998; Lozano *et al.*, 2004). Uma possível explicação para esse comportamento pode estar relacionada à presença de outras proteínas no lote de enzima adquirido da empresa *Sigma-Aldrich*. A análise de eletroforese, na sequência, confirma essa hipótese.

Sabe-se que embora o substrato palmitato de *p*- nitrofenila tenha sido frequentemente utilizado para a determinação da atividade de hidrólise de lipases devido à facilidade e a rapidez da análise, esse substrato não é o mais adequado para lipases não purificadas, pois pode sofrer a influência de outras hidrolases. Ou seja, essas enzimas também podem hidrolisar ésteres do palmitato de *p*-nitrofenila (Pinsirodom e Parkin, 2001).

4.1.2 Estabilidade Térmica das Enzimas

A estabilidade térmica enzimática é outro fator importante a ser considerado no estudo de enzimas quando se objetiva usá-las em aplicações industriais. Um aumento de temperatura geralmente corresponde a um aumento na taxa de reação enzimática (Gomes *et al.*, 2006). Entretanto, um aumento de temperatura e o tempo de exposição da enzima nessa faixa de temperatura, podem promover ou contribuir para um aumento na inativação térmica da lipase, acarretando uma redução da formação de produto desejado. Dessa forma, a verdadeira "*temperatura ótima*"**,** pode não ser necessariamente a temperatura medida em um *curto intervalo de tempo*, mas, sim, a temperatura na qual a enzima tem uma *atividade constante* por um *longo período* de tempo (Bisswanger, 2014).

De acordo com os dados de atividade ótima das enzimas obtidos experimentalmente em nosso laboratório e reportados na seção acima 4.1.1, pode-se dividi-las em três grupos: a) lipase de *T. lanuginosus*, cuja atividade ótima ocorre em

temperatura relativamente baixa (30ºC); b) lipases de *R. miehei* e *B. cepacia*, cujas atividades ótimas ocorrem em temperaturas relativamente médias (44ºC e 50ºC, respectivamente) e c) lipases de *C. antarctica* cuja atividade ótima ocorre em temperatura consideravelmente elevada (65–70ºC). Logo, estudos de estabilidade térmica foram realizados em intervalos pré-determinados de tempo (0, 60, 120, 180, 240 e 300 minutos) e, para esses intervalos de tempo, amostras das enzimas acima citadas foram colocadas para reagir com o substrato palmitato de *p*-nitrofenila (*p*-NPP) e suas atividades hidrolíticas foram determinadas por meio da hidrólise desse substrato.

O gráfico de estabilidade térmica da enzima livre de *R. miehei* na sua temperatura ótima (44ºC) em função do intervalo tempo (0, 60, 120, 180, 240 e 300 minutos) é mostrado na Figura 15a. Pode-se notar que após 60 minutos ocorre uma diminuição de aproximadamente 40% da atividade catalítica e, em seguida, essa mesma atividade catalítica se mantem constante até o fim do experimento que teve duração de 300 minutos, sempre nas mesmas condições. A diminuição de 40% observada no início do experimento pode ser atribuída à ruptura das interações não covalentes da enzima, que são responsáveis pela sua estabilidade na conformação nativa (Dizge, Keskinler e Tanriseven, 2009).

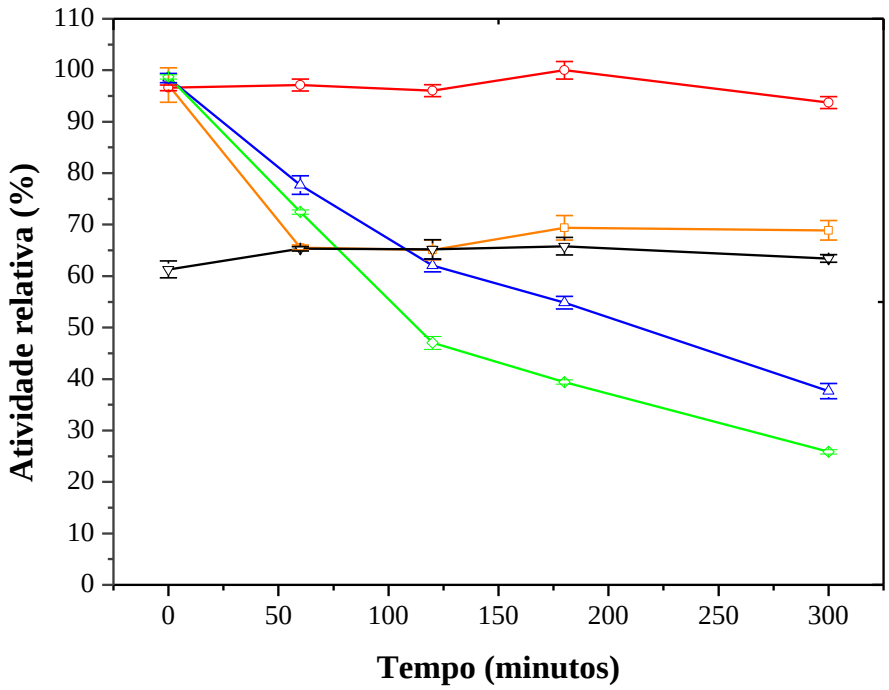


Figura 15 Estabilidade térmica das lipases na temperatura crítica (a) *R. miehei* 44ºC (□), (b) *T. lanuginosus* 30ºC (○), (c) *T. lanuginosus* 45ºC (▽), (d) *B. cepacia* 50ºC (◊) e (e) *C. antarctica* 70º C (Δ).

Para os estudos de estabilidade térmica da lipase de *T. lanuginosus* houve necessidade de se trabalhar com duas faixas distintas de temperatura: 30ºC (temperatura ótima da enzima) e a 45ºC (temperatura ideal para transformar o óleo de palma). A Figura 15b mostra os dados de estabilidade da lipase de *T. lanuginosus*. Observa-se que não houve desativação da enzima durante o período que permaneceu a 30ºC, mantendo-se 100% da sua atividade ótima. Esse comportamento pode ser explicado pela baixa temperatura de incubação que não interfere na estrutura terciária da enzima. Todavia, pode-se observar na Figura 15c que, quando a lipase de *T. lanuginosus* é incubada na temperatura de 45ºC, a atividade enzimática foi de ≈65% em relação à sua atividade inicial na temperatura ótima (30ºC), durante todo o intervalo de tempo de 300 minutos. Esse comportamento é uma forte indicação de que, na temperatura de 45ºC, não ocorre a desnaturação da enzima, indicando que é possível trabalhar com a lipase de *T. lanuginosus* nessas condições experimentais.

A Figura 15c mostra a estabilidade térmica da lipase de *B. cepacia* medida a 50ºC. A atividade lipolítica teve diminuição considerável (30–40% de redução na atividade inicial medida na faixa de temperatura ótima) durante o período de 1h de incubação em 50ºC, ao passo que, após 300 minutos de exposição, restou apenas 30% de sua atividade inicial, indicando uma considerável inativação da enzima em função do tempo de exposição na temperatura ótima de reação (50ºC).

Padilha *et al.* (2011) estudaram o comportamento e a estabilidade térmica da *B. cepacia* em três diferentes temperaturas 40ºC, 50ºC e 60ºC e mostrou que o tratamento a 40ºC por 2 horas acarreta uma diminuição da atividade lipolítica em torno de 15%. No entanto, no mesmo estudo, para temperaturas na faixa de 50ºC e 60ºC, ocorreu uma significativa diminuição da atividade lipolítica durante a primeira hora de exposição, nesse caso, ocorrendo uma redução da atividade lipolítica em torno de 45%. As observações reportadas por esses autores foram também observadas por Marques (2011) em seus estudos de determinação de parâmetros cinéticos feitos com a mesma enzima.

A estabilidade térmica da lipase de *C. antarctica* também foi analisada e os resultados são mostrados na Figura 15d. A enzima apresentou elevada tolerância à temperatura, durante a incubação a 70ºC por 300 minutos. Os dados mostram que essa lipase é termoestável no período de tempo de 0 a 60 minutos, em que manteve 80% da sua atividade inicial. Entre o período de tempo de 60 e 180 minutos, pode-se ainda detectar cerca de 50% da sua atividade catalítica inicial. Essa enzima manteve

aproximadamente 40% de sua atividade catalítica inicial quando exposta por 300 minutos à temperatura de 70ºC. Embora seja possível encontrar na literatura para a lipase de *C. antarctica*, estudos indicando a tolerância dessa enzima para valores elevados de temperatura na faixa de temperatura de 40ºC a 60ºC (Bourg-Garros, Razafindramboa e Pavia, 1998; Lozano *et al.*, 2004). A alta tolerância em elevada temperatura (70ºC) observada para a lipase de *C. antarctica* que sugere outras proteínas presentes no lote dessa enzima pode ter influenciado na hidrólise do palmitato de *p*-nitrofenila.

4.1.3 Estudos de eletroforese e zimografia para a determinação da atividade de hidrólise e esterificação

A pureza de uma enzima é um fator primordial básico para a obtenção de um biocatalisador eficiente e a técnica de zimografia, no caso específico das lipases pode ser bastante útil na determinação da atividade de esterificação ou de hidrólise da enzima. Com a intenção de obter mais informações das enzimas livres antes de sua imobilização nos suportes nanozeolíticos, foram feitos testes de pureza e especificidade catalítica das lipases. Devido ao maior número de dados de caracterização obtidos nesse trabalho, optou-se pela utilização da lipase de *R. miehei* como referência, nesse caso. Em estudos anteriores, realizados pelo nosso grupo de pesquisa há dois artigos científicos publicados com o uso dessa enzima (De Vasconcellos *et al.*, 2012; Bergamasco *et al.*, 2013).

4.1.4 Zimogramas de atividade de hidrólise e de esterificação das lipases

O zimograma de atividade hidrolítica foi realizado apenas para a lipase de *R. miehei* (RML), enquanto que os zimogramas de atividade de esterificação foram determinados para as lipases de *R. miehei* (RML), *T. lanuginosus* (TLL), *C. antarctica* (CA) e *B. cepacia* (BC), propostas neste trabalho de doutorado. A zimografia de atividade de esterificação foi usada para todas as enzimas porque essa é uma ferramenta útil e simples para a realização de testes preliminares do potencial catalítico das lipases.

À esquerda, na Figura 16, mostram-se os zimogramas de atividade hidrolítica (raia H) e de atividade de esterificação (raia E). A lipase de *R. miehei* apresentou duas bandas: uma banda localizada na região de 23–33 kDa, que corresponde à lipase de *R. miehei* (RML), exibiu atividade hidrolítica e de esterificação, enquanto a outra banda, de menor intensidade, localizada na região de 40 kDa não apresentou atividade de esterificação, o que indicou impureza presente no lote de enzima adquirido da empresa *Sigma-Aldrich* (Brady *et al.*, 1990; Brzozowski *et al.*, 1991). Isto implica que, se a parte impura do lote

de enzima for imobilizada, não deverá interferir na reação de transesterificação dos triacilglicerídeos. Logo, conclui-se, por meio desses ensaios de zimografia, que a lipase de RML pode realizar ambas as reações de hidrólise e esterificação, dependendo do tipo de substrato para o qual a enzima será empregada.

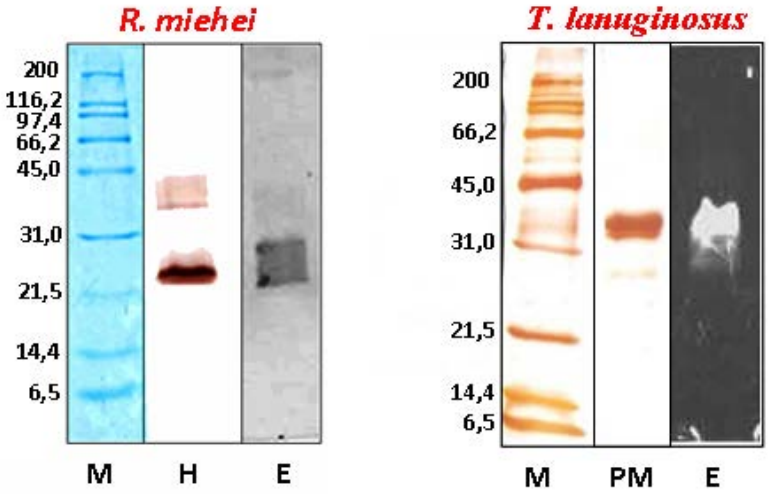


Figura 16 Zimogramas obtidos a partir da atividade de hidrólise (H) e de esterificação (E) juntamente com o marcador molecular (M) para lipase de *R. miehei* (esquerda). Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (PM) e atividade de esterificação (E) para lipase de *T. lanuginosus* (direita).

No caso da lipase de *T. lanuginosus*, o grau de pureza da enzima foi determinado conforme descrito no *item 3.1.2.1* pela técnica SDS-PAGE. À direita da Figura 16, indica-se apenas uma banda que correspondente à lipase produzida por *T. lanuginosus*, com massa molecular aproximada de 31kDa (Neves Petersen, Fojan e Petersen, 2001). Nota-se, a partir desse ensaio, que este lote de lipase utilizada é bastante homogêneo. O zimograma de esterificação para a lipase *T. lanuginosus* mostra uma elevada atividade de esterificação, indicando que essa enzima pode ser bastante específica na transesterificação dos triacilglicerídeos.

As análises dos zimogramas de esterificação das lipases de *R. miehei* (RML), *C. antarctica* (CA) e *B. cepacia* foram realizadas na mesma concentração e em condições que permitiram uma comparação entre as três enzimas. Para essa análise comparativa, a lipase de *T. lanuginosus* foi descartada, pois nessa concentração, a atividade de esterificação seria muito expressiva. A parte esquerda da Figura 17 (à esquerda) indica ausência da atividade de esterificação para a lipase *C. antarctica*. Observam-se resultados semelhantes para a lipase de *B. cepacia*, pois apresenta uma pequena banda, quase que

imperceptível, referente à atividade de esterificação. Além disso, pode-se observar, na análise de pureza da lipase de *C. antarctica* na parte direita da Figura 17, várias bandas eletroforéticas, confirmando que esse lote de enzima adquirido não tem pureza adequada para os estudos sistemáticos de imobilização.

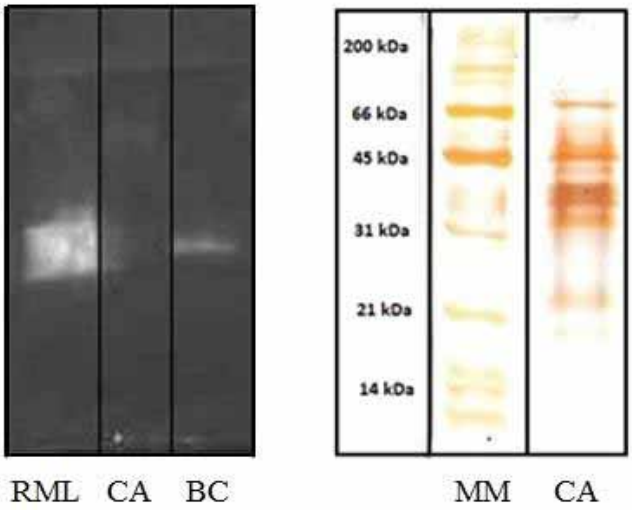


Figura 17 Zimogramas obtidos a partir da atividade de esterificação para as lipases de *R. miehei* (RML), *C. antarctica* (CA) e *B. cepacia* (BC), a esquerda. Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida juntamente com o marcador molecular (a direita).

As lipases de *C. antarctica* e *B. cepacia* também foram imobilizadas previamente nos nossos melhores suportes de imobilização e os resultados dos testes catalíticos (dados não apresentados) indicaram que essas enzimas não foram efetivas nas condições avaliadas. Como o foco deste trabalho foi a busca por suportes eficientes para imobilização enzimática, decidiu-se explorar apenas as duas lipases mais eficientes de *R. miehei* e *T. lanuginosus* para os estudos sistemáticos de imobilização de enzimas nos suportes nanozeolíticos.

4.2 Caracterização físico-química das nanozeólitas puras e comparação dos diferentes suportes zeolíticos/enzima no desempenho catalítico

4.2.1 *Sínteses e caracterização das nanozeólitas puras*

Na literatura, vários artigos recentes têm reportado procedimentos experimentais para as sínteses das nanozeólitas FAU, LTA, BEA, GIS e TS-1. Contudo, no início deste trabalho, uma série de problemas de sínteses foram detectados, principalmente relacionados com o baixo rendimento de algumas dessas nanozeólitas e, em alguns casos,

até mesmo dificuldades de reprodução de resultados reportados na literatura. Todavia, alguns procedimentos experimentais foram adaptados, sendo possível melhorar o rendimento e o grau de pureza das cinco nanozeólitas (Nano-X, Nano-GIS, Nano-LTA, Nano-BEA e Nano-TS1).

4.2.1.1 Difração de raios-X das nanozeólitas puras

A difração de raios-X é útil na identificação de um material policristalino, pois este apresenta um padrão de difração único (McCusker e Baerlocher, 2007). As zeólitas, em geral, encontram-se em fases policristalinas e a difração de raios X (DRX), normalmente, é a primeira técnica usada para a caracterização estrutural desses materiais. Como se pode observar na Figura 18, todas as amostras de nanozeólitas preparadas nesse estudo, apresentam-se cristalinas aos raios X, mostrando um perfil característico das nanozeólitas Nano-X, Nano-GIS, Nano-BEA, Nano-LTA e Nano-TS1.

O padrão de DRX da nanozeólita Nano-TS1, apresentado na Figura 18a, indica que as reflexões de maior intensidade observadas na região de 2 θ =23–25º são típicas da zeólita MFI. De uma maneira geral, pode-se afirmar que as modificações e adaptações realizadas nas condições de química sol-gel possibilitaram a obtenção de materiais nanozeolíticos com relativa pureza de fases e boa cristalinidade. Os dados são ainda comparáveis aos dados reportados na literatura (Cundy, Forrest e Plaisted, 2003; Cundy e Forrest, 2004).

A análise dos padrões de DRX para a amostra Nano-GIS (Figura 18b) exibe um padrão com três reflexões observadas em 2θ = 12,4º; 21,7º e 27,2º, esses picos correspondem às reflexões típica da zeólita GIS tetraédrica (Kecht *et al.*, 2004).

O padrão de difração para a Nano-LTA (Figura 18c) revela também a obtenção de uma amostra de zeólita A em sua fase pura e as principais reflexões verificadas em 2θ = 7,10º; 10,19º e 12,49º estão de acordo com o padrão de difração reportado para esse material (Biemmi e Bein, 2008; Faghihian *et al.*, 2013).

O padrão de difração obtido para a Nano-BEA (Figura 18d) revela também que amostras cristalinas do material foram obtidas. As reflexões obtidas em 2θ =7,8º, 21º, 22,48º estão de acordo com outros resultados reportados na literatura para zeólita do tipo BEA (Larlus *et al.*, 2011).

O padrão de difração de raios-x da nanozeólita Nano-X (Figura 18e) revela que o material preparado apresenta alta pureza, ou seja, não foram formadas fases que não

pertencem à família da zeólita Faujasita (FAU). Foi constatada uma reflexão menos intensa e alargada em 2θ= 6º, reflexão essa que está relacionada ao plano (111) da faujasita. Outras reflexões de difração importantes referentes a essa estrutura faujasítica foram também identificadas e estão localizadas na região de 2θ = 16º (331), 27º (646); essas reflexões são alargadas e apresentam baixa intensidade, o que é uma forte evidência da pequena dimensão de seus cristais (Zhan *et al.*, 2001; Zhan *et al.*, 2002).

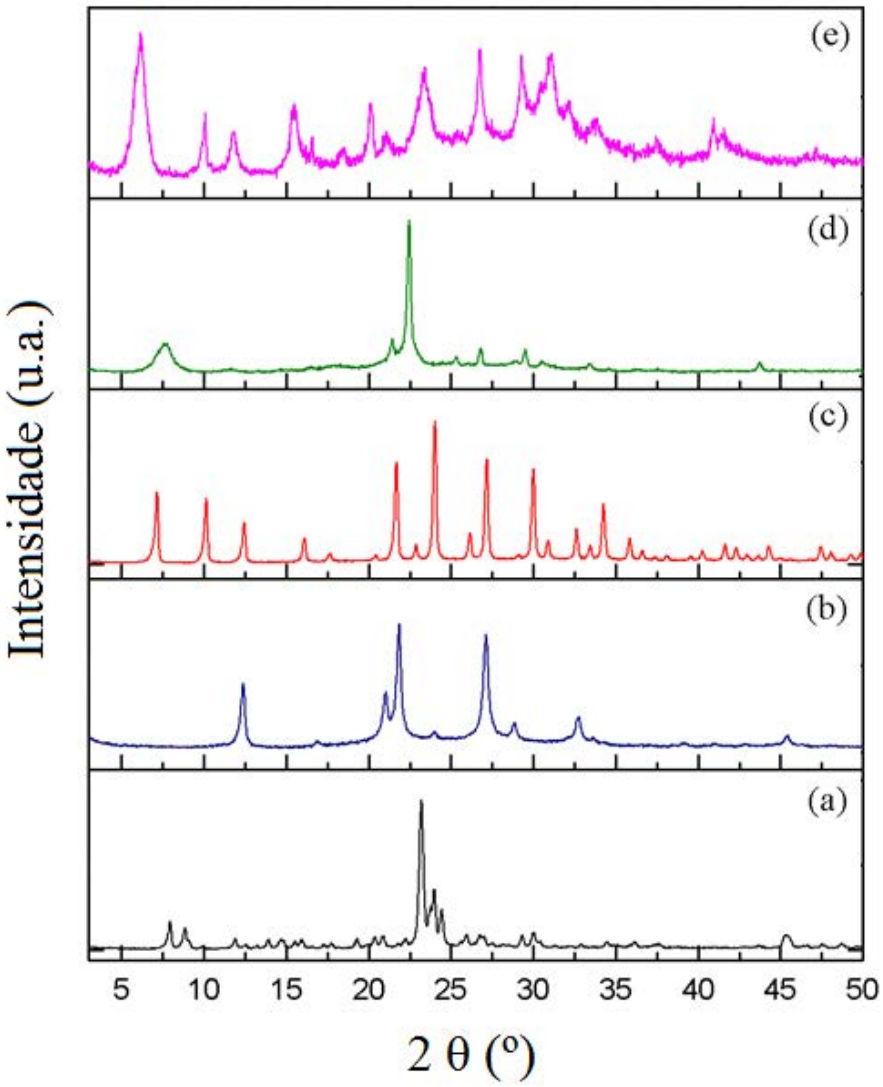


Figura 18 Padrões de difração de raios-X das diferentes famílias de nanozeólitas: a) Nano-X, b) Nano-GIS, c) Nano-LTA, d) Nano-BEA, e) Nano-TS1.

4.2.1.2 Espectroscopia na região do infravermelho das nanozeólitas puras

As nanozeólitas (Nano-TS1, Nano-GIS, Nano-LTA, Nano-BEA e Nano-X) também foram caracterizadas por infravermelho, num intervalo de 400 a 2000cm^{-1} (Figura 19). Em geral, a interpretação dos dados de espectroscopia de infravermelhos de

zeólitas pode ser dividida em dois grupos distintos: o esqueleto cristalino (500–1600 cm^{-1}) e os grupo hidroxilas e silanois geralmente são encontrado de 1500–4000 cm^{-1} (Flaningen, 1979). Dessa maneira, com o objetivo de obter mais detalhes das ligações químicas dos materiais nanozeolíticos, uma análise cuidadosa das frequências que ocorrem na região estrutural foi realizada.

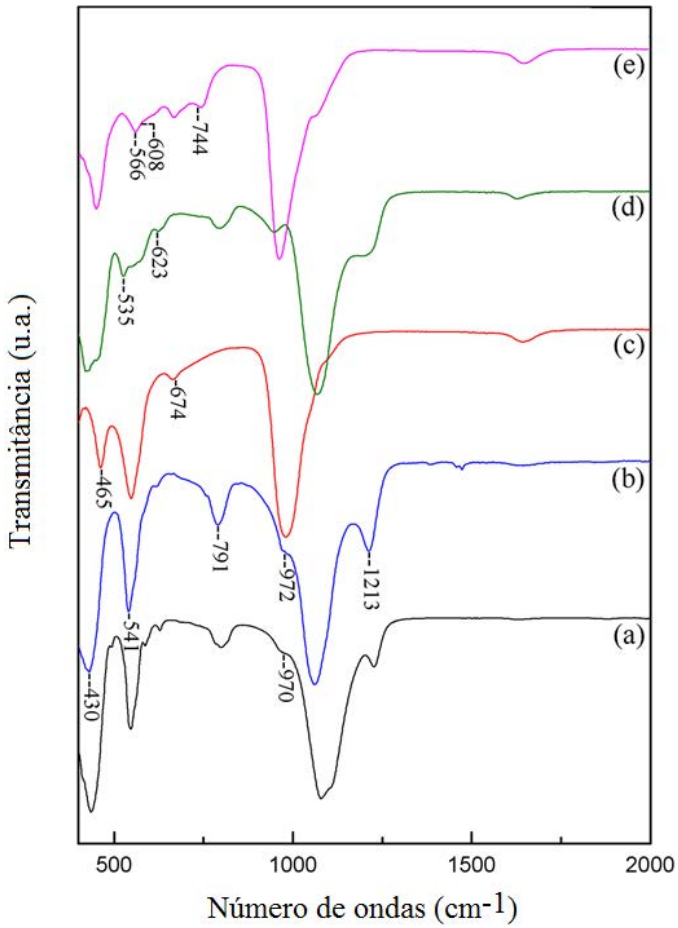


Figura 19 Espectro de infravermelho FTIR-ATR das diferentes nanozeólitas Nano-TS1, Nano-LTA, Nano-BEA e Nano-GIS.

O espectro de FTI-IR para a Nano-TS1 (Figura 19a) mostra uma banda de absorção na região de 970cm^{-1}, a qual, de acordo com a literatura, é uma "*impressão digital*" dos grupos tetraédricos $Ti(OSi)_4$ presentes em materiais microporosos (Pirutko *et al.*, 2001; Cundy e Forrest, 2004). Nota-se na Figura 19b que para a nanozeólita gismondina (Nano-GIS) as frequências de absorção observadas em (430, 541, 791, 972, 1060 cm^{-1}) estão de acordo com os principais dados espectrais que foram observados para a zeólita gismondina (454, 587, 740, 993, 1093 cm^{-1}) e reportados na literatura (Albert *et al.*, 1998; Nibou *et al.*, 2010).

O espectro ATR-FTIR observado para a nanozeólita Nano-LTA revela bandas de absorção na região espectral de 465, 557, 674, 996 e 1648cm^{-1} (Figura 19c). Essas bandas estão de acordo com os dados reportados na literatura (Pirutko *et al.*, 2001). As bandas de absorção em 665 cm^{-1} podem ser atribuídas às vibrações internas do tetraedro da Nano-LTA (Si, Al)O_4, ao passo que a banda em 996 cm^{-1} é atribuída às vibrações assimétricas para tetraedro (Si, Al)O_4 da Nano-LTA. No que diz respeito às bandas de absorção observadas na faixa espectral de 420–500 cm^{-1} e 950–1250cm^{-1}, podem ser relacionadas com a vibração das ligações do grupo T-O-T (T= Al,Si) (Azizi, Dehnavi e Joorabdoozha, 2013).

O espectro de FTIR-ATR da Nano-BEA (Figura 19d) mostra bandas de absorção típicas para a nanozeólita Beta na região espectral de 525, 573 e 623 cm^{-1}. As bandas intensas e alargadas na faixa espectral de 1060–1090 cm^{-1} são atribuídas às vibrações assimétricas (T-O-T) (Kantam *et al.*, 2006).

Na Figura 19e, observa-se o espectro ATR-FTIR da nanozeólita Nano-X e nota-se a presença de uma banda simétrica alargada em 744cm^{-1}, comumente, observada em Nano-X (Zhan *et al.*, 2001). Outra importante observação é que a vibração de anel duplo em 566cm^{-1}, típico de zeólita faujasita, aparece como duas bandas a 608 e 566 cm^{-1} em Nano-X (Zhan *et al.*, 2002).

4.2.1.3 Ressonância Magnética Nuclear (RMN-MAS) de ^{29}Si

As características estruturais das nanozeólitas, assim como a coordenação de silício das amostras, foram determinadas por espectroscopia de RMN-MAS ^{29}Si. Os espectros de RMN-MAS de ^{29}Si das amostras sintetizadas Nano-TS1, Nano-GIS, Nano-LTA, Nano-BEA e Nano-X estão descritos na Figura 20.

Na Figura 20, apresenta-se o espectro de RMN-MAS de ^{29}Si obtido para as amostras Nano-TS1, e nota-se um sinal intenso em -109,5 ppm, o que indica a predominância da espécie Si(4Si, 0Ti) e um deslocamento na região de 101 a -103 ppm, o qual sugere a presença da espécie tetraédrica Ti$(OSi)_4$ (Camblor, Corma e Valencia, 1998; Zhuang *et al.*, 2002).

Similarmente, Zhuang *et al.* (2002), visando compreender a falta de um sinal de RMN-MAS de ^{29}Si em zeólita TS-1, observaram que há um sinal de deslocamento quase imperceptível em -101 a -103 ppm, e esse sinal refere-se aos defeitos de Si-O-H e torna-se mais intenso em espectros de amostras com mais defeitos na estrutura devido à

incorporação do átomo de titânio. De acordo com a literatura, a partir da análise de RMN-MAS de ^{29}Si de zeólitas substituídas com heteroátomos (como o alumínio e o boro), pode-se facilmente identificar sinais para os núcleos de Si com o heteroátomo como vizinho mais próximo. Contudo, no caso do titânio observa-se que não há nenhum sinal de deslocamento químico bem resolvido que se refere aos átomos de silício, os quais são vizinhos mais próximos na estrutura de titânio (Blasco *et al.*, 1998; Zhuang *et al.*, 2002).

O espectro de RMN-MAS de ^{29}Si da amostra da nanozeólita beta calcinada é mostrado na Figura 20. A amostra apresenta dois sinais de deslocamento químico em cerca de -109,5 ppm e -101,5 ppm. O primeiro sinal Q4 refere-se à (4Si,0Al), enquanto o último pode resultar de Si (1OH, 3Si) ou Si (1Al, 3Si) (Fyfe *et al.*, 1991; Blasco *et al.*, 1998; Biemmi e Bein, 2008). Esse é um perfil de nanozeólitas com elevada relação Si:Al, uma vez que o sinal intenso é referente à espécie Si(4Si, 0Al) e indica que, na estrutura do material, predominam ligações do tipo Si-O-Si (Camblor, Corma e Valencia, 1998).

Comparando os espectros de RMN-MAS de ^{29}Si das amostras Nano-X, Nano-LTA e Nano-GIS, pode-se constatar (Figura 20) que eles apresentam um perfil de espectro característico de zeólitas com baixas razões Si/Al, de acordo com a literatura (Aguado, Serrano e Rodríguez, 2008). Esse conjunto de amostras apresentaram uma baixa razão Si/Al, ou seja, possuem elevadas quantidade de alumínio. Nesse caso, zeólitas na escala micrométrica com baixa razão Si/Al, caracterizadas com quatro coordenações de silício (denominado Q4), foram intensamente investigadas com espectroscopia de RMN-MAS de ^{29}Si e deslocamentos químicos são verificados para as cinco espécies de Q4 Si $(OAl)_4$, $Si(OAl)_3(OSi)$, Si $(OAl)_2(OSi)_2$, $Si(OAl)\text{-}(OSi)_3$ e Si $(OSi)_4$ atribuídas aos sinais em aproximadamente -84, -89, -94, -99 e -103 ppm, respectivamente (Fyfe *et al.*, 1991; Klinowski, 1991; 1993; Zhan *et al.*, 2002). Outra característica dos espectros de RMN-MAS de ^{29}Si de zeólitas é o alargamento do sinal referente à espécie Q3 (átomos de silício ligado a um grupo hidroxila) Si(3Si, 1OH) (Camblor, Corma e Valencia, 1998).

Os espectros de RMN-MAS de ^{29}Si das amostras Nano-X, Nano-LTA e Nano-GIS (Figura 20) mostram a presença dos cinco sinais diferentes com mudanças químicas no intervalo de -89 a -110 ppm. Esses deslocamentos químicos podem ser atribuídos aos diferentes ambientes de silício em Q3 $(Si(OSi/Al)_3OH)$ e Q4 $(Si(OSi/Al)_4)$ (Biemmi e Bein, 2008). Por exemplo, a nanozeólita Nano-X apresenta cinco picos de Q4 semelhantes às outras nanozeólitas. Contudo, existem alguns "ombros" pronunciados em seu espectro

de RMN-MAS ^{29}Si. Esses "ombros" fracos provavelmente são devidos à contribuição das espécies de Q3 (Zhan *et al.*, 2002).

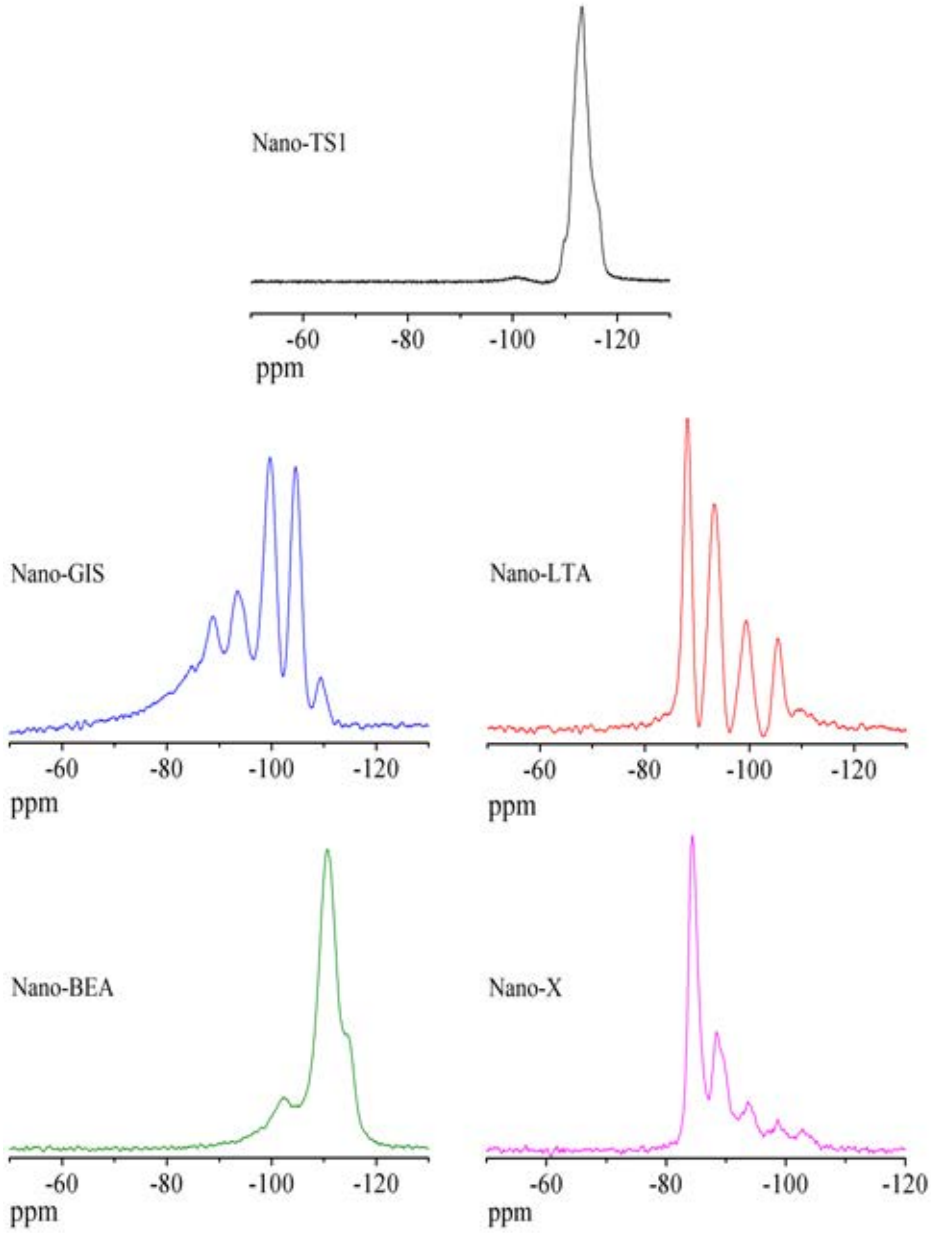


Figura 20 Espectros de RMN-MAS de ^{29}Si das amostras de nanozeólitas.

A composição química das amostras sintetizadas Nano-TS1, Nano-GIS, Nano-LTA, Nano-BEA e Nano-X foi determinada pela análise química elementar (ICP-OES) e os dados confirmaram as informações obtidas por RMN-MAS de ^{29}Si, conforme a Tabela 3. Nota-se que a relação SiO_2/Al_2O_3 para as amostras de Nano-BEA(≈22,2) e SiO_2/TiO_2 para Nano-TS1(≈74,2) é elevada, indicando a predominância das ligações do tipo Si-O-Si. Contudo, as amostras Nano-GIS (≈2,57), Nano-LTA(≈1,49) e Nano-X(≈1,59) apresentaram baixa relação SiO_2/Al_2O_3, ou alta quantidade de alumínio na estrutura.

Outra informação importante é que embora o resultado da Nano-GIS tenha indicado alta quantidade de alumínio na estrutura, observa-se que apenas 1,27% de Na_2O foi determinado para a amostra, mesmo após a troca iônica dos cátions de TMA^+ da estrutura da nanozeólita com íons de Na^+, conforme o procedimento descrito no *item 3.2.1.1*. Devido à baixa quantidade de íon de sódio, espera-se que a Nano-GIS seja menos efetiva na troca iônica quando comparada com as amostras Nano-LTA (Na_2O=11,69%) e Nano-X (Na_2O=13,97%), a baixa disponibilidade do cátion Na^+ da amostra Nano-GIS/Na, provavelmente, está relacionada com a incompleta remoção dos cátions tetrametilamônio (TMA^+), derivado do direcionador orgânico de estrutura.

Tabela 3 Composições químicas dos suportes nanozeolíticos obtidas por ICP-OES.

Amostra	***SiO_2 (%)***	***Al_2O_3 (%)***	***Na_2O (%)***	***TiO_2 (%)***
Nano-TS1	81,65	-	<0,01	1,10
Nano-GIS	42,73	16,60	1,27	-
Nano-LTA	37,42	24,98	11,69	-
Nano-BEA	81,92	3,69	<0,03	-
Nano-X/Na	33,23	20,84	13,97	-

4.2.1.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia de força atômica (AFM)

As técnicas de MEV e AFM foram utilizadas para uma caracterização mais detalhada da superfície desses nanomateriais, tais como o tamanho, a morfologia, a topografia, defeitos de superfícies e textura. Essas propriedades desempenham um papel fundamental na interação entre a nanozeólita e a enzima a ser imobilizada, conforme reportado na literatura (Binning *et al.*, 1982; Cederquist e Keating, 2009).

O tamanho e a morfologia das nanopartículas, em princípio, podem desempenhar um papel importante no processo de imobilização das enzimas. Por exemplo, a área superficial da matriz sólida é proporcional à sua capacidade efetiva de imobilização e, consequentemente, quanto maior a área superficial do suporte, mais enzimas são imobilizadas, dependendo da disponibilidade de sítios de ligação (Cederquist e Keating, 2009). Portanto, avaliar o tamanho e a disposição topográfica do suporte zeolítico é

importante por duas razões: (1) a rugosidade da superfície do sólido pode ser estimada permitindo uma comparação direta entre a rugosidade da superfície do sólido e a atividade catalítica e (2) uma correlação pode ser estabelecida entre a forma das nanopartículas e a quantidade de agente biológico imobilizado. Nesse sentido, a microscopia de força atômica pode ser uma técnica bastante versátil para se estudar a topografia da superfície de materiais com resolução nanométrica antes e após a imobilização das enzimas.

Os dados de MEV e AFM são apresentados para as nanozeólitas (Nano-TS1, Nano-GIS, Nano-LTA, Nano-BEA e Nano-X), cujas análises foram realizadas a partir de imagens de diferentes regiões representativas dessas amostras. Os dados obtidos indicaram que não houve variação na morfologia nas diferentes regiões analisadas e, devido à essa homogeneidade, apenas as imagens de 500nm das amostras com as melhores resoluções e qualidade foram escolhidas para representá-las (Figura 21, Figura 22, Figura 23, Figura 24 e Figura 25).

Na Figura 21a, a micrografia eletrônica da amostra de nanozeólita TS-1 (Nano-TS1) indica que a morfologia esférica e o diâmetro dos cristais (50 a 100nm) também corroboram os dados reportados na literatura (Cundy, Forrest e Plaisted, 2003; Cundy e Forrest, 2004). Nas medidas de topografia da nanozeólita TS-1 obtidas por AFM, a imagem de AFM bidimensional (2,5 x 2,5μm) indica que os cristais das nanozeólitas, na forma de aglomerados, cresceram uniformemente, confirmando a geometria quase esférica de 50–150nm (Figura 21b).

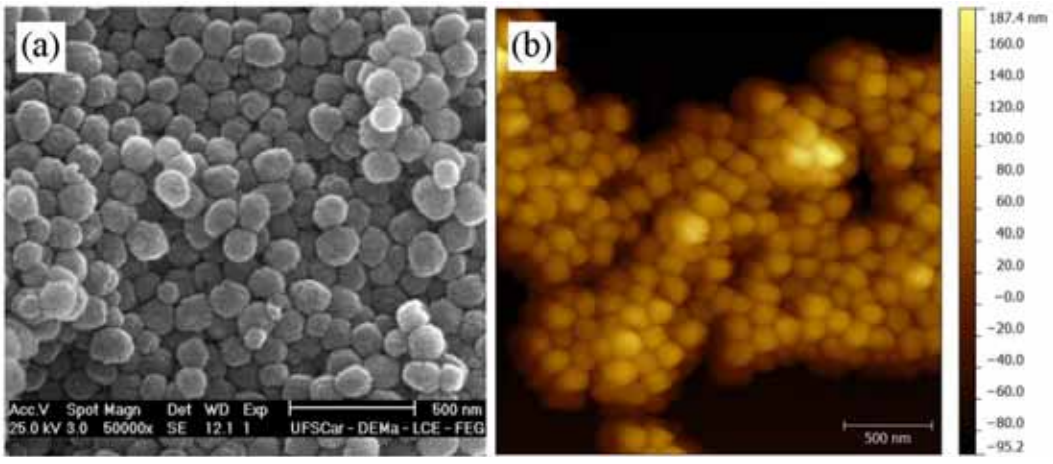


Figura 21 Imagens da nanozeólita TS-1 sintetizada. (a) micrografia eletrônica e (b) superfície dos dados de altura obtida no modo de *Tapping Mode* AFM, área avaliada 2,5x2,5μm.

A micrografia eletrônica da nanozeólita Nano-LTA (Figura 22a) revela partículas com uma morfologia esférica de diâmetro aproximado de 50–180nm. A imagem de AFM bidimensional da nanozeólita Nano-LTA também indica uma morfologia esférica, mas

ao contrário do que é observado nos dados de MEV, a superfície não é perfeitamente esférica, ou seja, é possível observar um certo grau de irregularidade por topografia de superfície (Figura 22b).

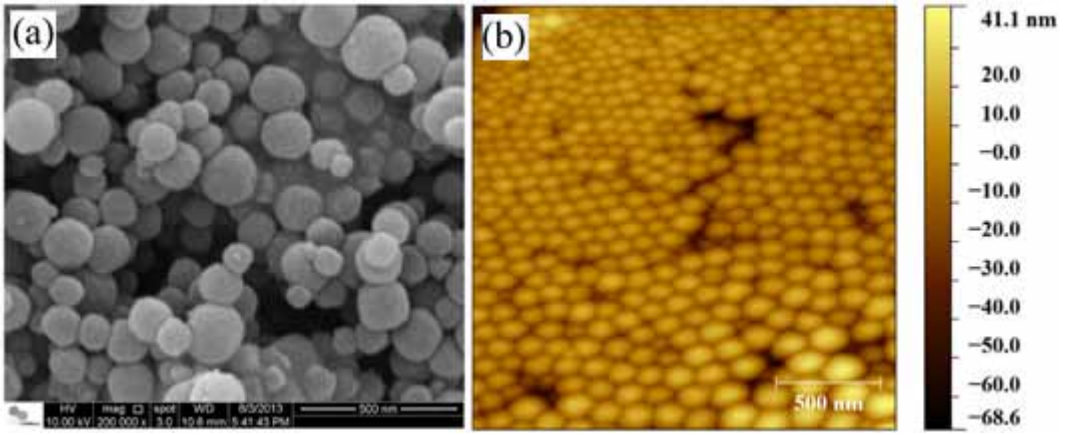


Figura 22 Imagens da nanozeólita LTA sintetizada. (a) micrografia eletrônica e (b) Imagem de contraste de fase da superfície dos dados de altura obtida no modo *Tapping Mode* AFM, área avaliada 2 x2 µm.

