



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

Adriano de Vasconcellos

Sínteses e caracterização de novos catalisadores zeolíticos e sua utilização como suportes inorgânicos para imobilização de lipase produzida por *Rhizomucor miehei* e seu estudo catalítico na reação de transesterificação do óleo de soja para a produção de biodiesel

São José do Rio Preto – SP

2010

Adriano de Vasconcellos

Sínteses e caracterização de novos catalisadores zeolíticos e sua utilização como suportes inorgânicos para imobilização de lipase produzida por *Rhizomucor miehei* e seu estudo catalítico na reação de transesterificação do óleo de soja para a produção de biodiesel

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

Orientador: Prof. Dr. José Geraldo Nery

São José do Rio Preto – SP

2010

Vasconcellos, Adriano de.

Sínteses e caracterização de novos catalisadores zeolíticos e sua utilização como suportes inorgânicos para imobilização de lipase produzida por *Rhizomucor miehei* e seu estudo catalítico na reação de transesterificação do óleo de soja para a produção de biodiesel/ Adriano de Vasconcellos. - São José do Rio Preto: [s.n.], 2010.

126 f.: il.; 30 cm.

Orientador: José Geraldo Nery

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Enzimas. 2. Catálise heterogênea. 3. Biodiesel. I. Nery, José Geraldo. II. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 662.756

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
Campus de São José do Rio Preto – UNESP

ADRIANO DE VASCONCELLOS

Sínteses e caracterização de novos catalisadores zeolíticos e sua utilização como suportes inorgânicos para imobilização de lipase produzida por *Rhizomucor miehei* e seu estudo catalítico na reação de transesterificação do óleo de soja para a produção de biodiesel

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

BANCA EXAMINADORA

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

Prof^a. Dr^a. Eleni Gomes
UNESP – São José do Rio Preto

Prof. Dr. José Manoel Marconcini
EMBRAPA – São Carlos

São José do Rio Preto
08/ novembro / 2010.

Dedico este trabalho

Aos meus pais, Alvaro e Luzinete, e à minha namorada Jhanaina, pelo estímulo constante e pela ajuda nos momentos mais difíceis.

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, pela oportunidade de desenvolver este trabalho, pela dedicação, pela amizade e por contribuir diretamente para minha formação.

Ao meu amigo, aluno de iniciação científica, Gil César Pereira Franco pela incansável ajuda prestada para a realização desse trabalho.

À Ana Lúcia Ferrarezi, aluna de doutorado, pela ajuda nas análises de atividade enzimática e uso da técnica de eletroforese, a qual foi imprescindível no desenvolvimento desse trabalho.

À Prof^a. Dr^a. Yvonne Primerano Mascarenhas pelas análises de difração de raios-X.

À Maria Helena Racy, pela ajuda nas análises de Microscopia Eletrônica de Varredura.

À Melisa M. Marengo do grupo Bertin – Bracol Holding Ltda – Divisão de Biodiesel, pelas análises de cromatografia gasosa.

Ao Prof. Dr. Gil Valdo José da Silva pelas análises de RMN ¹³C.

Ao Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes pelas análises de espectrometria de massa.

Aos técnicos que me auxiliaram em análises laboratoriais de diversas técnicas por sua atenção e gentileza.

Aos membros da banca de qualificação, Prof^a Dr^a. Eleni Gomes e Prof. Dr. José Manoel Marconcini, pelas valiosas contribuições na versão final deste trabalho.

À FAPESP, através do Programa de Bolsas, pelo apoio financeiro.

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 namorada, Jhanaina Ruedo de Almeida, pelo carinho, dedicação, compreensão e incentivo no estudo.

Aos meus queridos e amados sobrinhos Lucas, Felipe, Kaylaine, Aline e Dennis. Quando estou com eles me sinto repleto de alegria, energia e pureza.

Aos meus colegas de laboratório Gil, Alex, Danilo, Aryane, Glaucia, Vinícius, Roberto, Drielly, Isabella, Elisa e Lívia pelo auxílio, pelos risos, companheirismo e amizade durante todo esse tempo que estamos trabalhando juntos; agradeço também aos outros colegas que seguiram novos caminhos, mas amizade permanece e ao meu grande amigo Fábio Bertonha, pela ajuda prestada.

Finalmente, a toda minha família, pelos momentos de felicidade.