Os cristais da nanozeólita gismondina (Nano-GIS) foram cristalizados em forma esférica e o tamanho das partículas está na faixa de 50–100nm (Figura 23a), com característica morfológica e tamanho dos cristais semelhantes quando comparados com os dados reportados na literatura (Kecht *et al.*, 2004). Na Figura 23b, observa-se que a amostra analisada por AFM apresenta morfologia quase esférica com distribuição de tamanho entre 50-100nm.

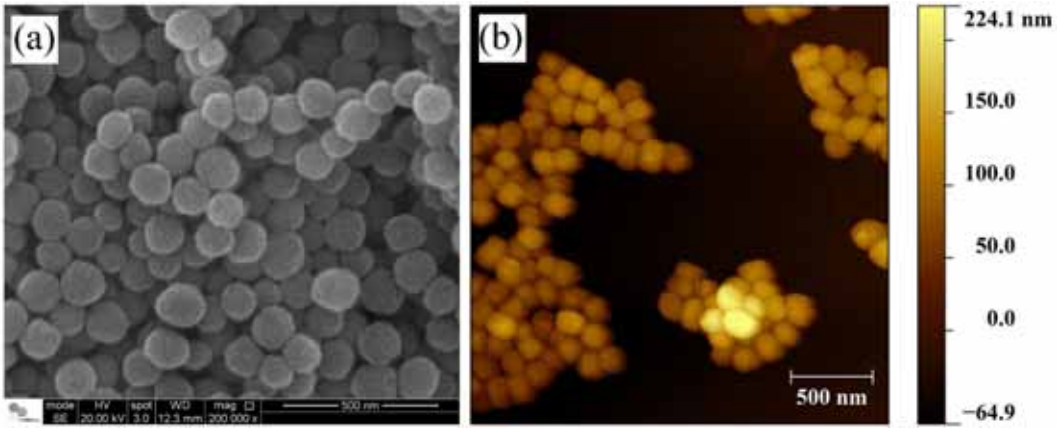


Figura 23 Imagens da nanozeólita GIS sintetizada. (a) micrografia eletrônica (b) Imagem de contraste de fase da superfície dos dados de altura obtida no modo Tapping Mode AFM, área avaliada 500x500nm.

A morfologia da nanozeólita Nano-BEA (Figura 24a) é complexa e de difícil identificação além de mostrar claramente que os cristais aparentemente cresceram

interligados formando aglomerados. Essa formação de aglomerados é típica da morfologia da nanozeólita Nano-BEA, que é atribuída, principalmente, à formação de dois polimorfos com tamanho de aproximadamente 50nm (Larlus *et al.*, 2011). A análise da topografia (Figura 24b) indica a formação ou presença de cristais com geometria irregulares com tamanho aproximado de 30–50nm.

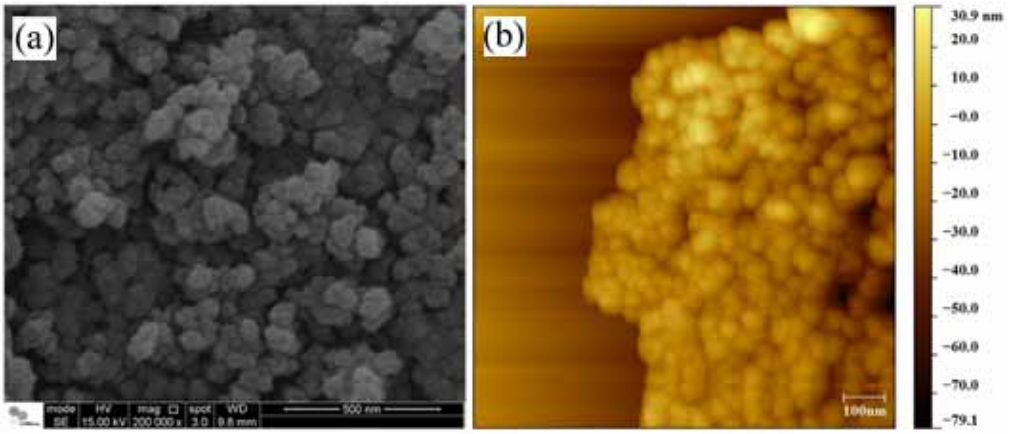


Figura 24 Imagens da nanozeólita BEA sintetizada. (a) micrografia eletrônica e (b) Imagem bidimensional da superfície dos dados de altura obtida no modo *Tapping Mode* AFM.

A análise da amostra da nanozeólita X pura (Nano-X/Na) por MEV, ilustrada na Figura 25a, mostra, claramente, que os cristais estão na forma esférica e bastão e que, aparentemente, cresceram interligadas formando aglomerados. Essa formação de aglomerados é típica da morfologia da nanozeólita Nano-X (Zhan *et al.*, 2001; Zhan *et al.*, 2002). Com a finalidade de caracterizar de forma mais precisa as morfologias da amostra Nano-X aglomerada, análises de AFM foram realizadas. Nota-se, na Figura 25b, a presença de partículas nanométricas com morfologia irregular, contudo com uma granulometria média inferior a 100nm.

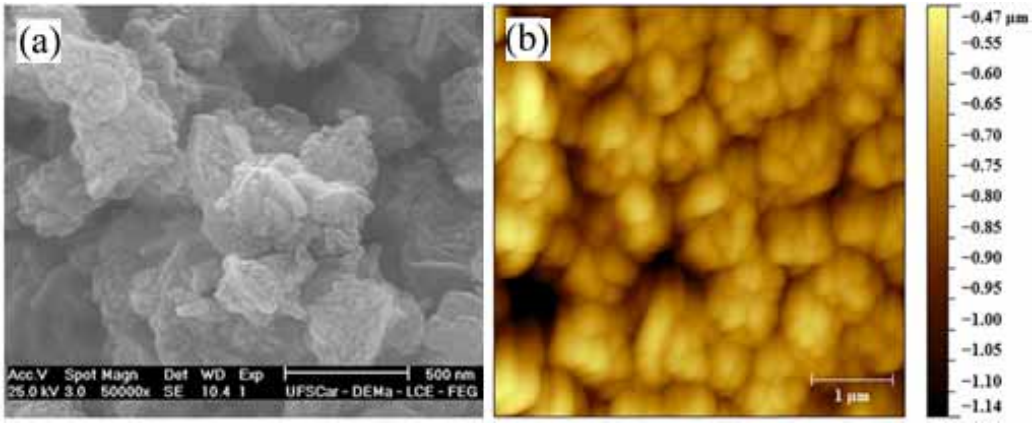


Figura 25 Imagens da nanozeólita Nano-X sintetizada. (a) micrografia eletrônica e (b) Imagem bidimensional da superfície dos dados de altura obtida no modo *Tapping Mode* AFM, área avaliada 5x5µm.

4.2.1.5 Microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução

A técnica de Microscopia Eletrônica de Transmissão de alta resolução (doravante HRTEM, a sigla em inglês) é uma ferramenta importante para realizar caracterizações estruturais e a maior parte dos estudos com uso dessa técnica está relacionada com o ordenamento estrutural do material cristalino. No caso específico desta pesquisa, o emprego dessa técnica objetiva o estudo das modificações estruturais e o ordenamento de zeólitas *antes* e *depois* da imobilização de enzimas. Há alguns relatos na literatura que descrevem o seu emprego para essa finalidade. Shah *et al.* (2007) utilizaram as imagens de HRTEM para compreender a natureza da interação entre a enzima *P-Glicolato fosfatase* (doravante PGA, sigla em inglês) e a zeólita SBA-15. Os resultados obtidos por eles mostraram que as características hexagonais da SBA-15 foram mantidas, a incorporação da enzima PGA não afetou a estrutura original do poro da SBA-15 e a enzima PGA imobilizada apareceu como objetos pretos nas paredes da zeólitas.

Yu *et al.* (2006) relataram que a adsorção de proteínas em nanozeólita LTA é fortemente dependente do tamanho e do plano cristalino dos nanocristais. Os autores observaram que, além da área de superfície externa e da densidade de carga superficial, a topografia (plano de cristal e curvatura da superfície) é um fator importante na adsorção da proteína na superfície da nanozeólita. As imagens de HRTEM permitiram determinar as dimensões da abertura dos poros e o plano cristalino e, assim, selecionar o suporte ideal para adsorção de proteínas.

Assim sendo, diante do potencial que essa técnica oferece, grande esforço foi empenhado para se obter dados das nossas amostras analisadas por HRTEM, no Laboratório Nacional de Nanotecnologia-Campinas (LNNano), e posteriormente usá-los para uma melhor compreensão da complexa interação entre a enzima e a superfície das nanozeólitas.

Os dados de HRTEM para a amostra Nano-TS1 estão representadas na Figura 26. As imagens estão organizadas em dois tipos de magnificações: (i) baixa amplificação do sinal (Figura 26d) e (ii) amplificações em alta resolução (HR) (Figura 26a-c). As imagens de alta resolução (Figura 26a-c) revelam a estrutura de poros desse material, enquanto que as imagens de baixas magnificações (Figura 26d) revelam os aspectos morfológicos da amostra, notando-se que essa amostra é composta por partículas de morfologia esférica e com distribuição do diâmetro da partícula de 70-100nm. Esses dados se correlacionam

com as análises por MEV e AFM, as quais indicaram que esse material é formado por nanocristais uniformes de 70-100nm.

As imagens em altas magnificações (Figura 26a-c) de um único cristal da Nano-TS1 mostram um grande volume de microporos e elevada porosidade textural. Os resultados evidenciam um ordenamento periódico em arranjo hexagonal dos poros (Figura 26a), ao passo que numa imagem com maior resolução ou detalhamento (Figura 26c), obtida perpendicularmente às paredes microporosas das nanozeólitas, constata-se um conjunto de canais em forma de franjas com espaçamento interplanar de 0,89nm, que corresponde à separação entre os planos da rede cristalina da nanozeólita, sugerindo que as paredes que compõe a estrutura desse material são altamente cristalina; deve-se salientar que as franjas experimentalmente aqui observadas são bastante comuns em materiais zeolíticos com topologia MFI (Valtchev, Tosheva e Bozhilov, 2005; Choi *et al.*, 2009; Na *et al.*, 2011) e que o padrão de difração FFT (*Fast Fourier Transform*) da imagem (Figura 26b) também confirma a natureza altamente cristalina desse material.

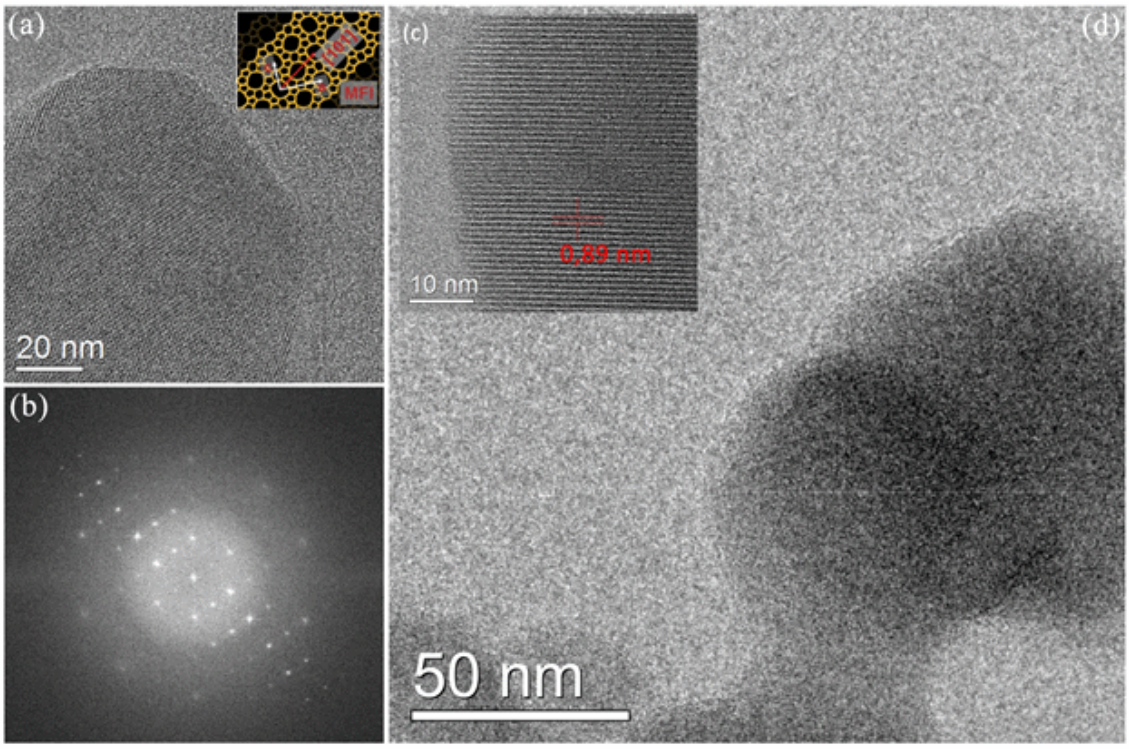


Figura 26 Imagem de HRTEM da nanozeólita TS-1. *Inset* mostra o modelo estrutural da zeólita com topologia MFI. Micrografia em alta resolução de uma única nanopartícula TS-1[(a) e (c)]. Difratograma de Fourier (b) e HRTEM em baixa magnificação (d).

As imagens de HRTEM em alta magnificação da nanozeólita LTA são apresentadas na Figura 27. Para a obtenção dessas imagens selecionou-se uma partícula

da nanozeólita LTA com diâmetro de aproximadamente 50nm. A análise dessa partícula indica claramente as franjas resolvidas com espaçamento de 0,82nm, as quais podem ser atribuídas aos planos (200) ou (220) da estrutura cúbica da nanozeólita LTA (Figura 27a). Além disso, não foi verificado nenhum intercrescimento de diferentes orientações nas franjas, mostrando que cada cristal de zeólita foi gerado a partir de um único núcleo isolado das partículas do gel precursor (Mintova *et al.*, 1999; Phan Huy, Yoon e Kim, 2012). Outra informação obtida é a presença de microporos observados no espaço entre as franjas, conforme mostrado no detalhe apresentado na Figura 27a. No módulo campo escuro (*darkfield*), o qual exclui os feixes não difratados, a imagem (Figura 27b) permite confirmar de forma precisa o diâmetro de uma partícula isolada (52,32nm).

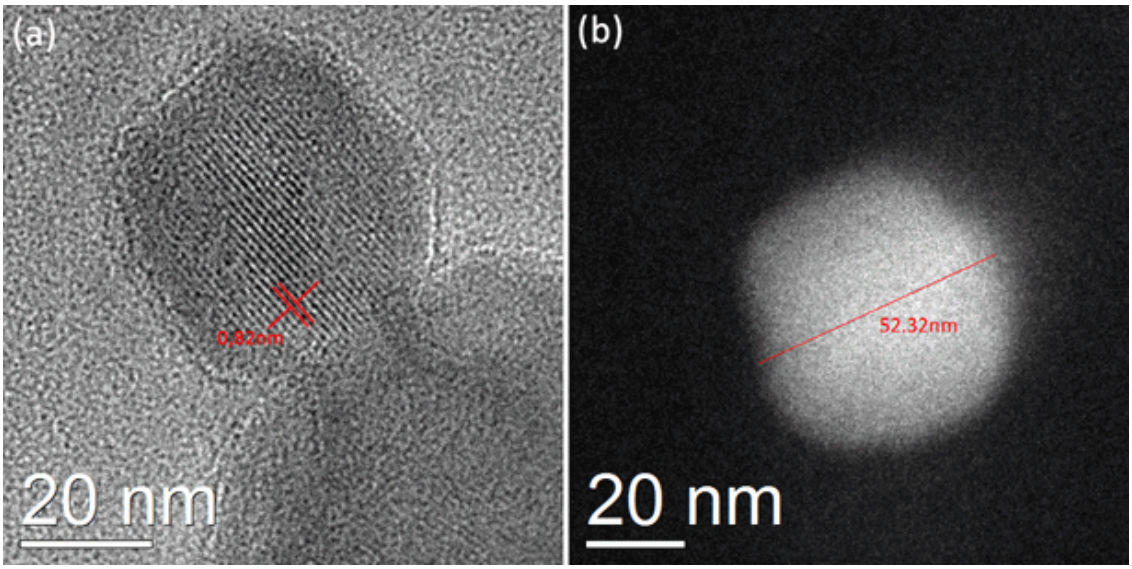


Figura 27 Nanozeólita LTA altamente cristalina obtida pelo método hidrotermal (duas formas diferentes de representação). (a) HRTEM imagem da nanozeólita microporosa LTA e (b) Imagem de campo escuro (*Dark Field)*.

As amostras de referência Nano-TS1 e Nano-LTA apresentaram cristais bem definidos, com morfologia e espaçamento interplanares regulares e com poucos defeitos estruturais. Todavia, as imagens representativas de HRTEM das amostras Nano-BEA e Nano-GIS (Figura 28) indicaram sensibilidade ao feixe de elétrons para as análises em alta resolução. Na análise da amostra Nano-BEA (Figura 28a) é possível visualizar os microporos, mas informações do ordenamento estrutural foram perdidas devido à influência do feixe de elétrons. No caso da amostra Nano-GIS, o feixe em alta resolução provocou o completo desordenamento estrutural e a amorfização do material antes da obtenção da imagem em alta resolução do material, conforme ilustrado na Figura 28b.

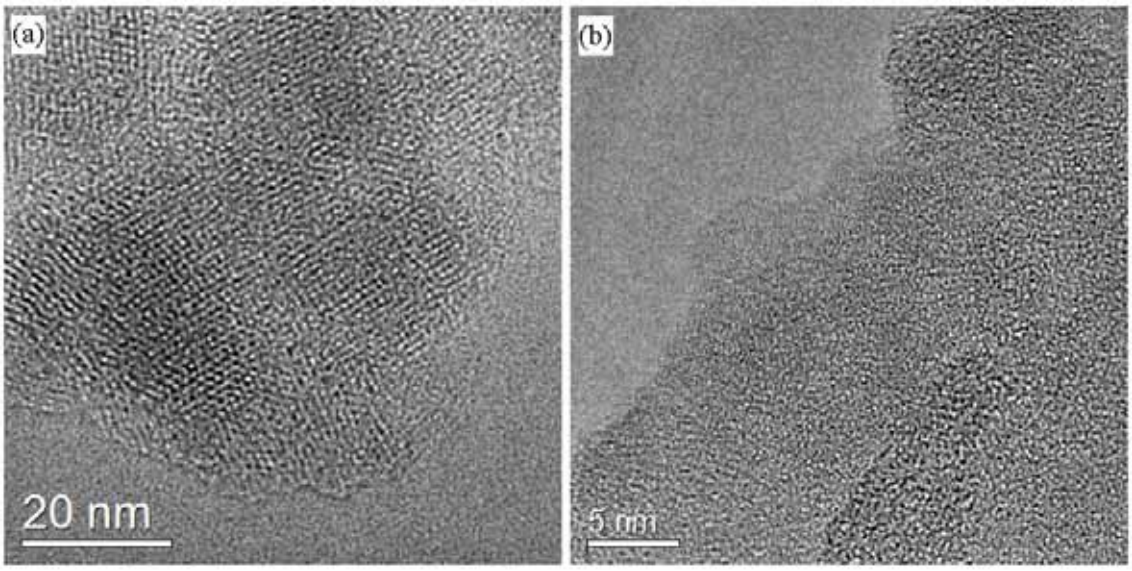


Figura 28 Imagens de HRTEM das diferentes nanozeólita. (a) Nano-BEA e (b) Nano-GIS.

Deve ser ressaltado que as zeólitas são altamente sensíveis ao feixe de elétrons para a obtenção de imagens de HRTEM em alta resolução (voltagem de 300kV), portanto, é comum problemas de degradação das amostras de zeólitas nessas condições. Para a obtenção dessas imagens em alta resolução ou magnificação, a principal dificuldade encontrada estava relacionada ao pouco tempo disponível para o ajuste de parâmetros do próprio equipamento, essenciais para a obtenção de imagens em HRTEM, principalmente, a otimização do microscópio e a orientação das partículas de nanozeólitas antes da perda da natureza cristalina das nanozeólitas, pelo tempo excessivo de exposição ao feixe de elétrons. Além disso, o contraste das imagens de HR-TEM é fraco, sendo necessário uma maior irradiação de elétrons para melhorar a qualidade da imagem, o que pode provocar a degradação de zeólitas com estrutura periódica sensíveis ao feixe de elétrons (Yoshida *et al.*, 2013). Dessa forma, observa-se que é difícil obter imagens de zeólita em alta resolução, uma vez que as informações estruturais podem ser facilmente perdidas sob a influência do feixe de elétrons. Infelizmente, dentre as diferentes estruturas nanozeolíticas avaliadas neste estudo, apenas as amostras Nano-TS1 e Nano-LTA mantiveram-se totalmente estáveis nas condições de análise em alta resolução (voltagem 300kV).

Verificada essa dificuldade de obter imagens de zeólitas por microscopia eletrônica de transmissão em alta resolução (HR-TEM), a fim de evitar a possível degradação provocada pelo feixe em alta resolução, a amostra da nanozeólita Na-X foi analisada utilizando um microscópio com aceleração da voltagem em 200kV.

Os dados de MET obtidos no módulo campo escuro (*darkfield*) — que exclui os feixes não difratados da amostra Nano-X/Na —, estão representados na Figura 29. As imagens estão organizadas em dois tipos de magnificações, (i) baixa amplificação do sinal (a e b) e (ii) alta amplificação do sinal (c). Nas imagens de baixas magnificações (Figura 29a–b), observa-se nitidamente aglomerados (≈250nm) de muitas partículas na amostra, enquanto que a imagem de alta resolução (Figura 29c) apresenta uma partícula isolada do aglomerado que revela um cristal bem definido, com dimensões de 20x150 nm e bordas regulares.

O espectro da análise de energia dispersiva de raios-X (EDX) da Nano-X/Na (Figura 29d) foi obtido da área assinalada (Figura 29a). Observa-se claramente que a Nano-X/Na é rica em Si, Al, O e Na. Nenhum sinal de impureza com metal de transição foi encontrado, com exceção da presença do cobre. Todavia, tal presença, não indica impureza, pois o cobre identificado deve-se à grade de cobre revestida com carbono usada na análise de MET. Na Figura 29e, a imagem da difração por elétrons da amostra ilustra a natureza cristalina da amostra e as principais reflexões existentes, sendo possível visualizar *spots* de difração em forma de anel correspondentes aos planos cristalinos (111), (220), (311) e (331) (Zhan *et al.*, 2001; Zhan *et al.*, 2002).

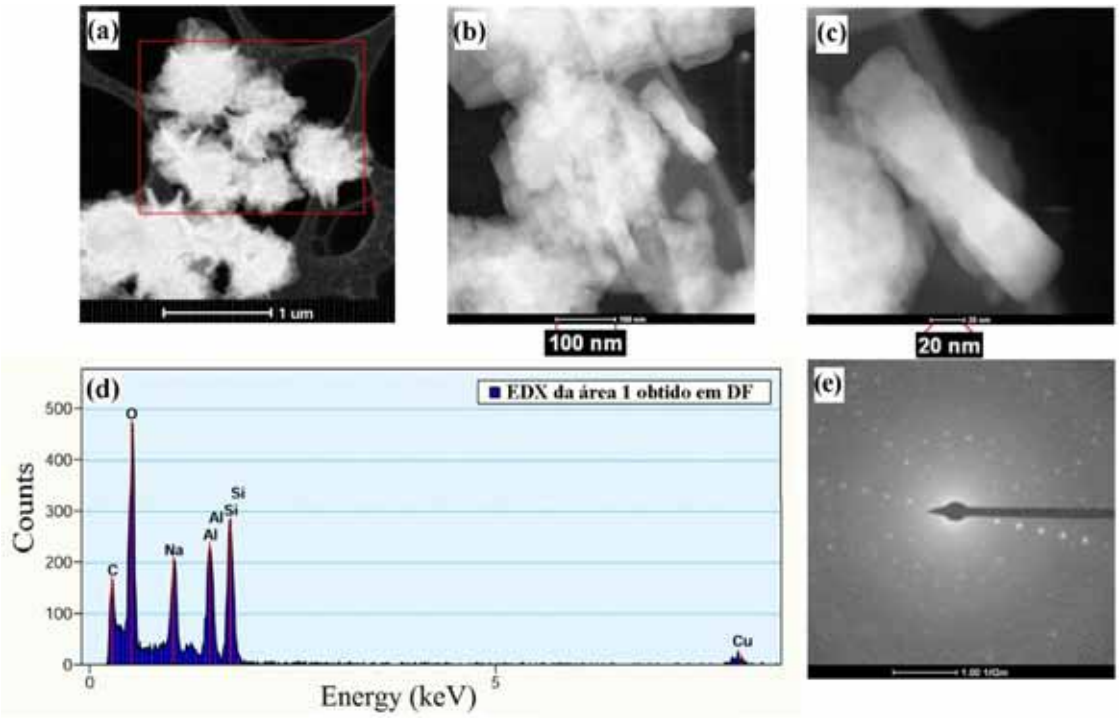


Figura 29 Imagens de MET em campo escuro (*Dark field*) da nanozeólita Nano-X (a-c), espectros de raios-x de energia dispersiva(EDX) (d) e padrão de difração de elétrons (e).

4.2.1.6 Resultados da caracterização dos complexos nanozeólitas/enzima-RML

Na proposta inicial do doutorado propusemos a investigação do comportamento e do potencial de cinco diferentes nanozeólitas, como possíveis suportes sólidos para a imobilização das lipases provenientes dos microrganismos *R. miehei* (RML), *T. lanuginosus* (TLL), *C. antarctica* (CA) e *B. cepacia* (BC) e avaliar os complexos nanozeólita-enzima na produção de biodiesel. Todavia, as lipases de *C. antarctica* e *B. cepacia* apresentaram ausência e baixa atividade de esterificação nas condições testadas, respectivamente, quando elas foram analisadas por zimografia (*item 4.1.4*). Isto não significa que elas não são apropriadas para a produção de biodiesel, uma vez que a reação alvo é a transesterificação. Contudo, dados preliminares utilizando essas duas enzimas na forma livre na reação de transesterificação também indicaram que houve baixa conversão do óleo de palma a biodiesel. Os produtos dessas reações catalisadas pelas lipases livres *C. antarctica* e *B. cepacia* não foram analisados por CG, devido ao baixo rendimento de ésteres etílicos. Sendo assim, os resultados dos estudos sistemáticos de imobilização de enzimas nos suportes nanozeolíticos, aqui ilustrados, são apenas para as duas lipases mais eficientes de *R. miehei* e *T. lanuginosus*.

A etapa inicial de seleção dos suportes foi efetuada empregando-se a enzima de *R. miehei* (RML) como referência, uma vez que já foi adquirida experiência em estudos anteriores realizados pelo nosso grupo de pesquisa com uso dessa lipase. Os resultados obtidos foram bastante significativos e, em virtude desse fato foram publicados dois artigos científicos (De Vasconcellos *et al.*, 2012; Bergamasco *et al.*, 2013).

Neste presente trabalho, os estudos iniciais de imobilização da lipase de *R. miehei* foram conduzidos utilizando-se as nanozeólitas Nano-X/Na, Nano-BEA, Nano-TS1, Nano-LTA/Na, Nano-GIS/Na e os dados obtidos são mostrados na Tabela 4. Com relação às porcentagens de imobilização da enzima *R. miehei* nos suportes zeolíticos, os dados indicaram que a maior imobilização ocorre para Nano-TS1 (31,9±0,8%), enquanto a menor imobilização ocorre para Nano-GIS/Na (18,3± 0,6%) e também para o suporte Nano-X/Na (20,6±0,9%). Os suportes zeolíticos Nano-BEA/Na e Nano-LTA/Na apresentam valores intermediários (23,0± 0,4% e 22,7± 0,2%).

A análise se torna mais interessante quando se correlacionam, não apenas a porcentagem de enzimas imobilizadas em função da estrutura, como também os dados de atividade enzimática. Nesse caso, pode-se observar que a maior atividade enzimática está no suporte Nano-BEA, que apresentou uma imobilização de 23,0± 0,4% e uma atividade

enzimática de 5,4±0,8U/mg-suporte para o complexo com a enzima. Esse dado é diferente em relação ao suporte Nano-LTA/Na, que também apresenta uma porcentagem de imobilização semelhante de 22,7±0,2%, porém, uma menor atividade do complexo Nano-LTA/Na-RML 0,8±0,2 U/mg-suporte. Outro caso interessante é o do suporte Nano-TS1, pois, embora tenha obtido a maior concentração de enzima imobilizada (31,9± 0,8%) comparada com os outros suportes, a atividade do complexo Nano-TS1-RML foi menor que 0,9±0,3 U/mg-suporte, indicando uma forte inativação da enzima.

Tabela 4 Porcentagem de imobilização e atividade enzimática para as diferentes nanozeólitas na forma pura (sódica), conforme descrito no *item 3.3.2*. Carga enzimática oferecida de 10mg proteína/g de suporte.

Suporte zeolítico	**Quantidade de enzima imobilizada no suporte** (mg/g suporte)	**Imobilização** (%)*****	**Atividade enzimática** (U/mg suporte)
Nano-X/Na	2,1	20,6±0,9	3,2±0,3
Nano-BEA	2,3	23,0± 0,4	5,4±0,8
Nano-TS1	3,2	31,9± 0,8	0,9±0,3
Nano-LTA/Na	2,7	22,7± 0,2	0,8±0,2
Nano-GIS/Na	1,8	18,3± 0,6	4,7±0,1

*Porcentagem de imobilização de *Rhizomucor miehei* = (massa de enzima na solução final (m*f*)/ massa de enzima na solução inicial (m*i*))*100.

Os testes com as diferentes estruturas nanozeolíticas permitem seguramente afirmar que a porcentagem de enzima imobilizada e a atividade enzimática são dependentes da estrutura cristalina dos suportes sólidos. Porém, como já era esperado uma baixa atividade enzimática foi observada para os suportes zeolíticos na sua forma pura, uma vez que a literatura reporta um comportamento semelhante para zeólita micrométrica em sua forma sódica (Yagiz, Kazan e Akin, 2007; De Vasconcellos *et al.*, 2012).

Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que o aumento da concentração de proteína imobilizada pode restringir o acesso do substrato aos sítios catalíticos da enzima por obstrução (efeito de transferência de massa) ou a imobilização pode ter provocado mudanças na conformação da enzima. De acordo com Mateo *et al.* (2007), a imobilização, na maior parte dos casos, produz ligeiras distorções na estrutura da enzima e isso pode alterar suas propriedades finais. Essas alterações não são controladas e, dessa forma, é

importante fazer uma seleção de suportes com uso de diferentes estratégias no intuito de encontrar soluções adequadas para a imobilização enzimática.

A partir do conhecimento prévio descrito na literatura (Serralha *et al.*, 1998) e também do trabalho desenvolvido pelo nosso grupo de pesquisa (De Vasconcellos *et al.*, 2012) sobre a influência do meio catiônico do suporte sólido na imobilização de enzimas, o passo seguinte foi fazer os mesmos experimentos, porém, dessa vez, usando as zeólitas derivadas das trocas iônicas.

4.3 Caracterização das nanozeólitas trocadas com cátions de transição e o efeito no desempenho catalítico dos complexos (nanozeólita/enzima) na transesterificação enzimática de óleo palma

4.3.1 Troca iônicas das nanozeólitas

Com o objetivo de obter materiais mais ativos, explorou-se a propriedade de troca iônica, principalmente para a nanozeólita (Nano-X e Nano-LTA), uma vez que com base na literatura e no trabalho publicado pelo nosso grupo em 2012 (De Vasconcellos *et al.*, 2012), é sabido que a troca iônica parcial ou total de zeólitas na escala micrométrica modifica: (a) as características dos materiais zeolíticos e (b) a forma como estes interagem com a enzima, o que, por consequência, torna os suportes muito mais ativos para a imobilização de enzimas (De Vasconcellos *et al.*, 2012).

A nanozeólita Nano-X foi escolhida para determinar os parâmetros ideais de troca iônica, pois esta nanozeólita é sintetizada pelo método hidrotermal convencional, sem adição de direcionadores orgânicos de estrutura, que torna o processo mais eficiente e econômico. Além disso, a Nano-X apresenta elevada quantidade de alumínio, ou seja, possui baixa razão Si/Al, o que favorece os estudos de troca iônica (Zhan *et al.*, 2001; Zhan *et al.*, 2002).

4.3.1.1 DRX dos derivados da troca iônica obtidos a partir da nanozeólita Nano-X/Na trocada com cátions de transição

A análise dos padrões de DRX (Figura 30–34) da amostra de Nano-X/Na sintetizada e seus derivados, obtidos em diferentes condições de troca iônica, revelou a flexibilidade da estrutura da Nano-X ao meio catiônico dominante, a concentração do íon e o tempo de troca iônica.

Inicialmente, de acordo com a metodologia descrita no *item 3.2.2.1* foi realizada a troca iônica da nanozeólita Nano-X com os seguintes cátions: Mn^{2+}, Cu^{2+}, Co^{2+}, Zn^{2+} e Ni^{2+}, em baixa concentração molar dos íons em solução (0,1M), tempo (16h) e temperatura (60ºC). Após a troca iônica dos materiais, foram estudados os difratogramas de raios-X das amostras da nanozeólita NaX, trocada com os diferentes cátions (Nano-X/Mn/0.1M, Nano-X/Cu/0.1M, Nano-X/Co/0.1M, Nano-X/Zn/0.1M e Nano-X/Ni/0.1M) em comparação ao da nanozeólita na sua forma sódica (Nano-X/Na), a fim de observar se ocorreu alguma mudança na estrutura cristalina da zeólita após a realização da troca iônica. Os difratogramas dessas amostras estão apresentados na Figura 30.

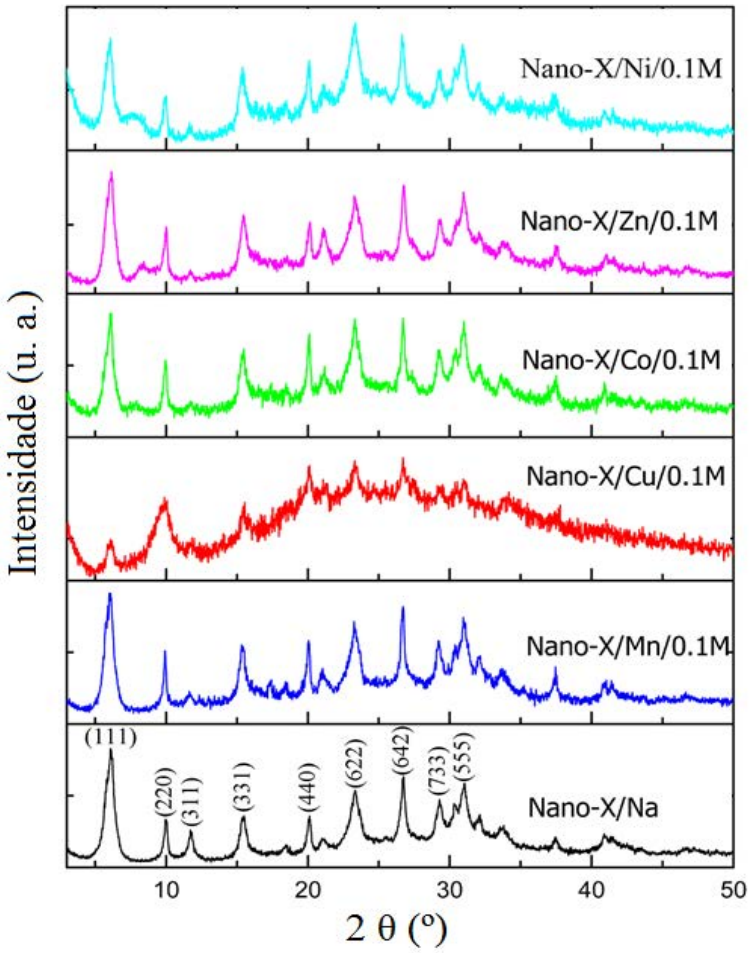


Figura 30 Difratograma da nanozeólita faujasita (Nano-X) trocada com os cátions de manganês (0,1M), cobre (0,1M), cobalto(0,1M), zinco (0,1M) e níquel (0,1M) em comparação com a sua forma sódica (Nano-X/Na).

A análise dos padrões de DRXs dessas amostras revelam que não houve nenhuma mudança estrutural significativa comparada com a amostra original (Nano-X/Na), ou seja, a maior parte das reflexões originais de Bragg, originalmente presentes na amostra (Nano-X/Na) sintetizada, foram mantidas. Todavia, para todas as amostras ocorreu uma diminuição na intensidade das reflexões de difração devido à incorporação dos cátions, uma vez que as amostras foram analisadas em condições experimentais semelhantes: mesma quantidade de amostras e porta-amostra.

Nesses experimentos, observou-se que o processo de troca-iônica não induziu mudanças estruturais significativas. Assim, estudos de troca iônica em função do tempo foram realizados, e estes foram feitos novamente com amostra (Nano-X/Na) submetida à troca iônica, de acordo com as seguintes condições: concentração da solução de níquel (0,1M), tempo (4h, 16h, 24h e 36h) e temperatura (60ºC), porém apenas um cátion foi selecionado para esse estudo exploratório. Cabe ressaltar que o níquel foi escolhido pelo fato de termos resultados positivos de sinergia na produção de biodiesel com o uso de lipase de *Rhizomucour miehei* imobilizada em microzeólita gismondina trocada com níquel (De Vasconcellos *et al.*, 2012) e também, após nossos estudos, outros autores terem observado efeito semelhante. Embora Wu *et al.* (2014) tenha utilizado lipases extraída do pâncreas de suínos imobilizada em pó cerâmico contendo Ni^{2+} (Ni-MCP) observaram uma ativação semelhante para a síntese de acetato de cinamila.

Os padrões de DRX das amostras Nano-X/Ni/4h, Nano-X/Ni/16h, Nano-X/Ni/24h e Nano-X/Ni/36h, mostrados na Figura 31, revelam que não houve mudanças significativas na estrutura. As reflexões de Bragg foram mantidas semelhante ao material original (Nano-X/Na) durante os períodos de tempo 4h, 16h e 24h, sendo observada apenas uma diminuição na intensidade dos picos de difração, como reportado anteriormente. Porém, para as amostras trocadas com níquel (36h), ocorreram mudanças estruturais, provavelmente devido à maior incorporação do cátion de níquel na estrutura cristalina da zeólita; pode-se notar ausência de algumas reflexões originalmente presentes na topologia da estrutura FAU (Nano-X/Na) e uma amorfização do material em relação à estrutura original.

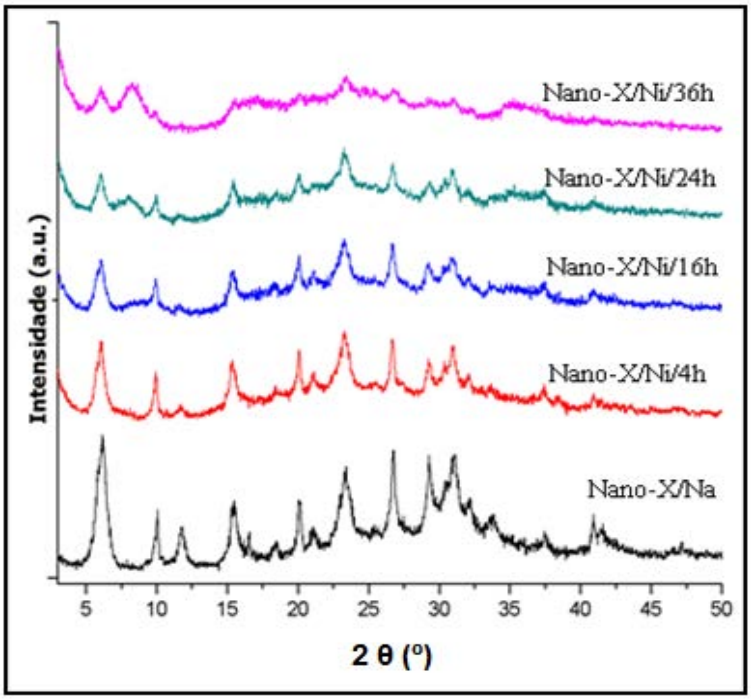


Figura 31 Difratograma da nanozeólita faujasita (Nano-X/Na) trocada com os cátions de níquel (0,1M) em diferentes tempos de exposição a solução a solução salina.

Outro parâmetro avaliado para a amostra (Nano-X/Na) foi a troca iônica nas seguintes condições: soluções em três diferentes concentrações molares de níquel (0,1M, 0,3M e 0,5M), tempo (36h) e temperatura (60ºC). A análise dos padrões de DRX das amostras Nano-X/Ni/0.1M, Nano-X/Ni/0.3M e Nano-X/Ni/0.5M (Figura 32) revela que as mudanças estruturais foram praticamente as mesmas e todas as amostras apresentaram características cristalográficas semelhantes. Ou seja, várias das reflexões originais desapareceram e houve diferentes graus de amorfização para as amostras Nano-X/Ni/0.1M, Nano-X/Ni/0.3M e a formação, provavelmente, de um material lamelar foi observada para a amostra Nano-X/Ni/0.5M. Embora seja possível observar uma diminuição da cristalinidade desses materiais, será mostrado mais adiante, na análise textural por adsorção de N_2, que esses materiais obtidos em alta concentração molar apresentam um aumento na área superficial e no volume de microporos, além da maior capacidade de adsorção de N_2. Em particular, os parâmetros dos poros e tamanho de partícula determinam a área total da superfície e, assim, afetam significativamente a capacidade de imobilização das enzimas e a atividade enzimática (Brena, González-Pombo e Batista-Viera, 2013).

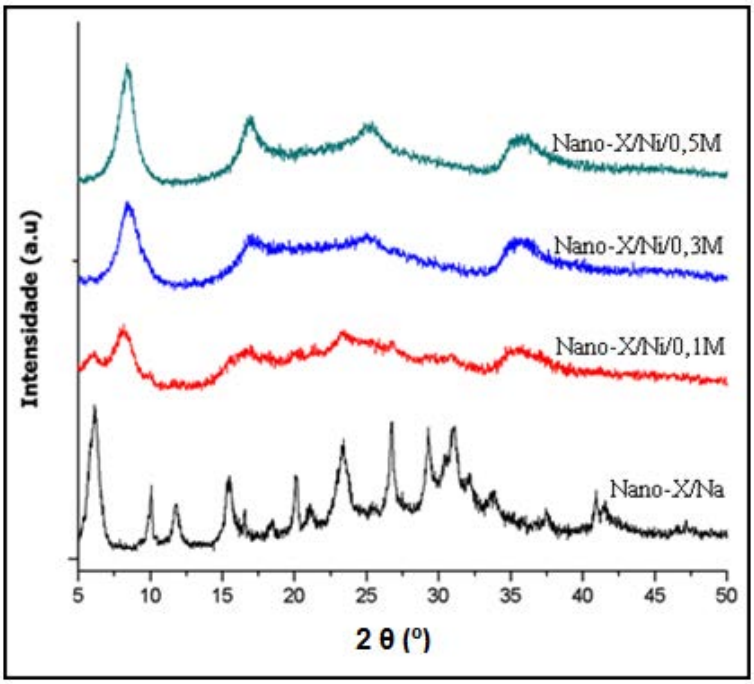


Figura 32 Difratograma da nanozeólita faujasita (Nano-X/Na) trocada com os cátions de níquel em diferentes concentrações molares.

Após os resultados prévios obtidos com a troca iônica utilizando íons de níquel como referência, observou-se um comportamento interessante na troca iônica em alta concentração molar para a nanozeólita (Nano-X/Na). Assim, decidiu-se fazer outro estudo exploratório de troca iônica dessa mesma nanozeólita (Nano-X/Na) utilizando diferentes cátions (Cu^{2+}, Zn^{2+}, Mn^{2+}, Co^{2+} e Ni^{2+}) em alta concentração molar. O objetivo desse tratamento foi melhorar o potencial de imobilização das lipases nesses novos materiais e analisar a influência da natureza do cátion na imobilização enzimática. Para atingir esse propósito, os experimentos foram feitos nas seguintes condições experimentais: concentração da solução do cátion (0,5M), a 60ºC por 36 horas.

A Figura 33 mostra o padrão de difração (DRXs) para esses materiais obtidos por troca iônica em alta concentração molar (0,5M) e, diferentemente dos resultados obtidos, usando-se uma concentração de 0,1M, os dados indicam que ocorreu a formação de materiais completamente diferentes da estrutura original. Os dados de DRXs dos derivados da troca iônica Nano-X/Cu/0.5M, Nano-X/Co/0.5M, Nano-X/Zn/0.5M e Nano-X/Ni/0.5M claramente indicam a ocorrência de mudanças cristalográficas drásticas em relação à amostra original.

A única exceção foi observada para o derivado de troca iônica Nano-X/Mn/0.5M, que manteve as reflexões de Bragg originais presentes em Nano-X/Na. Além da ausência

das reflexões de Bragg originais, observou-se que os derivados da troca iônica Nano-X/Co/0.5M, Nano-X/Zn/0.5M e Nano-X/Ni/0.5M mostraram alargada e baixa intensidade nas reflexões de Bragg, fornecendo evidências do pequeno tamanho dos seus cristais. Os dados de MEV e MET confirmaram essa observação (Figura 39 e Figura 40).

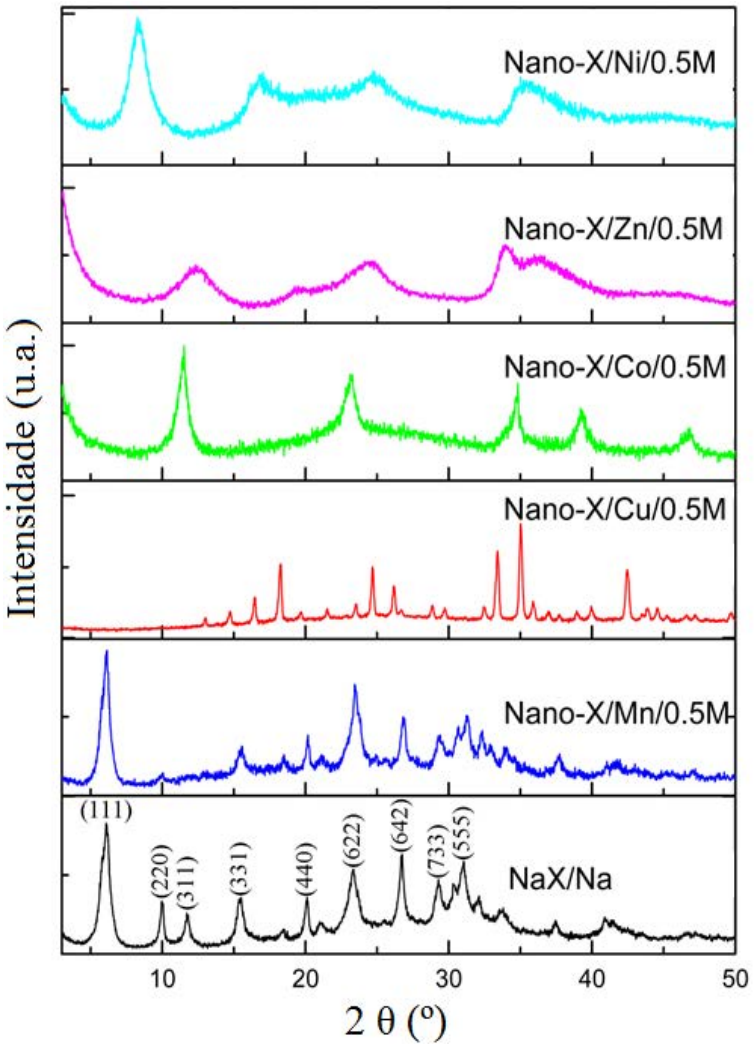


Figura 33 Difratogramas dos derivados da nanozeólita X (Nano-X/Na) trocada com os diferentes cátions de metais de transição. Nano-X/Mn/0.5M, Nano-X/Cu/0.5M, Nano-X/Co/0.5M, Nano-X/Zn/0.5M, Nano-X/Ni/0.5M.

Torna-se evidente, a partir desses dados experimentais de troca iônica para o sistema sob investigação, que alguns cátions podem promover diferentes graus de amorfização ou formação de material lamelar a partir da nanozeólita X e outros cátions podem promover a cristalização de novas estruturas. No caso das amostras Nano-X/Zn/0.5M, Nano-X/Co/0.5M e Nano-X/Ni/0.5M, o grau de amorfização difere de uma amostra para outra (Figura 33). No entanto, as reflexões de Bragg indicam a formação de

materiais lamelares (Xu *et al.*, 2014), e ainda, o suporte Nano-X/Zn/0.5M apresentou um grau de amorfização mais evidenciado em comparação com os outros derivados da troca iônica (Figura 33).

As tentativas para identificar esses materiais usando difração de raios-X e o banco de dados JCPDS não foram bem sucedidas. Esta perda de cristalinidade pode ser atribuída a dois possíveis efeitos: (i) a baixa relação Si/Al na estrutura da zeólita (1,0 < Si/Al < 1,5 para zeólita X) que, por sua vez, provoca a instabilidade química. Neste trabalho, a razão Si/Al, determinada por meio da análise de ICP-AOS, da nanozeólita Nano-X foi de 1,59 (ver Tabela 5), e (ii) o pH das soluções de Cu^{2+} (pH ~ 4,3), Mn^{2+} (pH ~ 6,2), Co^{2+} (pH ~ 4,6), Zn^{2+} (pH ~ 6,1) e Ni^{2+} (pH ~ 6,7), o que provavelmente causou a mudança na estrutura do material zeolítico.

Por outro lado, é interessante notar que a substituição dos íons de Na^{+} da Nano-X/Na por cátions de Cu^{2+}, durante o processo de troca iônica, pode mudar a topologia da amostra de faujasita (FAU) para uma amostra com topologia de gismondina (GIS) (Treacy, Higgins e Ballmoos, 1996), mostrando que sob essas condições de troca iônica, os íons de Cu^{2+} podem atuar como agente direcionador de estrutura (SDA), uma vez que foram capazes de transformar a Nano-X/Na (FAU) em zeólita gismondina micrométrica enriquecida com cobre (GIS) (Figura 33). Embora seja mais restrito, o papel de cátions inorgânicos, tais como: Rb^{+}, K^{+}, Ba^{2+}, Sr^{2+}, Ba^{2+}, and Ca^{2+}, atuando como direcionadores de novas estruturas de zeólitas, já foi explorado na literatura (Flanigen Edith, 1973; Barrer, 1981; Barrer, 1982). Contudo, no melhor do nosso entendimento até o presente momento não foram relatadas na literatura evidências experimentais do cátion Cu^{2+} atuando como um agente direcionador de estrutura. Para uma melhor compreensão do papel do Cu^{2+} nesse sistema particular, foram realizados vários experimentos com diferentes tempos de reação, cujos resultados são mostrados na Figura 34.

Pode-se observar que, depois de 16 horas, a estrutura cristalográfica original tinha colapsado completamente e apenas dois picos de difração da estrutura foram mantidos, localizado em $2\theta = 10^{o}$ e 35^{o}, respectivamente (Figura 34). Depois de 24 horas, observaram-se sete novas reflexões de Bragg, localizadas em $2\theta = 17^{o}$, 19^{o}, 25^{o}, 34^{o}, 36^{o} e 42^{o}. Decorridas 48 horas, essa estrutura evoluiu para uma forma mais cristalina e estável (Figura 34). Nesse caso, deve ser ressaltado que essa facilidade em promover a cristalização de uma nova estrutura foi observada apenas para o cátion Cu^{2+} nesse sistema.

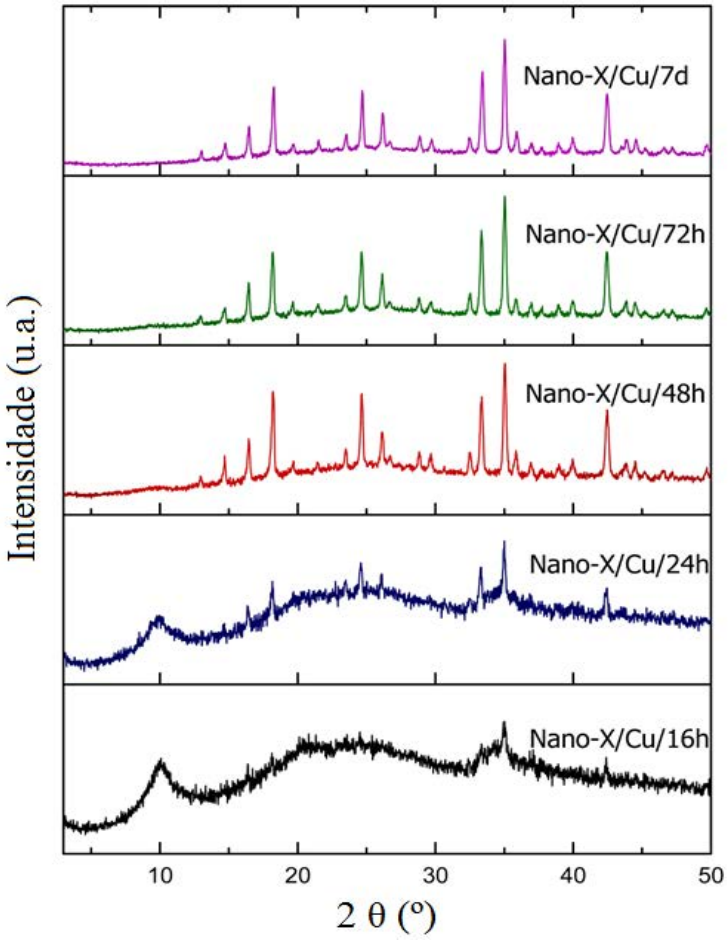


Figura 34 Padrões de DRX dos materiais zeolíticos formados por cátions inorgânicos de Cu^{2+} atuando como agente diretor de estrutura.

4.3.1.2 DRX dos derivados da troca iônica obtidos a partir da nanozeólita Nano-LTA/Na trocada com cátions de transição

A zeólita do tipo LTA foi uma das primeiras estudadas sistematicamente para a troca iônica devido à sua alta capacidade de troca, particularmente em baixas temperaturas, boa seletividade para os cátions de cálcio e magnésio e, o mais importante, o seu baixo custo e alto rendimento de sínteses desses materiais. Alguns estudos pertinentes dessa aplicação da zeólita LTA são datados desde a década de 1960 e 1980 (Barrer, Rees e Ward, 1963; Barri e Rees, 1980; Franklin e Townsend, 1985a; b). Atualmente, a zeólita LTA, juntamente com a zeólita faujasita (NaX), são comumente usadas para aplicações de troca iônica principalmente devido aos seus conhecidos e determinados sítios cristalográficos disponíveis para a troca iônica (Ekhteiari Salmas et al., 2013). Por outro lado, estudos de troca iônica com o uso de zeólita LTA na escala nanométrica têm sido menos desenvolvidos (Cundy e Cox, 2003). Desta forma, torna-se evidente que a nanozeólita Nano-LTA/Na obtida neste estudo, com baixa razão Si/Al que

favorece processos de troca iônica, é interessante para estudos comparativos com a Nano-X/Na, uma vez que essas zeólitas possuem estruturas completamente diferentes, embora ambas mostrem alta capacidade de troca iônica.

O objetivo desses experimentos foi verificar a estabilidade Nano-LTA em relação às variações de concentração, tempo de troca iônica e natureza dos cátions presentes em suas estruturas. Assim, embora a baixa taxa Si/Al ≈1,49 (Nano-LTA) e ≈1,59 (Nano-X) tenha sido observada em ambas amostras (Tabela 3), espera-se que, a princípio, as mudanças estruturais sejam diferentes devido à menor flexibilidade da nanozeólita LTA em comparação com a zeólita faujasita.

Na primeira etapa do trabalho, a nanozeólita Nano-LTA/Na foi convertida em cinco diferentes formas: Mn^{2+}, Cu^{2+}, Co^{2+}, Zn^{2+} e Ni^{2+} por troca iônica. Em um típico experimento de troca iônica, a nanozeólita (Nano-LTA/Na) foi submetida a esse processo com diferentes cátions em baixa concentração molar, de acordo com as condições descritas no *item 3.2.2.2*, à concentração da solução de íons manganês, cobre, cobalto, zinco e níquel (0,1M), tempo (16h) e temperatura (60ºC).

Os difratogramas das amostras da zeólita A (Nano-LTA/Na) e dos derivados da troca iônica estão apresentados na Figura 35. A análise dos padrões de DRX das amostras revela que não houve nenhuma mudança estrutural significativa comparada à amostra original (Nano-LTA/Na), e ocorreu apenas uma diminuição na intensidade das reflexões de difração devido à incorporação dos cátions. Entretanto, nos dados de DRX da amostra de cobalto (Nano-LTA/Co/0.1M), nota-se a ausência de reflexões de difração originais, principalmente na região $2\theta = 10{,}19^{o}$, indicando que ocorreu uma certa diminuição na cristalinidade dessa amostra.

Estudos de troca iônica com a amostra Nano-LTA/Na em soluções de níquel com diferentes concentrações molares também foram realizados. As trocas iônicas das Nano-LTA/Na foram feitas para três diferentes concentrações molares de acordo com as seguintes condições: concentrações da solução de níquel (0,1M, 0,3M e 0,5M), tempo (36h) e temperatura (60ºC), conforme *item 3.2.2.2*.

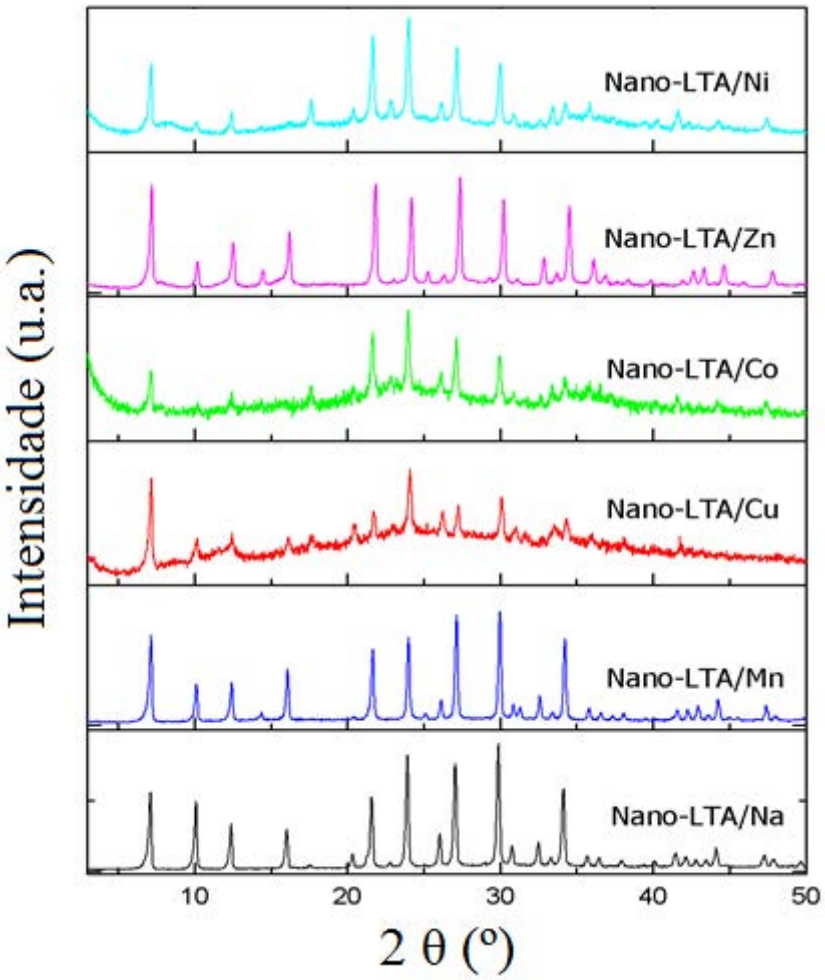


Figura 35 Difratogramas dos derivados da nanozeólita A (Nano-LTA/Na) trocada com os diferentes cátions de metais de transição. Nano-LTA/Mn/0.1M, Nano-LTA/Cu/0.1M, Nano-LTA/Co/0.1M, Nano-LTA/Zn/0.1M, Nano-LTA/Ni/0.1M.

A análise dos padrões de DRXs para o sistema Nano-LTA, apresentada na Figura 36, diferentemente do sistema Nano-X/Na, indica que não houve a completa modificação, na medida em que a estrutura da Nano-LTA é menos flexível ou suscetível à troca iônica com cátions de níquel.

Nota-se que a amostra Nano- LTA /Ni^{2+}/0.1M manteve a estrutura semelhante à nanozeólita pura (Nano-LTA/Na), contudo, é possível verificar uma diminuição na intensidade das reflexões e início da formação de reflexões alargadas. Por outro lado, as reflexões das amostras Nano-LTA/Ni/0.3M e Nano-LTA/Ni/0.5M foram semelhantes, indicando que uma maior incorporação do cátion na estrutura induz a mudanças estruturais mais significativas e as reflexões alargadas associadas à perda de cristalinidade são mais evidenciadas, provavelmente, devido ao início da formação de material lamelar.

Observa-se, ainda, que a amostra Nano-LTA é menos susceptível à troca iônica, apesar de algumas reflexões terem diminuído a intensidade ou mesmo desaparecido, outras reflexões características da estrutura LTA foram mantidas 2 θ = 7,10º; 21,68º; 24,02º, 27,12º e 29,98º.

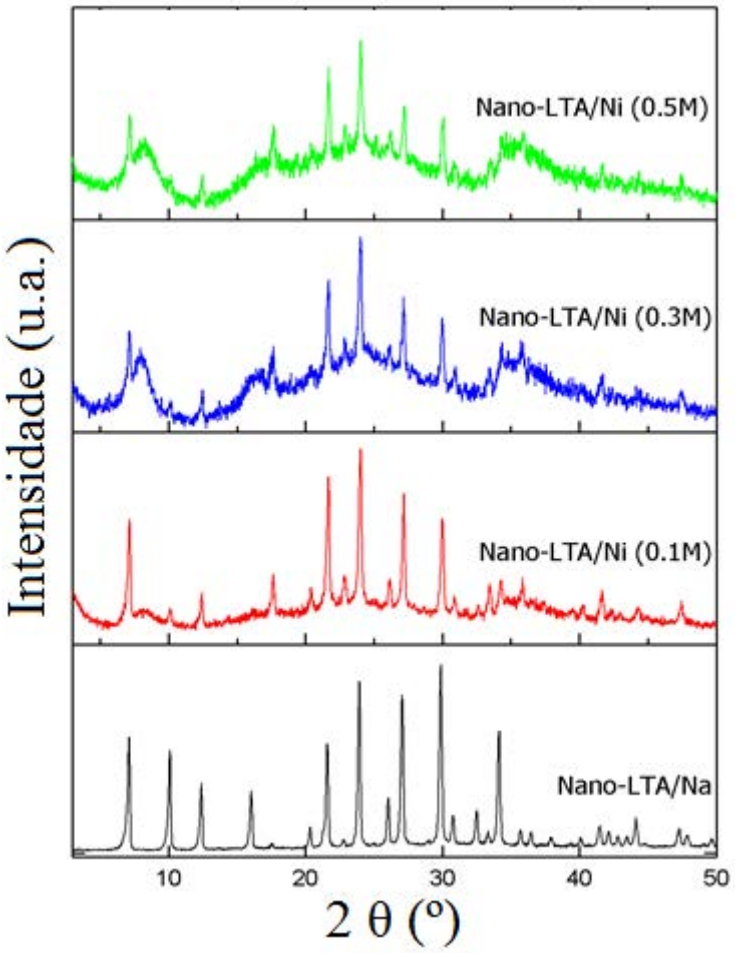


Figura 36 Difratogramas da nanozeólita A (Nano-LTA/Na) trocada com os cátions de níquel em diferentes concentrações da solução de troca iônica.

As outras nanozeólitas preparadas neste estudo, as nanozeólitas Nano-TS1, Nano-BEA, apresentaram alta razão Si/Al que foram confirmadas pelos dados de ICP-OES e RMN-MAS do ^{29}Si, detalhados na Tabela 3 e Figura 20, respectivamente.

Na Tabela 3 os dados de ICP-OES da nanozeólita da Nano-GIS indicaram baixa quantidade de íon de Na^+. Assim, a disponibilidade do cátion de Na^+ é baixa dada a ineficiência na remoção do cátion orgânico de tetrametilamônio (TMA^+), de tal modo que apresenta baixa capacidade de troca iônica quando comparada com as nanozeólitas Nano-X/Na e Nano-LTA. Portanto, como o objetivo da troca iônica é melhorar as características

do suporte, sendo este tratamento pouco efetivo para as nanozeólitas Nano-TS1, Nano-BEA e Nano-GIS, foram usadas apenas as duas nanozeólitas mais eficientes de Nano-X/Na e Nano-LTA para os estudos sistemáticos da influência da troca iônica.

No decorrer do texto, no *item 4.3.7*, será discutida a correlação entre a quantidade de enzima imobilizada, a atividade enzimática e o papel fundamental dos cátions na estrutura cristalográfica do suporte zeolítico. Embora, as nanozeólitas Nano-TS1, Nano-BEA e Nano-GIS não sejam efetivas na troca iônica, esses materiais foram muito ativos para a imobilização enzimática e com elevado potencial catalítico quando tiveram suas superfícies modificadas quimicamente com a adição de grupos do agente aminosilano (3-aminopropil-trimetóxisilano (APTMS)) e funcionalizadas com glutaraldeído (GA) — esse estudo está descrito no *item 4.4*.

Na sequência, após os experimentos de troca iônica descritos nas seções acima, e a caracterização desses materiais por difração de raios-X, poderá ser observado que, dentre todas as amostras preparadas por troca iônica, apenas os derivados da troca iônica em alta concentração molar das amostras derivadas de troca iônica da amostra Nano-X/Na (Nano-X/Mn/0.5M, Nano-X/Cu/0.5M, Nano-X/Co/0.5M, Nano-X/Zn/0.5M, e Nano-X/Ni/0.5M) foram completamente caracterizados, pois, como será verificado adiante, os suportes obtidos desses derivados apresentaram os melhores resultados catalíticos em relação aos demais suportes.

No intuito de compreender melhor o sistema estudado, nesta etapa do trabalho, utilizou-se as técnicas de infravermelho, ICP-OES, RMN-MAS de ^{29}Si, MEV, MET e adsorção de N_2, para a caracterização desses materiais selecionados. Os dados coletados foram suficientes para a discussão e entendimento das características desses suportes.

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

A amostra da nanozeólita Nano-X/Na submetida ao tratamento com os diferentes cátions iônica em alta concentração molar foram analisadas por FTIR-ATR, com o objetivo de verificar se ocorreu alguma mudança nas vibrações das ligações químicas do suporte zeolítico. As análises das bandas de absorção foram feitas na região estrutural da nanozeólita 400-1500cm^{-1}. A Figura 37 mostra os espectros de FTIR-ATR das amostras Nano-X/Na, Nano-X/Mn/0.5M, Nano-X/Cu/0.5M, Nano-X/Co/0.5M, Nano-X/Zn/0.5M e Nano-X/Ni/0.5M.

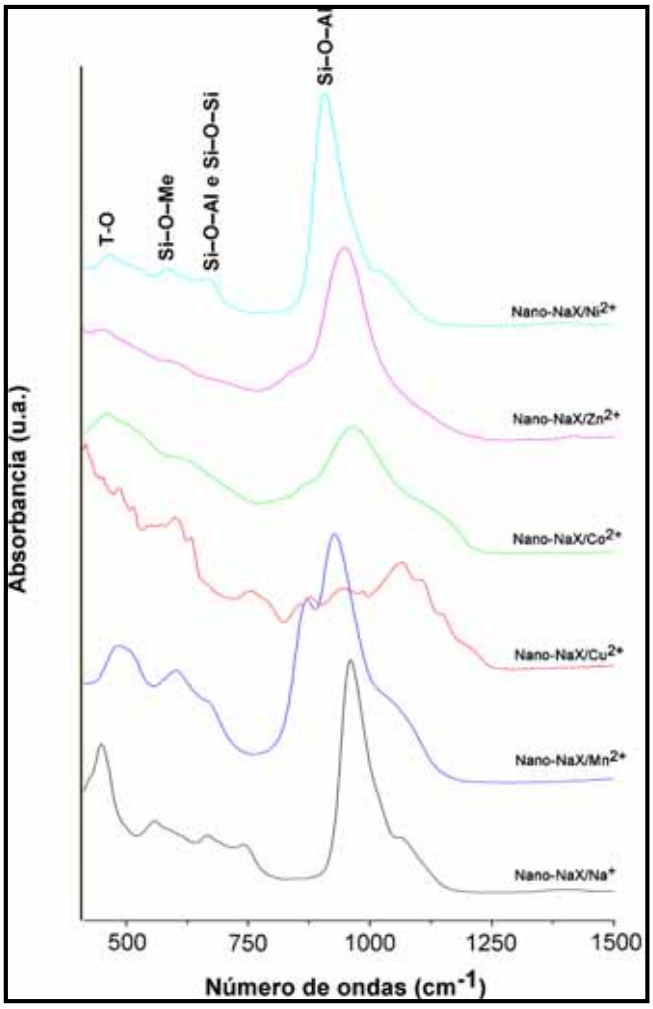


Figura 37 Espectro de infravermelho FTIR-ATR das amostras Nano-X/Na, Nano-X/Mn/0.5M, Nano-X/Cu/0.5M, Nano-X/Co/0.5M, Nano-X/Zn/0.5M, Nano-X/Ni/0.5M**.**

De acordo com a literatura, as bandas localizadas na região de 1200–450cm^{-1} são atribuídas aos estiramentos das ligações entre Si-O-Al, Si-O-Si, Si-O e Al-O, enquanto que a banda localizada em aproximadamente 660cm^{-1} pode ser atribuída ao estiramento das ligações Me-O-Si-O, em que Me representa um cátion metálico, que, geralmente, é o íon de sódio, que pode ser substituído por um outro cátion, no nosso caso Mn^{2+}, Cu^{2+}, Co^{2+}, Zn^{2+} e Ni^{2+}, por meio de experimentos de troca-iônica (Flaningen, 1979).

A análise dos espectros de ATR-FTIR obtidos para as nanozeólitas Nano-X/Na, Nano-X/Mn/0.5M, Nano-X/Cu/0.5M, Nano-X/Co/0.5M, Nano-X/Zn/0.5M e Nano-X/Ni/0.5M na região do esqueleto estrutural de 500–1600cm^{-1} (Figura 37) revela variações significativas nessa faixa espectral em relação à amostra original Nano-X/Na, sendo mais uma evidência experimental de que a nanozeólita faujasita (Nano-X/Na) é extremamente suscetível e fortemente afetada pelo tratamento de troca iônica, que induz

modificações em sua estrutura cristalográfica original, conforme foi mostrado anteriormente nos dados de difração de raios X na Figura 33.

4.3.3 *ICP-OES dos derivados da troca-iônica obtidos a partir da nanozeólita Nano-X/Na trocada com cátions de transição*

As análises de ICP-OES mostram o conteúdo do íon do metal dos derivados de troca iônica comparado com a amostra original Nano-X/Na. A Tabela 5 apresenta a quantidade de íons metálicos em forma de óxido (% *m*/*m*), para as cinco amostras diferentes. Pode-se notar que a relação SiO_2/Al_2O_3 (ver Tabela 5) de Nano-X/Na (≈1,59), Nano-X/Mn/0.5M (≈1,53), Nano-X/Cu/0.5M (≈1,55) e Nano-X/Co/0.5M (≈1,55), praticamente não foi alterada com o tratamento de troca iônica para os cátions de Mn^{2+}, Cu^{2+} e Co^{2+}. No entanto, para as amostras Nano-X/Zn/0.5M (≈1,49) e Nano-X/Ni/0.5M (≈1,42) as razões foram menores. Outra importante diferença está relacionada à quantidade de água ligada ao suporte, todas amostras obtiveram uma variação (≈30-35%), enquanto a amostra Nano-X/Ni/0.5M apresentou maior quantidade de água ligada ou coordenada na estrutura (48,64%).

De acordo com Serralha *et al.* (1998) a natureza do cátion na estrutura da zeólita pode afetar a quantidade de água ligada ao suporte. Além disso, sabe-se que em reações catalisadas por enzimas imobilizadas em meios não aquosos, uma pequena quantidade de água não muda o equilíbrio reacional em favor da hidrólise e aumenta a taxa catalítica. Dessa forma, o suporte Nano-X/Ni/0.5M, com maior quantidade de água coordenada ao cátion de transição pode proporcionar um microambiente favorável para a imobilização da enzima, porque possui água suficiente para manter a camada de hidratação da enzima (Nie *et al.*, 2006).

A análise se torna ainda mais interessante quando observa-se a relação Si/Me (em que Me é o cátion metálico): SiO_2/Na_2O(≈2,38)> SiO_2/MnO(≈2,09)> SiO_2/CoO(≈1,57) > SiO_2/NiO (≈1,22) ≥ SiO_2/ZnO (≈1,21) e SiO_2/CuO (≈0,87). A baixa relação Si/Me significa maior quantidade do cátion presente no "*bulk* ou microambiente" do suporte zeolítico. Quando correlacionam-se esses dados com os dados de DRX, observa-se que a maior concentração do cátion na estrutura está diretamente associada com os diferentes graus de amorfização da nanozeólita X e formação de nova estrutura. No caso do suporte Nano-X/Cu/0.5M, foi a amostra que obteve a maior incorporação do cátion dentre todas as amostras estudadas, o que induziu a formação de uma nova estrutura cristalina (Tabela 5).

De acordo com as análises de ICP-OES, com base na quantidade de Na^+ removido, os suportes Nano-X/Ni/0.5M e Nano-X/Cu/0.5M alcançaram troca iônica máxima, as amostras Nano-X/Mn/0.5M, Nano-X/Zn/0.5M e Nano-X/Co/0.5M também atingiram altos níveis de troca iônica 86,3%, 87,0% e 94,8% respectivamente. No entanto, comparando o conteúdo total dos respectivos cátions incorporados com relação às quantidades de Na_2O e Al_2O_3 restantes na zeólita, torna-se evidente que uma fração significativa dos cátions incorporados não está apenas substituindo cátions de Na^+ na estrutura, mas sim, estão presentes no "*bulk*" das amostras, porque as estruturas ficaram amorfizadas. Ver-se-á mais adiante, com a completa caracterização da amostra Nano-X/Ni/0.5M por análises de MET e XPS, que ocorre a formação de aglomerados de diferentes espécies de óxidos dos cátions durante a etapa de troca iônica em alta concentração molar.

Tabela 5 Composições químicas dos suportes nanozeolíticos obtidas por ICP-OES.

Amostra	*SiO_2 (%)*	*Al_2O_3 (%)*	*SiO_2/ Al_2O_3*	*Na_2O (%)*	*CuO (%)*	*MnO (%)*	*CoO (%)*	*ZnO (%)*	*NiO (%)*	*H_2O (%)*
Nano-X/Na	33,23	20,84	1,59	13,97	-	-	-	-	-	34,56
Nano-X/Cu/0.5M	23,34	14,92	1,55	0,08	26,65	-	-	-	-	33,22
Nano-X/Mn/0.5M	31,14	20,24	1,53	1,92	-	14,68	-	-	-	30,06
Nano-X/Co/0.5M	28,29	18,47	1,55	0,72	-	-	18,01	-	-	36,48
Nano-X/Zn/0.5M	27,25	18,18	1,49	1,81	-	-	-	22,56	-	30,60
Nano-X/Ni/0.5M	18,23	12,83	1,42	0,12	-	-	-	-	14,88	48,64

4.3.4 RMN-MAS de ^{29}Si dos derivados da troca iônica obtidos a partir da nanozeólita Nano-X/Na trocada com cátions de transição

Os derivados da troca iônica em alta concentração molar Nano-X/Cu/0.5M, Nano-X/Zn/0.5M e Nano-X/Ni/0.5M, indicaram maiores quantidades de cátions presentes na estrutura, conforme mostrado na análise de ICP-OES na Tabela 5. Desta forma, como a análise de RMN-MAS de ^{29}Si é mais restrita, decidiu-se selecionar apenas essas três amostras que foram significativamente modificadas após a troca iônica.

Na Figura 38, estão apresentados os espectros da amostra sódica em comparação com as amostras obtidas por troca iônica. O espectro da nanozeólita Nano-X/Na consiste de distintos deslocamentos químicos localizados na região de -84,0, -88,5, -93,5 e -98,7 ppm (precisão de ± 0,5 ppm), originários de Si (nAl), sendo o número de átomos de Al com n= 4, 3, 2 e 1, respectivamente (Weihe *et al.*, 2001). A substituição dos cátions de sódio pelos cátions zinco (Nano-X/Zn/0.5M) resultou em ligeiros deslocamentos dos sinais Si(nAl) menores que 1 ppm, indicando que houve algumas mudanças na geometria local dos tetraedros SiO_4.

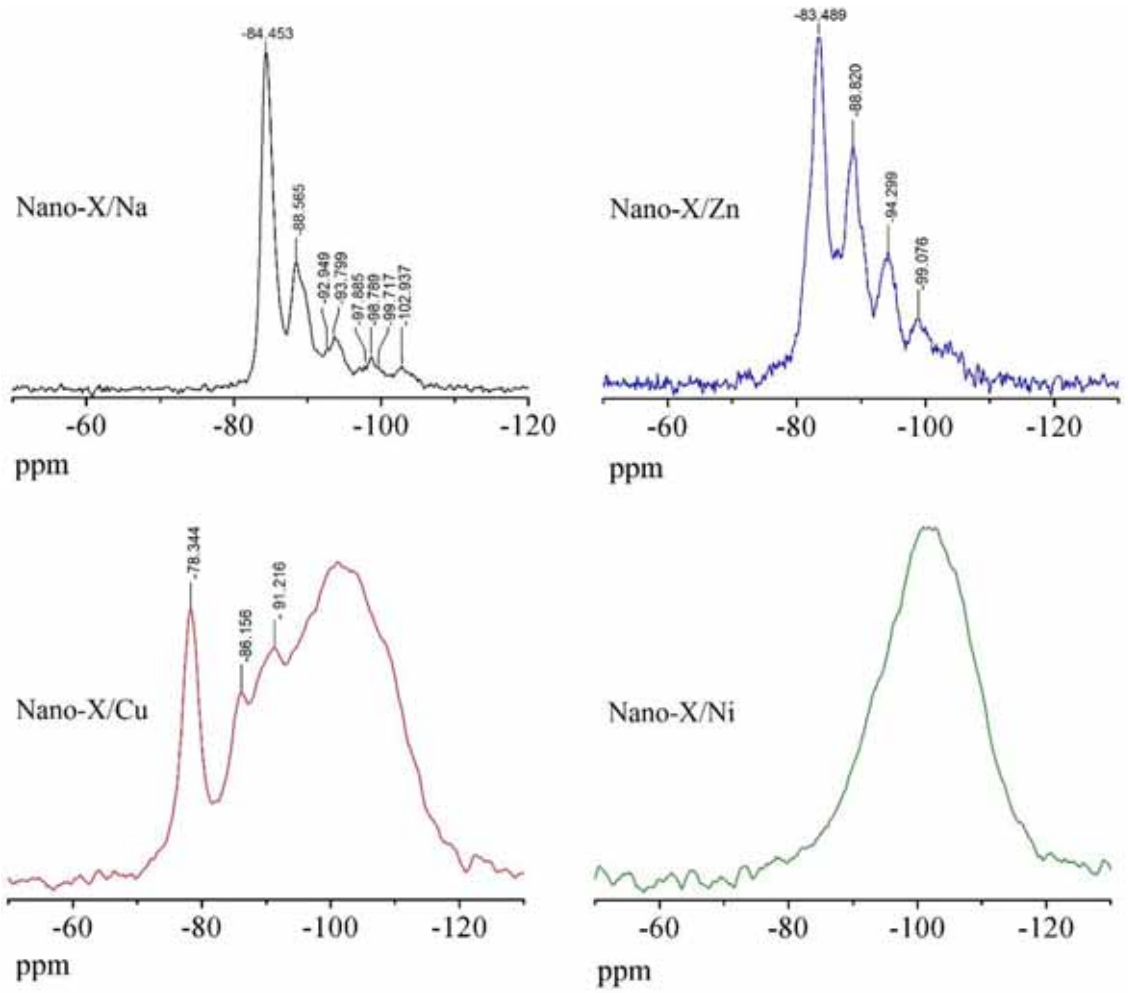


Figura 38 Espectros de RMN-MAS de 29Si das amostras derivadas da troca iônica com zinco, cobre e níquel comparada com a amostra pura Nano-X/Na.

Por outro lado, quando foi analisada por RMN-MAS de ^{29}Si, as amostras Nano-X/Cu/0.5M e Nano-X/Ni/0.5M os dados das amostras indicam que uma forte perturbação é evidente a partir dos espectros das duas amostras. O formato do espectro dessas duas amostras é claramente diferente da amostra Nano-X/Na. No caso da amostra Nano-

X/Ni/0.5M é possível observar o aumento na largura do deslocamento químico, o que torna mais difícil a identificação da geometria local dos tetraedros SiO_4 por causa da amorfização ou a transformação da zeólita em um material lamelar, enquanto que os espectros de RMN-MAS ^{29}Si da Nano-X/Cu/0.5M. Não obstante seja verificado um alargamento no espectro, notam-se alguns deslocamentos químicos bem definidos. Contudo, as posições dos deslocamentos dos sinais são completamente diferentes da amostra original, indicando mudanças drásticas na geometria local dos tetraedros SiO_4. Sendo assim, os dados RMN-MAS ^{29}Si da amostra Nano-X/Cu/0.5M confirmam o que foi mencionado anteriormente nas análises de DRX (Figura 34) que o cátion de Cu^{2+} atuou como agente direcionador de estrutura porque promoveu a formação de um novo material zeolítico.

4.3.5 *Caracterização dos materiais nanozeolítico da nanozeólita Nano-X/Na e seus derivados por troca iônica por MEV e MET*

4.3.5.1 Microscopia eletrônica de varredura

As micrografias eletrônicas das amostras Nano-X/Mn/0.5M, Nano-X/Cu/0.5M, Nano-X/Zn/0.5M, Nano-X/Co/0.5M e Nano-X/Ni/0.5M podem ser observadas na Figura 39. A análise da amostra da nanozeólita X pura (Nano-X/Na), ilustrada na Figura 39a, mostra, claramente, que os cristais estão na forma esférica e cilíndrica que aparentemente cresceram interligadas formando aglomerados. Esta formação de aglomerados é típica da morfologia da nanozeólita Nano-NaX (Zhan *et al.*, 2001; Zhan *et al.*, 2002).

No caso da amostra Nano-X/Mn/0.5M os dados de MEV, mostrados na Figura 39b, indicam que a morfologia típica em forma de aglomerados foi mantida e o tamanho desses aglomerados é de aproximadamente 250nm, sendo composto por partículas de 30–70nm. Todavia, a troca iônica do Nano-X/Na com os cátions de cobalto, zinco e níquel (Figura 39d, Figura 39e, e Figura 39f, respectivamente) originou a formação de materiais morfologicamente diferentes quando comparados com a amostra de Nano-X/Na.

A morfologia dos materiais Nano-X/Co/0.5M, Nano-X/Zn/0.5M, Nano-X/Ni/0.5M são bastante semelhantes entre si, e podem ser descritas como um tipo particular de nanofloco cristalizado em forma de folhas aglomeradas. Diferentemente das amostras anteriores, o tamanho dos cristais da amostra Nano-X/Cu/0.5M aumentou para a escala micrométrica, conforme pode ser visto na Figura 39c. Esses dados estão de acordo com aqueles observado na difração de raios X (Figura 33).

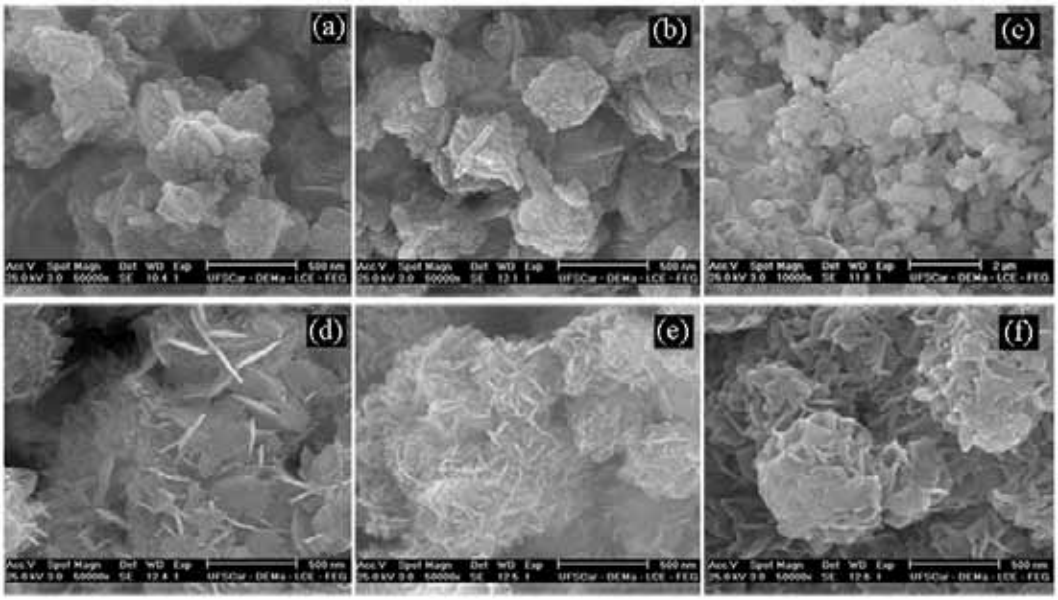


Figura 39 MEV dos suportes nanozeolíticos com topologia faujasita: (a) Nano-X/Na, (b) Nano-X/Mn/0.5M, (c) Nano-X/Cu/0.5M, (d) Nano-X/Co/0.5M, (e) Nano-X/Zn/0.5M, (f) Nano-X/Ni/0.5M.

4.3.5.2 Microscopia eletrônica de transmissão

A Figura 40 mostra os dados de MET obtidos para a nanozeólita (Nano-X/Na) e seus derivados de troca iônica, no módulo campo escuro (*darkfield*), o qual exclui os feixes não difratados.

Observa-se que a análise comparativa indica a concordância e a complementariedade das duas técnicas MEV e MET. Contudo, a análise por MET revela detalhes interessantes e confirma o tamanho das partículas dentro da faixa de 30 a 100 nm, conforme mencionado na literatura por Zhan *et al.* (2001). A única exceção foi a amostra Nano-X/Cu/0.5M (Figura 40c), cujo tamanho de partículas estava dentro do intervalo de partículas considerada micrométricas. Os dados de MET da amostra Nano-X/Cu/0.5M também confirmaram o que foi observado nas análises anteriores de MEV e DRX para essa amostra.

Nesse sentido, observa-se que essas amostras obtidas por troca iônicas em altas concentrações podem ser divididas em três grupos a partir das imagens de TEM: (1) imagens de baixa magnificação da Nano-X/Na (Figura 40a) e Nano-X/Mn/0.5M (Figura 40b) revelaram nanopartículas na forma de agregados com aproximadamente 250 nm; (2) a imagem das amostras Nano-X/Cu/0.5M (Figura 40c) indicou que ocorreu um aumento no tamanho do cristal; e (3) as imagens sugerem que as amostras Nano-X/Co/0.5M, Nano-

X/Zn/0.5M, Nano-X/Ni/0.5M são bastante semelhantes entre si, complementando o que foi observado por MEV, contudo, os materiais formam agregados grandes em forma de agulhas.

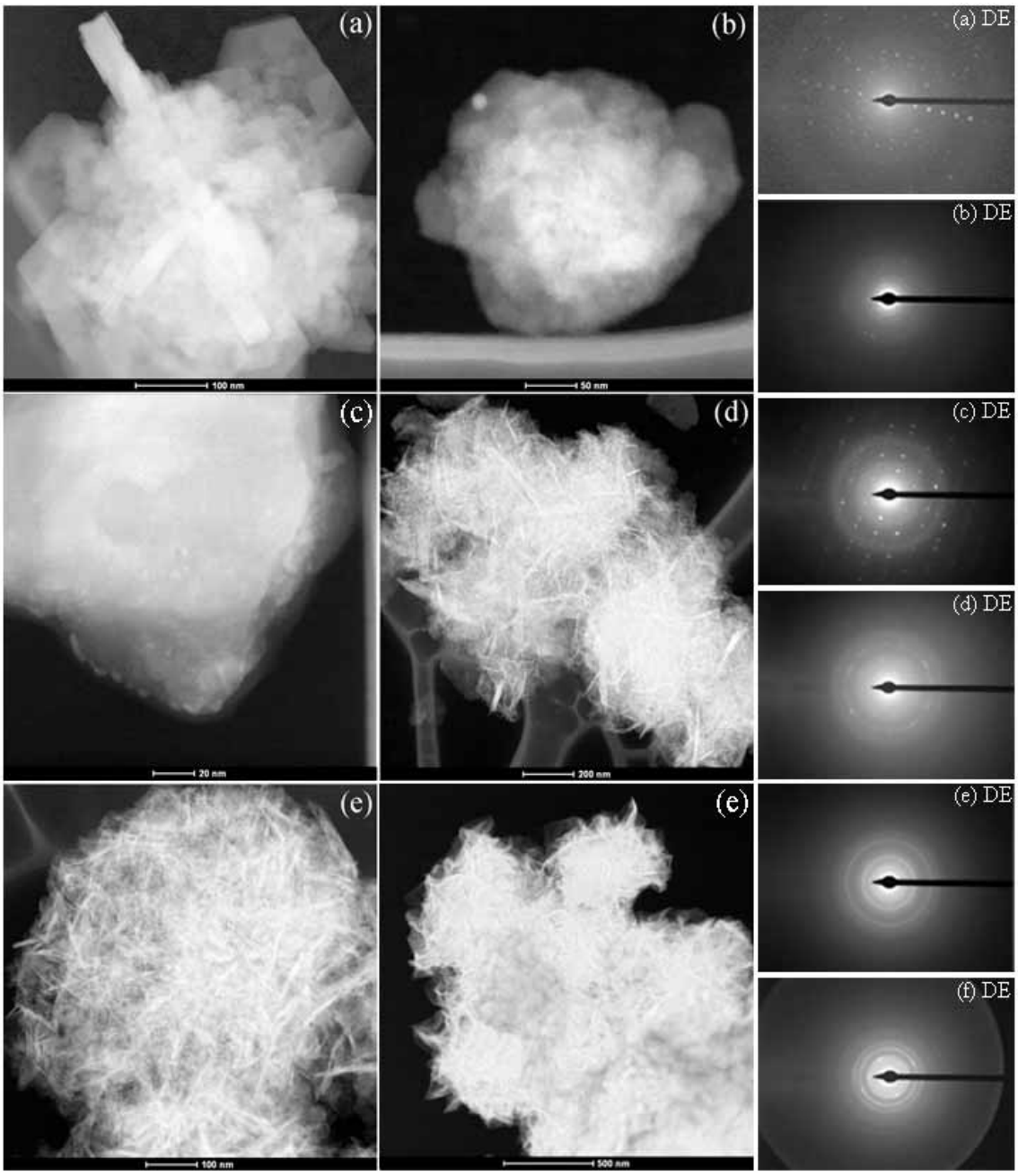


Figura 40 Imagens de MET em campo escuro dos suportes nanozeolíticos com topologia faujasita e as suas respectivas imagens dos padrões de difração de elétrons (DE) escala: (a) Nano-X/Na, (b) Nano-X/Mn/0.5M, (c) Nano-X/Cu/0.5M, (d) Nano-X/Co/0.5M, (e) Nano-X/Zn/0.5M, (f) Nano-X/Ni/0.5M.