“É melhor tentar e falhar, que preocupar-se e ver a vida passar.
É melhor tentar, ainda que em vão que sentar-se, fazendo nada até o final.
Eu prefiro na chuva caminhar, que em dias frios em casa me esconder.
Prefiro ser feliz embora louco, que em conformidade viver...”

Martin Luther King

RESUMO

Os principais objetivos do presente trabalho de pesquisa são a síntese de novos catalisadores zeolíticos, a avaliação de seus usos como possíveis matrizes para imobilização enzimática, e o uso desse complexo zeólita/enzima como catalisador para produção de biodiesel. Inicialmente foram sintetizadas duas classes de zeólitas: faujasita (FAU) e gismondina (GIS), em suas formas sódicas, e estas zeólitas foram convertidas para as formas Cu^{2+} , Ni^{2+} e Zn^{2+} por troca iônica. Na sequência foi avaliado o potencial desses materiais zeolíticos para imobilização e atividade lipolítica da enzima (Lipase de *Rhizomucor miehei*) na reação de hidrólise do *p*-nitrofenil palmitato (*p*NPP) a *p*-nitrofenol (*p*NP). Os estudos de imobilização foram feitos variando os parâmetros térmicos do pré-tratamento do suporte zeolítico e o meio catiônico dominante. Os resultados obtidos mostraram que dos 16 suportes avaliados para imobilização enzimática, todos se mostraram capazes de imobilizar a enzima em questão e produzir atividade catalítica, no entanto, o melhor compromisso entre imobilização e atividade enzimática foi obtido pelo complexo LIPASE/GIS/ Ni^{2+} pré-tratada a 200°C. Este complexo que imobilizou $11,2 \pm 0,6\%$ da quantidade de enzima da solução e obteve uma atividade de 13,278 U/mg-suporte. Para as reações de transesterificação foram usados como catalisadores as zeólitas puras (GIS/ Ni^{2+} e GIS/ Zn^{2+}), enzimas livres (Lipases de *Rhizomucor miehei*) e enzimas imobilizadas sobre as zeólitas (LIPASE/GIS/ Ni^{2+} e LIPASE/GIS/ Zn^{2+}) para a produção de biodiesel a partir do óleo vegetal (óleo de soja). Os resultados obtidos indicaram que os dois complexos produziram biodiesel, no entanto, o teor de ésteres metílicos de 56,2% produzidos pelo suporte LIPASE/GIS/ Ni^{2+} mostrou que houve uma sinergia ao passo que para mesma quantidade de enzima na sua forma livre o teor obtido foi apenas 39,3%. Finalmente novos materiais zeolíticos foram sintetizados com o auxílio de direcionadores orgânicos (structure directing agents, SDAs) derivados de (S)-Esparteína com o objetivo de sintetizar zeólitas com poros maiores contendo vanádio em sua estrutura cristalográfica. Estas estruturas são isomorfas à zeólita ETS-10, a qual tem potencial de realizar a reação de transesterificação para a produção de biodiesel.

Palavras chave: Biodiesel, Lipase, Imobilização, Zeólita, (S)-Esparteína e Vanádiosilicatos