No canto direito da Figura 40, onde estão ilustrados os padrões de difração de elétrons tirados na região analisada de cada amostra, é possível observar que todas as

amostras apresentam certo grau de cristalinidade. As amostras Nano-X/Na e a Nano-X/Cu/0.5M apresentam planos cristalinos bem definidos, sendo possível, até mesmo, observar os *spots* da difração de életrons. Contudo, embora verifiquem-se diferentes graus de amorfização ou formação de estrutura lamelar das amostras Nano-X/Co/0.5M, Nano-X/Zn/0.5M e Nano-X/Ni/0.5M, notam-se os arcos nos anéis com forte intensidade luminosa correspondente à forte textura dos planos cristalinos desses materiais.

4.3.6 *Análise textural por adsorção de nitrogênio*

As isotermas obtidas por meio da análise de adsorção de N_2 estão apresentadas na Figura 41. Avaliando-se o suporte, antes e após a troca iônica, a amostra Nano-X/Na sofre modificações na capacidade de adsorção e também no tamanho da área de superfície externa.

No caso da nanozeólita Nano-X/Na pura, antes da troca iônica, a análise da área de superfície externa foi de 114,6 m^2/g avaliada a partir do *t-plot* na análise de BET (Figura 42). No estudo realizado por Zhan *et al.*, 2002 verificaram-se a área de superfície externa como 115 ± 10 m^2/g para a nanozeólita Nano-NaX e 44,3 m^2/g para a zeólita na escala micrométrica micro-NaX. Em outro estudo realizado por Don Ta Ngoc et al. (2013), a área de superfície externa verificada foi 92m^2/g, indicando que as nanopartículas têm maior área superficial que zeólitas na escala micrométrica. A partir desses resultados, torna-se evidente que esses dados estão coerentes com os reportados na literatura.

Com relação aos materiais obtidos por troca iônica, pode-se dividi-los em três grupos distintos:

O suporte Nano-X/Mn/0.5M que nas análises anteriores de difração de raios X e microscopia indicou pequenas variações no aspecto morfológico e nas reflexões de difração quando comparado com a amostra pura (Nano-X/Na). No entanto, na análise textural observa-se um comportamento completamente diferente. Nota-se que esse suporte obteve a maior capacidade de adsorção de N_2 (Figura 41) dentre os suportes avaliados, mas houve uma ligeira diminuição da área de superfície externa (94,5 m^2/g) com relação à Nano-X/Na. O grande volume de microporos e a redução da área de superfície pode estar relacionada ao bloqueio de alguns poros da zeólita, causado pela substituição do Na^+ por Mn^{2+} (Diaz *et al.*, 2004).

Para o suporte Nano-X/Cu/0.5M, houve uma diminuição significativa na capacidade de adsorção de N_2 e também da área de superfície externa (Figura 41 e Figura

42). Os dados confirmam novamente que o material obtido a partir da troca iônica com o cobre apresenta característica de materiais na escala micrométrica. Neste caso, o cobre apresentou uma área de superfície externa de 44,3 m^2/g, enquanto que a micro-NaX, descrita na literatura, apresenta área de superfície externa 43±5m^2/g (Zhan *et al.*, 2002). Provavelmente, a formação de diferentes estado de oxidação do íon de cobre e as interações iônicas, leva a um aumento no tamanho da partícula sólida que é acompanhado por uma diminuição na área superficial (Nezamzadeh-Ejhieh e Karimi-Shamsabadi, 2013).

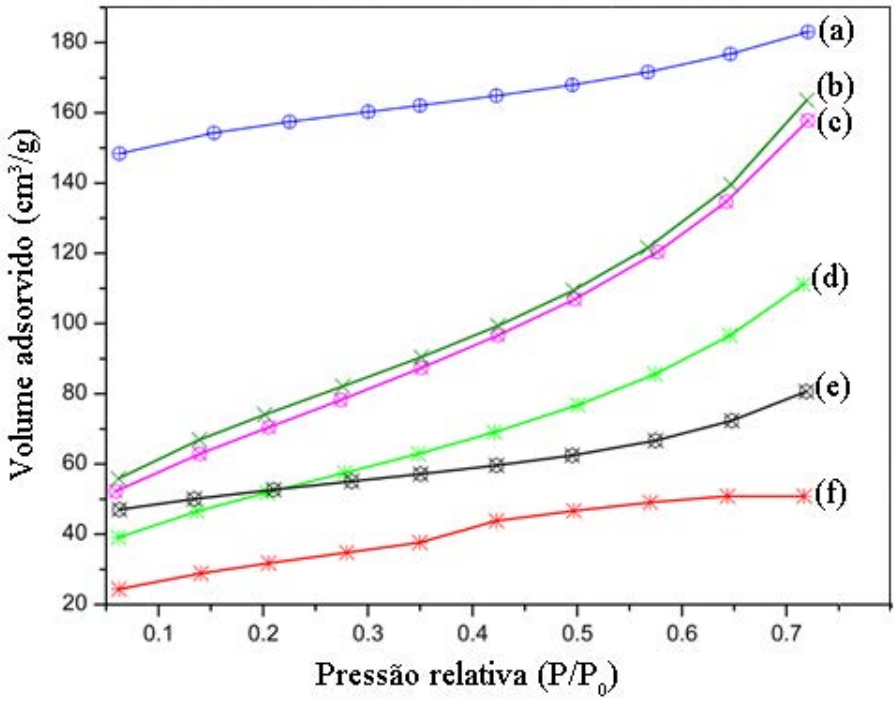


Figura 41 Isotermas de adsorção de N_2 a 77 K das amostras (a) Nano-X/Mn/0.5M, (b) Nano-X/Co/0.5M, (c) Nano-X/Zn/0.5M, (d) Nano-X/Ni/0.5M, (e) Nano-X/Na e (f) Nano-X/Cu/0.5M**.**

Como se observa na Figura 42, no caso das amostras Nano-X/Co/0.5M, Nano-X/Zn/0.5M, Nano-X/Ni/0.5M, ocorreu um aumento significativo na área superficial. Na Figura 41, constata-se que esses derivados da troca iônica também obtiveram elevada capacidade adsorção de N_2. Assim, há de se considerar os resultados das análises anteriores: a análise por MET dessas amostras indicou que elas são semelhantes e formaram grandes agregados de pequenas partículas em forma de agulhas; e a análise de raios-X indicou uma redução na cristalinidade após a troca iônica e formação de estrutura lamelar. Portanto, uma possível interpretação para esses resultados é que a deformação da estrutura cristalina, existente em alto níveis de troca iônica para os cátions (Co^{2+}, Zn^{2+} e Ni^{2+}), confirmadas nas análises de DRXs pela formação de estrutura lamelar, induz um

aumento no volume de microporos e da área superficial (Amari, Ginoux e Bonnetain, 1994). Sarbak (1993) estudou a zeólita do tipo X modificadas por sucessivas trocas iônicas com cobalto e explicou que a deformação da estrutura cristalina da zeólita ocorreu por perturbações nos mútuos arranjos das diferentes espécies de íons óxidos, localizados nas regiões próximas onde os íons de Co^{2+} foram introduzidos.

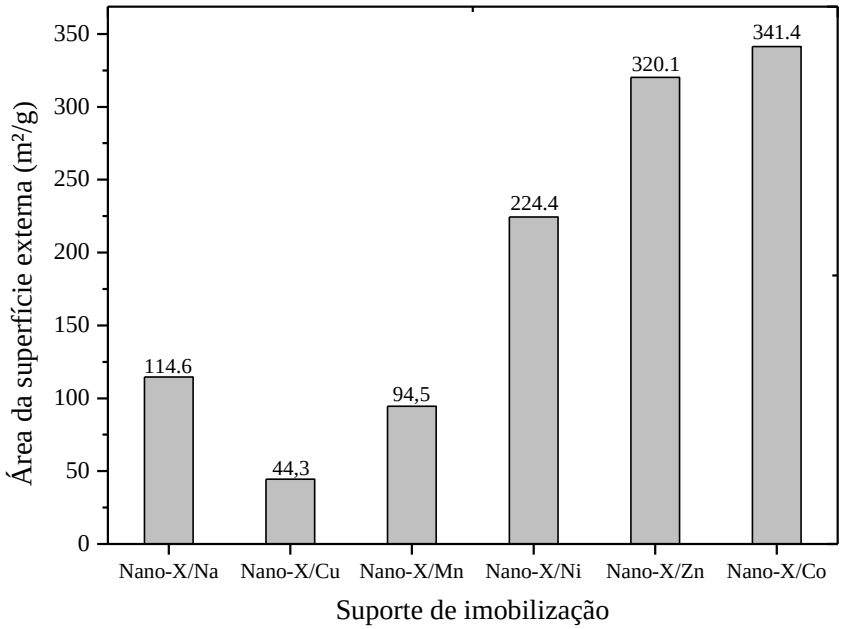


Figura 42 Área externa do cristal calculado a partir dos dados da análise textural por adsorção de N_2.

4.3.7 *Imobilização das enzimas e caracterização dos complexos nanozeólitas/ enzimas*

4.3.7.1 Imobilização e atividade enzimática dos derivados obtidos por troca iônica da Nano-X/Na em baixa concentração molar

A Tabela 6 apresenta os valores de imobilização e atividade enzimática em função da troca iônica, de acordo com as seguintes condições: concentração da solução dos cátions (0,1M), tempo (16h) e temperatura (60ºC).

Há de se ressaltar um dado bastante interessante relativo as atividades enzimáticas, apresentados na Tabela 6, para os complexos Nano-X/Zn/0.1M-RML e Nano-X/Ni/0.1M-RML, após a troca iônica, as medidas foram 8,4±0,5 e 11,9±0,2 U/mg-suporte. Todavia, nota-se que esses valores são maiores quando comparados com os demais complexos Nano-X/Na-RML, Nano-X/Mn/0.1M-RML, Nano-X/Cu/0.1M-RML e Nano-X/Co/0.1M -RML, pois para esses suportes as atividades determinadas foram 3,2±0,3; 2,0±0,3; 3,4±0,2 e 2,4±0,1U/mg-suporte, respectivamente. Esse aumento significativo da

atividade enzimática, para os suportes de níquel e zinco derivados da troca iônica, é uma forte indicação de que a atividade enzimática também está relacionada com o cátion presente na estrutura do suporte nanozeolítico.

Com relação à quantidade de enzima imobilizada, observou-se que houve uma variação entre os suportes, dentre os quais o que apresentou maior eficiência de imobilização (74,6±0.3%) foi o Nano-X/Cu/0.1M. Correlacionando a quantidade de enzima imobilizada pelo suporte sólido com a atividade enzimática do complexo nanozeólita/enzima pode-se observar que a maior atividade enzimática foi obtida para o complexo Nano-X/Ni/0.1M-RML (11,9±0,2 U/mg-suporte) e a quantidade de enzima imobilizada pelo suporte Nano-X/Ni/0.1M foi 35,4±1,0%. Esse dado é diferente em relação ao suporte Nano-X/Cu/0.1M e ao complexo Nano-X/Cu/0.1M-RML que apresentam uma imobilização de 74,6±0,3%, porém, uma menor atividade (3,4±0,2 U/mg-suporte) para o complexo. Portanto, esse dado indica que conseguir uma eficiência de 74,6±0,3% na imobilização em um determinado suporte, não necessariamente implica que a enzima será imobilizada na sua forma ativa nesse suporte.

Tabela 6 Porcentagem de imobilização e atividade enzimática* da lipase de *Rhizomucor miehei* em função das condições de troca iônica: concentração molar dos íons em solução (0,1M), tempo (16h) e temperatura (60ºC). Carga enzimática oferecida de 10mg proteína/g de suporte.

Suporte zeolítico	**Imobilização** (mg/g suporte)	**Imobilização** (%)[#]	**Atividade enzimática** (U/mg suporte)
Nano-X/Na	2,06 ± 0,09	20,6 ± 0,9	3,2 ± 0,3
Nano-X/Cu/0.1M	7,46 ± 0,03	74,6 ± 0,3	3,4 ± 0,2
Nano-X/Mn/0.1M	1,46 ± 0,08	14,6 ± 0,8	2,0 ± 0,3
Nano-X/Co/0.1M	2,08 ± 0,02	20,8 ± 0,2	2,4 ± 0,1
Nano-X/Zn/0.1M	3,76 ± 0,06	37,6 ± 0,6	8,4 ± 0,5
Nano-X/Ni/0.1M	3,54 ± 0,10	35,4 ± 1,0	11,9 ± 0,2

* Os testes de atividades para os complexos nanozeólita-enzima foram realizados conforme descrito no *item 3.3.2*. [#]Porcentagem de imobilização de *R. miehei* = (massa de enzima na solução final (m*f*)/massa de enzima na solução inicial (m*i*))*100.

A nanozeólita Nano-X/Na trocada com diferentes cátions permite afirmar que a quantidade de enzima imobilizada e a atividade enzimática são altamente dependentes da natureza iônica presente nesses sólidos. Embora o suporte Nano-X/Cu/0,1M-RML tenha

sido o mais efetivo para a imobilização de enzimas, a atividade de hidrólise foi baixa, indicando zeólitas modificadas com cobre pode promover mudanças conformacionais na enzima de *R. miehei* e reduz o acesso de moléculas de substrato ao sítio ativo da enzima (impedimento estérico). A mesma observação já foi relatada com uso de zeólitas na escala micrométricas (De Vasconcellos *et al.*, 2012). Além disso, tal informação é corroborada pela elevada concentração de enzimas imobilizadas que reduz o acesso de moléculas ao substrato, uma vez que a maior reatividade de grupos iônicos situados na superfície da enzima é que permite uma elevada adsorção iônica da enzima neste suporte e esta forte interação pode distorcer a sua estrutura conformacional ativa (Mateo *et al.*, 2007).

Dessa forma, baseado principalmente na atividade de hidrólise do óleo de soja, o complexo Nano-X/Ni/0.1M-RML provou ser o mais promissor para realizar os estudos de biocatálise em comparação com os outros complexos trocados com diferentes cátions. Ademais, temos o conhecimento prévio em um trabalho anterior desenvolvido pelo nosso grupo de pesquisa sobre a importância de zeólitas trocadas com níquel na ativação de lipases (De Vasconcellos *et al.*, 2012). Assim, tendo em vista que a nanozeólita Nano-X/Na trocada com o cátion de níquel (Nano-X/Ni/0.1M) foi o suporte mais eficiente para a imobilização da lipase de *R. miehei*, nas etapas subsequentes utilizou-se somente o suporte Nano-X/Ni para avaliar dois parâmetros importantes no processo de troca iônica (o tempo e a concentração molar) e correlacioná-los à quantidade de enzima imobilizada e à atividade enzimática.

4.3.7.2 Imobilização e atividade enzimática para o suporte Nano-X/Ni/0.1M obtido em diferentes tempos de troca iônica

A nanozeólita (Nano-X/Na) foi submetida à troca iônica em diferentes períodos de tempo reacional, de acordo com as seguintes condições: concentração da solução de níquel (0,1M), tempo (4h, 16h, 24h e 36h) e temperatura (60ºC). As amostras obtidas foram denominadas Nano-X/Ni/0.1M(4h), Nano-X/Ni/0.1M(16h), Nano-X/Ni/0.1M (24h) e Nano-X/Ni/0.1M(36h), avaliando-se a eficiência de imobilização da lipase de *R. miehei* e a atividade de hidrólise do óleo de soja pelo complexo nanozeólita-enzima. Os resultados estão reportados na Tabela 7, na qual vê-se que a porcentagem de enzima imobilizada foi bastante semelhante para os quatros suportes, tendo sido observada uma saturação da imobilização em torno de 35,4 a 37,6%. Um forte indício de que a atividade enzimática está correlacionada com a variação do tempo da troca iônica pode ser evidenciada, uma vez que a atividade enzimática aumentou de acordo com o tempo de

troca iônica 4h < 16h < 24h < 36h. Assim, o maior valor para atividade enzimática foi observado para o complexo Nano-X/Ni/0.1M(36h)-RML (20,2±1,5 U/mg-suporte).

Nota-se que, embora a maior concentração de níquel não tenha resultado em uma maior imobilização de proteína, um efeito significante na atividade hidrolítica pode ser verificado. Os padrões de DRX dessas amostras (mostrados na Figura 31) revelam que ocorreram mudanças na estrutura dos materiais em função do tempo de troca iônica, provavelmente devido à maior incorporação do cátion de níquel na estrutura cristalina da nanozeólita. Com isso, uma maior quantidade de cátions presentes no suporte zeolítico podem formar diferentes espécies de óxidos de níquel durante a etapa de troca iônica e essas espécies desempenham um papel importante de ativação da enzima na interação da enzima com o suporte (Danuthai et al., 2011). Esse fenômeno será discutido em mais detalhes no *item 4.3.9.1* com as análises de espectroscopia de fotoelétrons induzida por raios-X (XPS) e microscopia eletrônica de transmissão (MET).

Tabela 7 Porcentagem de imobilização e atividade enzimática da lipase de *Rhizomucor miehei* em função do tempo da troca iônica de $NiSO_4$ no processo de troca iônica: Nano-Ni/0,1M/4-36h. Carga enzimática oferecida de 10mg proteína/g de suporte.

Suporte zeolítico	**Imobilização** (mg/g suporte)	**Imobilização** (%)*	**Atividade enzimática** (U/mg suporte)
Nano-X/Ni/0.1M(4h)	3,76 ± 0,03	37,6±0,25	9,6±0,8
Nano-X/Ni/0.1M(16h)	3,54 ± 0,10	35,4±0,98	11,9±0,2
Nano-X/Ni/0.1M(24h)	3,64 ± 0,04	36,4±0,43	17,3±1,1
Nano-X/Ni/0.1M(36h)	3,58 ± 0,10	35,8±0,98	20,2±1,5

* Porcentagem de imobilização de *Rhizomucor miehei* = (massa de enzima na solução final (m*f*)/massa de enzima na solução inicial (m*i*))*100.

4.3.7.3 Imobilização e atividade enzimática para o suporte Nano-X/Ni/36h obtido em diferentes concentrações molares

Para verificar se a concentração molar da solução de troca iônica melhora as características do suporte Nano-X/Ni, os experimentos foram realizados variando-se a concentração do cátion entre 0,1M e 0,5M e os ensaios de troca iônica foram realizados por 36h. Três suportes foram estudados, como mostra a Tabela 8, denominados Nano-

X/Ni/0.1M, Nano-X/Ni/0.3M e Nano-X/Ni/0.5M, avaliando-se a eficiência de imobilização e a atividade de hidrólise do óleo de soja.

Os resultados apresentados na Tabela 8 confirmam que a atividade enzimática está correlacionada com o meio catiônico dominante. Os níveis de imobilização foram semelhantes para os três suportes, indicando que a molaridade do cátion não interferiu na capacidade de imobilização do suporte. Por outro lado, os dados mostram que o aumento do tempo de troca iônica e a concentração de níquel favorecem a atividade catalítica, uma vez que a maior atividade enzimática obtida foi para o complexo Nano-X/Ni/0.5M-RML (44,0±2,1U/mg-suporte). Novamente, os dados podem ser explicados pela maior quantidade de cátions presentes no suporte zeolítico que aumenta a quantidade de diferentes espécies de níquel e, consequentemente, favorece uma maior ativação da enzima. Por conseguinte, conclui-se que a maior concentração dessas diferentes espécies de níquel presentes na nanozeólita submetida à troca iônica permite obter suportes com um microambiente apropriado para as moléculas de substrato acessarem os sítios catalíticos da enzima previamente imobilizada.

Tabela 8 Porcentagem de imobilização e atividade enzimática da lipase de *R. miehei* em função da concentração molar de $NiSO_4$ no processo de troca iônica: Nano-X/Ni/0,1M-0,5M/36h. Carga enzimática oferecida de 10mg proteína/g de suporte.

Suporte zeolítico	**Imobilização** (mg/g suporte)	**Imobilização** (%)*	**Atividade enzimática** (U/mg suporte)
Nano-X/Ni/0.1M	3,58 ± 0,09	35,8 ± 0,98	20,2 ± 1,5
Nano-X/Ni/0.3M	3,91 ± 0,01	39,1 ± 0,14	28,4 ± 1,2
Nano-X/Ni/0.5M	3,78 ± 0,10	37,8 ± 1,0	44,0 ± 2,1

*Porcentagem de imobilização de *Rhizomucor miehei* = (massa de enzima na solução final (m*f*)/massa de enzima na solução inicial (m*i*))*100.

4.3.7.4 Imobilização e atividade enzimática dos derivados obtidos por troca iônica da amostra Nano-X/Na em alta concentração molar

Na tentativa de se obter catalisadores mais eficientes e tendo conhecimento prévio de que as condições ideais de troca iônica do suporte são 0,5M/36h, nesta parte do trabalho, decidiu-se novamente por estudar o sistema faujasítico (Nano-X/Na), com os diferentes cátions (Mn^{2+}, Co^{2+}, Cu^{2+}, Zn^{2+} e Ni^{2+}) para a imobilização da lipase de *Rhizomucor miehei* (RML).

A quantidade de enzima imobilizada nos suportes derivados de Nano-X/Na é mostrada na Tabela 9.

A comparação com a porcentagem de enzima imobilizada pela nanozeólita Nano-X/Na na forma sódica, em relação aos outros suportes, torna evidente que as nanozeólitas trocadas com os diferentes metais de transição podem imobilizar uma maior quantidade de enzimas. Essa observação pode ser facilmente explicada por regiões com maior densidade de carga negativa da enzima e o caráter mais positivo do suporte devido à incorporação dos cátions que aumenta a atração da enzima, a qual emprega força eletrostáticas na ligação entre a enzima e suporte. Deve-se lembrar também que as zeólitas trocadas com estes cátions, sobretudo os metais de transição, formam complexos com os grupamentos -NH_2 (amino terminal) da enzima, grupos aspagina e lisina em menor número (Macario, A. *et al.*, 2008). Em contrapartida, presume-se que os grupos silanóis que contribuem para o aumento da carga negativa na superfície das nanozeólitas sódicas (e podem interagir com regiões positivas da enzima) sofrem o efeito de repulsão das regiões carregadas negativamente das enzimas, que são predominantes, resultando em uma menor taxa de imobilização (Macario *et al.*, 2007).

Se por um lado o suporte Nano-X/Na foi capaz de imobilizar apenas 20,6±0,9%, por outro, altos valores de imobilização foram obtidos para Nano-X/Co/0.5M (100%) e valores intermediários foram observados para Nano-X/Ni/0.5M, Nano-X/Cu/0.5M, Nano-X/Mn/0.5M e Nano-X/Zn/0.5M (37,8±1,0%; 37,8±0,6%; 29,1±0,3% e 27,3±2,1%, respectivamente). As atividades enzimáticas obtidas para os complexos Nano-X/Na-RML, Nano-X/Mn/0.5M-RML, Nano-X/Cu/0.5M-RML, Nano-X/Co/0.5M-RML, Nano-X/Zn/0.5M-RML e Nano-X/Ni/0.5M-RML foram 3,2±0,3; 6,0±1,1; 8,0±1,6; 5,6±1,1; 9,2±0,4 e 44,0±2,1 U/mg-suporte, respectivamente.

A análise desses dados, conforme esperado, indica novamente que o complexo nanozeólita/enzima da amostra trocada com o níquel (Nano-X/Ni/0.5M-RML) apresentou a maior atividade de hidrólise do óleo de soja em comparação com os demais complexos (nanozeólita/enzima), ou seja, Ni^{2+}>> Zn^{2+}> Cu^{2+}> Mn^{2+}> Co^{2+}> Na^{+}.

Os dados obtidos indicam que uma troca iônica mais efetiva leva a um aumento na atividade enzimática, pois o complexo Nano-X/Ni/0.5M-RML apresenta uma atividade enzimática aproximadamente 14 vezes maior que a atividade obtida para o complexo da forma pura da zeólita (Nano-X/Na-RML). Por outro lado, nota-se que o suporte Nano-X/Co/0.5M imobilizou 100% da quantidade de proteína oferecida ao

sistema, mas a atividade enzimática obtida foi baixa de apenas 5,6±1,1 U/mg-suporte. Pode-se afirmar que a porcentagem de enzima imobilizada e a atividade enzimática são altamente dependentes não apenas da estrutura cristalina do suporte sólido como também da natureza iônica predominante nesses sólidos, quando se trata de zeólitas. No caso do suporte Nano-X/Co/0.5M pode ter ocorrido distorções na estrutura da enzima e isso pode ter alterado as propriedades finais da enzima ou, até mesmo, a alta quantidade de enzima restringiu o acesso do substrato aos sítios catalíticos da enzima (Mateo *et al.*, 2007).

Tabela 9 Porcentagem de imobilização e atividade enzimática da lipase de *Rhizomucor miehei* em função das condições de troca iônica: Nano-X/0,5M/36h. Carga enzimática oferecida de 10mg proteína/ g de suporte.

Suporte zeolítico	**Imobilização** (mg/g suporte)	**Imobilização** (%)*	**Atividade enzimática** (U/mg suporte)
Nano-X/Na	2,06 ± 0,09	20,6 ± 0,9	3,2 ± 0,3
Nano-X/Mn/0.5M	2,91 ± 0,03	29,1 ± 0,3	6,0 ± 1,1
Nano-X/Cu/0.5M	3,78 ± 0,06	37,8 ± 0,6	8,0 ± 1,6
Nano-X/Co/0.5M	10,0	100	5,6 ± 1,1
Nano-X/Zn/0.5M	2,73 ± 0,21	27,3 ± 2,1	9,2 ± 0,4
Nano-X/Ni/0.5M	3,78 ± 0,10	37,8 ± 1,0	44,0 ± 2,1

*Porcentagem de imobilização de *Rhizomucor miehei* = (massa de enzima na solução final (m*f*)/massa de enzima na solução inicial (m*i*))*100.

Após ter encontrado os melhores suportes para a imobilização da lipase de *Rhizomucor miehei*, resolveu-se estender os conhecimentos para a lipase *T. lanuginosus* que também é efetiva na catálise da reação de transesterificação de triacilglicerídeos para a produção de biodiesel. Decidiu-se estudar a interação da lipase de *T. lanuginosus* com o sistema faujasítico (Nano-X/Na), utilizando diferentes cátions (Mn^{2+}, Cu^{2+}, Co^{2+}, Zn^{2+}, Ni^{2+}), também nas condições ideais de troca iônica (0,5M/36h).

A análise da Tabela 10 mostra que a quantidade de enzima imobilizada também foi dividida em três grupos: a maior eficiência de imobilização foi observada para Nano-X/Co/0.5M e Nano-X/Zn/0.5M (100% e 90,8±1,0%, respectivamente); valores intermediários de imobilização foram observados para Nano-X/Mn/0.5M e Nano-X/Cu/0.5M (77,5±0,9 e 68,4±4,1%, respectivamente); e os valores mais baixos de

imobilização foram para os suportes Nano-X/Ni/0.5M e Nano-X/Na (43,7±1,1 e 18.3±2,1%, respectivamente).

Uma comparação entre os dados de atividade enzimática obtidos com a lipase de *T. lanuginosus* e a lipase de *R. miehei* (RML), imobilizadas nas mesmas condições nos suportes Nano-X/Na, Nano-X/Mn/0.5M, Nano-X/Cu/0.5M, Nano-X/Co/0.5M, Nano-X/Zn/0.5M, Nano-X/Ni/0.5M (Tabela 9 e Tabela 10) indicam que complexos nanozeólitas/lipases de *T. lanuginosus* apresentaram uma maior atividade catalítica na hidrólise do óleo de soja.

Tabela 10 Porcentagem de imobilização e atividade enzimática da lipase de *T. lanuginosus* em função das condições de troca iônica: Nano-X/0,5M/36h. Carga enzimática oferecida de 10mg proteína/g de suporte.

Suporte zeolítico	**Imobilização** (mg/g suporte)	**Imobilização** (%)*	**Atividade enzimática** (U/mg suporte)
Nano-X/Na	1,83 ± 0,21	18,3 ± 2,1	2.4 ± 0,3
Nano-X/Mn/0.5M	7,75 ± 0,09	77,5 ± 0,9	28,4 ± 2,4
Nano-X/Cu/0.5M	68,4 ± 0,41	68,4 ± 4,1	9,6 ± 0,7
Nano-X/Co/0.5M	100	100	24,8 ± 1,0
Nano-X/Zn/0.5M	9,08 ± 0,10	90,8 ± 1,0	25,2 ± 1,2
Nano-X/Ni/0.5M	4,37 ± 0,11	43,7 ± 1,1	51,6 ± 1,8

* Porcentagem de imobilização de *Thermomyces lanuginosus* = (massa de enzima na solução final (m*f*)/massa de enzima na solução inicial (m*i*))*100.

De acordo com os resultados obtidos até aqui, ambas as lipases de *R. miehei* e *T. lanuginosus* são mais ativas quando imobilizadas em suporte modificado com Ni^{2+}, tornando evidente que as maiores atividades enzimáticas foram obtidas quando comparadas com os outros suportes 44,0±2,1 U/mg-suporte (Nano-X/Ni/0.5M-RML) para 51,6±1,8 U/mg-suporte (Nano-X/Ni/0.5M-TLL). Nesse caso, pode-se afirmar que as diferentes espécies de óxido de níquel favoreceram a interação entre a enzima e o suporte, o que permitiu uma melhor conformação de ambas as enzimas quando imobilizadas nesse suporte. Entretanto, quando os suportes modificados com Cu^{2+} foram utilizados nos complexos (Nano-X/Cu/0.5M-RML e Nano-X/Cu/0.5M-TLL), as atividades se mostraram muito baixas (8,0±1,6 U/mg-suporte e 9,6±0,7 U/mg-suporte,

respectivamente), indicando que o cobre mesmo presente como cátion de compensação no suporte zeolítico pode causar distorção da estrutura nativa da enzima.

Quando avaliados os suportes modificados com Mn^{2+}, Co^{2+}, Zn^{2+}, nota-se que esses suportes avaliados interagiram de forma diferente com as enzimas. Se comparar, apenas as atividades enzimáticas obtidas para ambas enzimas, os dados indicam que é evidente que as maiores atividades enzimáticas foram observadas para os complexos formado pelo lipase de *T. lanuginosus* e os diferentes suportes: 6,0 ±1,1 U/mg-suporte (Nano-X/Mn/0.5M-RML) para 28,4±2,4 U/mg-suporte (Nano-X/Mn/0.5M-TLL); 5,6±1,1 U/mg-suporte (Nano-X/Co/0.5M-RML) para 24,8±1,0 U/mg-suporte (Nano-X/Co/0.5M-TLL); 9,2±0,4 U/mg-suporte (Nano-X/Zn/0.5M-RML) para 25,2 ± 1,2 U/mg-suporte (Nano-X/Zn/0.5M-TLL).

Os dados apresentados nas Tabela 9 e Tabela 10 indicaram que esses suportes também foram mais eficientes para a imobilização da lipase de *T. lanuginosus* (TLL), exceto o suporte Nano-X/Co/0.5M que apresentou 100% de imobilização para as duas lipases, porém não exibiu elevada atividade enzimática. Em vista disso, três possíveis explicações podem ser atribuídas a esse comportamento diferente: (i) as distorções nas conformações das enzimas são diferentes e ambas sofrem distorções provocadas pelo processo de imobilização. A forte interação eletrostática entre a lipase de *R. miehei* (RML) e a superfície do suporte restringe os acessos dos sítios catalíticos ao substrato; (ii) a massa molecular da lipase de *R. meihei* é menor que a da lipase de *T. lanuginosus*. Logo, a lipase de *R. meihei* pode ser imobilizada preferencialmente na face interna e a lipase de *T. lanuginosus* na parte mais externa, assim a TLL é mais ativa porque os derivados de RML podem promover maior resistência à transferência de massa do meio ao microambiente do biocatalisador; e (iii) a impureza presente no lote de enzima de RML adquirido pode ser adsorvida, impedindo o acesso do substrato e esse mesmo efeito não pode ser observado para a lipase de TLL, uma vez que o lote dessa enzima é bastante homogêneo.

4.3.7.5 Imobilização e atividade enzimática para nanozeólita Nano-LTA trocada com diferentes cátions

Os estudos de imobilização enzimática também foram estendidos para a nanozeólita Nano-LTA/Na usando a lipase *T. lanuginosus* (TLL) uma vez que essa enzima ter apresentou bons resultados para o sistema Nano-X/Na e seus derivados de troca iônica.

Os dados de imobilização e atividade enzimática em função da troca iônica estão apresentados na Tabela 11 e foram obtidos de acordo com as seguintes condições: concentração da solução de níquel (0,1M), tempo (16h) e temperatura (60ºC). As atividades enzimáticas determinadas para os complexos Nano-LTA/Mn/0.1M-TLL, Nano-LTA/Cu/0.1M-TLL, Nano-LTA/Co/0.1M- TLL, Nano-LTA/Zn/0.1M-TLL e Nano-LTA/Ni/0.1M-TLL, foram 12,1±0,6; 11,4±1,2; 3,8±0,7; 22,4 ±1,6 e 24,3±0,4 U/mg-suporte, respectivamente.

Aqui, mais uma vez, pode-se observar que esses valores são maiores quando comparados com o valor obtido para o complexo Nano-LTA/Na-TLL, pois para esse suporte a atividade foi 3,2±0,1 U/mg-suporte. Este aumento significativo é uma forte indicação de que a atividade enzimática está relacionada com o cátion presente na estrutura do suporte da nanozeólita LTA, semelhante ao que foi anteriormente observado para o suporte Nano-X/Na e seus derivados de troca iônica.

Tabela 11 Porcentagem de imobilização e atividade enzimática da lipase de *Thermomyces lanuginosus* em função das condições de troca iônica: Nano-LTA/0,1M/16h (*). Carga enzimática oferecida de 10mg proteína/g de suporte.

Suporte zeolítico	**Imobilização** (mg/g suporte)	**Imobilização** (%)*	**Atividade enzimática** (U/mg suporte)
Nano-LTA/Na	2,25 ± 0,09	22,5 ± 0,9	3,2 ± 0,1
Nano-LTA/Mn/0.1M	2,33 ± 0,02	23,3 ± 0,2	12,1 ± 0,6
Nano-LTA/Cu/0.1M	5,98 ± 0,12	59,8 ± 1,2	11,4 ± 1,2
Nano-LTA/Co/0.1M	0,45 ± 0,03	4,5 ± 0,3	3,8 ± 0,7
Nano-LTA/Zn/0.1M	2,18 ± 0,11	21,8 ± 1,1	22,4 ± 1,6
Nano-LTA/Ni/0.1M	4,24 ± 0,08	42,4 ± 0,8	24,3 ± 0,4

* Porcentagem de imobilização de *Thermomyces lanuginosus* = (massa de enzima na solução final (m*f*)/massa de enzima na solução inicial (m*i*)*100.

Com relação à quantidade de enzima imobilizada, constatou-se que houve uma variação entre os suportes, dentre os quais aquele com maior eficiência de imobilização foi o Nano-LTA/Cu/0.1M (59,8±1,2%). Todavia, correlacionando a quantidade de enzima imobilizada no suporte nanozeolítico com a atividade enzimática do complexo

nanozeólita-enzima pôde-se observar que a maior atividade foi obtida pelo complexo Nano-LTA/Ni/0.1M/TLL (24,3±0,4 U/mg suporte) e a quantidade de enzima imobilizada nesse suporte foi de 42,4±0.8%. Esse dado é diferente em relação ao suporte Nano-LTA/Cu/0.1M que apresenta uma imobilização de 59,8±1,2%. Porém, uma menor atividade de 11,4±1,2 U/mg-suporte foi medida para este complexo, indicando novamente que o fato de conseguir uma boa eficiência de imobilização não necessariamente implica ou indica que a enzima será imobilizada em sua forma ativa.

4.3.7.6 Imobilização e atividade enzimática para suporte (Nano-LTA/Ni) em função da concentração molar na troca iônica

Nessa etapa do trabalho, utilizou-se somente o suporte Nano-LTA/Ni para avaliar a troca iônica em função da concentração molar, visto que a nanozeólita LTA trocada com o cátion de níquel (Nano-LTA/Ni/0.1M) mostrou-se o suporte mais eficiente para a imobilização da lipase de *T. lanuginosus*.

Para verificar se a concentração molar da solução de troca iônica melhora as características do suporte Nano-LTA/Ni, os experimentos foram realizados variando-se a concentração do cátion entre 0,1M e 0,5M e os ensaios de troca iônica foram realizados por 36h. Foram estudados três suportes, como mostra a Tabela 12, denominados Nano-LTA/Ni/0,1M, Nano-LTA/Ni/0,3M e Nano-LTA/Ni/0,5M, avaliando-se a eficiência da imobilização e a atividade de hidrólise do óleo de soja.

Tabela 12 Porcentagem de imobilização e atividade enzimática em função da concentração molar de $NiSO_4$ no processo de troca iônica: Nano-LTA/0,1M-0,5M/36h.

Suporte zeolítico	**Imobilização** (mg/g suporte)	**Imobilização** (%)*	**Atividade enzimática** (U/mg suporte)
Nano-X/ LTA/0.1M	4,41 ± 0.08	44,1 ± 0.8	26,2 ± 1,3
Nano-X/ LTA/0.3M	4,85 ± 0,10	48,5 ± 1,0	32,4 ± 2,1
Nano-X/ LTA/0.5M	5,64 ± 0,21	56,4 ± 2,1	44,3 ± 1,2

* Porcentagem de imobilização de *Thermomyces lanuginosus* = (massa de enzima na solução final (m*f*)/massa de enzima na solução inicial (m*i*))*100.

Os resultados apresentados na Tabela 12 novamente confirmam que a atividade enzimática está correlacionada com o meio catiônico dominante. Contudo, diferente do que foi observado para a nanozeólita Nano-X, os níveis de imobilização aumentaram de acordo com a razão molar para Nano-LTA, indicando que a molaridade também interferiu na capacidade de imobilização do suporte. Além disso, os dados indicam uma boa correlação da atividade enzimática com a variação da concentração molar do cátion no procedimento de troca iônica, uma vez que a maior atividade foi obtida para o complexo Nano-LTA/Ni/0.5M-TLL (44,3±1,2U/mg-suporte). Apesar da estrutura na Nano-LTA ser diferente da Nano-X, esses resultados confirmam uma maior quantidade de cátions de Ni^{2+} presentes na região extra-rede favorece a ativação da enzima e a melhor orientação da enzima na superfície do suporte.

4.3.8 *Produção de biodiesel com os complexos nanozeólitas-enzimas*

4.3.8.1 Produção de biodiesel usando óleo de palma com os complexos de Nano-X/ lipase R. miehei (RML)

Estudos catalíticos sistemáticos com uso de quantidades equivalentes de enzima imobilizada no suporte nanozeolítico e na sua forma livre foram realizados a fim de se obter uma melhor visão sobre o efeito de espécies catiônicas presentes nos suportes zeolíticos e suas influências no rendimento de ésteres etílicos de ácidos graxos (EEAG) obtidos nas reações de transesterificação. Os testes catalíticos para a produção de biodiesel foram feitos com os complexos nanozeólitas-enzimas que obtiveram as atividades enzimáticas mais efetivas. Nesse caso, para a lipase de *R. miehei* foram utilizados os complexos Nano-X/Na/0.5M-RML, Nano-X/Zn/0.5M-RML, Nano-X/Mn/0.5M-RML, Nano-X/Co/0.5M-RML e Nano-X/Ni/0.5M-RML.

A quantificação dos ésteres etílicos formados foi feita por cromatografia gasosa (CG), conforme procedimento experimental (*item 3.4.3*). A Figura 43 mostra a produção de ésteres etílicos a partir do óleo de palma, obtida com os complexos nanozeólitas-lipase/RML, acima citados. Os resultados das análises dos produtos formados indicam que a lipase de *R. miehei* imobilizada em diferentes formas da nanozeólita Nano-X foram capazes de catalisar a reação de transesterificação do óleo de palma com etanol para produzir ésteres etílicos.

No caso específico da enzima de *R. miehei*, foi observado, de forma sistemática, que a maior quantidade de EEAGs foi obtida utilizando a quantidade equivalente da enzima na sua forma livre, em comparação com a mesma quantidade imobilizada sobre

os suportes nanozeolítico Nano-X/Mn/0,5M-RML, Nano-X/Cu/0.5M-RML, Nano-X/Co/0.5M-RML e Nano-X/Zn/0.5M-RML (Figura 43). Esses resultados confirmam que a imobilização de RML nesses suportes resultou em uma orientação não favorável da enzima e, por isso, a lipase livre foi mais ativa. Entretanto, estudos na literatura indicam uma menor atividade de lipases solúveis na síntese de biodiesel se comparadas com lipases imobilizadas devido à formação de agregados bimoleculares (Fernandez-Lorente *et al.*, 2003; Palomo *et al.*, 2003; Mendes *et al.*, 2012). Todavia, tais resultados catalíticos estão de acordo com os dados de atividade enzimática determinados anteriormente, com exceção do complexo Nano-X/Ni/0.5M-RML, para o qual foi observado que a conversão em ésteres etílicos, formados pela enzima na sua forma imobilizada, é ligeiramente maior (73,6%), enquanto que a quantidade produzida pela enzima, na sua forma livre é de 61,6%.

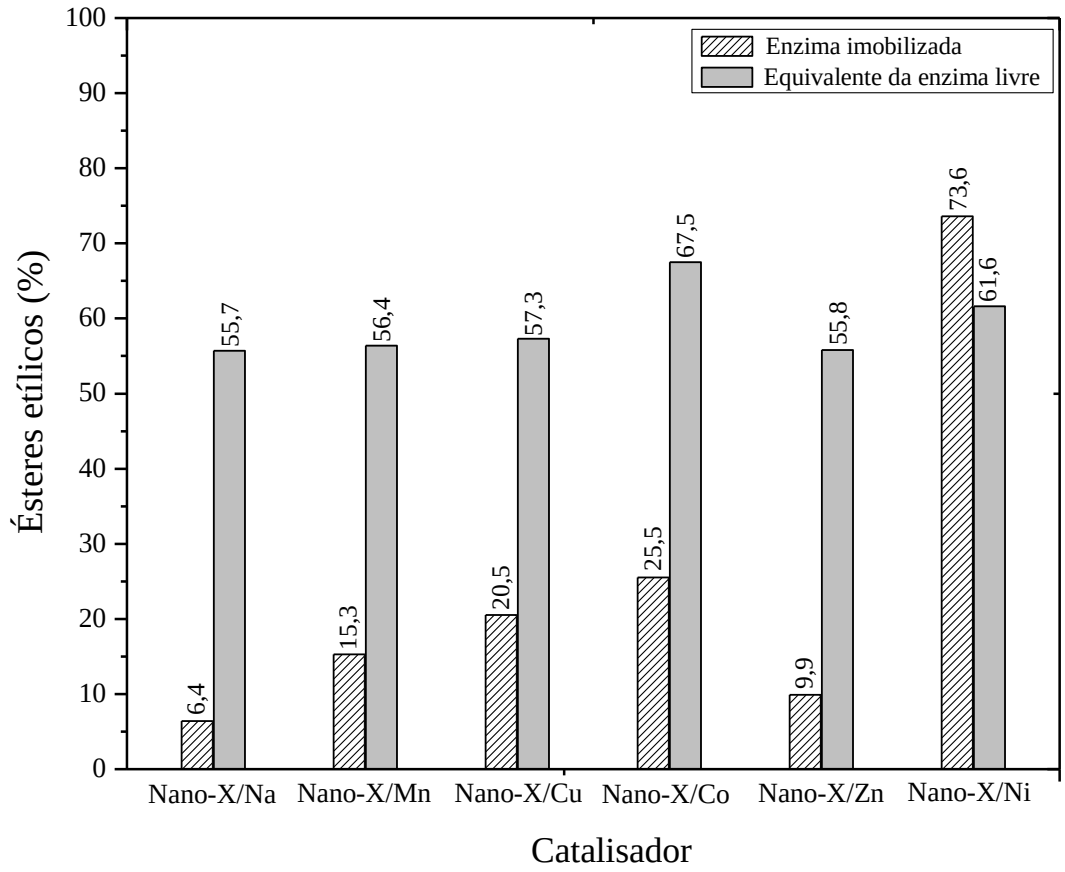


Figura 43 Rendimentos de ésteres etílicos produzidos com os complexos Nano-X/Na-RML, Nano-X/Mn/0.5M-RML, Nano-X/Cu/0.5M-RML, Nano-X/Co/0.5M-RML, Nano-X/Zn/0.5M-RML, Nano-X/Ni/0.5M-RML e os respectivos equivalente da enzima em sua forma livre. Condições de Reação: 48h em 40°C razão óleo palma: etanol igual 1:4 e 5% (m/m) da razão óleo:biocatalisador.

4.3.8.2 Otimização e produção de biodiesel usando complexo Nano-X/Ni/0.5M-RML

A otimização da produção de biodiesel foi obtida por meio do planejamento experimental da superfície de resposta do tipo Box-Behnken, empregando-se a lipase *R. miehei*, imobilizada na nanozeólita Nano-X/Ni/0.5M. Do ponto de vista prático, o uso de um biocatalisador ativo é ideal para se obter uma boa correlação entre os dados de otimização e os parâmetros avaliados. De acordo com os resultados descritos *no item anterior 4.3.8.1* para a lipase (RML), este complexo mostrou ser o biocatalisador mais eficiente, pois obteve o melhor rendimento: 73,6% de ésteres etílicos. Dessa forma, durante o ensaio de otimização, a conversão total não pode ser atingida, possibilitando obter mais informações a respeito dos padrões de interações das variáveis.

Para os testes de otimização foram realizados 15 ensaios com três repetições do ponto central variando parâmetros que influenciam a reação de transesterificação, como o tempo reacional (T), razão molar (O:E) e a quantidade de catalisador (Q). A Tabela 13 mostra a matriz de planejamento do *Box-Behnken* com as três variáveis, juntamente com a porcentagem de rendimento obtido em ésteres etílicos.

Tabela 13 Matriz de planejamento experimental com os rendimentos de ésteres etílicos.

Ensaio	Variáveis			Rendimento de ésteres etílicos (%)
	Razão molar (óleo de palma:etanol)	Quantidade de Catalisador (%)	Tempo de Reação (h)	
1	1:5	3,0	30	53,4
2	1:4	5,0	30	67,4
3	1:5	5,0	48	61,7
4	1:5	5,0	12	60,2
5	1:6	5,0	30	61,9
6	1:5	1,0	12	22,9
7	1:4	3,0	48	56,3
8	1:6	3,0	48	56,9
9	1:5	1,0	48	31,9
10	1:4	3,0	12	52,8
11	1:6	1,0	30	23,4
12	1:6	3,0	12	33,1
13	1:4	1,0	30	57,2
14	1:5	3,0	30	56,2
15	1:5	3,0	30	51,5

A Tabela 13 apresenta os valores de ésteres obtidos em função dos parâmetros avaliados. As condições otimizadas foram para o ensaio 2, que apresentou o maior rendimento de ésteres etílicos, 67,4%, foi obtido nas seguintes condição de reação: razão molar O:E de 1:4, quantidade de catalisador 5% (% em massa em relação ao óleo) a 40°C, tempo de 30h, e estão de acordo com o que foi reportado na literatura a respeito da eficiência da utilização de uma baixa razão molar O:A para a produção de biodiesel via catálise enzimática. Nesse caso, um pequeno excesso de álcool desloca o equilíbrio e a dispersão reduz a viscosidade do meio reacional e melhora a acessibilidade do óleo no microambiente do biocatalisador. Além disso, a máxima conversão foi alcançada na maior concentração de biocatalisador, mostrando que a reação é cinematicamente controlada pelo biocatalisador.

Segundo Verdugo *et al.* (2011) a otimização realizada pela metodologia de superfície de resposta mostrou que a melhor razão molar O:E para a reação de produção de biodiesel foi 1:3 Óleo:Álcool. Na transesterificação enzimática do óleo de canola via rota metílica, Yucel e colaboradores (2011) encontraram a melhor condição para a produção de ésteres, utilizando uma razão molar de 1:4 Óleo:Álcool (Yücel *et al.*, 2011). Charpe e Rathod (2011) também observaram, na transesterificação enzimática uma melhor conversão a ésteres quando foi utilizada uma razão molar de 1:3 Óleo:Álcool. Segundo estes autores, em reações catalisadas por compostos alcalinos, uma alta razão molar Óleo:Álcool aumenta a conversão de ésteres. Isso porque o álcool em excesso desloca o equilíbrio para a produção do biodiesel. No entanto, uma diminuição na conversão de ésteres em reações com alta razão molar Óleo:Álcool foi observada em transesterificação enzimática, sobretudo devido à inibição da lipase pelo álcool, principalmente quando este é insolúvel na mistura.

Na sequência, com o auxílio do software MINITAB 16 os coeficientes de regressão e as constantes do modelo experimental foram obtidas e indicaram que o modelo quadrático previu o rendimento de ésteres etílicos, conforme a Tabela 14.

De acordo com Liao e Chung (2011), a precisão do modelo polinomial pode ser avaliada pelo coeficiente de determinação (R^2). Este coeficiente obtido em nosso estudo informou que 98,69% da variação no rendimento de ésteres etílicos podem ser explicados pelo modelo (Tabela 14), para o qual o valor do coeficiente de determinação ajustado (R^2 adj.= 96,34%) também foi significativo.

Os valores de *p* (do modelo quadrático) são utilizados como ferramenta para avaliar a significância de cada um dos coeficientes, assim é importante para compreender o padrão das interações entre as variáveis (Lin *et al.*, 2012). Caso o valor de *p* para o modelo seja menor do que 0,05, é possível notar uma relação estatisticamente significativa entre a resposta e a variável selecionada com um nível de confiança de 95% (Singh *et al.*, 2012). Porém, ao contrário dos valores ajustados, o valor de *p* da falta de ajuste tem que ser maior que 0,05 para ser significativo, porque a falta de ajuste mede a inadequação do modelo nas variações das respostas. Neste caso, para o nosso planejamento experimental o *p* da falta de ajuste (0,287) foi maior que 0,05; há evidências, assim, de que o modelo explicou adequadamente as variações de respostas. A aplicação desse modelo foi satisfatória porque a condição ótima foi alcançada e ajustada para a variável de otimização.

Tabela 14 Valores de p do modelo quadrático completo determinado para as variáveis.

Termos	**Valor de p**
O:E (Razão óleo: etanol)	0,545
T (tempo de reação)	0,366
Q (Quantidade de catalisador)	0,003
O:E* O:E	0,731
Q*Q	0,001
T*T	0,279
O:E*Q	0,483
O:E* T	0,746
Q*T	0,234

R^2 = 98,69%, R^2(adj) = 96,34%, *p* do Falta de ajuste = 0,287. Onde, (T)= tempo reacional, (O:E)= razão molar e (Q)=quantidade de catalisador.

Considerando os dados da Tabela 14, é possível verificar que a quantidade de catalisador (Q) foi significante ($p<0,01$), tanto na análise linear, quanto na análise quadrática (Q*Q), indicando forte influência deste parâmetro na superfície de resposta do aumento do rendimento de ésteres etílicos. Os demais coeficientes lineares (O:E, T), quadráticos (O:E*O:E, T*T) e de interação (O:E*Q, O:E*T, O:E*T), não foram significativos na determinação do modelo, $p>0,05$ dentro das condições avaliadas. Logo, pode-se inferir que apenas a quantidade de catalisador influencia significativamente no rendimento de ésteres etílicos. Contudo, embora não tenha sido observada significância

nos parâmetros razão molar (O:E) e no tempo reacional (T), serão verificados mais adiante que os gráficos de contorno (Figura 44) e a produção de ésteres etílicos em função do tempo (Figura 45) explicam de forma precisa a importância dessas variáveis no modelo.

A partir da análise de regressão sobre a matriz de planejamento experimental e as respostas dadas na Tabela 14, a equação polinomial de segunda ordem (Equação 7) foi obtida para explicar a eficiência do complexo Nano-X/Ni/0.5M-RML na conversão de óleo de palma a ésteres etílicos. O valor de *p* determinado para a regressão foi de ($p<0,0001$), o que indica que o modelo é adequado para explicar a relação entre a superfície de resposta e os parâmetros envolvidos (Shaw *et al.*, 2008).

$$EE = 28,9056 - 9,6042\,R + 2,2194\,Q + 0,4831\,T + 0,5250\,R^2 - 0,0242\,Q^2$$
$$-0,0054\,T^2 + 0,0525\,RQ + 0,0264\,RT - 0,0052\,QT + 2,7702$$

Equação 7 Equação polinomial de segunda ordem para o modelo quadrático, onde EE é o valor predito de ésteres etílicos produzidos, R= razão molar óleo:etanol(O:E), T= tempo reacional e quantidade de catalisador (Q).

O uso de gráficos de contorno (*contour plot*) descrito pelo modelo de regressão, conforme apresentados na Figura 44 foi outra forma utilizada para avaliar os efeitos das variáveis na produção de ésteres etílicos a partir do óleo de palma. Os dados permitem um melhor entendimento das variáveis e da superfície de resposta do modelo.

O efeito da interação entre razão molar O:E e a quantidade de catalisador foi mostrado na Figura 44a. Observou-se que a baixa razão molar, juntamente com a maior quantidade de catalisador, foi determinante para a reação catalítica e que o máximo rendimento em ésteres foi alcançado para os ensaios conduzidos com a maior concentração de catalisador (5% em massa). Essa interação pode ser facilmente explicada, uma vez que é sabido que o excesso de álcool pode inativar a lipase, diminuindo a atividade catalítica da enzima. Por outro lado, uma maior quantidade de catalisador presente no meio reacional também aumenta os sítios catalíticos e, consequentemente, a taxa reacional.

O efeito da interação entre tempo de reação (T) e a quantidade de catalisador (Q) está apresentado na Figura 44b. Pode-se observar que a maior quantidade de catalisador foi determinante para a produção de biodiesel e, curiosamente, ao que tudo indica, nas reações, os períodos de tempo reacionais avaliados (12, 30 e 48h) não influenciaram

significativamente na quantidade de ésteres produzidos. A Figura 44b mostra que a partir de 12h de reação e em uma baixa razão molar O:E, pode-se verificar que a maior parte do óleo já tinha sido convertida a biodiesel.

A interação entre a razão molar O:E e tempo na síntese de ésteres etílicos é apresentada na Figura 44c. O parâmetro de tempo sobre a produção de biodiesel não apresentou significância, ao passo que com o aumento da razão molar (álcool:óleo), houve a diminuição da produção de ésteres etílicos. Isso indica que a atividade das enzimas é sensivelmente inibida pelo excesso de álcool na reação (Li e Yan, 2010).

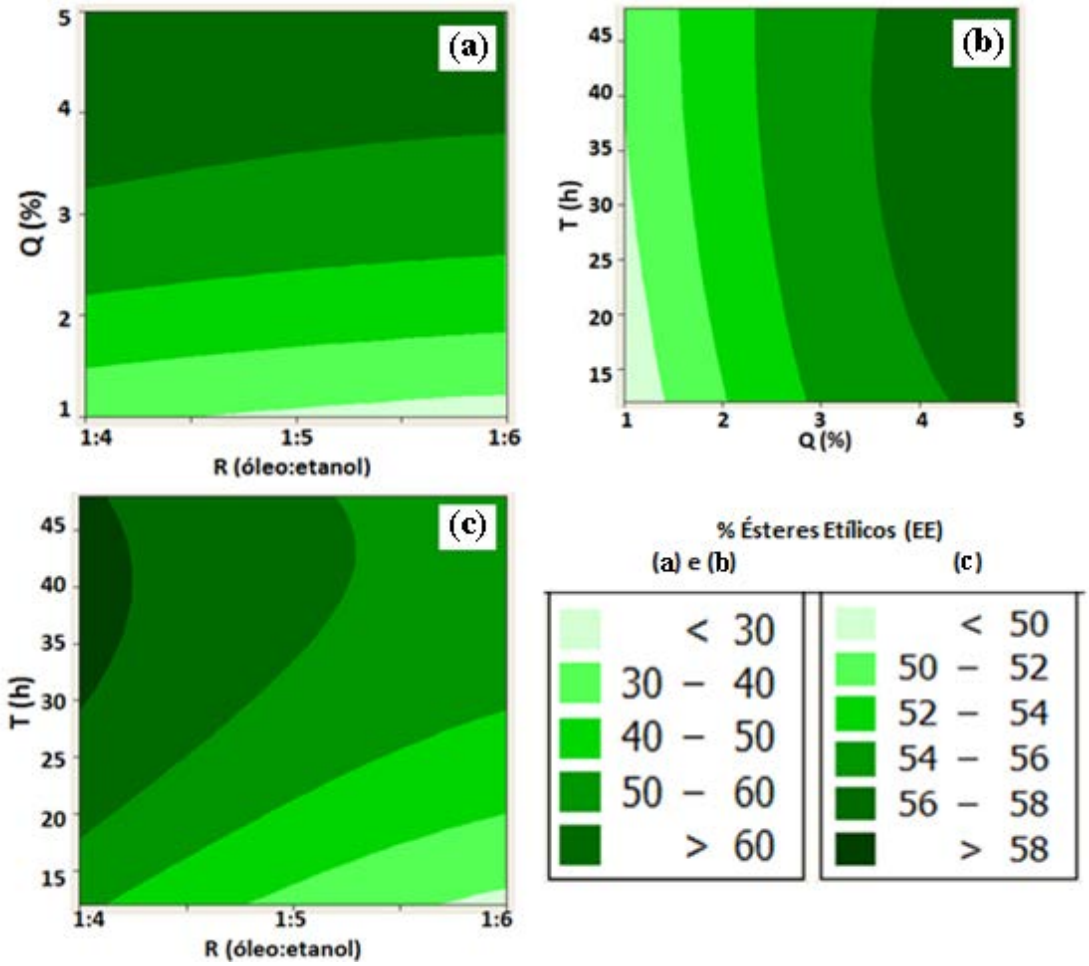


Figura 44 Gráficos de Contorno obtidos a partir do modelo previsto, mantendo constantes Tempo em 30 horas (a), Razão molar O:E em 1:5 (b), Quantidade do catalisador em 3% (massa em relação ao óleo de palma) (c). Resposta EE dado pelo gradiente em verde indicado na legenda, figuras a e b (a esquerda) e c (a direita).

Os resultados observados na otimização relacionado ao tempo são representativos e reprodutíveis. Do ponto de vista científico, tais constatações são interessantes e motivaram a seguinte pergunta: Quais razões explica o fato dos períodos de tempo (12,

30 e 48h) não terem sido significativos nos testes realizados? Assim, uma reação nas condições otimizadas, em função do tempo, foi realizada para responder tal questão.

A Figura 45 mostra a conversão do óleo de palma a ésteres etílicos em intervalos de tempo pré-determinados, com dados que indicam um comportamento não usual: pode-se verificar que nos períodos de tempo 0–3h e 3–6h, a conversão é muito rápida, atingindo 27,6% e 49,1%, respectivamente. Nessas etapas da reação, o fator limitante foi o álcool, uma vez que o etanol foi adicionado em *batelada alimentada* (0, 3, 6 e 9h) para não ocorrer a inativação da enzima. Contudo, nos demais intervalos de tempo avaliados de 9 a 96h a taxa catalítica foi menos acentuada, atingindo 89,6% após 96 horas. Portanto, nos períodos de tempo determinados no delineamento experimental de Box Behnken (12, 30 e 48h), notou-se uma etapa lenta da reação, o que justifica a pequena variação da conversão dos ésteres.

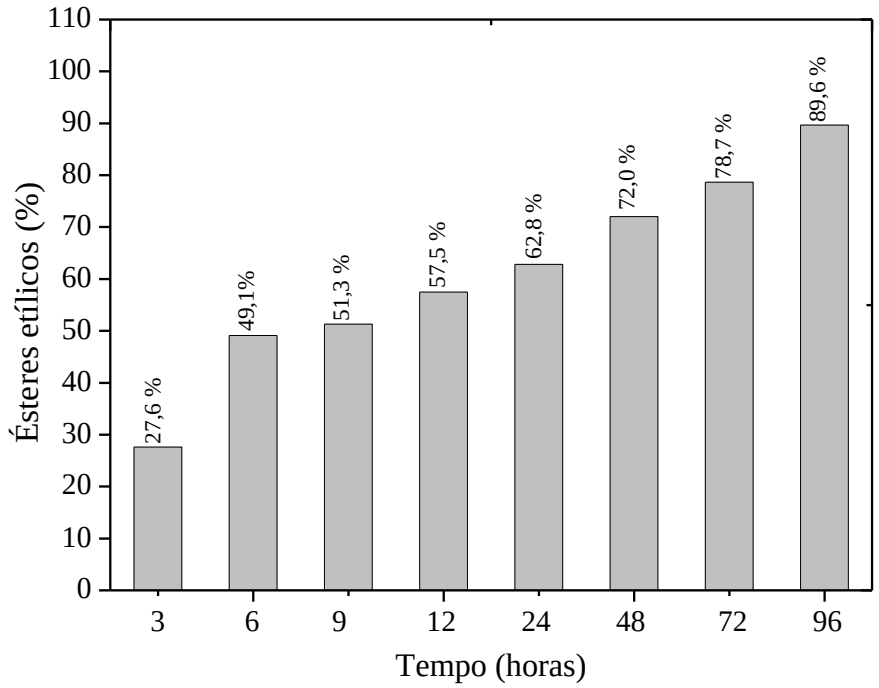


Figura 45 Produção de biodiesel em função do tempo utilizando a lipase de *Rhizomucor miehei* imobilizada sobre o suporte nanozeolíticos Nano-X/Ni/0.5M. Condições de Reação: 3-96h em 40°C razão óleo palma: etanol igual 1:4 e 5% (m/m) da razão óleo:biocatalisador.

De acordo com Rodrigues e Fernandez-Lafuente (2010), a enzima lipase de *R. miehei* é 1,3 específica e, assim, a quebra da molécula de triacilglicerídeo é rápida devido à maior especificidade da enzima nas posições 1,3 da molécula do substrato, o que justifica a alta taxa de conversão inicial, enquanto que a etapa determinante na velocidade

da reação para a conversão de biodiesel é a quebra na posição 2 que é mais lenta e depende da migração espontânea do grupo acila da posição 2 para a posição 1 ou 3 da molécula de triacilglicerídeo (Figura 5).

A validação do método foi realizada de acordo com Dizge *et al.* (2009) e a precisão do modelo foi avaliada com experimentos em triplicata em condições não testadas no modelo: Razão óleo:etanol (1:4), razão óleo:biocatalisador (5%, m/m) e T(48h); e o valor teórico foi calculado usando a Equação 7 obtida a partir do modelo de regressão. Os dados da média das três medidas experimentais (71,6%±1,8%) foram comparados com o valor teórico (68,3%), indicando que uma boa correlação foi obtida entre os resultados experimentais e o valor teórico.

4.3.8.3 Produção de Biodiesel usando óleo de palma com os complexos de Nano-X/ lipase T. lanuginosus (TLL)

A fim de verificar a eficiência do método *Box Benhken*, após estudos de otimização e a determinação dos parâmetros que influenciam a produção de biodiesel por meio de tal método, foram testados os complexos potencialmente mais eficientes selecionados pelos dados de atividade enzimática. Os dados referentes à produção de biodiesel obtida com os complexos derivados da enzima *T. lanuginosus*, Nano-X/Na-TLL, Nano-X/Zn/0.5M-TLL, Nano-X/Mn/0.5M-TLL, Nano-X/Co/0.5M-TLL e Nano-X/Ni/0.5M-TLL estão apresentados na Figura 46 e estão de acordo com os dados de atividade catalítica enzimática, ou seja, o resultado mais relevante foi obtido com o complexo Nano-X/Ni/0.5M-TLL que obteve a maior atividade enzimática (51,6 U/mg-suporte), Tabela 10.

A lipase de *T. lanuginosus* apresentou um comportamento completamente diferente do que foi observado para a lipase de *R. miehei* (Figura 44 e Figura 46). Os complexos (Nano-X/Mn/0.5M-TLL, Nano-X/Co/0.5M-TLL, Nano-X/Zn/0.5M-TLL) foram ativos e obtiveram uma conversão de 79,1; 84,2 e 84,8% do óleo de palma a ésteres etílicos, respectivamente, e bastante semelhante com a quantidade de ésteres produzidos para o equivalente de enzima na sua forma livre.

A única exceção observada foi para o complexo Nano-X/Cu/0.5M-TLL, que também seguiu o mesmo padrão do Nano-X/Cu/0.5M-RML, os quais apresentaram menores rendimentos que a enzima na sua forma livre. Esta é uma clara indicação de que os cátions cúpricos são fortes agentes de distorção para as duas enzimas, confirmando o que foi relatado anteriormente (De Vasconcellos *et al.*, 2012).

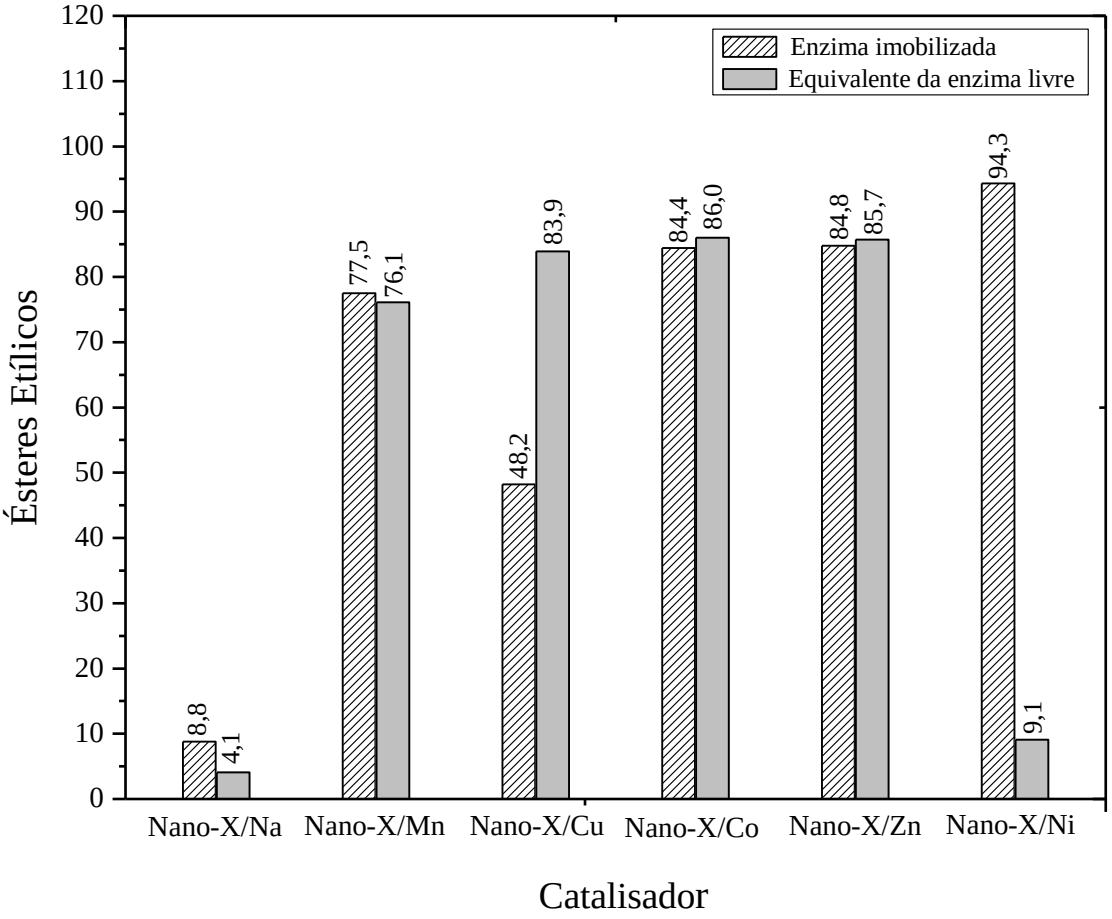


Figura 46 Rendimentos de ésteres etílicos produzidos com os complexos Nano-X/Na-TLL, Nano-X/Mn/0.5M-TLL, Nano-X/Cu/0.5M-TLL, Nano-X/Co/0.5M-TLL, Nano-X/Zn/0.5M-TLL, Nano-X/Ni/0.5M-TLL e os respectivos equivalentes da enzima em sua forma livre. Condições de Reação: 48h em 40°C razão óleo: etanol igual 1:4 e 5% (m/m) da razão óleo:biocatalisador.

No entanto, os resultados mais relevantes foram fornecidos também para o complexo formado entre a lipase de *T. lanuginosus* com o suporte trocado com níquel (Nano-X/Ni/0.5M-TLL). A quantidade de ésteres etílicos de ácidos graxos (EEAG) formados pela enzima livre foi 9,1% e a enzima na sua forma imobilizada obteve o rendimento de 94,3% de EEAG, resultando numa diferença cerca de dez vezes maior do que o rendimento da enzima na sua forma livre. Algumas hipóteses podem ser usadas para explicar o efeito sinérgico do complexo Nano-X/Ni/0.5M-TLL e estão descritas detalhadamente nos *itens 4.3.9 e 4.3.10* e aqui resumidas: (i) maior proteção da enzima na sua forma imobilizada; (ii) no suporte Nano-X/Ni/0.5M, a maior quantidade de água ou coordenada pode proporcionar um microambiente favorável para a imobilização de enzima; (iii) diferentes espécies de níquel proveniente da troca iônica foram determinadas

por análises de MET e XPS; (iv) a análise de AFM mostrou um recobrimento uniforme de lipases na superfície do suporte e (v) o suporte Nano-X/Ni/0.5M apresenta carga positiva e pode realizar o movimento dinâmico que estabiliza a enzima na melhor orientação com o sítio catalítico voltado para o meio reacional.

Deve-se ressaltar que mesmo tendo imobilizado apenas 43,7±1,1% da carga de lipase de *T. lanuginosus* oferecida — valor mais baixo quando comparado com os outros derivados de troca iônica — o rendimento de EEAG (94,3%) foi superior aos rendimentos obtidos com os outros complexos nanozeólita-X/lipase de *T. lanuginosus*. Essa é uma outra evidencia de que ocorre o efeito sinérgico entre o suporte zeolítico Nano-X/Ni/0.5M e a enzima de *T. lanuginosus*, demonstrando mais uma vez a importância do meio catiônico dominante no desempenho do biocatalisador.

Nos testes de reuso do biocatalisador, o complexo Nano-X/Ni/0.5M-TLL manteve-se estável e ativo depois de alguns ciclos de reação. Os resultados revelaram que o complexo Nano-X/Ni/0.5-TLL foi capaz de produzir um alto rendimento de EEAGs, até 3 ciclos, e, depois de cinco ciclos reacionais, o seu desempenho foi estabilizado e os rendimentos EEAGs mantiveram-se em torno de 60% (Figura 47). Além disso, pode-se ressaltar que o biocalisador não foi submetido a nenhum tratamento específico antes de cada ciclo reacional.

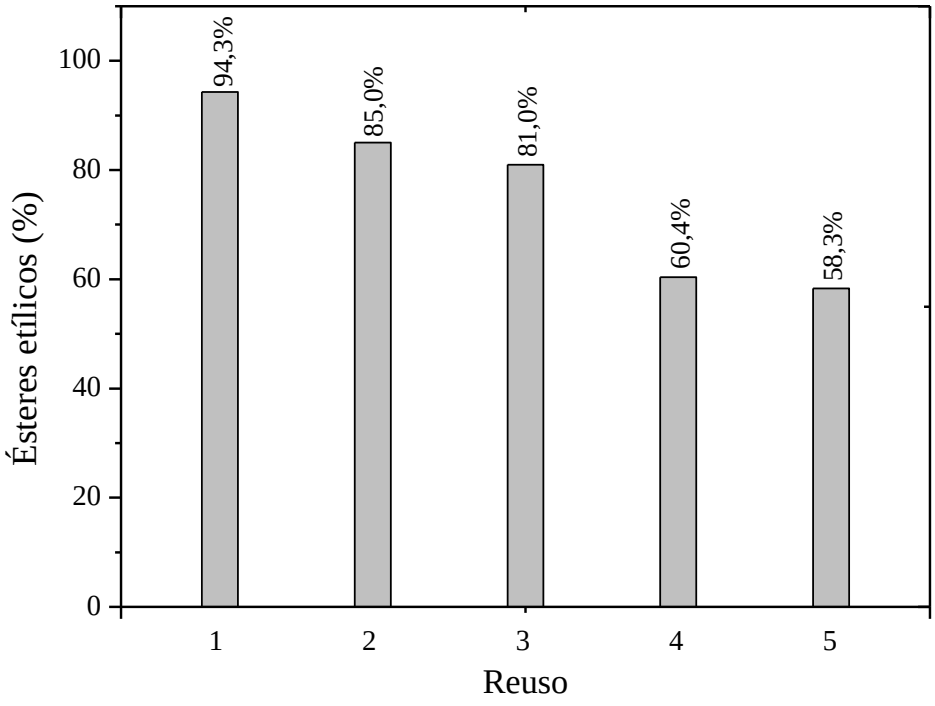


Figura 47 Testes de reuso para o complexo Nano-X/Ni/0.5M-TLL. Condições de Reação: 48h em 40°C razão óleo palma:etanol igual 1:4 e 5% (m/m) da razão óleo:biocatalisador.

Nesse caso, de acordo com duas revisões citadas, alguns métodos têm sido publicados na literatura para contornar os problemas técnicos da reutilização de biocatalisadores heterogêneos enzimáticos, como por exemplo: (i) lavagem da lipase imobilizada com álcool isopropílico. Dessa forma, a atividade é restaurada e ocorre a remoção do glicerol; ou (ii) promover microambiente hidrofóbico na superfície do biocatalisador que possa impedir a desativação e/ou agregação de agentes hidrofílicos, substratos e/ou produtos da reação, o que não implica em desativação pelo solvente da reação de transesterificação (metanol ou etanol) e nem pelo subproduto da reação (glicerol) (Ranganathan, Narasimhan e Muthukumar, 2008; Bajaj *et al.*, 2010). Assim, alguns desses procedimentos podem ser aplicados para o nosso sistema, visando a atingir níveis ideais de reuso dos biocatalisadores na produção enzimática de biodiesel.

4.3.8.4 Produção de biodiesel com os complexos Nano- LTA/TLL e Nano-X /TLL

Tendo em vista os bons resultados obtidos para o sistema Nano-X/Ni/0.5M/TLL optou-se por estender esses estudos para o sistema Nano-LTA, focando principalmente nos derivados dessa nanozeólita obtidos com níquel e a enzima *T. lanuginosus* (TLL).

A Figura 48 mostra os teores de ésteres etílicos analisados por cromatografia gasosa das amostras obtidas por meio das reações de transesterificação do óleo de palma com os diferentes catalisadores (Nano-LTA/Na-TLL, Nano-X/Na-TLL, Nano-LTA/Ni/0.5M-TLL e Nano-X/Ni/0.5M-TLL) comparados com a quantidade equivalente de enzima na sua forma livre. Para os complexos (Nano-LTA/Na e Nano-X/Na) a produção de ésteres metílicos foi muito baixa (8,8% e 18,6%, respectivamente). Todavia, para os complexos (Nano-X/Ni/0.5M/TLL e Nano-LTA/Ni/0.5M/TLL) foi obtido um percentual elevado de conversão de óleo de palma a ésteres etílicos (94,8% e 85,1%, respectivamente).

Neste caso, pode-se observar que ocorreu um comportamento sinérgico do complexo catalítico nanozeólita/enzima, quando comparado com a produção de ésteres etílicos obtidos com a concentração equivalente da enzima livre (vide Figura 48). Contudo, os resultados mostram ainda que o complexo Nano-LTA/Ni/0.5M-TLL também apresentou o maior percentual de formação de ésteres etílicos e o efeito sinergético nesse sistema é visível. Porém, esse efeito é mais evidente e pronunciado para o complexo Nano-X/Ni/0.5M-TLL que, no caso, favoreceu a formação de ésteres etílicos numa ordem

de grandeza 10 vezes maior que o equivalente produzido pela enzima livre (vide Figura 48).

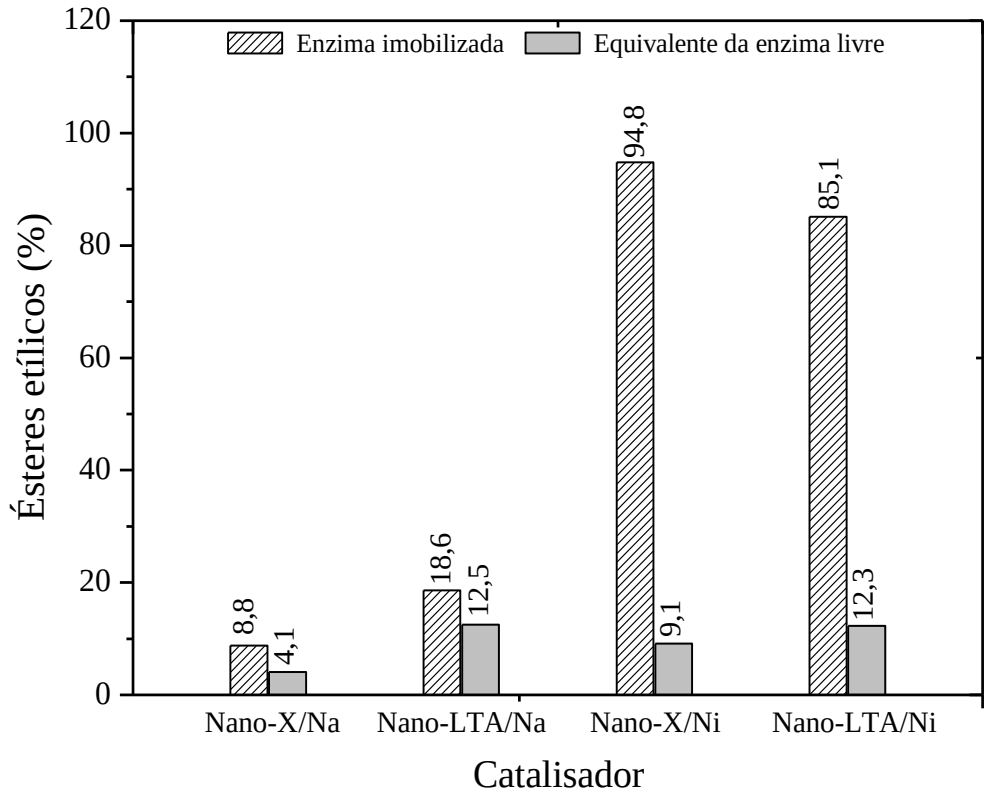


Figura 48 Porcentagem de ésteres etílicos produzidos com os complexos Nano-X/Na-TLL, Nano-LTA/Na-TLL, Nano-X/Ni/0.5M-TLL, Nano-LTA/Ni/0.5M-TLL e os respectivos equivalente da enzima em sua forma livre. Condições de Reação: 48h em 40°C razão óleo palma:etanol igual 1:4 e 5% (m/m) da razão óleo:biocatalisador.

4.3.9 *Caracterização do suporte Nano-X/Ni/0.5M e do complexo Nano-X/Ni/0.5M-TLL*

4.3.9.1 Análises de MEV, AFM, MET e XPS do suporte Nano-X/Ni/0.5M

Diante dos resultados catalíticos obtidos com o complexo Nano-X/Ni/0.5M/TLL e o efeito sinergístico observado nesse sistema para a reação de transesterificação do óleo de palma a biodiesel via rota etílica, decidiu-se fazer uma caracterização mais detalhada dessa amostra utilizando as técnicas MEV, MET, AFM e XPS. Estas caracterizações foram feitas nos grandes centros de caracterização de materiais localizados em São Paulo, e as condições experimentais nas quais esses dados foram coletados estão descritas no *item 3.6*.

A Figura 49 mostra os dados de MEV e AFM para a amostra Nano-X/Ni/0.5M. Os dados MEV indicam a formação de aglomerados que cresceram com a morfologia que foi classificada como nanoflocos cristalizados em forma de folhas aglomeradas. Contudo, apenas com dados de MEV é difícil inferir a natureza nanométrica desse material, o que foi possível a partir dos dados de AFM, mais úteis nesse sentido. A boa dispersão desse material em folhas de mica possibilitou a obtenção de bons dados de AFM e a análise da topografia dessa amostra (ilustrada na Figura 49b) indica claramente a formação de nano-grãos (30–50nm) que, aparentemente, cresceram interligados, formando aglomerados. Essa formação de aglomerados é uma característica típica da nanozeólita (Nano-X/Na), os dados de AFM possibilitaram a observação detalhada do tamanho do cristal e sua topografia.

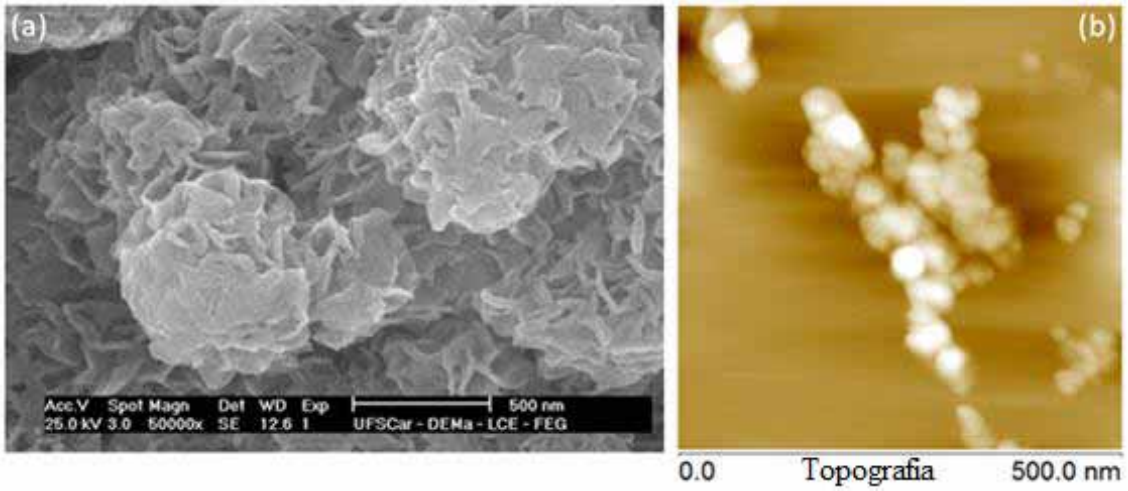


Figura 49 Imagens da nanozeólita NaX/Ni/0.5M sintetizada. (a) Micrografia eletrônica de varredura e (b) Imagem bidimensional da superfície dos dados de altura obtida no modo *Tapping Mode* AFM, área avaliada 500x500nm, com contraste de variação de altura de 0 a 150nm.

As imagens bidimensionais de AFM também estão de acordo com o que foi verificado nas análises de microscopia eletrônica de transmissão (MET). A Figura 50 mostra as imagens de MET obtidas no módulo campo escuro (*darkfield*). Em baixa magnificação, observa-se, nitidamente, um aglomerado de muitas partículas pequenas (Figura 50a), enquanto a imagem com maior resolução (Figura 50b) permite confirmar a presença de partículas na ordem de 30–50nm e a presença de pequenas partículas (em contraste branco) depositadas na superfície da amostra Nano-X/Ni/0.5 M. Os dados de EDX indicaram que esses agregados são formados de nanopartículas de níquel.

Em geral, os métodos reportados na literatura para produzir nanopartículas de Ni envolvem a redução eletroquímica (Reetz e Helbig, 1994; Hou *et al.*, 2005; Umegaki *et al.*, 2009), redução química (Hoon *et al.*, 1983; Bein *et al.*, 1988; Ely *et al.*, 1999), sol-gel (Gong *et al.*, 2008), evaporação de metais (Ely *et al.*, 1999), o uso de precursores organometálicos (Ely *et al.*, 1999; Murray *et al.*, 2001) e o uso de troca iônica e métodos de impregnação (Coughlan e Keane, 1991). No entanto, a partir desses dados experimentais, é possível evidenciar que o tratamento de troca iônica da nanozeólita sintetizada Nano-X/Na com íon de níquel induziu a formação destes *clusters* de níquel.

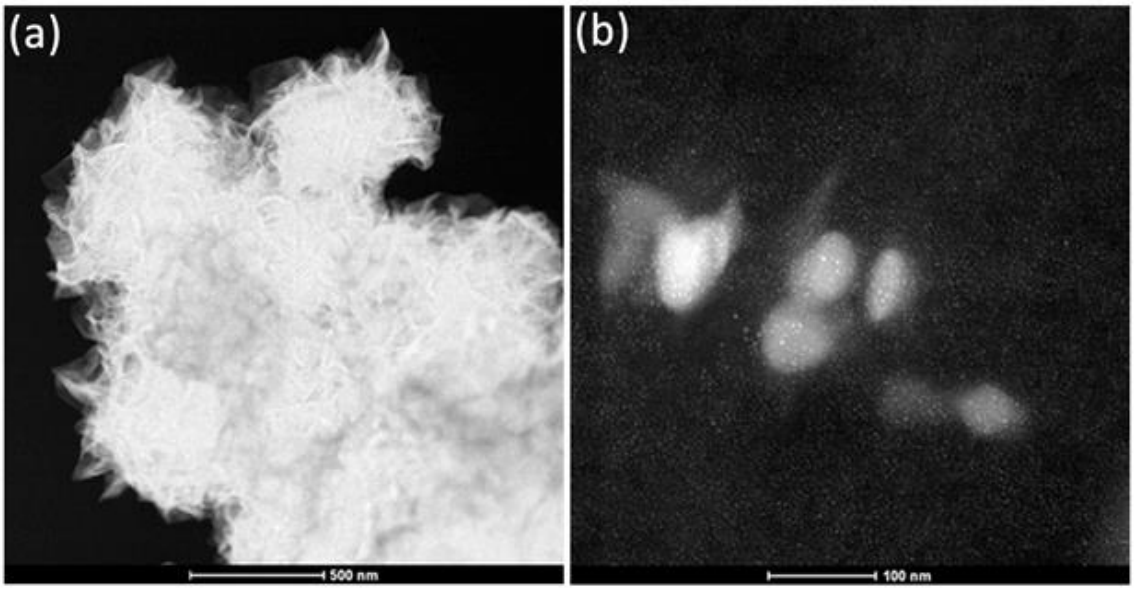


Figura 50 Micrografia de MET em campo escuro da nanozeólita Nano-X/Ni/0.5M sintetizada. (a) baixa magnificação e (b) alta resolução.

Vários experimentos de troca iônica foram executados e a formação desses agregados nanométricos de níquel são reprodutíveis e para entender melhor o sistema, análises por XPS foram realizadas para esta amostra. A análise de espectroscopia de fotoelétrons induzida por raios-X (XPS) é um método não destrutivo de investigação que, em contraste com a TEM, permite a análise química da superfície de nanopartículas e, em princípio, os estados de oxidação do níquel na região de superfície podem ser determinados a partir das energias de ligação e os seus desvios químicos em espectros XPS.

Nas análises dos espectros de Ni $2p_{3/2}$ do metal de níquel oxidado, óxidos de níquel, hidróxidos e oxihidróxidos níquel tem sido verificada sistematicamente a energia de ligação de 852,6, 854,6 e 856,1 eV para Ni^0, Ni^{2+} e Ni^{3+}, respectivamente (Grosvenor *et al.*, 2006).

A Figura 51 apresenta os espectros de XPS global, Ni $2p_{3/2}$ e Al2pNi3p da amostra de Nano-X/Ni/0.5M. O espectro de varredura exploratória indica todos os elementos presentes na amostra O, Si, Al, Ni e C (provenientes do reagente de síntese) e uma pequena quantidade de resíduos S (proveniente da troca iônica com sulfato de níquel).