ABSTRACT

*The main goals of this research work are the syntheses of new zeolitic catalysts and their use as possible solid matrices for enzyme immobilization, and the study this complex zeolite/enzyme as a catalyst for biodiesel production. Initially, two different zeolites were synthesized: faujasite (FAU) and gismondine (GIS). The two zeolites were first prepared in their sodic forms and thereafter they were submitted to an ion exchange process in order to the replace the extra-framework Na^+ by Cu^{2+} , Ni^{2+} and Zn^{2+} . The potential of these zeolitic materials for immobilization and lipolytic activity of the enzyme (Lipase from *Rhizomucor miehei*) was evaluated through the hydrolysis reaction from *p*-nitrophenyl palmitate (pNPP) to *p*-nitrophenol (pNP). Several immobilization studies were performed and two main parameters were singled out for this study: the thermal parameters or thermal stability of the zeolitic support and the main dominant cationic medium. The results showed that all of the 16 prepared zeolitic supports were not only able to immobilize the enzyme, but also they were able to show significant catalytic activity. However, the best compromise between immobilization and enzymatic activity was obtained with the complex LIPASE/GIS/ Ni^{2+} pre-treated at 200 °C, since it was able to immobilize $11.2 \pm 0.6\%$ of the amount of enzymes in solution and an activity of 13.278 U/mg-support. The transesterification reactions for the production of biodiesel from vegetable oils (soybean oil) were performed with the following catalysts: zeolite pure (GIS/ Zn^{2+} and GIS/ Ni^{2+}), free enzymes (Lipases from *Rhizomucor miehei*) and immobilized enzymes on zeolites (LIPASE/GIS/ Zn^{2+} and LIPASE/GIS/ Ni^{2+}). The results indicated that two zeolite/enzyme complexes were able to produce biodiesel, but the content of methyl esters of 56.2% produced by support LIPASE/GIS/ Ni^{2+} is a clear indication of the occurrence of synergy for this system, since the same amount of enzyme in its free form is able to produce a yield of 39.3% of methyl esters. Finally new vanadosilicates iso-structural to the titanasilicate ETS-10 were synthesized using organic directs (structure directing agents, SDAs) derived from (S)-Sparteine in the sol-gel chemistry. The catalytic potential of these new vanadosilicates molecular sieves for the production of biodiesel through the transesterification reaction will be evaluated in the future.*

Keywords: Biodiesel, Lipase, Immobilization, zeolite, (S)-Sparteine and Vanadium Silicate.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Evolução do marco regulatório do biodiesel na matriz energética brasileira	27
Figura 2 Potencialidade das regiões brasileiras para a produção de plantas oleaginosas e gordura animal	28
Figura 3 Zeólita faujasita e gismondina vista ao longo do eixo [111].....	35
Figura 4 Unidades primárias de construção	36
Figura 5 Unidades secundárias de construção.....	37
Figura 6 Unidades poliédricas de construção.....	37
Figura 7 Formação estrutural das zeólitas A e Y	38
Figura 8 Esquema da formação da zeólita sintética	39
Figura 9 Esquema dos diversos tipos de seletividade de forma exibido por catalisadores com base em zeólitas.....	42
Figura 10 Estrutura tridimensional da ETS-10.....	47
Figura 11 Esquema de reações para lipases atuando sobre ligações ésteres.....	48
Figura 12 Mecanismo de reação das lipases	50
Figura 13 Estrutura das formas aberta e fechada da Lipase de <i>Rhizhomucor miehei</i> (RML).	51
Figura 14 Principais métodos de imobilização de enzimas	54
Figura 15 Quadro geral da produção de biodiesel baseada nas fontes de matérias primas e nos catalisadores usados no processo de transesterificação.....	60
Figura 16 Difratoograma experimental e o padrão simulado da zeólita faujasita	73
Figura 17 Micrografia eletrônica da zeólita faujasita.....	73

Figura 18 Difrátograma experimental e o padrão simulado da zeólita gismondina. .	74
Figura 19 Micrografia eletrônica da zeólita gismondina.....	75
Figura 20 Difrátograma da zeólita faujasita na sua forma sódica em comparação com a trocada com os cátions de cobre, zinco e níquel.....	76
Figura 21 Difrátograma da zeólita gismondina na sua forma sódica em comparação com a trocada com os cátions de cobre, zinco e níquel.....	77
Figura 22 Difrátograma da zeólita gismondina trocada com cobre sem pré-tratamento térmico em comparação com a GIS pré-tratada a 200°C e a 550°C.....	78
Figura 23 Difrátograma da zeólita gismondina trocada com zinco sem pré-tratamento térmico em comparação com a GIS pré-tratada a 200°C e a 550°C.....	79
Figura 24 Difrátograma da zeólita gismondina trocada com níquel sem pré-tratamento térmico em comparação com a GIS pré-tratada a 200°C e a 550°C.....	80
Figura 25 Inibição enzimática pelo cátion de cobre.....	81
Figura 26 Inibição enzimática pelo cátion de zinco	82
Figura 27 Inibição enzimática pelo cátion de níquel	82
Figura 28 Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida, para a localização e a determinação do grau de pureza da enzima.	83
Figura 29 Atividade enzimática em função da temperatura para enzima livre	91
Figura 30 Atividade enzimática em função da temperatura para enzima imobilizada no sólido	92
Figura 31 Estabilidade enzimática na temperatura ótima (44°C) para enzima livre.....	93
Figura 32 Estabilidade enzimática do sólido a temperatura ótima (44°C) para enzima imobilizada	94