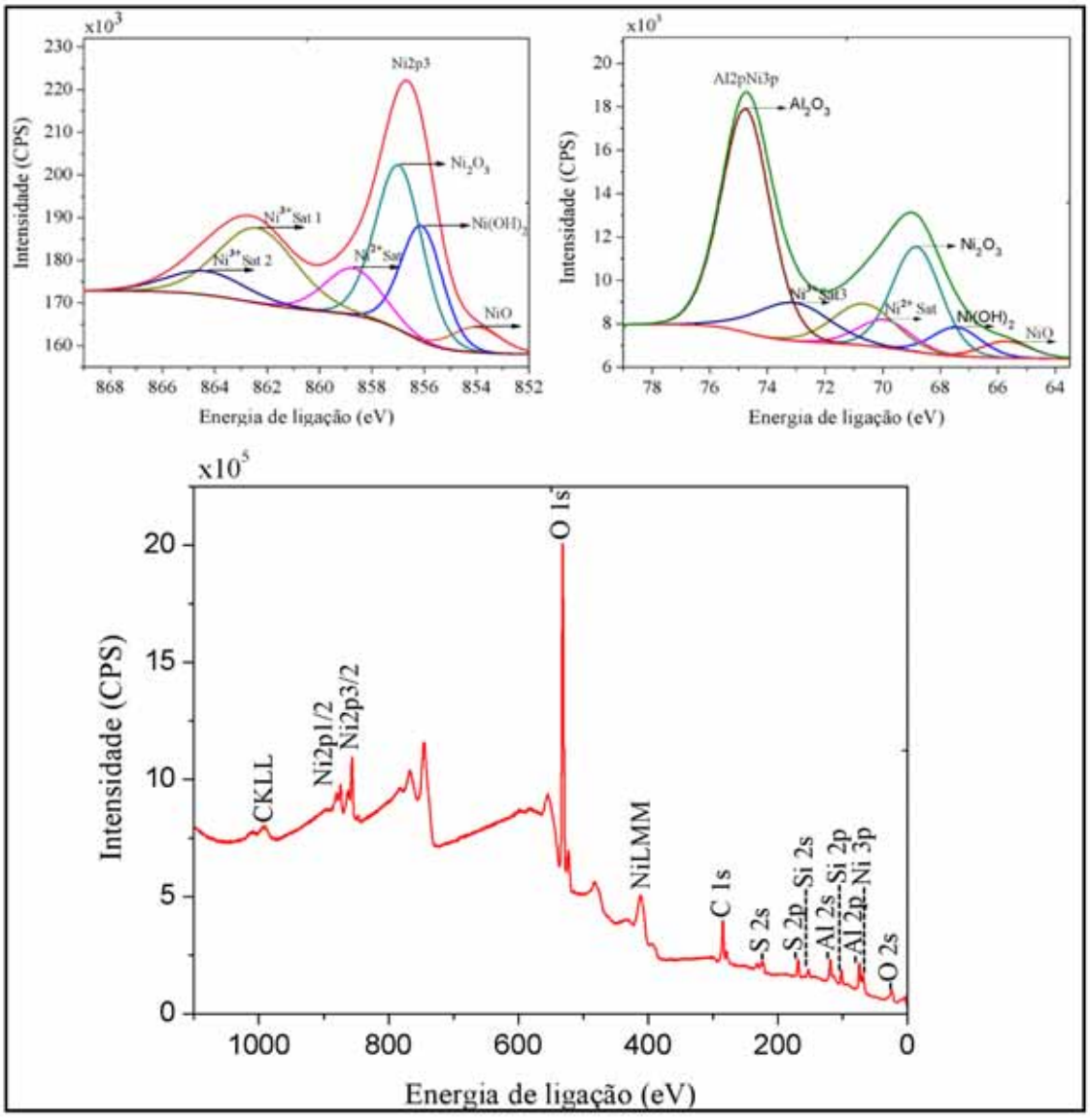


Figura 51 XPS dados globais, Ni$2p_{3/2}$ e Al2pNi3p para a amostra Nano-X/Ni/0.5M.

Os espectros XPS de alta resolução das amostras Nano-X/Ni/0.5M foram ajustados com três componentes, representando os seguintes desvios químicos por XPS: NiO (854,0 eV), $Ni(OH)_2$ (856,1 eV), e Ni_2O_3 (857 eV). As estruturas de satélite dessas fases também foram adquiridas a fim de obter um espectro mais adequado: NiO e $Ni(OH)_2$ (Ni II) a 858,7 eV e de Ni_2O_3 (Ni III) a 862,4 e 864,4 eV.

O espectro de Al2pNi3p indica uma sobreposição com os picos das diferentes espécies de Ni3p. Observa-se ainda a presença de um desvio químico forte em 74,7 eV, o qual foi atribuído a fase Al_2O_3. Portanto, as análises preliminares dos XPS revelaram que a composição química da amostra Nano-X/Ni/0.5 M é bastante complexa, sendo possível notar que as espécies de Ni^{2+} e Ni^{3+} estão presentes na superfície da amostra e essas diferentes espécies de níquel podem desempenhar um papel importante no comportamento sinérgico observado entre a lipase de *T. lanuginosus* e o suporte Nano-X/Ni/0.5M.

4.3.9.2 Análises de AFM do suporte Nano-X/Ni/0.5M antes e depois da imobilização da lipase de T. lanuginosus

As micrografias de superfície da nanozeólita (Nano-X/Ni/0,5M) antes e depois da adsorção das lipases provenientes do fungo de *T. lanuginosus* são apresentadas na Figura 52. Quando comparada à topografia superficial da nanozeólita Nano-X/Ni/0.5M (Figura 52a-b) com a topografia do complexo Nano-X/Ni/0.5M/TLL (Figura 52c-d) obtidas por microscopia de força atômica (AFM) pode-se notar claramente que existem diferenças entre as topografias da superfície dos dois materiais. No caso do complexo Nano-X/Ni/0.5M/TLL, as imagens topográficas mostram uma superfície zeolítica coberta por uma camada nanoestrutural bastante espessa proveniente da imobilização das moléculas de lipase *T. lanuginosus* (Figura 52c-d) em forma de agregados com valores estimados entre 100–150nm.

As imagens de fases (Figura 52b e Figura 52d) mostram as diferenças entre as superfícies dos suportes zeolíticos antes (Figura 52b) e depois da imobilização da enzima (Figura 52d). A principal diferença entre elas é a rugosidade das superfícies que aumenta com a imobilização da enzima. Após a imobilização da enzima, as partículas das nanozeólitas se apresentam mais dispersas e em aglomerados menores (Figura 52d) quando comparada com a superfície da nanozeólita sem enzima (Figura 52b). De acordo com a literatura uma possível explicação para este recobrimento uniforme e homogêneo da superfície zeolítica pode ser atribuído à densidade de carga na superfície da nanozeólita

que reduz a repulsão eletrostática das moléculas de enzima, conduzindo à maior deposição das lipases e o recobrimento uniforme de grande parte da superfície do suporte (Gooding, Hall e Hall, 1997; Zhang e Tan, 2001; Losic *et al.*, 2004; Kosanovic *et al.*, 2008; Min *et al.*, 2013).

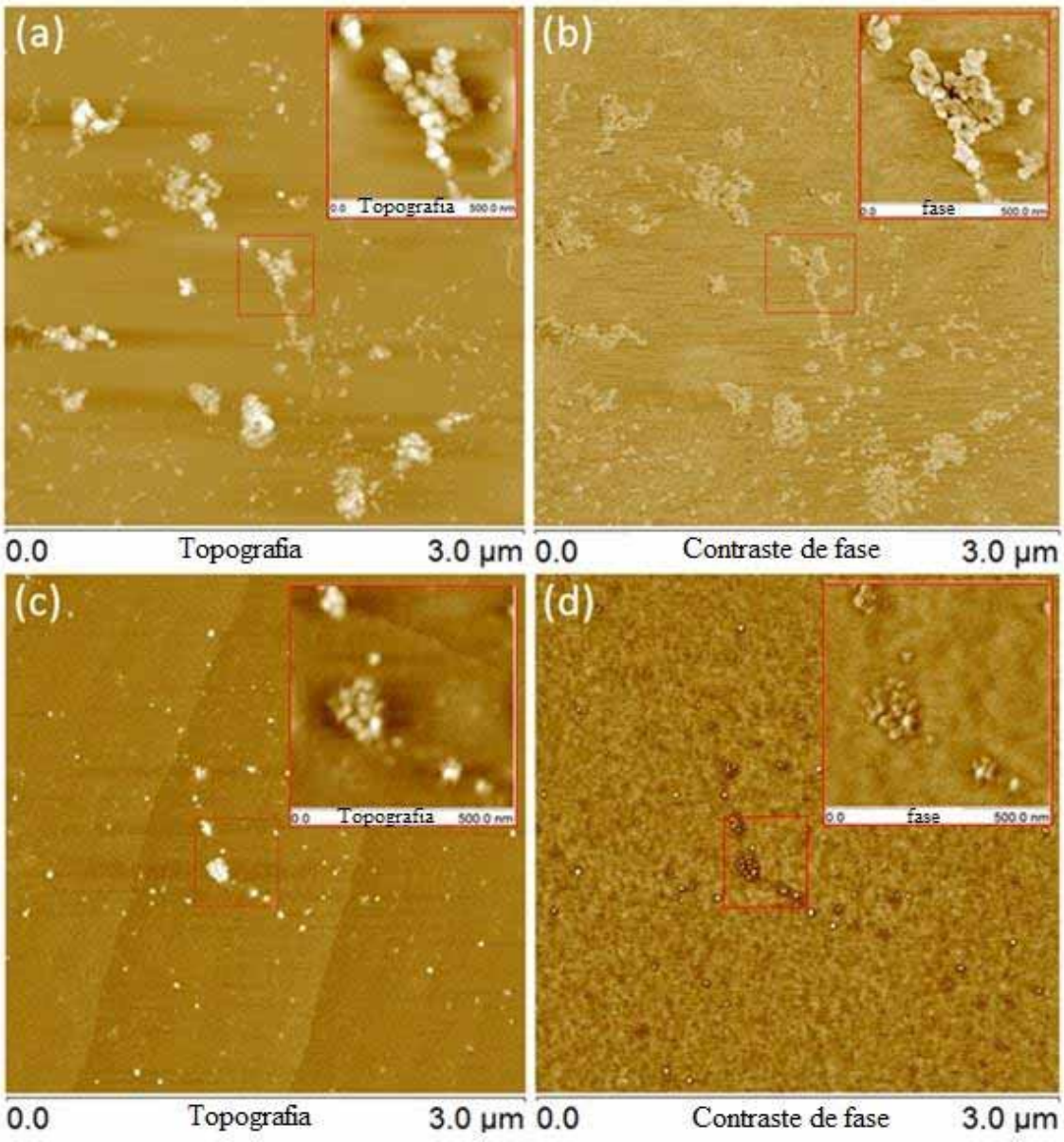


Figura 52 Imagens de AFM: (a) e (b) Nanozeólita Nano-X/Ni/0.5M; (c) e (d) Nanozeólita Nano-X/Ni/0.5M/TLL. A-C (coluna da esquerda) são as imagens bidimensionais da superfície e B-D (coluna da esquerda) imagens de contraste de fase da superfície dos dados de altura obtida no modo Tapping Mode AFM, área avaliada 3 x3µm, *insert* 500x500nm.

4.3.10 Cálculos de bioinformática do comportamento dinâmico das enzimas para explicar os fenômenos da interação com os suportes nanozeolíticos

Resultados promissores foram observados para o complexo Nano-X/Ni/0.5M-TLL tanto no rendimento total da reação, como também no reuso do biocatalisador, o que naturalmente gera possíveis perguntas: Quais são as possíveis razões que levam a esse efeito sinergético do suporte nanozeolítico obtido por troca iônica com cátions de Ni^{2+} na sua interação específica com a enzima de *T. lanuginosus*? Por que o efeito sinergético é observado para o complexo Nano-X/Ni/0.5M-TLL, nas reações de transesterificação para a produção de biodiesel, e não é observado para os outros complexos nanozeólita-enzimas, especialmente para o complexo Nano-X/Ni/0.5M-RML?

A bioinformática é uma ferramenta importante para compreender fenômenos complexos que ocorrem na estrutura da enzima. Com o intuito de entender e responder as questões acima e, ainda, explicar o aumento das taxas catalíticas observadas para alguns complexos nanozeólita/lipases imobilizadas, nesta etapa do trabalho, foram feitas simulações do comportamento dinâmico das lipases de *T. lanuginosus* e *R. miehei* seguindo a metodologia descrita nos *itens 3.5* e *3.5.1*.

As duas lipases têm a sua estrutura cristalográfica disponível no banco de dados de proteínas (PDB) (Berman *et al.*, 2000) sob as IDs 1DT3 (*T. lanuginosus*) (Brzozowski *et al.*, 2000) e 3TGL (*R. miehei*) (Brzozowski *et al.*, 1992). Cada lipase é constituída por 269 resíduos de aminoácidos. Estruturalmente, as lipases conhecidas são semelhantes, compostas por oito folhas beta conectadas e também por três alfa-hélices longas e outras oito alfa-hélices mais curtas (Figura 53a).

Os resíduos catalíticos semelhantes à tripsina são Ser-146, Asp-201 e His-256, como mostrado na Figura 53b-c. A lipase *T. lanuginosus* está disponível tanto em conformação aberta como em fechada. A forma fechada foi escolhida de modo a explorar as regiões acopladas à abertura do sítio catalítico. A *lid* compreende um trecho de oito resíduos de Iso108 a Leu-135 (Figura 53d). Ambas as lipases apresentam um total de 30% (85 resíduos) de similaridade na sequência das lipases (Figura 53d), especialmente nos resíduos catalíticos e na região da *lid*.

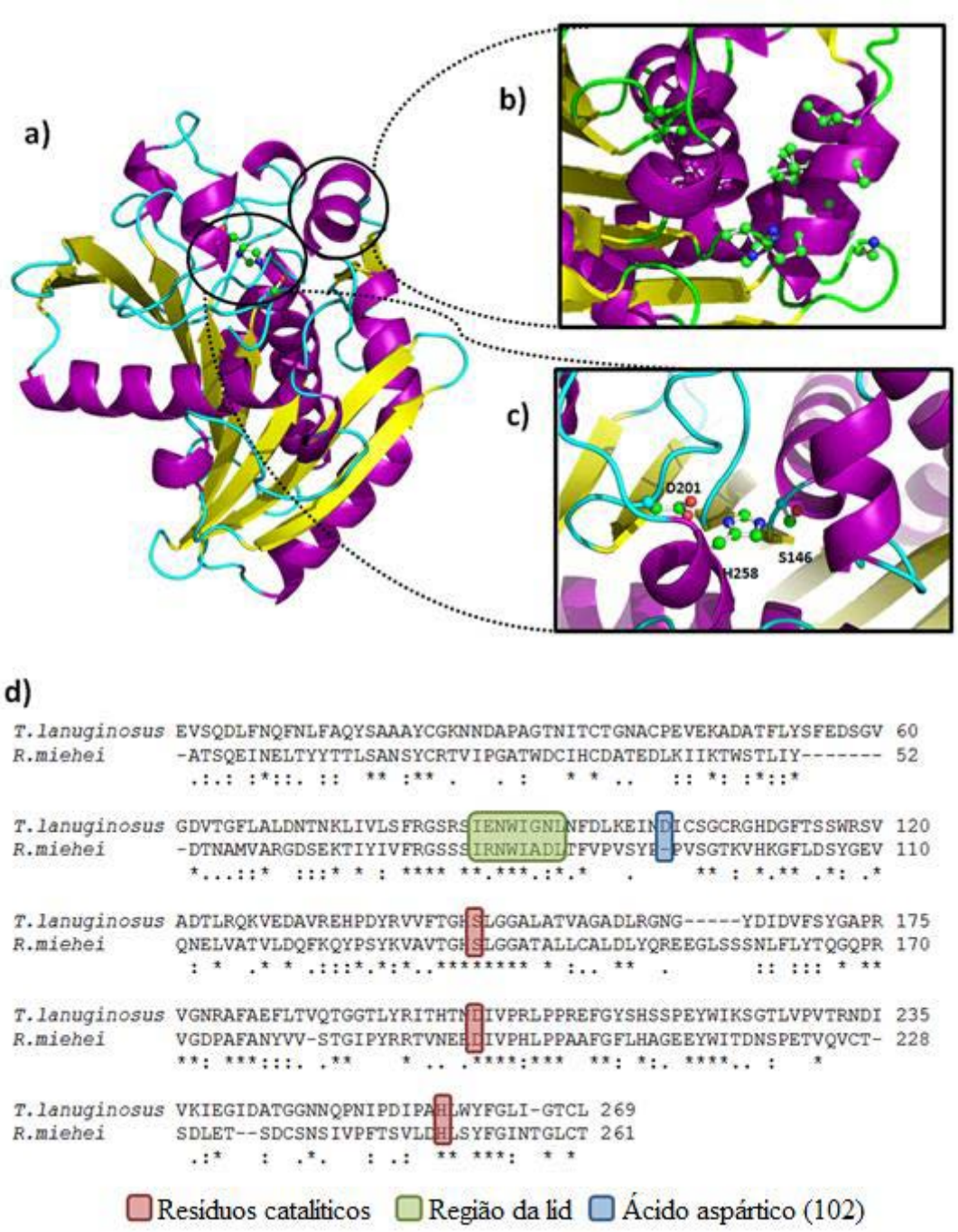


Figura 53 Estrutura tridimensional da lipase de *Rhizomucor miehei*, exibindo oito folhas β, conectadas com regiões de α-hélices (a). Lid α-hélice curta cobrindo a entrada do sítio catalítico (b). A tríade catalítica é formada por Ser-146, Asp-201 e His-258 (c). Alinhamento da sequência de aminoácidos entre as lipases de *T. lanuginosus* e *R. miehei* (d).

O potencial eletrostático de superfície (Figura 54) indica que há uma região carregada negativamente (cor vermelha), presente em ambas as lipases, podendo-se verificar ainda uma região relativamente neutra (cor branca), com algumas regiões carregadas positivamente (cor azul) ilustradas no lado inverso das lipases (giro 180º).

Apesar disso, ao contrário do caráter estrutural, as duas enzimas apresentam padrões eletrostáticos diferentes, que podem influenciar o processo de imobilização das enzimas nos suportes zeolíticos. Nesse caso, as regiões carregadas negativamente das enzimas próximas da *lid* podem ser possíveis locais de ligação para as zeólitas com superfícies carregadas positivamente (ver Tabela 15).

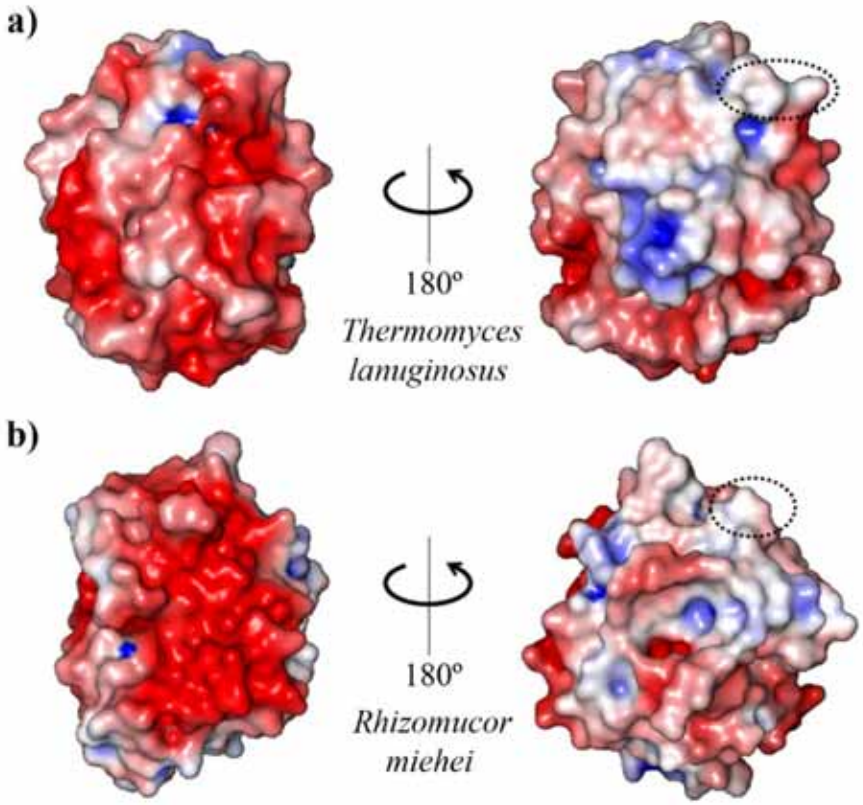


Figura 54 Superfície de potencial eletrostático gerada pela solução da equação de *Poisson-Boltzmann* com base na distribuição de carga associada ao campo de força *Amber*. Os círculos tracejados mostram a localização das *lids*. Ilustração gerada em *PyMol*.

Os círculos tracejados mostram a localização da *lid* cobrindo o sítio catalítico e em ambas as enzimas, a *lid* confere uma região neutra no potencial eletrostático da superfície. A existência dessas regiões neutras para ambas as lipases pode ser interessante, uma vez que, a maneira possível de aumentar a atividade catalítica, após a imobilização da enzima nos suportes zeolíticos, poderia ocorrer somente se essa interação fosse regulada por um mecanismo alostérico. De modo a investigar a possibilidade de existir tal mecanismo, a análise de bioinformática foi realizada usando simulações por modos normais.

Tabela 15 Potencial zeta dos suportes nanozeolíticos obtidos por troca iônica.

Nanozeólita	**Potencial Zeta (mV)**	**Desvio Padrão (±mV)**
Nano-X/Na	-50,9	0,2
Nano-X/Cu/0.5M	+13,7	0,2
Nano-X/Mn/0.5M	+41,0	0,3
Nano-X/Co/0.5M	+41,5	1,0
Nano-X/Zn/0.5M	+16,6	0,2
Nano-X/Ni/0.5M	+3,7	0,9

A análise no modo normal (Figura 55) ilustra o movimento mais provável que ocorre quando a lipase de *T. lanuginosus* interage com o suporte nanozeolítico de carga positiva, propondo um mecanismo que correlaciona a carga negativa da superfície da enzima com a abertura da *lid*.

Para a lipase de *T. lanuginosus*, o resíduo de aminoácido Asp-102 (com carga negativa) situa-se no prolongamento da região da *lid*. Outro resíduo de aspartato (Asp-158) está na região perto da *lid* (embora esse resíduo não seja um componente de extensão da *lid*); ambos os resíduos de aminoácidos contribuem para a maior parte das cargas negativas nessa área.

De acordo com o mecanismo sugerido, é provável que o deslocamento inicial da *lid* para as suas coordenadas finais seja causado pela carga positiva da superfície da zeólita. Os parâmetros obtidos foram calculados pelo desvio quadrático médio Cα, método padrão geralmente empregado para a comparação estrutural de proteínas. Verificou-se que esse deslocamento pode apresentar variação entre 1,3–2,0Å, dependendo da posição do resíduo de aminoácido. Supomos, assim, que devido à interação entre os resíduos de ácido aspártico 102 e 158, com a zeólita carregada positivamente, altera a conformação da lipase, estabiliza a abertura da *lid* e expõe a tríade catalítica permanentemente ao meio de reação.

De acordo com o mecanismo proposto, as zeólitas com potencial zeta negativo não interagem com o sítio de ligação da lipase constituída de Asp-102 e Asp-158, que induz a uma baixa atividade catalítica como observado pela zeólita Nano-X/Na, Tabela

10 e Tabela 15. Esse mecanismo também explica os rendimentos de ésteres etílicos semelhantes, obtidos a partir da enzima de TLL na sua forma livre e, também, na sua forma imobilizada para os seguintes complexos: Nano-X/Mn/0.5M-TLL, Nano-X/Co/0.5M-TLL e Nano-X/Zn/0.5M/TLL (ver Figura 46). O baixo rendimento de ésteres etílicos observado para o complexo Nano-X/Cu/0,5M/TLL pode ser atribuído ao fato de que os íons de cobre são fortes agentes de distorção das lipases conforme relatado na literatura (Sharma *et al.*, 2002; Borkar *et al.*, 2009; Riaz *et al.*, 2010; De Vasconcellos *et al.*, 2012).

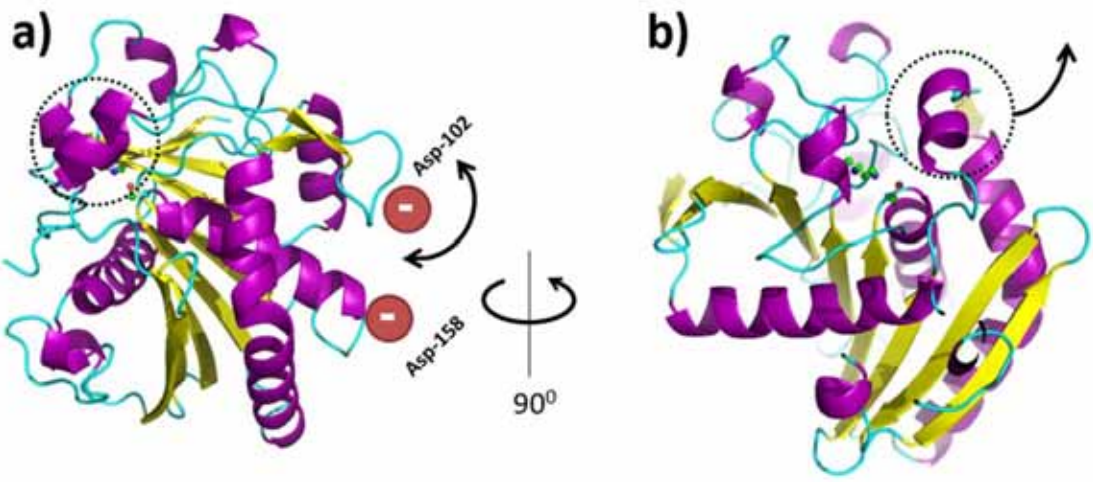


Figura 55 A análise no modo normal indica uma correlação no movimento da enzima negativamente carregada na região em torno de resíduos de Asp-102 e Asp-158 (a) e a abertura da *lid* (b). O resíduo de aminoácido Asp-102 é uma extensão da estrutura de *lid*, resultando na sua abertura.

O mesmo comportamento dinâmico não foi observado para os quatro complexos Nano-X/lipase de *R. miehei* (Nano-X/Mn/0.5M-RML, Nano-X/Cu/0.5M-RML, Nano-X/Co/0.5M-RML e Nano-X/Zn/0.5M-RML) que apresentaram baixas conversões em ésteres etílicos quando comparados com os valores produzidos pela enzima livre (ver Figura 43). Sabe-se que essa lipase não tem a sequência específica de resíduos de aminoácidos necessária para realizar o movimento de deslocamento harmônico da abertura da *lid* (Figura 55).

Curiosamente, a lipase de *R. miehei* não possui o resíduo fundamental, o aspartato na posição 102, como indica o alinhamento de sequências das duas lipases (Figura 53), dificultando a imobilização desta lipase na sua conformação aberta sobre os suportes nanozeolíticos. De acordo com o modelo proposto, nenhum dos materiais nanozeolíticos

usados como suporte de imobilização, neste estudo, aumenta consideravelmente a atividade catalítica da lipase de *R. miehei*, visto que não houve uma sinergia entre a lipase de *R. miehei* estudada e os suportes nanozeolíticos. Para a lipase de *T. lanuginosus*, o efeito sinergético foi responsável pela abertura da *lid* e, consequentemente aumentou a atividade do biocatalisador.

A comparação entre o modelo alostérico proposto neste estudo e outro relatado na literatura revela importante diferença entre eles. Por exemplo, Macario *et al.* (2007) propuseram um modelo distinto para a interação lipase–zeólita baseado principalmente em interações eletrostáticas e ligações covalentes. Esses autores estudaram exclusivamente a lipase *R. miehei* e especularam que as cargas negativas do suporte zeolítico podem interagir com a cadeia principal do aminoácido da enzima. Além disso, indicaram que a arginina-86, localizada na borda do *lid* da lipase, é que desempenha o papel principal na imobilização da lipase. No entanto, o modelo proposto é essencialmente especulativo e os autores não demonstraram resultados experimentais que poderiam apoiá-lo. Embora Herrgard, *et al.* (2000) tenham revelado que a arginina-86 é responsável pela estabilização das lipases nas conformações aberta/fechada, não é claro o modo como o suporte zeolítico pode interagir com esse resíduo de aminoácido e aumentar a taxa de atividade catalítica da enzima.

Por outro lado, o modelo alostérico, proposto fundamentado na simulação de macromoléculas, explica os resultados experimentais deste trabalho e sugerem que o mecanismo alostérico está relacionado com a abertura da *lid* da lipase de *T. lanuginosus* no processo de imobilização. Assim, este atua de forma bem efetiva expondo os resíduos de aminoácidos catalíticos ao substrato. O modelo combina o potencial eletrostático da superfície das enzimas selecionadas e a análise de modo normal para identificar os possíveis movimentos sinérgicos entre a abertura da *lid* e regiões negativas alostéricas. O modelo é robusto o suficiente para explicar as diferenças nos resultados experimentais das lipases de *T. lanuginosus* e *R. miehei*, e também é bem sucedido para explicar as diferenças observadas quando se utiliza suportes zeolíticos com diferentes cargas de superfície líquida.

Embora o modelo alostérico proposto, discutido acima, tenha uma correlação sólida entre as estruturas das enzimas e a carga superficial das nanozeólitas, os elevados teores de ésteres etílicos, obtidos experimentalmente para os complexos Nano-X/Ni/0.5M-TLL e Nano-X/Ni/0.5M-RML, também podem estar relacionado com as

diferentes espécies de níquel formadas sobre a superfície do suporte zeolítico, conforme ilustrado nos dados de MET e XPS (Figura 50b e Figura 51).

O aumento no rendimento em ésteres etílicos obtidos para o complexo Nano-X/Ni/0.5M-RML não foi tão relevante, devido à falta do resíduo aspartato na posição 102, tal como explicado pelo mecanismo alostérico proposto. No entanto, observou-se que ocorreu um comportamento sinérgico para o complexo Nano-X/Ni/0,5-TLL, visto que este biocatalisador apresentou um rendimento de ésteres de 94,3%, aproximadamente 10 vezes maior, quando comparado com a produção de ésteres etílicos para a mesma concentração de enzima *T. lanuginosus* na sua forma livre, que produziu 9,1%. Neste caso, o comportamento sinérgico também pode ser influenciado pela formação interessante e incomum das pequenas partículas de níquel observadas nos dados de MET do suporte Nano-X/Ni/0.5M, Figura 50b.

Apesar de existirem vários relatos na literatura descrevendo o papel de espécies catiônicas, tais como Ca^{2+}, Fe^{2+} e Mg^{2+} que podem atuar na ativação de lipases, o papel do efeito das espécies de níquel, promovendo ou facilitando a ativação de enzimas, ainda não foi devidamente investigado. Segundo esses estudos, as espécies de níquel em solução têm efeito inibitório que causam a inativação das lipases (Sharma *et al.*, 2002; Borkar *et al.*, 2009; Riaz *et al.*, 2010). Na literatura, a importância dos íons de níquel já foi mencionada para as enzimas dependente do níquel em sistemas biológicos (a urease e outras enzimas também importantes, como a metil coenzima M (MC) e redutase (MCR); hidrogenases do tipo [NiFe], monóxido de carbono desidrogenase (CODH), Acetil-coenzima A (acetil-CoA) e superóxido dismutase (NiSOD) (Ermler *et al.*, 1998; Dobbek *et al.*, 2001; Thauer, 2001).

Embora esses estudos não estejam especificamente relacionados com lipases, os nossos resultados experimentais demonstraram de forma sistemática que o suporte sólido zeolítico, quando tratado com níquel, sempre ativa a lipase de um modo muito particular e, no caso da lipase de *T. lanuginosus* essa ativação foi mais acentuada devido à especificidade da estrutura cristalográfica que esta enzima tem para interagir com as cargas superficiais positivas das nanozeólitas, conforme proposto pelo mecanismo alostérico. Esse comportamento único do complexo Nano-X/Ni/0.5M-TLL é uma forte indicação de que vários inconvenientes relatados para a enzima livre podem ser superados por meio do uso desse material como biocatalisadores heterogêneos na produção de biodiesel.

4.4 Caracterização das nanozeólitas modificadas com agentes orgânicos e o efeito no desempenho catalíticos dos complexos (nanozeólita/enzima) na transesterificação enzimática do óleo microalgas

Conforme mencionado no *item 4.2.1.3*, haja vista a predominância das ligações do tipo Si-O-Si e/ou a baixa disponibilidade dos íons de Na^+, as nanozeólitas Nano-TS1, Nano-BEA e Nano-GIS/Na não foram efetivas para a troca iônica. A despeito disso, com a funcionalização desses materiais, obteve-se uma melhor interação com a lipase de *T. lanuginosus*. Nesse sentido, sabe-se que as zeólitas contêm uma elevada densidade de grupos silanóis (-OH), dispersos por toda superfície. Dado que esses grupos são sensíveis ao efeito de reação que pode provocar o agente sililante, a alternativa utilizada foi a adição de grupos aminosilano para modificação da superfície dessas nanozeólitas.

Desta forma, com o intuito de solucionar os problemas dos materiais com baixa capacidade de troca iônica, os grupos de aminosilano foram utilizados para modificar a superfície dessas nanozeólitas. Para o desenvolvimento desta parte do trabalho, foi proposto um estudo comparativo de funcionalização entre as nanozeólitas com baixa capacidade de troca iônica (Nano-TS1, Nano-BEA e Nano-GIS/Na), as nanozeólitas Nano-NaX/Na e Nano-LTA/Na (zeólitas com elevada capacidade de troca iônica) e a nanozeólita NaX/Ni, o material mais efetivo para a imobilização das lipases.

Na primeira etapa deste estudo, a superfície das nanozeólitas (Nano-TS1, Nano-BEA, Nano-GIS/Na, Nano-LTA/Na, Nano-NaX/Na e Nano-NaX/Ni) foi quimicamente modificada com a adição do grupo aminosilano 3-Aminopropil-trimetóxisilano (APTMS), *ver item 3.2.3.1*. As amostras obtidas foram denominadas Nano-TS1-NH, Nano-GIS-NH, Nano-LTA-NH, Nano-BEA-NH, Nano-X/Na-NH e Nano-NaX/Ni-NH; na segunda etapa, as amostras silanizadas foram funcionalizadas com a adição de glutaraldeído, obtendo-se os seguintes materiais: Nano-TS1/GA, Nano-GIS/GA, Nano-LTA/GA, Nano-BEA/GA, Nano-X/Na/GA e Nano-X/Ni/GA, visto no *item 3.2.3.2*.

4.4.1 Análises termogravimétricas das nanozeólita antes da funcionalização

Um dos pré-requisitos para a funcionalização é a remoção do *template* orgânico utilizado nas sínteses das nanozeólitas por calcinação. Sabe-se que a presença de direcionadores orgânicos de estrutura (SDA´s) nas condições de química sol-gel é essencial para a obtenção das nanozeólitas Nano-TS1, Nano-BEA, Nano-GIS e Nano-LTA. Neste caso, na primeira etapa antes da funcionalização, foram feitas análises termogravimétricas (TGA) que mostraram a decomposição térmica dos SDA´s presentes

nestas amostras (Figura 56). O principal objetivo das análises de TGA foi avaliar os parâmetros térmicos para remover por calcinação o *template* orgânico utilizado na síntese da nanozeólita.

A partir da análise termogravimétrica da amostra Nano-TS1(Figura 56a), podemos considerar que a perda de massa mais intensa (360–450ºC) corresponde a decomposição térmica do SDA (cátions TEA^+ que fazem o balanceamento de carga dos grupos $Si\text{-}O^-$). Em tal caso, as análises indicam que a temperatura mais efetiva de decomposição é em torno de 500ºC, visto que a primeira derivada da perda de massa atinge um máximo na faixa de 360–450ºC, o que significa um maior grau de decomposição térmica do template. Este comportamento da curva termogravimétrica varia de acordo com os grupos funcionais e depende também da interação com a estrutura da nanozeólita (Kobler, 2008).

A Nano-GIS exibiu dois picos principais de perda de massa, os quais foram atribuídos a dessorção da água oclusa (87–100ºC, ≈5% da massa e a perda de 200–480 ºC) atribuída à decomposição do agente direcionador de estrutura cátion tetrametilamônio (TMA) (Figura 56b). A Nano-LTA apresenta um perfil diferente, com uma perda de ≈ 15%, proveniente da desidratação (70–200ºC). A remoção até 200ºC deve-se à presença de moléculas de água fortemente adsorvidas (Figura 56c). As outras duas perdas de massa, em 342ºC e 468ºC, estão relacionadas com a decomposição do agente direcionador de estrutura (TMA) (Biemmi e Bein, 2008).

A curva de análise térmica da nanozeólita beta está apresentada na Figura 56d. A partir da análise termogravimétrica (TGA) e da sua primeira derivada (DTG) observam-se três picos distintos. Estes estão correlacionados com três estágios diferentes de perda de massa, conforme mencionado na literatura: 30–140, 140–270, e 400–520ºC. O primeiro pico é devido à dessorção da água oclusa (sequência I); o segundo pico refere-se à remoção dos compostos (trietilamina e etileno) formados a partir da degradação dos cations TEA (sequência II); o último pico da (sequência III) corresponde à pirólise de cátions TEA que interagiram fortemente com a estrutura contendo espécies de Al (Serrano *et al.*, 2001).

Na Figura 56, nota-se o perfil das análises de TGA das amostras Nano-X/Na (Figura 56e) e Nano-X/Ni (Figura 56f), o pico principal de perda de massa para ambas as amostras pode ser atribuído à perda de água do material zeolítico; a diferença no perfil pode ser justificada pela presença de cátions de níquel hidratados na amostra Nano-X/Ni.

Assim sendo, a partir dos resultados de TGA, as amostras Nano-TS1, Nano-BEA e Nano-LTA/Na foram calcinadas a 550ºC antes da funcionalização, tendo em vista que nessa temperatura já terá ocorrido a completa decomposição das moléculas orgânicas (Hazm *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 2013).

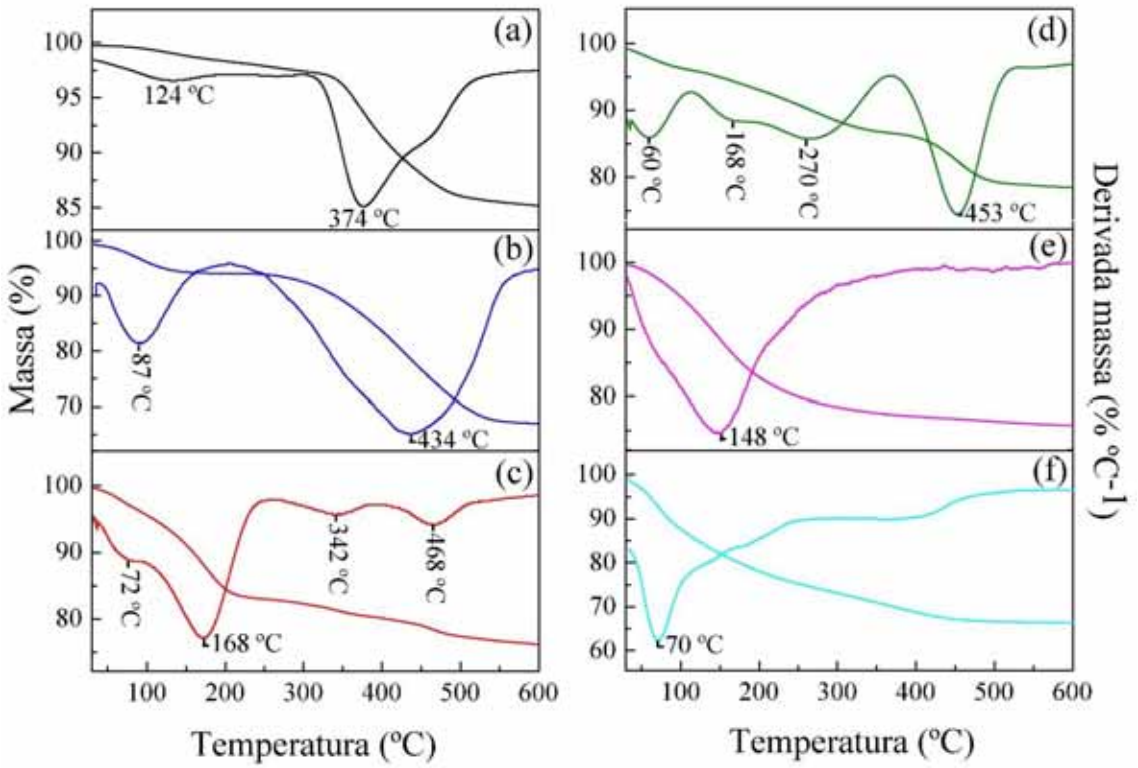


Figura 56 Curvas de TGA e a primeira derivada DTG das amostras de (a) Nano TS1, (b)Nano-GIS, (c) Nano-LTA, (d) Nano-BEA, (e) Nano-NaX e (f) Nano-NaX/Ni.

A caracterização por espectrometria no infravermelho por reflectância total atenuada (ATR) pode ser usada para identificar os grupos funcionais de materiais de sílica modificada. Espectros vibracionais na região do infravermelho na faixa de 1300–4000 das nanozeólitas antes e após a modificação com 3-aminopropil-trimetoxisilano (APTMS) e com glutaraldeído (GA) são mostrados na Figura 57.

As nanozeólitas puras foram usadas como padrão de comparação, a fim de demonstrar que a incorporação do grupo silano e glutaraldeído foi realizada com sucesso. Nos espectros das nanozeólitas puras na faixa de 400 a 4000 cm^{-1}, foram observadas apenas as bandas características das nanozeólitas, já identificadas nas Figura 19 e Figura 37. Em geral, as amostras funcionalizadas e analisadas por infravermelho exibem uma banda forte em aproximadamente 1100 cm^{-1} devido as vibrações Si-O-Si e um "ombro"

em cerca de 1200 cm^{-1}, que é atribuída a vibrações de Si-CH_2, cuja visualização é dificultada devido à sobreposição da banda característica da nanozeólita, em 1100cm^{-1}.

Outro sinal que poderia ser observado nas amostras amino-funcionalizadas com APTMS é um alongamento da vibração (C-N) do aminopropil, que é tipicamente observado em comprimentos de onda entre 1000 e 1200 cm^{-1}. Todavia, essa banda não pode ser resolvida devido a sobreposição da banda intensa em 1000–1130 cm^{-1} (atribuída às vibrações do grupo T-O-T da própria nanozeólita) e da banda em 1200–1250cm^{-1} (atribuída as vibrações Si-CH_2). Em cerca de 3300 cm^{-1}, o estiramento N-H do grupo amino também é de difícil visualização, devido ao forte sinal das moléculas de água adsorvidas e do grupos silanóis entre 3000 e 3600 cm^{-1} (Chiang, Ishida e Koenig, 1980; Rücker, 1996).

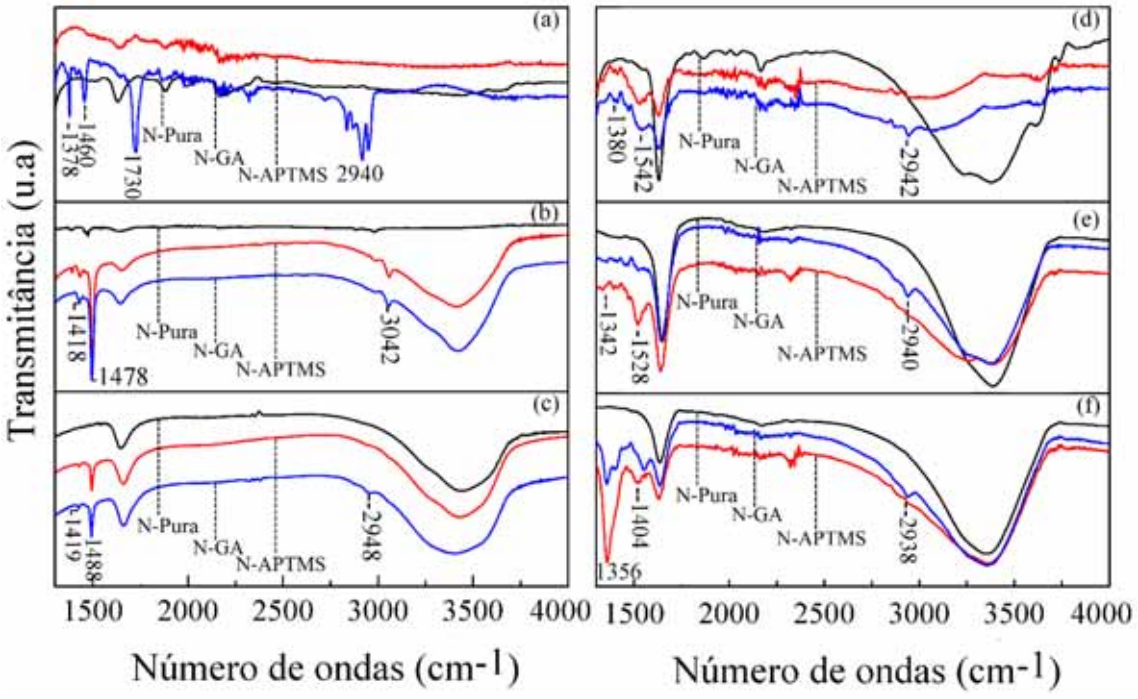


Figura 57 ATR-FTIR das amostras funcionalizadas em comparação com as amostras puras (a) Nano TS1, (b)Nano-GIS, (c) Nano-LTA, (d) Nano-BEA, (e) Nano-NaX e (f) Nano-NaX/Ni.

Assim, quando analisadas as amostras nos espectros vibracionais na região do infravermelho (1300–4000 cm^{-1}), verifica-se uma riqueza de detalhes para as nanozeólitas modificadas com APTMS e funcionalizadas com o glutaraldeído. A análise detalhada dos espectros da Figura 57 mostram duas bandas localizadas em 1350–1460 cm^{-1} (Dobramento (CH)-R-CH_3), atribuídas à presença de grupos metílico (-CH_3), presentes no glutaraldeído. Wang e colaboradores (2008) encapsularam nanopartículas de sílica

utilizando o polimetilmetacrilato, e observaram também duas bandas localizadas em 1380 e 1464 cm^{-1}, às quais atribuíram ao grupo metil presente no metilmetacrilato.

Os modos de estiramento C=O e C=N são detectados em aproximadamente 1530 e 1750cm^{-1}, o que demonstra claramente a ligação do grupo GA. Notavelmente, a presença da banda em 2950 e 2880 cm^{-1} fica evidenciada as ligações referentes ao alogamento -CH=CH. Tais constatações implicam na reação dos grupos amino da nanozeólita funcionalizada APTMS com o glutaraldeído, indicando fortemente que os grupos orgânicos foram efetivamente incorporados na superfície das nanozeólitas (Rücker, 1996; Selvasekarapandian *et al.*, 2006). Assim, pode-se inferir que os procedimentos de modificação da superfície da nanozeólitas Nano-TS-1, Nano-GIS, Nano-LTA, Nano-BEA, Nano-X/Na e Nano-X/Ni foram realizados de forma precisa e os resultados obtidos corroboram os dados reportados na literatura (Chang e Tanaka, 2002; Chen *et al.*, 2007; Jung e Hartmann, 2008; Mansur *et al.*, 2008).

4.4.2 Potencial Zeta

Após as caracterizações estruturais, as nanozeólitas foram submetidas à análise do potencial eletrostático com o objetivo de explicar as possíveis interações entre nanozeólita pura, nanozeólita-APTMS e nanozeólita-APTMS/GA com a lipase de *T. lanuginosus*. Nesse sentido, o potencial zeta é uma ferramenta útil na determinação da carga na superfície dos materiais.

Nanozeólitas-APTMS são carregadas positivamente, ao passo que a nanozeólita pura e a lipase são carregadas negativamente. O processo de imobilização é um compromisso entre as forças atrativas (entre a lipase e a nanozeólita funcionalizada) e as forças repulsivas (entre a lipase e a nanozeólita). Para os suportes funcionalizados, as forças de atração aumentam de acordo com o caráter positivo da carga e para as nanozeólitas puras, as forças de repulsão entre a lipase e a nanozeólita são mais fortes, resultando em uma menor quantidade de lipases imobilizadas na superfície da nanozeólita pura (Wang *et al.*, 2008; Bucatariu *et al.*, 2013).

Como mencionado acima, a interação eletrostática desempenha um papel importante na imobilização, sendo, portanto, necessário compreender melhor as propriedades de carga da superfície da nanozeólita modificada. O potencial zeta foi determinado para as nanozeólitas após o pré-tratamento com o (i) APTMS e (ii) APTMS/GA e após a imobilização (iii) APTMS/Lipase e (iv) APTMS/GA/Lipase. Este

foi o primeiro passo para compreender as interações eletrocinéticas entre nanozeólitas, os suportes de imobilização e a lipase de *T. lanuginosus*, utilizada para a imobilização. Em todos os casos estudados, o potencial zeta tornou-se mais positivo com a adição dos grupos orgânicos, com as nanozeólitas apresentando, claramente, cargas negativas, exceto para a Nano-X/Ni que, após a amino-funcionalização apresentaram cargas positivas, como mostrado na Figura 58.

Neste caso, as nanozeólitas puras têm grupos negativos Si-O^- na superfície e, após a funcionalização, as cargas positivas dos grupos orgânicos são adicionadas na superfície das nanozeólitas. Na sequência, após a imobilização da lipase de *T. lanuginosus*, nos complexos formados com os derivados das amostras (Nano TS1, Nano-BEA, Nano-NaX e Nano-NaX/Ni) apresentaram cargas negativas (Figura 58 e Figura 59). Os valores de potencial zeta tornam-se negativos porque a lipase de *T. lanuginosus* é fortemente carregada por cargas negativas, conforme foi discutido na Figura 54.

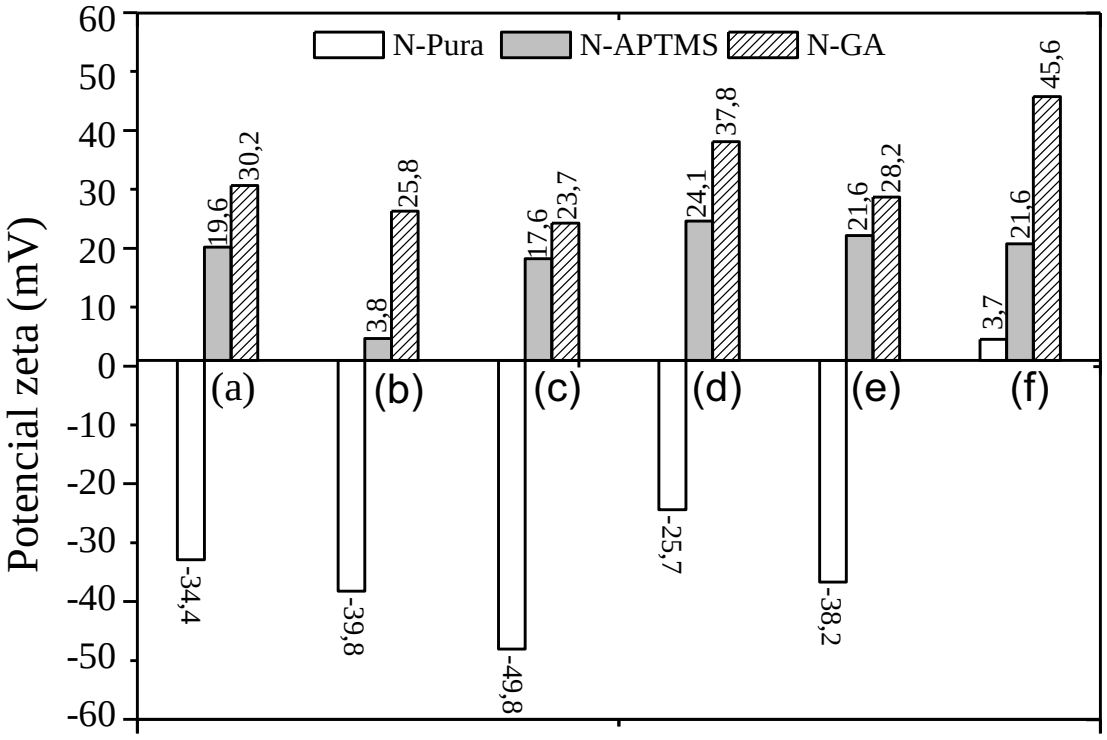


Figura 58 Potencial zeta para as diferentes amostras funcionalizadas em comparação com as amostras puras (a) Nano TS1, (b)Nano-GIS, (c) Nano-LTA, (d) Nano-BEA, (e) Nano-NaX e (f) Nano-NaX/Ni.

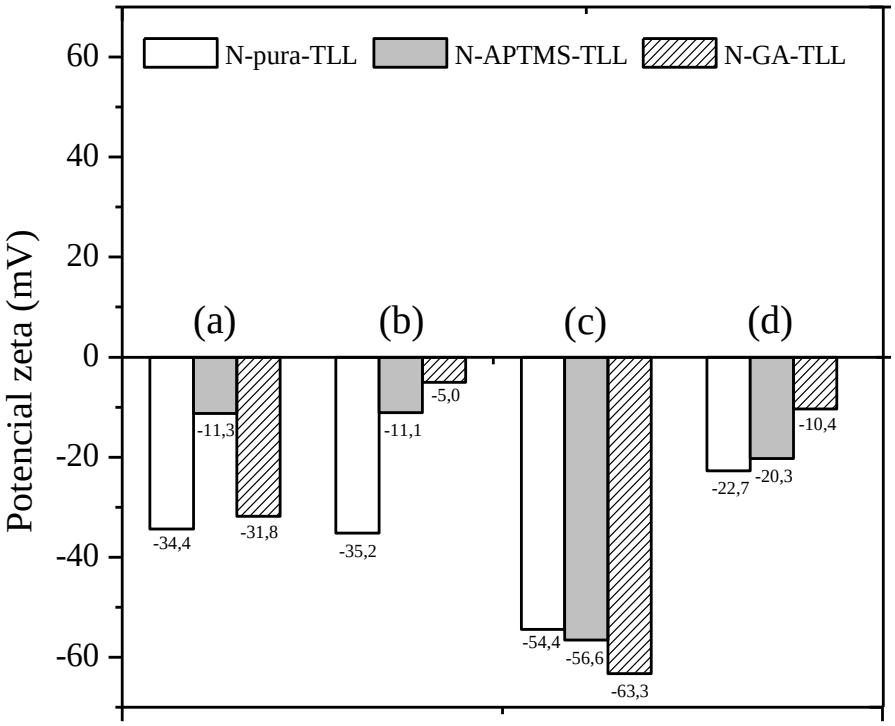


Figura 59 Potencial zeta, após a imobilização, das amostras funcionalizadas exemplificadas pelas seguintes amostras: (a) Nano TS1, (b) Nano-BEA, (e) Nano-NaX e (f) Nano-NaX/Ni.

4.4.3 Imobilização e Atividade da Lipase em Função do Potencial Eletrostático

Nanozeólitas com diferentes estruturas (TS-1), (GIS), (LTA), (BEA), (NaX) e (NaX/Ni) foram testadas como suportes para a imobilização da lipase de *T. lanuginosus*. Afim de comparar os suportes de imobilização, todos os ensaios de imobilização e atividade enzimática foram feitos da mesma forma para os diferentes materiais: (1) nanozeólita pura N-(Nanozeólita); (2) nanozeólitas silanizadas (Nanozeólita/NH); e (3) nanozeólitas funcionalizadas com a adição de glutaraldeído (Nanozeólita/GA). O efeito dos diferentes padrões de carga da superfície dos suportes zeolíticos determinados por potencial zeta foi correlacionado com os dados de imobilização e de atividade enzimática.

A Tabela 16 apresenta os valores de imobilizações e atividades enzimáticas em função do potencial eletrostático dos suportes. Comparando a quantidade de enzima imobilizada para as nanozeólitas puras com as quantidades imobilizadas para NH-Nanozeólitas e GA-Nanozeólitas, verificou-se que a funcionalização conduziu a um aumento significativo na quantidade de enzima imobilizada, indicando que a carga da superfície desempenha um papel crucial na imobilização enzimática. A partir dos resultados de potencial zeta, apresentados na Figura 58, observa-se que a incorporação

do grupo silano influencia significativamente o potencial elétrico da superfície da nanozeólita.

Inicialmente o pH da solução de imobilização foi ajustado para 7,0 e, nestas condições, a lipase é negativamente carregada. Todavia, os suportes silanizados com APTMS apresentam cargas positivas, registrando medidas do potencial zeta dos diferentes materiais que variaram entre 19,6-24,1 mV. Esse caráter mais positivo dos suportes silanizados aumenta a atração entre o suporte e a enzima, fazendo com que as cargas opostas expliquem o aumento da quantidade de enzimas imobilizadas.

Na Figura 58, observa-se que as nanozeólitas puras apresentam cargas negativas de potencial zeta nas condições práticas. Tais cargas negativas sofrem o efeito das forças de repulsão na adsorção da enzima sobre o suporte nanozeolítico. Desse modo, a quantidade de enzima imobilizada é menor quando comparada com os suportes positivamente carregados.

Ademais, observa-se que a quantidade de enzimas adsorvidas nos suportes Nanozeólita/NH e Nanozeólita/GA são semelhantes na maior parte dos suportes avaliados, exceto para os derivados da amostra Nano-GIS. Isso explica-se, primeiramente, pelas áreas superficiais que são as mesmas; em segundo lugar, espera-se que a quantidade de (-NH) em Nanozeólita/NH seja igual a quantidade de GA em Nanozeólita/GA, ver *item 3.2.3*. Porém, os mecanismos de imobilização são completamente diferentes entre os dois métodos.

A análise se torna mais interessante, quando se correlaciona não apenas a porcentagem de enzimas imobilizadas em função do potencial eletrostático, como também a atividade enzimática, cujos resultados são apresentados na Tabela 16. A partir deles, verificou-se que a máxima atividade (76,4 U/mg-sólido) foi observada para o suporte Nano-NaX/Ni-G, o qual exibiu a carga mais positiva (45,6mV) (Figura 58). Além disso, o rendimento de imobilização (97,7%) foi praticamente o máximo. Este dado permite afirmar, seguramente, que a porcentagem de enzima imobilizada e a atividade enzimática são altamente dependentes, não apenas da estrutura cristalina do suporte sólido, como também do potencial eletrostático predominante nesses sólidos. A título de ilustração, podemos observar que o aumento da carga no suporte (Nano-TS1) de -34,2 para 30,2mV (Figura 58), proporcionou uma melhora no rendimento de imobilização de 31,9 para 98,5% e a um aumento na atividade de 15,6 para 56,0 U/mg-sólido (Tabela 16).

A ocorrência da maior adsorção da lipase em materiais positivamente carregados é frequentemente discutida na literatura (Rong *et al.*, 2007; Min *et al.*, 2012).

Tabela 16 Efeito da funcionalização no processo de imobilização. Carga enzimática oferecida de 10mg proteína/g de suporte.

Suporte zeolítico	**Quant. de enzima imobilizada no suporte*** (mg/g suporte)	**Imobilização** (%)*	**Atividade enzimática** (U/mg suporte)
Nano-TS1	3,2	31,9	15,6
Nano-TS1/NH	9,8	97,6	48,0
Nano-TS1/GA	9,9	98,5	56,0
Nano-GIS	1,5	15,2	4,0
Nano-GIS/NH	3,0	30,2	56,0
Nano-GIS/GA	7,9	79,1	28,0
Nano-LTA	1,8	18,4	8,0
Nano-LTA/NH	9,7	97,1	68,0
Nano-LTA/GA	10	100	46,0
Nano-BEA	1,7	16,9	3,6
Nano-BEA/NH	10	100	76,4
Nano-BEA/GA	10	100	68,0
Nano-X	1,8	18,3	2,0
Nano-X/NH	7,7	76,6	74,0
Nano-X/GA	9,8	98,0	56,0
Nano-X/Ni	4,4	43,7	64,0
Nano-X/Ni/NH	9,6	95,6	76,0
Nano-X/Ni/GA	9,8	97,7	78,0

*Porcentagem de imobilização = (massa de enzima na solução final (m_f)/ massa de enzima na solução final m_i))*100.

Uma outra hipótese para o aumento das atividades enzimáticas e os rendimentos de imobilização é a de que o aumento do braço espaçador tende a aumentar a concentração de enzima imobilizada por ser mais reativo quimicamente e, uma vez que se encontra mais longe do microambiente do suporte, reduz possíveis distorções na estrutura da

enzima, tornando mais acessível ao substrato, o que melhora o contato enzima/substrato e uma maior transferência de massa, por estar mais distante do microambiente do suporte que pode restringir este acesso (Adriano *et al.*, 2005; Alptekin *et al.*, 2011).

Diferentemente do que foi discutido anteriormente, a atividade não foi diretamente proporcional à carga para os suportes Nano-GIS, Nano-LTA, Nano-NaX Nano-BEA. Na Tabela 16, os dados obtidos para esses materiais indicaram que as amostras funcionalizadas do aminosilanos, positivamente carregadas mas com menor carga que as amostras de glutaraldeído, foram cataliticamente mais efetivas. As possíveis explicações para esta relação inversa é que a adição da molécula de glutaraldeído pode: (i) conduzir a aglomeração na superfície imobilizada, (ii) levar à redução da atividade devido a restrições espaciais, (iii) limitar o acesso do substrato aos sítios ativos da enzima, (iv) distorcer a enzima devido a elevada reatividade do glutaraldeído, ocorrendo uma orientação desfavorável da enzima e (v) os grupos amino do suporte são ativados por dímeros de glutaraldeído que são altamente reativos em pH 7,0 nas condições estabelecidas, o que também permite maior estabilização da enzima. Esse efeito pode ser ampliado, quando ocorrem várias ligações diferentes entre a enzima e a matriz de imobilização, principalmente devido à ligação cruzada não específica do glutaraldeído (Talbert e Goddard, 2012; Feng *et al.*, 2013).

4.4.4 Produção de biodiesel com uso do óleo de microalgas

Os teores de ésteres produzidos a partir do óleo de microalgas estão apresentados na Figura 60 e foram testados de modo a avaliar a eficiência dos diferentes suportes de imobilização. Todos os ensaios de produção de biodiesel foram realizados da mesma forma em condições comparativas, seguindo os parâmetros determinados pelo método de *Box Benhken* (*item 4.3.8.2*).

Os resultados da análise por cromatografia gasosa (CG) do produto com enzimas livres não foram incorporados para efeito de comparação, pois as análises de imobilização indicaram que uma elevada quantidade de enzima foi imobilizada nos suportes silanizados e também nos suportes tratados com glutaraldeído que ligou covalentemente. Portanto, considera-se que a produção de biodiesel para a quantidade equivalente das enzimas livres é máxima (98% de ésteres etílicos). Por outro lado, os dados de CG dos teores de ésteres etílicos obtidos a partir do óleo de microalgas com o uso dos biocatalisadores (nanozeólita-enzima) para as nanozeólitas titanosilicalita (Nano-TS1),

gismondina (Nano-GIS), família A (Nano-LTA), beta (BEA), faujasita (NaX) e faujasita tratada com Ni^{2+} (NaX/Ni) foram avaliados em três condições, de acordo com os diferentes tratamentos que os suportes foram submetidos: enzima imobilizada nas nanozeólitas puras (N-(Nanozeólita), enzima imobilizada nas nanozeólitas silanizadas (N-(Nanozeólita)/NH) e nanozeólitas funcionalizadas com a adição de glutaraldeído (N-(Nanozeólita)/(GA).

A partir dos dados da Figura 60, comparando o teor de ésteres produzidos por análise de GC, constata-se que a lipase de *T. lanuginosus*, tanto por adsorção no suporte silanizado, como por ligação covalente melhoraram a atividade catalítica quando comparada com o suporte puro não tratado para todos os suportes avaliados. Verificou-se que a lipase imobilizada nos complexos Nano-TS1/NH-TLL e Nano-TS1/GA-TLL resultou em 56,4% e 55,6% de ésteres etílicos, respectivamente. Os dados indicam que o rendimento da produção de biodiesel foi aproximadamente 4 vezes superior ao valor determinado para o suporte não tratado (Nano-TS1-TLL); 12,6% de ésteres produzidos.

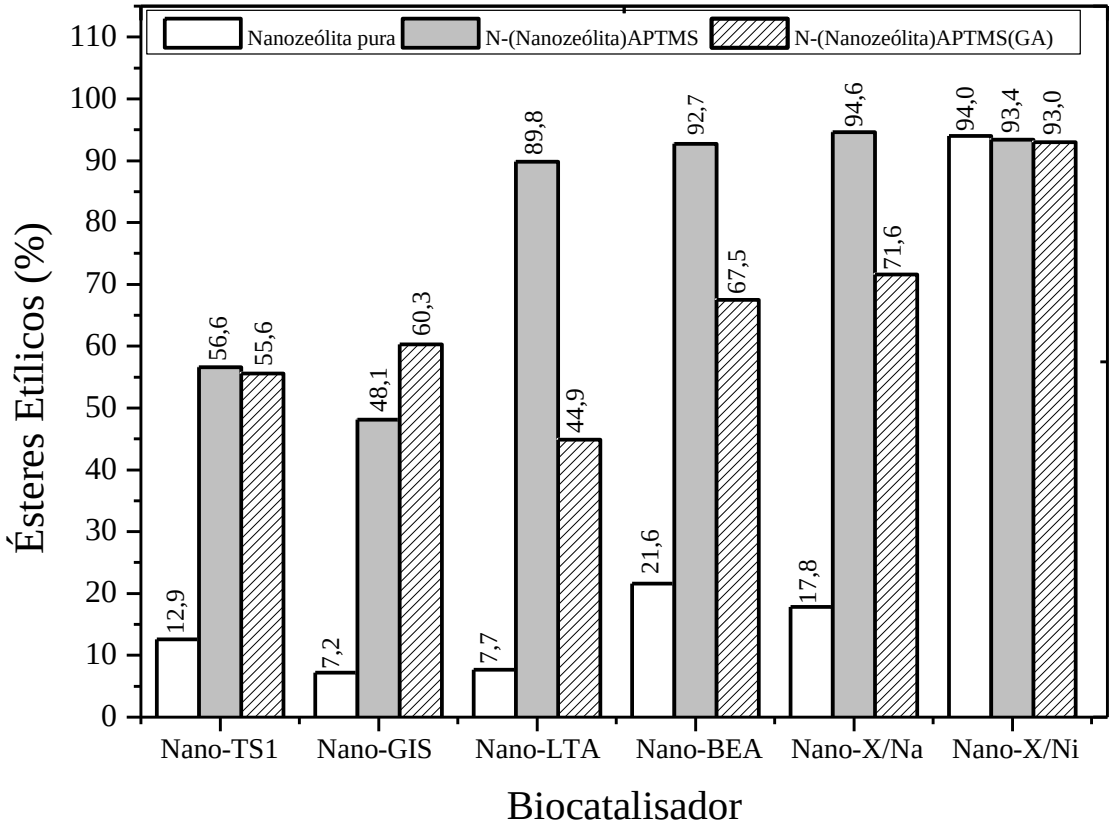


Figura 60 Porcentagem de ésteres etílicos produzidos para os diferentes complexos nanozeólita-enzima de *Thermomyces lanuginosus* imobilizada. Condições de Reação: 48h em 40°C razão óleo microalgas: etanol igual 1:4 e 5% (m/m) da razão óleo:biocatalisador

As amostras das nanozeólitas (Nano-LTA, Nano-BEA e Nano-X) comportaram-se de forma diferente (conforme a Figura 60). Assim, para a lipase imobilizada por adsorção no suporte silanizado, a produção de ésteres etílicos foi maior quando comparada com a amostra funcionalizada com glutaraldeído, obtendo-se rendimentos de 89,8%, 92,7% e 94,6% de ésteres etílicos para os complexos Nano-LTA/NH-TLL, Nano-BEA/NH-TLL e Nano-X/Na/NH-TLL, respectivamente. Em comparação, a enzima imobilizada por ligação covalente apresentou rendimentos de ésteres etílicos ligeiramente inferiores quando comparados com a nanozeólita silanizada, o que provavelmente devido à distorção na estrutura da enzima causada pela ligação covalente.

No caso do complexo Nano-BEA/GA-TLL o percentual de rendimento foi de 67,5% de óleo convertido a ésteres etílicos e para o complexo Nano-X/GA-TLL o rendimento foi de 71,6%. Opostamente, o complexo Nano-LTA/GA-TLL indicou uma redução significativa, obtendo-se 44,9% de conversão. Uma possível explicação para tais resultados é que a reticulação com glutaraldeído reduziu a acessibilidade do substrato aos sítios catalíticos da enzima, em conformidade com a Tabela 16, indicando que, de fato, pode ter ocorrido a distorção devido à sua elevada reatividade, a qual pode, também reduzir os poros do suporte por reticulação.

Para os complexos (Nano-LTA/Na-TLL, Nano-BEA-TLL e Nano-X/Na-TLL) os dados de produção de ésteres etílicos foram muito baixos: 7,7%, 21,6% e 17,8%, respectivamente. A partir do conjunto de dados obtidos de produção de biodiesel, observa-se que as nanozeólitas (Nano-LTA, Nano-BEA e Nano-X) funcionalizadas são suportes mais eficientes para a imobilização da lipase de *T. lanuginosus* do que o suporte titanosilicato Nano-TS1.

Os suportes derivados da Nano-GIS apresentaram um comportamento completamente diferentes dos demais suportes, embora o complexo Nano-GIS/NH-TLL tenha obtido maior atividade enzimática, quando comparado com o complexo Nano-GIS/GA-TLL. Verifica-se, assim, que o rendimento de ésteres etílicos foi baixo (48,1%) para o complexo (Nano-GIS/NH-TLL), enquanto que, para o complexo Nano-GIS/GA-TLL, o rendimento de ésteres etílicos foi de 60,3%. Uma possível explicação para essa diferença pode estar correlacionada a dois fatores: (i) a baixa dispersão do catalisador Nano-GIS/NH-TLL na reação e (ii) dentre os suportes funcionalizados esse apresentou a menor quantidade de enzima imobilizada ≈30,2%.

Os resultados mais significativos na reação de transesterificação do óleo de microalgas a biodiesel foram novamente para os suportes com presença de níquel na estrutura, conforme descrito anteriormente no *item 4.3.8.3*. Este material também foi funcionalizado com o intuito de mostrar que a característica estrutural do suporte é importante para testes de reuso do biocatalisador.

A Figura 60 mostra os teores de ésteres etílicos obtidos por cromatografia gasosa das reações de transesterificação do óleo de microalgas com os três diferentes biocatalisadores. Em todos os casos a produção foi acima de 90%. Para o complexo Nano-X/Ni-TLL a produção de ésteres etílicos foi a mais elevada: 94,0%.

Os complexos Nano-X/Ni/NH-TLL e Nano-X/Ni/GA-TLL também obtiveram um percentual elevado de conversão de óleo a ésteres etílicos (93,4 e 93,0%, respectivamente), indicando que o processo de imobilização por adsorção física e por ligação covalente no suporte não apresentou impacto negativo sobre a atividade do biocatalisador na produção de biodiesel.

Para suportes tratados com níquel, a geometria interna desse suportes não foi significativamente alterada com a adição de glutaraldeído, devido à sua característica de estrutura lamelar. Normalmente, a diminuição na atividade catalítica é observada em virtude da alteração da carga superficial e da estrutura espacial da molécula de enzima (Cunha *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2011). Diferentemente das outras estruturas nanozeolíticas, os três biocatalisadores obtidos apresentaram potenciais catalíticos semelhantes, mas com características estruturais completamente diferentes, sendo este conjunto de catalisadores ideal para os testes de reutilização.

4.4.5 Reutilização

A estabilidade do biocatalisador é um fator primordial a ser considerado para o uso em aplicações industriais, uma vez que, quando reutilizado em vários ciclos de reação, pode ocorrer perda total ou parcial da atividade catalítica do biocatalisador devido à dessorção da enzima e/ou do cátion de compensação no meio reacional. Logo, o biocatalisador ideal pode não ser aquele que apresenta a melhor atividade catalítica inicial e, nessas circunstâncias, para determinar o potencial catalítico de um biocatalisador deve-se considerar se a atividade catalítica é constante por vários ciclos reacionais.

Para determinar o potencial de reutilização e investigar a força do mecanismo de imobilização da lipase em NH-nanozeólita e GA- nanozeólita, a lipase imobilizada nas

diferentes formas foi avaliada em ciclos de reuso dos biocatalisadores. Os resultados de três ciclos de reação constante são mostrados na Figura 61, na qual verifica-se um rendimento reacional de 86,7%, mantendo cerca de 93% da sua atividade catalítica inicial para o complexo GA-Nanozeólita, após os ciclos reacionais. Além disso, entre o 2º e o 3º ciclo praticamente não houve perda da atividade catalítica. Esta pequena perda de atividade inicial pode facilmente ser explicada, no caso da ligação covalente, é necessário considerar que algumas enzimas podem ser adsorvidas pelo suporte, além daquelas que se ligaram covalentemente. Portanto, nesta situação pode existir um efeito duplo, o que poderia justificar a instabilidade inicial e o melhor desempenho nos outros ciclos.

A diminuição da atividade para a lipase imobilizada por adsorção, provavelmente, pode ser resultado da ocorrência da dessorção da enzima, o que foi bastante evidenciada em NH-Nanozeólita. Para o complexo Nano-X/Ni o teor de ésteres etílicos obtido foi de 70,2% após três ciclos, sendo a atividade remanescente de 71,6%. A atividade da lipase em Nanozeólita/NH foi, contudo, significativamente reduzida, com a obtenção de um teor de ésteres de apenas 44,6% em NH-Nanozeólita após três ciclos e a porcentagem de atividade remanescente foi de 47,7% (Figura 61).

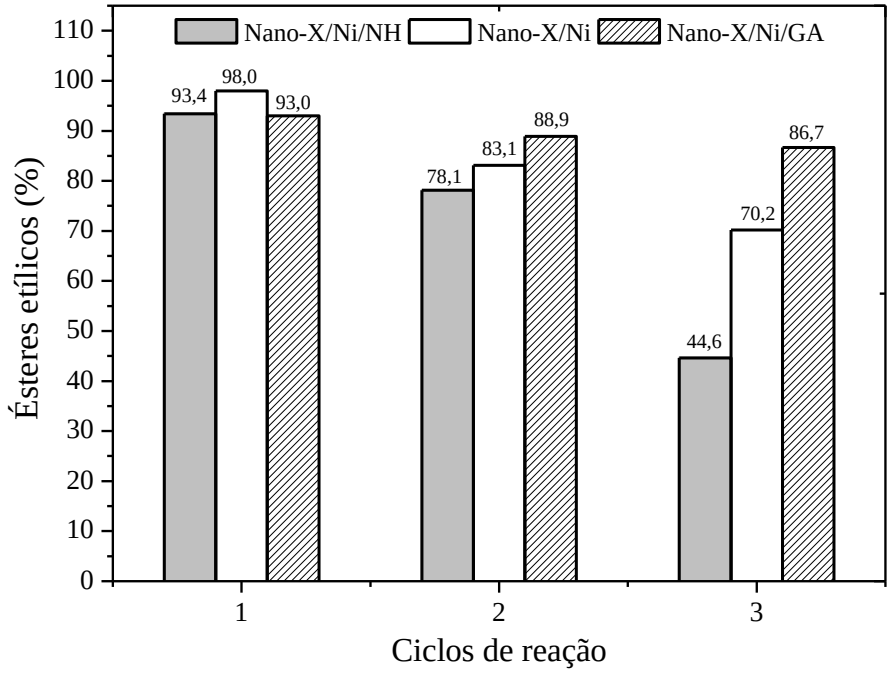


Figura 61 Reuso da lipase de *Thermomyces lanuginosus* imobilizada nas diferentes formas da nanozeólita Nano-X trocada com níquel.

O desempenho de reutilização da lipase imobilizada não só demonstrou que a lipase imobilizada em GA-Nanozeólita pode ser aplicada em sistema contínuo de reação, como também indica que não ocorre uma ligação forte entre a lipase e o suporte NH-Nanozeólita, uma vez que a enzima pode ser facilmente dessorvida do suporte. Em contraste, mesmo sendo uma imobilização por adsorção, a interação entre a enzima e o suporte no complexo Nano-X/Ni-TLL é forte e uma possível explicação para a diminuição do rendimento de ésteres pode estar relacionada com a deposição de glicerol (subproduto da reação) na superfície do suporte.

Quando o suporte é ativado com o glutaraldeído promove uma maior hidrofobização do biocatalisador o que, consequentemente, reduz a adsorção do subproduto da reação (glicerol) no seu microambiente, o efeito inibitório do glicerol é minimizado. Outra informação importante é que a lipase imobilizada na Nanozeólita/GA é mais estável, comprovando estar covalentemente ligada.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES

Tendo em vista que o objetivo do trabalho foi sintetizar suportes nanozeolíticos para imobilizar lipases proveniente de diferentes microrganismos e utilizar o complexo nanozeólita/enzima na reação de transesterificação do óleo de palma e do óleo de microalgas para a produção de biodiesel via rota etílica. Os dados experimentais obtidos nesse estudo levaram às seguintes conclusões:

5.1 Caracterização das enzimas livres dos testes enzimáticos relevantes

- As análises de temperatura ótima e estabilidade enzimática das lipases mostraram que a verdadeira "temperatura ótima" é a temperatura na qual a enzima possui uma atividade constante por um longo período de tempo, pois ocorreu uma perda significativa de atividade enzimática com o aumento do tempo de exposição.
- A zimografia de atividade de esterificação e a eletroforese foram métodos úteis e simples para a seleção de lipases de alto potencial catalítico e maior grau de pureza.

5.2 Caracterização físico-química das nanozeólitas puras e comparação dos diferentes suportes zeolíticos/enzima no desempenho catalítico

- Os resultados de (DRX), (ATR-FTIR), (RMN-MAS), (ICP-OES), (MEV), (MET) e (AFM) para esses materiais indicam que as nanozeólitas titanosilicalita (Nano-TS1), nanozeólita A (Nano-LTA), beta (Nano-BEA), gismondina (Nano-GIS) e faujasita (Nano-X) foram sintetizadas de forma pura e com rendimentos apropriados aos estudos de imobilização e atividade enzimática.
- As análises quantitativas indicaram que os suportes puros foram capazes de imobilizar a lipase de *R. miehei*. Os dados de atividade enzimática mostraram que cada nanozeólita tem uma maneira peculiar de interagir com a enzima estudada, principalmente, de acordo com as diferentes propriedades físico-químicas de suas estruturas. Contudo, os biocatalisadores preparados com os suportes nanozeolíticos puros e a lipase de *R. miehei* foram menos ativos do que os suportes ativados e, por isso, não foram usados para a produção de biodiesel devido à baixa atividade enzimática.

5.3 Caracterização das nanozeólitas trocadas com cátions de transição e o efeito no desempenho catalítico dos complexos (nanozeólita/enzima) na transesterificação enzimática de óleo palma

- A nanozeólita (Nano-X/Na) apresenta estrutura flexível e suscetível à troca iônica. Quando este material foi modificado por troca iônica utilizando espécies de cátions divalentes (Mn^{2+}, Cu^{2+}, Co^{2+}, Zn^{2+} e Ni^{2+}) não apresentaram mudanças estruturais significativas nas condições (0,1M/16h). Todavia, nas concentrações molares (0,5M/36h), mudanças significativas foram observadas, devido à maior incorporação do cátion na estrutura. Essas informações foram confirmadas por DRX, FTIR-ATR, ICP-OES, RMN-MAS ^{29}Si, MEV, MET e Adsorção de N_2.
- A troca iônica da nanozeólita (Nano-X/Na) direcionou a formação de um material lamelar, quando trocado em 0,5M ($NiSO_4$)/36h, mas, levou à formação de suportes mais ativos que afetam o grau de imobilização e a atividade das lipases de *R. miehei* e *T. lanuginosus*.
- Estudo de otimização do processo de transesterificação do óleo de palma a biodiesel pelo método *Box-Behnken* mostrou que a quantidade de catalisador tem influência significativa no rendimento em ésteres etílicos. Obteve-se, desta maneira, os melhores resultados em baixa razão molar O:E de 1:4 e quantidade de catalisador 5% (% em peso em relação ao óleo).
- Na avaliação do potencial catalítico dos complexos (nanozeólita/lipases imobilizadas) na reação de transesterificação do óleo de palma para a produção de biodiesel. Embora todos os complexos derivados da Nano-X/Na com lipases *T. lanuginosus* e *R. miehei* tenham sido capazes de catalisar essa reação, o melhor desempenho catalítico foi obtido com o complexo Nano-X/Ni/0.5M-TLL. Um efeito sinergético foi observado devido à interação entre a superfície carregada positivamente dos suportes zeolíticos tratados com Ni^{2+} e a enzima *T. lanuginosus* nas reações de transesterificação.
- O uso comparativo de diferentes técnicas microscópicas mostrou-se uma ferramenta importante para determinar as características das nanozeólitas, tais como: tamanho, topografia, morfologia e os planos cristalinos. As técnicas de AFM e HRTEM, apesar de serem mais complexas e trabalhosas, apresentaram mais detalhes dos materiais avaliados. Essas técnicas, juntamente com a técnica de XPS da superfície, permitiram determinar de forma precisa as características

estruturais e a presença de diferentes espécies de níquel do suporte Nano-X/Ni/0.5M que podem ter contribuído para o efeito sinergético.

- A análise de bioinformática feita por simulações do comportamento dinâmico das lipases mostrou-se importante para propor um modelo robusto, pois justificou as diferenças nos resultados experimentais das lipases de *T. lanuginosus* e *R. miehei* e, também, as diferenças observadas quando se utilizaram suportes zeolíticos com diferentes cargas de superfície líquida.

5.4 Caracterização das nanozeólitas modificadas com agentes orgânicos e o efeito no desempenho catalíticos dos complexos (nanozeólita/enzima) na transesterificação enzimática do óleo microalgas

- A superfície das nanozeólitas (Nano-TS1, Nano-BEA, Nano-GIS/Na, Nano-LTA/Na, Nano-NaX/Na e Nano-NaX/Ni) foram quimicamente modificadas com a adição do grupo aminosilano (3-Aminopropil-trimetóxisilano (APTMS)) e funcionalizadas com glutaraldeído. A eficiente incorporação dos grupos orgânicos foi confirmada por FTIR-ATR e Potencial zeta.
- A modificação das superfícies das nanozeólitas permitiu comparar dois tipos de interação entre a lipase de *T. lanuginosus* e os diferentes suportes: ligação por adsorção (nanozeólitas puras e as nanozeólitas–NH) e ligação covalente (nanozeólitas–GA). A incorporação de moléculas orgânicas na superfície das nanozeólitas não somente modificou a carga dos suportes de imobilização, mas, ainda, foi possível verificar uma boa correlação entre a carga da superfície, a interação, o grau de imobilização e a atividade das enzimas. Nesse sentido, a quantidade de enzima *T. lanuginosus* imobilizada e a atividade, seja para a ligação por adsorção nas nanozeólitas(–NH), seja por ligação covalente nas nanozeólitas (–GA) aumentou relativamente em comparação com as nanozeólitas puras. Observa-se que o potencial eletrostático da superfície do nanomaterial desempenha um papel importante na avaliação dos suportes e que a funcionalização leva à formação de suportes mais eficientes para essas condições experimentais.
- Na avaliação do potencial catalítico dos complexos (nanozeólita/lipases imobilizadas) nas três formas (N-(Nanozeólita pura), (N-(Nanozeólita)APTMS) e (N-(Nanozeólita)APTMS(GA)), provenientes das diferentes nanozeólitas na

reação de transesterificação do óleo de microalgas para a produção de biodiesel, a análise do rendimento de ésteres indicou que tanto o complexo ligado por adsorção no suporte silanizado como o complexo obtido por ligação covalente produziram uma quantidade maior de ésteres etílicos em comparação com o complexo enzima/nanozeólita-pura. Contudo, novamente observou-se que os complexos funcionalizados para nanozeólita modificada com níquel (Nano-X/Ni/NH-TLL e Nano-X/Ni/GA-TLL) foram os mais efetivos para produção de biodiesel.

- Finalmente, os biocatalisadores obtidos, tanto por adsorção (Nano-X/Ni e Nano-X/Ni/NH-TLL), como por ligação covalente (Nano-X/Ni/GA-TLL) foram analisados em testes de ciclo reacionais contínuos para a produção de biodiesel. A lipase imobilizada covalentemente apresentou o melhor desempenho, mantendo 93% da sua atividade catalítica inicial, após três ciclos reacionais. Enquanto que a lipase imobilizada por adsorção no suporte Nano-X/Ni/NH perdeu grande parte da atividade catalítica.

De acordo com os resultados obtidos, pode-se concluir que:

Os resultados obtidos indicam que a nanozeólita Nano-X e Nano-LTA ativada por troca iônica com níquel levam à formação de potenciais matrizes de imobilização das lipases de *R. miehei* e de *T. lanuginosus*.

Os resultados também indicaram que a funcionalização das nanozeólitas com glutaraldeído pode ser um método utilizado na síntese de potenciais matrizes para imobilização de enzimas, obtendo-se suportes promissores e eficientes para a aplicação em processos contínuos de produção de biodiesel a partir de novas fontes de substrato.

Considerando os desafios da matriz energética brasileira, especialmente, os relacionados com a produção de biocombustíveis oriundos de fontes limpas e renováveis, a exploração dessas nanozeólitas, principalmente com níquel presente na estrutura, tem um valor científico e um desenvolvimento tecnológico bastante interessante para a implantação da catálise heterogênea enzimática no processo industrial visando à produção de biodiesel proveniente de fontes de matérias primas alternativas que não entram em conflito com a agricultura como: o óleo de palma e o óleo de microalgas.

6 PERSPECTIVAS FUTURAS

As próximas etapas, para continuidade desse trabalho, e que poderão ser exploradas futuramente são:

i. verificar se, de fato, ocorre limitação difusional ou distorção nos suportes obtidos por troca iônica que imobilizaram grande quantidade de enzima, mas obtiveram baixa atividade enzimática, a partir da condução de pesquisas com baixa carga de enzima a ser imobilizada;

ii. investigações para determinar o ponto de saturação do suporte Nano-X/Ni/0.5M com cargas maiores de enzima, oferecida para a imobilização. Sabe-se que uma maior concentração de enzimas pode melhorar a estabilidade operacional dos biocatalisadores nos testes de reuso;

iii. avaliar o uso dos melhores biocatalisadores obtidos em outras reações, tais como a hidrólise, esterificação e hidroesterificação. Estas reações favorecem o uso de matérias-primas de baixa qualidade, ou seja, com elevado teor de água e alto índice de ácidos graxos livres para a produção de biodiesel;

iv. modificar a superfície das nanozeólitas, visando obter um microambiente hidrofóbico para diminuir a desativação pelo solvente da reação de transesterificação (metanol ou etanol) e também pelo subproduto da reação (glicerol). Essa mudança poderá aumentar a estabilidade e o número de ciclos de reuso do biocatalisador;

v. estudar etapas de lavagem do biocatalisador com solventes hidrofílicos nos testes de reuso para restaurar a atividade do biocatalisador após a remoção do glicerol;

vi. estudar sistemas híbridos (ligações covalente, adsorção hidrofóbica e adsorção iônica);

vii. utilizar outros agentes de modificação como 3-glicidiloxi-propil-trimetoxi-silano (doravante GPTMS, a sigla em inglês) para inserção de grupos epóxi, os quais podem ser hidrolisados e oxidados para a formação de grupos glioxil, altamente ativos para a imobilização de enzimas;

viii. realizar ensaios de estabilidade térmica e caracterização dos biocatalisadores quanto a pH ótimo, efeito da concentração de substrato;

ix. testar a adsorção iônica, seguida de reticulação com o glutaraldeído para reduzir a dessorção e aumentar a hidrofobicidade.

7 REFERÊNCIAS

ABBASZAADEH, A. et al. Current biodiesel production technologies: A comparative review. **Energy Conversion and Management,** v. 63, n. 0, p. 138-148, 11// 2012.

ACS. Titration was performed by following the protocol established for Chloramine T: *Reagent Chemicals: American Chemical Society Specifications*, 8th ed.; **American Chemical Society: Washington, DC**, pp 242-244. 1993.

ADRIANO, W. S. et al. Stabilization of penicillin G acylase by immobilization on glutaraldehyde-activated chitosan. **Brazilian Journal of Chemical Engineering,** v. 22, p. 529-538, 2005.

AGUADO, J.; SERRANO, D. P.; RODRÍGUEZ, J. M. Zeolite Beta with hierarchical porosity prepared from organofunctionalized seeds. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 115, n. 3, p. 504-513, 2008.

AHMAD, A. L. et al. Microalgae as a sustainable energy source for biodiesel production: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 15, p. 584-593, 2011.

AL-ZUHAIR, S.; HASAN, M.; RAMACHANDRAN, K. B. Kinetics of the enzymatic hydrolysis of palm oil by lipase. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 1155-1163, 2003.

AL-ZUHAIR, S. et al. The effect of fatty acid concentration and water content on the production of biodiesel by lipase. **Biochemical Engineering Journal**, v. 30, p. 212-217, 2006.

ALBERT, B. R. et al. Investigations on P zeolites: Synthesis, characterisation, and structure of highly crystalline low-silica NaP. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 21, p. 133-142, 1998.

ALIM, M. A. et al. Enzymatic transesterification of fractionated rice bran oil with conjugated linoleic acid: Optimization by response surface methodology. **LWT - Food Science and Technology**, v. 41, p. 764-770, 2008.

ALPTEKIN, Ö. et al. Covalent immobilization of catalase onto spacer-arm attached modified florisil: Characterization and application to batch and plug-flow type reactor systems. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 49, p. 547-554, 2011.

AMARI, D.; GINOUX, J.-L.; BONNETAIN, L. Textural damage of cation-exchanged LTA zeolites studied by gas adsorption. **Zeolites**, v. 14, p. 58-64, 1994.

AOUF, C. et al. The use of lipases as biocatalysts for the epoxidation of fatty acids and phenolic compounds. **Green Chemistry**, v. 16, p. 1740-1754, 2014.

AZIZI, S. N.; DEHNAVI, A. R.; JOORABDOOZHA, A. Synthesis and characterization of LTA nanozeolite using barley husk silica: Mercury removal from standard and real solutions. **Materials Research Bulletin**, v. 48, p. 1753-1759, 2013.

BAERLOCHER, C.; MCCUSKER, L. B.; OLSON, D. H. "**Atlas of zeolite framework types**", 6th Edition, Elsevier, Amsterdam, 2007.

BAHAR, I. et al. Normal mode analysis of biomolecular structures: functional mechanisms of membrane proteins. **Chemical reviews**, v. 110, p. 1463-97, 2010.

BAJAJ, A. et al. Biodiesel production through lipase catalyzed transesterification: An overview. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 62, p. 9-14, 2010.

BAKER, N. A. et al. Electrostatics of nanosystems: Application to microtubules and the ribosome. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, p. 10037-10041, 2001.

BALAT, M.; BALAT, H. Progress in biodiesel processing. **Applied Energy,** v. 87, p. 1815-1835, 2010.

BARON, A.M.; **Preparação e Caracterização de Lipases Imobilizadas para Utilização em Biocatálise**. Curitiba, 2008. 138f. Tese (Doutorado em Química)- Setor de ciências exatas, Universidade Federal do Paraná.

BARRER, R. M. Zeolites and their synthesis. **Zeolites**, v. 1, p. 130-140, 1981.

BARRER, R. M. Hydrothermal chemistry of zeolites. **London; New York: Academic Press**, 1982.

BEIN, T. et al. Intrazeolite chemistry of nickel(0) complexes and Ni(0,II) clusters studied by EXAFS, solid-state NMR and FT-IR spectroscopy. **Journal of the American Chemical Society**, v. 110, p. 1801-1810, 1988.

BERGAMASCO, J. et al. Enzymatic transesterification of soybean oil with ethanol using lipases immobilized on highly crystalline PVA microspheres. **Biomass and Bioenergy**, v. 59, p. 218-233, 2013.

BERMAN, H. M. et al. The Protein Data Bank and the challenge of structural genomics. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 7, p. 957-959, 2000.

BIEMMI, E.; BEIN, T. Assembly of nanozeolite monolayers on the gold substrates of piezoelectric sensors. **Langmuir**, v. 24, p. 11196-11202, 2008.

BINNING, G. et al. Surface studies by scanning tunneling microscopy. **Physical Review Letters**, v. 49, p. 57-61, 1982.

BISSWANGER, H. Enzyme assays. **Perspectives in Science**, v. 1, p. 41-55, 2014.

BLASCO, T. et al. Direct synthesis and characterization of hydrophobic aluminum-free Ti-beta zeolite. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 102, p. 75-88, 1998.

BORKAR, P. S. et al. Purification and characterization of extracellular lipase from a new strain: Pseudomonas aeruginosa SRT 9. **Brazilian Journal of Microbiology,** v. 40, p. 358-366, 2009.

BORNSCHEUER, U. T. Immobilizing enzymes: How to create more suitable biocatalysts. **Angewandte Chemie-International Edition,** v. 42, p. 3336-3337, 2003.

BOURG-GARROS, S.; RAZAFINDRAMBOA, N.; PAVIA, A. A. Optimization of lipase-catalyzed synthesis of (z)-3-hexen-1-yl acetate by direct esterification in hexane

and a solvent-free medium. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 22, p. 240-245, 1998.

BOX, G. E. P.; BEHNKEN, D. W. Simplex-Sum Designs: A Class of Second Order Rotatable Designs Derivable From Those of First Order. **The Annals of Mathematical Statistics**, p. 838-864, 1960.

BRADFORD, M. 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.

BRADIN, D. S. Fuel additive consisting of fatty acid esters, glycerol ethers, and triglycerides, diesel fuels. U.S. Patent 5,578,090, 1996.

BRADY, L. et al. A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase. **Nature,** v. 343, p. 767-70, 1990.

BRAGA, A. A. C.; MORGON, N. H. Descrições estruturais cristalinas de zeólitos. **Química Nova**, v. 30, p. 178-188, 2007.

BRENA, B.; GONZÁLEZ-POMBO, P.; BATISTA-VIERA, F. Immobilization of Enzymes: A Literature Survey. In: Guisan, J. M. (Ed.). **Immobilization of Enzymes and Cells: Humana Press**, v.1051, cap. 2, p.15-31, 2013.

BRENNAN, L.; OWENDE, P. Biofuels from microalgae—A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, p. 557-577, 2010.

BRUSH, T. S. et al. purification and characterization of extracellular lipases from *Ophiostoma piliferum*. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 7, p. 2131-2138, 1999.

BRZOZOWSKI, A. M. et al. A model for interfacial activation in lipases from the structure of a fungal lipase-inhibitor complex. **Nature**, v. 351, p. 491-4, 1991.

BRZOZOWSKI, A. M. et al. Structure and molecular model refinement of *Rhizomucor miehei* triacyglyceride lipase: a case study of the use of simulated annealing in partial model refinement. **Acta Crystallographica Section B**, v. 48, p. 307-319, 1992.

BRZOZOWSKI, A. M. et al. Structural origins of the interfacial activation in *Thermomyces (Humicola) lanuginosa* lipase. **Biochemistry**, v. 39, p. 15071-82, 2000.

BUCATARIU, F. et al. Poly(ethyleneimine) cross-linked multilayers deposited onto solid surfaces and enzyme immobilization as a function of the film properties. **Applied Surface Science**, v. 280, p. 812-819, 2013.

CAMBLOR, M. A. et al. Synthesis of nanocrystalline zeolite beta in the absence of alkali metal cations. In: Hakze Chon, S.-K. I. a. Y. S. U. (Ed.). **Studies in Surface Science and Catalysis**: Elsevier, v. 105, p.341-348, 1997.

CAMBLOR, M. A.; CORMA, A.; VALENCIA, S. Characterization of nanocrystalline zeolite Beta. **Microporous and Mesoporous Materials,** v. 25, p. 59-74, 1998.

CEDERQUIST, K. B.; KEATING, C. D. Curvature Effects in DNA: Au Nanoparticle Conjugates. **Acs Nano**, v. 3, p. 256-260, 2009.

CHANG, M. C.; TANAKA, J. FT-IR study for hydroxyapatite/collagen nanocomposite cross-linked by glutaraldehyde. **Biomaterials**, v. 23, p. 4811-4818, 2002.

CHAROENCHAITRAKOOL, M.; THIENMETHANGKOON, J. Statistical optimization for biodiesel production from waste frying oil through two-step catalyzed process. **Fuel Processing Technology**, v. 92, p. 112-118, 2011.

CHARPE, T. W.; RATHOD, V. K. Biodiesel production using waste frying oil. **Waste management**, v. 31, p. 85-90, 2011.

CHEN, J. H. et al. Pervaporation and characterization of chitosan membranes cross-linked by 3-aminopropyltriethoxysilane. **Journal of Membrane Science**, v. 292, p. 125-132, 2007.

CHEW, Y. H. et al. Kinetic study on the hydrolysis of palm olein using immobilized lipase. **Biochemical Engineering Journal**, v. 39, p. 516-520, 2008.

CHIANG, C.-H.; ISHIDA, H.; KOENIG, J. L. The structure of γ-aminopropyl triethoxysilane on glass surfaces. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 74, p. 396-404, 1980.

CHING, W. H. R., C. W. **Cartilha do SEBRAE sobre biodiesel** 2007. Disponível em: <http://www2.ba.sebrae.com.br/banco/documentos/biblioteca/cartilha_biodiesel.pdf>. Acesso em: 5 Abril. 2015.

CHOI, M. et al. Stable single-unit-cell nanosheets of zeolite MFI as active and long-lived catalysts. **Nature**, vol 461, p. 246, 2009.

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

COUGHLAN, B.; KEANE, M. A. The effects of the environment on the growth of nickel metal particles supported on a range of Y zeolites prepared by ion exchange and impregnation. **Zeolites,** v. 11, p. 2-11, 1991.

CROOKS, G. E. et al. Comparison of hydrolysis and esterification behavior of *Humicola lanuginosa* and *Rhizomucor miehei* lipases in AOT-stabilized water-in-oil microemulsions: II. Effect of temperature on reaction kinetics and general considerations of stability and productivity. **Biotechnol Bioeng,** v. 48, p. 190-6, 1995.

CUNDY, C. S.; COX, P. A. The hydrothermal synthesis of zeolites: Precursors, intermediates and reaction mechanism. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 82, p. 1-78, 2005.

CUNDY, C. S.; FORREST, J. O. Some observations on the preparation and properties of colloidal silicalites Part II: Preparation, characterisation and properties of colloidal silicalite-1, TS-1, silicalite-2 and TS-2. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 72, p. 67-80, 2004.

CUNDY, C. S.; FORREST, J. O.; PLAISTED, R. J. Some observations on the preparation and properties of colloidal silicalites. Part I: synthesis of colloidal silicalite-1 and titanosilicalite-1 (TS-1). **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 66, p. 143-156, 2003.

CUNHA, A. et al. Immobilization of *Yarrowia lipolytica* Lipase—A comparison of stability of physical adsorption and covalent attachment techniques. In: Adney, W.; McMillan, J., *et al* (Ed.). **Biotechnology for Fuels and Chemicals: Humana Press**, cap. 19, p.169-176, 2008.

DABDOUB, M. J.; BRONZE, J. L.; RAMPIN, M. A. Biodiesel: A critical verview on the current status and perspectives at the academy and industry. **Biodiesel: visao critica do status atual e perspectivas na academia e na industria**, v. 32, p. 776-792, 2009.

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

DANQUAH, M. K. et al. Microalgal growth characteristics and subsequent influence on dewatering efficiency. **Chemical Engineering Journal**, v. 151, p. 73-78, 8/15/ 2009.

DAVIS, M. E. Ordered porous materials for emerging applications. **Nature**, v. 417, p. 813-821, 2002.

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

DEMIRBAS, A. Progress and recent trends in biodiesel fuels. **Energy Conversion and Management**, v. 50, p. 14-34, 2009.

DEMIRBAŞ, A. Biodiesel fuels from vegetable oils via catalytic and non-catalytic supercritical alcohol transesterifications and other methods: a survey. **Energy conversion and Management**, v. 44, p. 2093-2109, 2003.

DI SERIO, M. et al. Heterogeneous catalysts for biodiesel production. **Energy & Fuels**, v. 22, p. 207-217, 2008.

DIAZ, E. et al. Characterization of Co, Fe and Mn-exchanged zeolites by inverse gas chromatography. **J Chromatogr A**, v. 1049, p. 161-169, 2004.

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

DIZGE, N. et al. Biodiesel production from sunflower, soybean, and waste cooking oils by transesterification using lipase immobilized onto a novel microporous polymer. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 1983-1991, 2009.

DIZGE, N.; KESKINLER, B.; TANRISEVEN, A. Biodiesel production from canola oil by using lipase immobilized onto hydrophobic microporous styrene–divinylbenzene copolymer. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, p. 220-225, 2009.

DOBBEK, H. et al. Crystal structure of a carbon monoxide dehydrogenase reveals a [Ni-4Fe-5S] cluster. **Science**, v. 293, p. 1281-1285, 2001.

DOLINSKY, T. J. et al. PDB2PQR: an automated pipeline for the setup of Poisson-Boltzmann electrostatics calculations. **Nucleic Acids Research**, v. 32, p. 665-667, 2004.

DON TA NGOC AND THANH HUYEN PHAM AND KHANH DIEU HONG, N. Synthesis, characterization and application of nanozeolite NaX from Vietnamese kaolin. **Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology**, v. 4, p. 045018, 2013.

DOSSAT, V.; COMBES, D.; MARTY, A. Continuous enzymatic transesterification of high oleic sunflower oil in a packed bed reactor: influence of the glycerol production. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 25, p. 194-200, 1999.

DU, W. et al. Perspectives for biotechnological production of biodiesel and impacts. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 79, p. 331-337, 2008.

DU, W.; XU, Y.; LIU, D. Lipase-catalysed transesterification of soya bean oil for biodiesel production during continuous batch operation. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 38, p. 103-106, 2003.

DU, W. et al. Study on acyl migration in immobilized lipozyme TL-catalyzed transesterification of soybean oil for biodiesel production. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 37, p. 68-71, 2005.

ELY, T. O. et al. Synthesis of nickel nanoparticles. Influence of aggregation induced by modification of poly(vinylpyrrolidone) chain length on their magnetic properties. **Chemistry of Materials**, v. 11, p. 526-529, 1999.

ERMLER, U. et al. Active sites of transition-metal enzymes with a focus on nickel. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 8, p. 749-758, 1998.

FAGHIHIAN, H. et al. Synthesis of a novel magnetic zeolite nanocomposite for removal of Cs^{+} and Sr^{2+} from aqueous solution: kinetic, equilibrium, and thermodynamic studies. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 393, p. 445-451, 2013.

FAN, X. Enzymatic biodiesel production–the way of the future. **Lipid Technology**, v. 24, p. 31-32, 2012.

FENG, X. et al. Enabling the utilization of wool as an enzyme support: Enhancing the activity and stability of lipase immobilized onto woolen cloth. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces,** v. 102, p. 526-533, 2013.

FERNANDES, M. L. M. et al. Hydrolysis and synthesis reactions catalysed by *Thermomyces lanuginosa* lipase in the AOT/Isooctane reversed micellar system. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 30, p. 43-49, 2004.

FERNANDEZ-LORENTE, G. et al. Self-assembly of *Pseudomonas fluorescens* lipase into bimolecular aggregates dramatically affects functional properties. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 82, p. 232-7, 2003.

FERREIRA, J. R.; CRISTO, C. M. P. N. **– O futuro da indústria: biodiesel: coletânea de artigos–** Brasília: MDIC-STI/IEL, 2006, 145 p. : il. (Série Política Industrial, Tecnológica e de Comércio Exterior, 14)**.**

FJERBAEK, L.; CHRISTENSEN, K. V.; NORDDAHL, B. A. Review of the current state of biodiesel production using enzymatic transesterification. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 102, p. 1298-1315, 2009.

FLANIGEN EDITH, M. A review and new perspectives in zeolite crystallization. In: (Ed.). **Molecular Sieves: American Chemical Society**, v.121, cap. 10, p.119-139, 1973.

FLANIGEN, E. M. et al. Aluminophosphate molecular sieves and the periodic table. In: Y. Murakami, A. I. a. J. W. W. (Ed.). **Studies in Surface Science and Catalysis**: Elsevier, v. 28, p.103-112, 1986.

FLANINGEN, E. M. **J.A. Rabo (Ed.), Zeolite Chem. Catal., ACS, Washington**, p. 80, 1979.

FUKUDA, H.; KONDO, A.; NODA, H. Biodiesel fuel production by transesterification of oils. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 92, p. 405-416, 2001.

FYFE, C. A. et al. One- and two-dimensional high-resolution solid-state NMR studies of zeolite lattice structures. **Chemical Reviews**, v. 91, p. 1525-1543, 1991.

GANESAN, D.; RAJENDRAN, A.; THANGAVELU, V. An overview on the recent advances in the transesterification of vegetable oils for biodiesel production using chemical and biocatalysts. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 8, p. 367-394, 2009.

GHOBARKAR, H.; SCHÄF, O. Synthesis of gismondine-type zeolites by the hydrothermal method. **Materials Research Bulletin**, v. 34, p. 517-525, 1999.

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

GOMES, F. M. et al. Determinação das propriedades catalíticas em meio aquoso e orgânico da lipase de *Candida rugosa* imobilizada em celulignina quimicamente modificada por carbonildiimidazol. **Química Nova**, v. 29, p. 710-718, 2006.

GONG, J. et al. Structural and magnetic properties of hcp and fcc Ni nanoparticles. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 457, p. 6-9, 2008.

GONÇALVES, A. P. V. et al. Zeolites as supports for enzymatic hydrolysis reactions. Comparative study of several zeolites. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 1, p. 53-60, 1996.

GONÇALVES, A. P. V. et al. Effect of the immobilization support on the hydrolytic activity of a cutinase from *Fusarium solani pisi*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 20, p. 93-101, 1997.

GOODING, J. J.; HALL, C. E.; HALL, E. A. H. Physical study of film-forming acrylate emulsion polymers for biosensor applications. **Analytica Chimica Acta**, v. 349, p. 131-141, 1997.

GROSVENOR, A. P. et al. New interpretations of XPS spectra of nickel metal and oxides. **Surface Science,** v. 600, p. 1771-1779, 2006.

GUI, M. M.; LEE, K. T.; BHATIA, S. Feasibility of edible oil vs. non-edible oil vs. waste edible oil as biodiesel feedstock. **Energy**, v. 33, p. 1646-1653, 2008.

GUPTA, P.; UPADHYAY, L. S. B.; SHRIVASTAVA, R. Lipase catalyzed-transesterification of vegetable oils by lipolytic bacteria. **Research Journal of Microbiology**, v. 6, p. 281-288, 2011.

GUPTA, R.; GUPTA, N.; RATHI, P. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 64, p. 763-781, 2004.

HAAS, M. J. **Fuels as solvents for the conduct of enzymatic reactions**. U.S. Patent No. 5,697,986. 16, 1997.

HAMA, S. et al. Lipase localization in *Rhizopus oryzae* cells immobilized within biomass support particles for use as whole-cell biocatalysts in biodiesel-fuel production. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 101, p. 328-33, 2006.

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

HAN, Z. L. et al. Enhancing thermostability of a *Rhizomucor miehei* lipase by engineering a disulfide bond and displaying on the yeast cell surface. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 85, p. 117-26, 2009.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Methods for detection and characterization of lipases: A comprehensive review. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 782-798, 2009.

HAZM, J. E. et al. Synthesis and characterization of gallium-beta zeolite from fluoride-containing media. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 43, p. 11-25, 2001.

HEDLUND, J.; SCHOEMAN, B.; STERTE, J. Ultrathin oriented zeolite LTA films. **Chemical Communications**, v. 13, p. 1193-1194, 1997.

HELWANI, Z. et al. Technologies for production of biodiesel focusing on green catalytic techniques: A review. **Fuel Processing Technology**, v. 90, p. 1502-1514, 2009.

HERRGARD, S.; GIBAS, C. J.; SUBRAMANIAM, S. Role of an electrostatic network of residues in the enzymatic action of the *Rhizomucor miehei* lipase family. **Biochemistry**, v. 39, p. 2921-2930, 2000.

HINCAPIE, B. O. et al. Synthesis of mordenite nanocrystals. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 67, p. 19-26, 2004.

HOLMBERG, B. A.; WANG, H.; YAN, Y. High silica zeolite Y nanocrystals by dealumination and direct synthesis. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 74, p. 189-198, 2004.

HOON, S. R. et al. Preparation and properties of nickel ferrofluids. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 39, p. 107-110, 1983.

HOSSAIN, A. B. M. S. et al. Biodiesel fuel production from algae as renewable energy. **American journal of biochemistry and biotechnology**, v. 4, p. 250-254, 2008.

HOU, Y. et al. Size-controlled synthesis of nickel nanoparticles. **Applied Surface Science**, v. 241, p. 218-222, 2005.

HU, Y.-Y. et al. Crystal plane- and size-dependent protein adsorption on nanozeolite. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 113, p. 18040-18046, 2009.

HUANG, X.-J. et al. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on electrospun cellulose nanofiber membrane. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 70, p. 95-100, 2011.

INTERNATIONAL ZEOLITE ASSOCIATION <**http://www.iza-online.org/**> **Consulta feita no dia 06/08/2014.**

JAEGER, K. E.; DIJKSTRA, B. W.; REETZ, M. T. Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 53, p. 315-51, 1999.

JANAUN, J.; ELLIS, N. Perspectives on biodiesel as a sustainable fuel. **Renewable & Sustainable Energy Reviews,** v. 14, p. 1312-1320, 2010.

JI et al. Enhanced protein digestion through the confinement of nanozeolite-assembled microchip reactors. **Analytical Chemistry,** v. 80, n. 7, p. 2457-2463, 2008.

JUNG, D.; HARTMANN, M. Oxidation of Indole with CPO and GOx Immobilized on SBA-15. **Studies in Surface Science and Catalysis**, 174, p.1045-1050, 2008.

JURADO, E. et al. Enzyme-based detergent formulas for fatty soils and hard surfaces in a continuous-flow device. **Journal of Surfactants and Detergents**, v. 9, p. 83-90, 2006.

KAIEDA, M. et al. Effect of methanol and water contents on production of biodiesel fuel from plant oil catalyzed by various lipases in a solvent-free system. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 91, p. 12-15, 2001.

KANG, Y. J. et al. Uniform nanozeolite microspheres with large secondary pore architecture. **Chemistry of Materials**, v. 18, p. 1861-1866, 2006.

KANTAM, M. L. et al. Synthesis of nanocrystalline zeolite beta in supercritical fluids, characterization and catalytic activity. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical,** v. 252, p. 76-84, 2006.

KECHT, J. et al. Nanosized gismondine grown in colloidal precursor solutions. **Langmuir,** v. 20, p. 5271-5276, 2004.

KLINOWSKI, J. Solid-state NMR studies of molecular sieve catalysts. **Chemical Reviews,** v. 91, p. 1459-1479, 1991.

KLINOWSKI, J. Applications of solid-state NMR for the study of molecular sieves. **Analytica Chimica Acta,** v. 283, p. 929-965, 1993.

KOBLER, J. **Thin Films from Porous Nanoparticles.** München, 2008. 223f. PhD Thesis-Faculty of Chemistry and Pharmacy, Universidade de Munique Ludwig-Maximilians.

KOJIMA, Y.; KOBAYASHI, M.; SHIMIZU, S. A novel lipase from Pseudomonas fluorescens HU380: gene cloning, overproduction, renaturation-activation, two-step purification, and characterization. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 96, p. 242-249, 2003.

KOSANOVIC, C. et al. Study of the microstructure of amorphous aluminosilicate gel before and after its hydrothermal treatment. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 110, p. 177-185, 2008.

KRIEGER, N. **Produção, purificação e caracterização de lipases de *Penicillium citrinum***. Curitiba. 1995, 260f. Tese (Doutorado em Ciências – Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná. 1995.

KWON, M. A. et al. Synthesis activity-based zymography for detection of lipases and esterases. **Biotechnology Letters**, v. 33, p. 741-6, 2011.

LARLUS, O. et al. A powerful structure-directing agent for the synthesis of nanosized Al- and high-silica zeolite Beta in alkaline medium. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 142, p. 17-25, 2011.

LECA, M. et al. Optimization of biodiesel production by transesterification of vegetable oils using lipases. **Romanian Biotechnological Letters**, v. 15, n. 5, p. 5618-30, 2010.

LEE, D.-W.; PARK, Y.-M.; LEE, K.-Y. Heterogeneous base catalysts for transesterification in biodiesel synthesis. **Catalysis Surveys from Asia**, v. 13, p. 63-77, 2009.

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.

LI, Q.; YAN, Y. Production of biodiesel catalyzed by immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase from *Sapium sebiferum* oil in micro-aqueous phase. **Applied Energy**, v. 87, p. 3148-3154, 2010.

LI, Y. et al. Effects of novel silane modification of zeolite surface on polymer chain rigidification and partial pore blockage in polyethersulfone (PES)–zeolite A mixed matrix membranes. **Journal of Membrane Science**, v. 275, p. 17-28, 2006.

LIAO, C.-C.; CHUNG, T.-W. Analysis of parameters and interaction between parameters of the microwave-assisted continuous transesterification process of Jatropha oil using response surface methodology. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 89, p. 2575-2581, 2011.

LIE, E.; MOLIN, G. Hydrolysis and esterification with immobilized lipase on hydrophobic and hydrophilic zeolites. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 50, p. 549-553, 1991.

LIM, S.; TEONG, L. K. Recent trends, opportunities and challenges of biodiesel in Malaysia: An overview. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, p. 938-954, 2010.

LIN, L. et al. Transesterification of rapeseed oil to biodiesel on CaO/α-Fe hollow fiber catalyst: optimization by response surface methodology. **BioEnergy Research**, v. 5, p. 949-957, 2012.

LINDORFF-LARSEN, K. et al. Improved side-chain torsion potentials for the Amber ff99SB protein force field. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 78, p. 1950-1958, 2010.

LOK, B. M. et al. Silicoaluminophosphate molecular sieves: another new class of microporous crystalline inorganic solids. **Journal of the American Chemical Society**, v. 106, p. 6092-6093, 1984.

LOSIC, D. et al. Scanning probe microscopy characterisation of immobilised enzyme molecules on a biosensor surface: visualisation of individual molecules. **Journal of the Serbian Chemical Society**, v. 69, p. 93-106, 2004.

LOZANO, P. et al. Membrane reactor with immobilized *Candida antarctica* lipase B for ester synthesis in supercritical carbon dioxide. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 29, p. 121-128, 2004.

LUKOVIĆ, N.; KNEŽEVIĆ-JUGOVIĆ, Z.; BEZBRADICA, D. Biodiesel fuel production by enzymatic transesterification of oils: recent trends, challenges and future perspectives. **M., M., ed., Alternative Fuel**, 2011.

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

MA, Z.; ZHANG, C.; CHEN, C. Analyzing the factors that influence Chinese consumers′ adoption of the biodiesel: The private vehicles owner′s investigating in Beijing. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 37, p. 199-206, 2014.

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

MACARIO, A. et al. Study of lipase immobilization on zeolitic support and transesterification reaction in a solvent free-system. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 25, p. 328-335, 2007.

MACARIO, A. et al. Biodiesel production by immobilized lipase on zeolites and related materials. In: Antoine Gédéon, P. M. a. F. B. (Ed.). **Studies in Surface Science and Catalysis**: Elsevier, v. 174, Part B, p.1011-1016, 2008.

MANSUR, H. S. et al. FTIR spectroscopy characterization of poly (vinyl alcohol) hydrogel with different hydrolysis degree and chemically crosslinked with glutaraldehyde. **Materials Science and Engineering: C**, v. 28, p. 539-548, 2008.

MARQUES, P. P. Estudo da imobilização de lipase de *Burkholderia cepacia* em alginato de sódio. 2011.79f. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas.

MARTINELLE, M.; HULT, K. Kinetics of triglyceride lipase. In: Lipases: Their Structure, Biochemistry and Application. **Eds. WOOLEY, P.; PETERSEN, S. B., 159, Cambridge University Press.** 1994

MATA, T. M.; et al. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, p. 217-232, 2010.

MATEO, C. et al. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 1451-1463, 2007.

McCUSKER, L. B.; BAERLOCHER, C. Zeolite Structures. **In: Introduction to Zeolite Science and Practice. Cejka, J.; van Bekkum, H.; Corma, A.; Schuth, F. (Eds). 3rd ed. Elsevier**, 2007.

MCGINNIS, K. M.; DEMPSTER, T. A.; SOMMERFELD, M. R. Characterization of the growth and lipid content of the diatom *Chaetoceros muelleri*. **Journal of Applied Phycology**, v. 9, p. 19-24, 1997.

MENDES, A. A. et al. Evaluation of immobilized lipases on poly-hydroxybutyrate beads to catalyze biodiesel synthesis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 50, p. 503-511, 2012.

MEYERS, B. L. et al. Determination of structural boron in borosilicate molecular sieves via X-ray diffraction. **Journal of Catalysis**, v. 91, p. 352-355, 1985.

MIN, D. et al. Direct immobilization of glucose oxidase in magnetic mesoporous bioactive glasses. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 1, p. 3295-3303, 2013.

MIN, K. et al. Enzyme immobilization on carbon nanomaterials: Loading density investigation and zeta potential analysis. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 83, p. 87-93, 2012.

MINOWA, T. et al. Oil production from algal cells of *Dunaliella tertiolecta* by direct thermochemical liquefaction. **Fuel**, v. 74, p. 1735-1738, 1995.

MINTOVA, S. et al. Mechanism of zeolite a nanocrystal growth from colloids at room temperature. **Science**, v. 283, p. 958-960, 1999.

MOLINA GRIMA, E. et al. Photobioreactors: light regime, mass transfer, and scaleup. **Journal of Biotechnology**, v. 70, p. 231-247, 1999.

MURRAY, C. B. et al. Monodisperse 3d Transition-Metal (Co, Ni, Fe) Nanoparticles and Their Assembly into Nanoparticle Superlattices. **Mrs Bulletin**, v. 26, p. 985-991, 2001.

NA, K. et al. Directing Zeolite Structures into Hierarchically Nanoporous Architectures. **Science**, v. 333, p. 328-332, 2011.

NAWANI, N.; SINGH, R.; KAUR, J. Immobilization and stability studies of a lipase from thermophilic *Bacillus sp*: The effect of process parameters on immobilization of enzyme. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 9, p. 559-565, 2006.

NERY, J. G. et al. Rietveld refinement and solid state NMR study of Nd-, Sm-, Gd-, and Dy-containing Y zeolites. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 41, p. 281-293, 2000.

NEVES PETERSEN, M. T.; FOJAN, P.; PETERSEN, S. B. How do lipases and esterases work: the electrostatic contribution. **Journal of Biotechnology**, v. 85, p. 115-47, 2001.

NEWSAM, J. M.; VAUGHAN, D. E. W. Structural Studies of Gallosilicate Zeolites. In: Y. Murakami, A. I. a. J. W. W. (Ed.). **Studies in Surface Science and Catalysis**: Elsevier, v. 28, p. 457-464,1986.

NEZAMZADEH-EJHIEH, A.; KARIMI-SHAMSABADI, M. Decolorization of a binary azo dyes mixture using CuO incorporated nanozeolite-X as a heterogeneous catalyst and solar irradiation. **Chemical Engineering Journal,** v. 228, p. 631-641, 2013.

Nibou, D. et al. Adsorption of Zn^{2+} ions onto NaA and NaX zeolites: kinetic, equilibrium and thermodynamic studies. **Journal of Hazardous Materials**, v. 173, p. 637-46, 2010.

NIE, K. et al. Lipase catalyzed methanolysis to produce biodiesel: Optimization of the biodiesel production. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 43, p. 142-147, 2006.

NIELSEN, P. M.; BRASK, J.; FJERBAEK, L. Enzymatic biodiesel production: Technical and economical considerations. **European Journal of Lipid Science and Technology,** v. 110, p. 692-700, 2008.

NOUREDDINI, H.; GAO, X.; PHILKANA, R. S. Immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase for biodiesel fuel production from soybean oil. **Bioresource technology**, v. 96, p. 769-77, May 2005.

PADILHA, G. S. et al. Evaluation of an extrecellular lipase from *Pseudomonas cepacia* for purification in aqueous two-phase system. **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 31, p. 16-22, 2011.

PALOMO, J. M. et al. General Trend of Lipase to Self-Assemble Giving Bimolecular Aggregates Greatly Modifies the Enzyme Functionality. **Biomacromolecules**, v. 4, p. 1-6, 2003.

PARISE, J. B. Some gallium phosphate frameworks related to the aluminium phosphate molecular sieves: X-ray structural characterization of $\{(PriNH_3)[Ga_4(PO_4)_4\}H_2O$. **Journal of the Chemical Society, Chemical Communications**, p. 606-607, 1985.

PENCREAC'H, G.; BARATTI, J. C. Hydrolysis of p-nitrophenyl palmitate in n-heptane by the *Pseudomonas cepacia* lipase: A simple test for the determination of lipase activity in organic media. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 18, p. 417-422, 1996.

PETERSSON, A. E. V.; ADLERCREUTZ, P.; MATTIASSON, B. A water activity control system for enzymatic reactions in organic media. **Biotechnology and Bioengineering,** v. 97, p. 235-241, 2007.

PHAN HUY, H.; YOON, K.-B.; KIM, D.-P. Synthesis of hierarchically porous zeolite A crystals with uniform particle size in a droplet microreactor. **RSC Advances,** v. 2, p. 5323-5328, 2012.

PINSIRODOM, P.; PARKIN, K. L. Lipase Assays. In: (Ed.). **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**: John Wiley & Sons, Inc., 2001.

PINZI, S. et al. The ideal vegetable oil-based biodiesel composition: A review of social, economical and technical implications. **Energy & Fuels**, v. 23, p. 2325-2341, 2009.

PIRUTKO, L. V. et al. Preparation and catalytic study of metal modified TS-1 in the oxidation of benzene to phenol by N_2O. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 48, p. 345-353, 2001.

PLUEDDEMANN, E. P. Silane Coupling Agents. **Springer Science & Business Media**, 1982.

PONDER, J. TINKER Software Tools for Molecular Design, Version 4.1, **Washington University School of Medicine**, available from http://dasher.wustl.edu/tinker 2003.

POPPE, J. K. et al. Enzymatic reactors for biodiesel synthesis: Present status and future prospects. **Biotechnology Advances**,v.(0), p. (0), 2015.

RANGANATHAN, S. V.; et al. An overview of enzymatic production of biodiesel. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 3975-3981, 2008.

REETZ, M. T.; HELBIG, W. Size-selective synthesis of nanostructured transition metal clusters. **Journal of the American Chemical Society**, v. 116, p. 7401-7402, 1994.

RIAZ, M. et al. Characterization of lipase produced by *Bacillus* sp. FH5 in immobilized and free state. **Annals of microbiology**, v. 60, p. 169-175, 2010.

RIBEIRO, B. D. et al. Production and use of lipases in bioenergy: a review from the feedstocks to biodiesel production. **Enzyme research**, v. 2011, 2011.

ROBLES-MEDINA, A. et al. Biocatalysis: Towards ever greener biodiesel production. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 398-408, 2009.

ROCHA, J.; ANDERSON, MICHAEL W. Microporous titanosilicates and other novel mixed octahedral-tetrahedral framework oxides. **European Journal of Inorganic Chemistry**, v. 2000, p. 801-818, 2000.

RODRIGUES, R. C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Lipase from *Rhizomucor miehei* as an industrial biocatalyst in chemical process. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic,** v. 64, p. 1-22, 2010.

RODRIGUES, R. C. et al. Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization. **Chemical Society Reviews,** v. 42, n. 15, p. 6290-6307, 2013.

RONG, H. et al. Core/shell fluorescent magnetic silica-coated composite nanoparticles for bioconjugation. **Nanotechnology,** v. 18, p. 315601, 2007.

RÜCKER, G. Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie. Von M. Hesse, H. Meier, B. Zeeh. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 1995, 364 S. mit 221 Abbildungen und 100 Tabellen, kartoniert, DM 82,-, ISBN 3135761053. **Pharmazie in unserer Zeit,** v. 25, p. 220-220, 1996.

SAMUKAWA, T. et al. Pretreatment of immobilized *Candida antarctica* lipase for biodiesel fuel production from plant oil. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 90, p. 180-183, 2000.

SARBAK, Z. Structural and thermal characterization of zeolite type X modified by successive ion exchange with cobalt and manganese cations. **Crystal Research and Technology**, v. 28, p. 979-987, 1993.

SAXENA, R. K. et al. Purification strategies for microbial lipases. **Journal of Microbiological Methods**, v. 52, p. 1-18, 2003.

SCHAGGER, H. Tricine-SDS-PAGE. **Nat. Protocols**, v. 1, p. 16-22, 2006.

SCHRAG, J. D. et al. Ser-His-Glu triad forms the catalytic site of the lipase from Geotrichum candidum. **Nature**, v. 351, p. 761-764, 1991.

SCHULTZ, N. et al. Zeta potential measurement as a diagnostic tool in enzyme immobilisation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 66, p. 39-44, 2008.

Selvasekarapandian, S. et al. Laser Raman and FTIR studies on Li^+ interaction in PVAc–LiClO4 polymer electrolytes. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 65, p. 1234-1240, 2006.

SERRALHA, F. N. et al. Zeolites as supports for an enzymatic alcoholysis reaction. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic,** v. 4, p. 303-311,1998.

SERRANO, D. P. et al. Crystallization mechanism of all-silica zeolite beta in fluoride medium. **Microporous and Mesoporous Materials,** v. 46, p. 35-46, Jul 2001.

SHAH, P. et al. Immobilization of Ntn hydrolases on APTES fuctionalized SBA-15. **From Zeolites to Porous Mof Materials: the 40th Anniversary of International Zeolite Conference, Proceedings of the 15th International Zeolite Conference**, v. 170, p. 1891-1898, 2007.

SHARMA, R. et al. Purification and characterisation of a thermostable alkaline lipase from a new thermophilic *Bacillus* sp. RSJ-1. **Process Biochemistry**, v. 37, p. 1075-1084, 2002.

SHAW, J. F. et al. Continuous enzymatic synthesis of biodiesel with Novozym 435. **Energy & Fuels**, v. 22, p. 840-844, 2008.

SHEN, Y. et al. Heterotrophic culture of *Chlorella protothecoides* in various nitrogen sources for lipid production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 160, p. 1674-84, 2010.

SHIMADA, Y. et al. Conversion of vegetable oil to biodiesel using immobilized *Candida antarctica* lipase. **Journal of the American Oil Chemists' Society,** v. 76, p. 789-793, 1999.

SHIRLEY, D. A. High-Resolution X-Ray Photoemission Spectrum of the Valence Bands of Gold. **Physical Review B,** v. 5, p. 4709-4714, 1972.

SINGH, B. et al. Synthesis of biodiesel using potassium fluoride (KF) supported by hydrotalcite and process optimization by Box–Behnken design. **Biomass Conversion and Biorefinery,** v. 2, p. 317-325, 2012.

SINGH, S. P.; SINGH, D. Biodiesel production through the use of different sources and characterization of oils and their esters as the substitute of diesel: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews,** v. 14, p. 200-216, 2010.

SMART, L. E.; MOORE, E. A. **Solid State Chemistry: An Introduction**. CRC press, 2012.

SMITH, G. Surface Analysis by Electron Spectroscopy. In: (Ed.). **Surface Analysis by Electron Spectroscopy**: Springer US, 1994. cap. 2, p.3-14. (Updates in Applied Physics and Electrical Technology).

SONG, W. et al. Synthesis, characterization, and adsorption properties of nanocrystalline ZSM-5. **Langmuir**, v. 20, p. 8301-8306, 2004.

SORIANO, N. U., Jr.; VENDITTI, R.; ARGYROPOULOS, D. S. Biodiesel synthesis via homogeneous Lewis acid-catalyzed transesterification. **Fuel**, v. 88, p. 560-565, 2009.

SOTOFT, L. F. et al. Novel investigation of enzymatic biodiesel reaction by isothermal calorimetry. **Thermochimica Acta**, v. 501, p. 84-90, 2010.

SPERA, R. et al. Bioengineering for pollution prevention through development of immobilization of lipases for very efficient biodiesel production, Olive and Oil Health (**Nova Book Series**). 2011.

SZCZESNA-ANTCZAK, M. et al. Enzymatic biodiesel synthesis - Key factors affecting efficiency of the process. **Renewable Energy**, v. 34, p. 1185-1194, 2009.

SÁNCHEZ MIRÓN, A. et al. Comparative evaluation of compact photobioreactors for large-scale monoculture of microalgae. **Journal of Biotechnology**, v. 70, p. 249-270, 1999.

TALBERT, J. N.; GODDARD, J. M. Enzymes on material surfaces. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 93, p. 8-19, 2012.

THAUER, R. K. Nickel to the Fore. **Science,** v. 293, p. 1264-1265, 2001.

THOMAS, A. et al. Role of the lid hydrophobicity pattern in pancreatic lipase activity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, p. 40074-40083, 2005.

TOLMASQUIM, M. T. Perspectivas e planejamento do setor energético no Brasil. **Estudos Avançados**, v. 26, p. 247-260, 2012.

TOSHEVA, L.; VALTCHEV, V. P. Nanozeolites: Synthesis, crystallization mechanism, and applications. **Chemistry of Materials**, v. 17, p. 2494-2513, 2005.

TREACY, M. M. J.; HIGGINS, J. B.; BALLMOOS, R. V. **Collection of Particle Size is about 300 nm for the Sample Judged to Simulated XRD Powder Patterns for Zeolites**, 3rd ed., Elsevier, New York, 1996.

TREVISAN, H. C. **Lipases. In: SAID, S; PIETRO, R. C. L. C. Enzimas com agentes biotecnológicos. Ed. Legis Summa**, 2004, Cap. 4, 35-85.

TRIMBUR, D. E. et al. **Heterotrophic microalgae expressing invertase**. US8497116, 2013.

UMEGAKI, T. et al. Hollow Ni–SiO_2 nanosphere-catalyzed hydrolytic dehydrogenation of ammonia borane for chemical hydrogen storage. **Journal of Power Sources**, v. 191, p. 209-216, 2009.

VALTCHEV, et al. Rapid synthesis of silicalite-1 nanocrystals by conventional heating. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 68, p. 91-95, 2004.

VALTCHEV, V. P.; TOSHEVA, L.; BOZHILOV, K. N. Synthesis of zeolite nanocrystals at room temperature. **Langmuir**, v. 21, p. 10724-10729, 2005.

VAN GRIEKEN, R. et al. Anomalous crystallization mechanism in the synthesis of nanocrystalline ZSM-5. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 39, p. 135-147, 2000.

VERDUGO, C. et al. Production of a new second generation biodiesel with a low cost lipase derived from *Thermomyces lanuginosus*: Optimization by response surface methodology. **Catalysis Today**, v. 167, p. 107-112, 2011.

VIEIRA, A. P. D. A.; DA SILVA, M. A. P.; LANGONE, M. A. P. Biodiesel production via esterification reactions catalyzed by lipase. **Latin American Applied Research**, v. 36, p. 283-288, 2006.

VYAS, A. P.; VERMA, J. L.; SUBRAHMANYAM, N. A review on FAME production processes. **Fuel**, v. 89, p. 1-9, 2010.

WANG, H. et al. The effect of 3-aminopropyltrimethoxysilane on the formation of $NiFe_2O_4/SiO_2$ nanocomposites. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 320, p. 1916-1920, 2008.

WEIHE, M. et al. Influence of the nature of residual alkali cations on the catalytic activity of zeolites X, Y, and EMT in their Brønsted acid forms. **Journal of Catalysis**, v. 198, p. 256-265, 2001.

WEITKAMP, J. Zeolites and catalysis. **Solid State Ionics**, v. 131, p. 175-188, 2000.

WILLIAMS, D. B.; CARTER, C. B. **The transmission electron microscope**. Springer, 1996.

WILSON, S. T. et al. Aluminophosphate molecular sieves: a new class of microporous crystalline inorganic solids. **Journal of the American Chemical Society**, v. 104, p. 1146-1147,1982.

WINKLER, F. K.; D'ARCY, A.; HUNZIKER, W. Structure of human pancreatic lipase. **Nature**, v. 343, p. 771-774, 1990.

WINKLER, U. K.; STUCKMANN, M. Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. **Journal of Bacteriology**, v. 138, p. 663-670, 1979.

WU, J. et al. Protein adsorption onto nanozeolite: Effect of micropore openings. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 406, p. 130-138, 2013.

WU, Z. et al. Lipase immobilized on novel ceramic supporter with Ni activation for efficient cinnamyl acetate synthesis. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 110, p. 32-38, 2014.

XU, H. et al. Structural diversity of lamellar zeolite Nu-6(1)-postsynthesis of delaminated analogues. **Dalton Transactions**, v. 43, p. 10492-10500, 2014.

XU, H.; MIAO, X.; WU, Q. High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. **Journal of Biotechnology**, v. 126, p. 499-507, 2006.

XU, Y. et al. A novel enzymatic route for biodiesel production from renewable oils in a solvent-free medium. **Biotechnology letters,** v. 25, p. 1239-1241, 2003.

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

YANG, K. S.; SOHN, J.-H.; KIM, H. K. Catalytic properties of a lipase from *Photobacterium lipolyticum* for biodiesel production containing a high methanol concentration. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 107, p. 599-604, 2009.

YOSHIDA, K. et al. Atomic sites and stability of Cs^{+} captured within zeolitic nanocavities. **Scientific reports**, v. 3, 2013.

YU, T. et al. Controlled nanozeolite-assembled electrode: Remarkable enzyme-immobilization ability and high sensitivity as biosensor. **Chemistry-a European Journal**, v. 12, p. 1137-1143, 2006.

YÜCEL, S.; TERZIOĞLU, P.; ÖZÇIMEN, D. Lipase applications in biodiesel production. **Carbon**, v. 79, p. 86-94, 2013.

YÜCEL, Y. et al. Lipase immobilization and production of fatty acid methyl esters from canola oil using immobilized lipase. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, p. 1496-1501, 2011.

ZANIN, MORAES, F. F. Enzimas imobilizadas. In: SAID, S; PIETRO, R. C. L. C. Enzimas como agentes biotecnológicos. **Ed. Legis Summa**, Cap. 4, 35-85, 2004.

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

ZHAN, B. Z. et al. A novel, organic-additive-free synthesis of nanometer-sized NaX crystals. **Chemical Communications**, p. 1176-1177, 2001.

ZHANG, P.; TAN, W. H. Atomic force microscopy for the characterization of immobilized enzyme molecules on biosensor surfaces. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, v. 369, p. 302-307, 2001.

ZHANG, Y. et al. Enrichment of low-abundance peptides and proteins on zeolite nanocrystals for direct MALDI-TOF MS analysis. **Angewandte Chemie**, v. 117, p. 621-623, 2005.

ZHENG, S. et al. Acid-catalyzed production of biodiesel from waste frying oil. **Biomass & Bioenergy**, v. 30, p. 267-272, 2006.

ZHOU, X. et al. Nanozeolite-assembled interface towards sensitive biosensing. **Electrochemistry Communications**, v. 9, p. 1525-1529, 2007.

ZHUANG, J. et al. NMR Study on the Acidity of TS-1 Zeolite. **Catalysis Letters**, v. 83, p. 87-91, 2002.

Autorizo a reprodução xerográfica para fins de pesquisa.

São José do Rio Preto, 12 / 05 / 2015

Adriano de Vasconcellos
Assinatura