Figura 33 Óleo e biodiesel medido qualitativamente por TLC para diferentes catalisadores	95
Figura 34 Porcentagem ésteres metílicos produzidos para diferentes quantidades de enzimas livres utilizadas como catalisadores analisadas por cromatografia gasosa.....	97
Figura 35 Porcentagem ésteres metílicos produzidos para diferentes catalisadores da zeólita gismondina (GIS) trocada com os cátions de Ni^{2+} analisadas por cromatografia gasosa	98
Figura 36 Porcentagem ésteres metílicos produzidos para diferentes catalisadores da Zeólita gismondina (GIS) trocada com os cátions de Zn^{2+} analisadas por cromatografia gasosa.....	98
Figura 37 MS-ES teórico e experimental do composto orgânico (1)-Metil-iso-Esparteínum	100
Figura 38 MS-ES experimental do composto orgânico N,N' Dimetil-Esparteínum...	101
Figura 39 RMN ^{13}C experimental do composto orgânico N,N' Dimetil-Esparteínum.	102
Figura 40 MS-ES experimental do composto orgânico (N)-Etil-Esparteínum	103
Figura 41 RMN ^{13}C experimental do composto orgânico (N)-Etil-Esparteínum	104
Figura 42 Difratoograma da amostra da zeólita comercial ETS-10	106
Figura 43 Difratoograma de raios-X da zeólita obtida usando o template orgânico N(1)-Metil-iso-Esparteínum derivado de (S)- Esparteína (180°C).....	107
Figura 44 Difratoograma de raios-X da zeólita obtida usando o template orgânico N(1) -Metil-iso-Esparteínum derivado de (S)- Esparteína (230°C).....	107

Figura 45 Difratoograma de raios-X da zeólita obtida usando o template orgânico N-N'-Dimetil-Esparteínum derivado de (S)- Esparteína (180°C)	108
Figura 46 Difratoograma de raios-X da zeólita obtida usando o template orgânico N-N'-Dimetil-Esparteínum derivado de (S)- Esparteína (230°C)	109
Figura 47 Difratoograma de raios-X da zeólita obtida usando o template orgânico N-Etil- Esparteínum derivado de (S)- Esparteína (180°C)	110
Figura 48 Difratoograma de raios-X da zeólita obtida usando o template orgânico N-Etil- Esparteínum derivado de (S)- Esparteína (230°C)	110
Figura 49 Micrografia eletrônica das amostras obtidas com cátions orgânicos derivados de (S)-Esparteína.....	111
Figura 50 Avaliação do tempo reacional da produção de biodiesel catalisado pela enzima livre	125
Figura 51 Potencial da catálise enzimática utilizando matéria prima de baixa qualidade.....	126

LISTA DE TABELAS E ESQUEMAS

Tabela 1 Condições de análise para determinação de ésteres metílicos por cromatografia gasosa.....	70
Tabela 2 Dados cristalográficos do ângulo de difração 2 theta ($^{\circ}$) e intensidade relativa de sinal dos padrões de difração calculados para a zeólita faujasita Na-Y..	72
Tabela 3 Dados cristalográficos do ângulo de difração 2 theta ($^{\circ}$) e intensidade relativa de sinal dos padrões de difração calculados para a zeólita gismondina Na-P1	74
Tabela 4 Porcentagem de imobilização e atividade enzimática em função do pré-tratamento da zeólita gismondina.....	87
Tabela 5 Resumo das zeólitas sintetizadas com o auxílio dos direcionadores de estruturas derivados de (S)-Esparteína.....	89
Tabela 6 Porcentagem dos cátions presentes antes e depois do processo de imobilização nos suportes de imobilização enzimática da zeólita gismondina trocada com os cátions de cobre, níquel e zinco quando pré-tratadas à 200°C antes do processo de imobilização.	90
 Esquema 1 Representação da reação de transesterificação de uma molécula de triglicerídeo.....	30
Esquema 2 Esquema geral da produção de biodiesel catalisado por RML.....	56
Esquema 3 Reações envolvidas em cada síntese de SDA preparado a partir de (S)-Esparteína.....	63

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1. Cálculo da quantidade de enzima adsorvida sobre a matriz de imobilização.....	67
Equação 2. Cálculo da atividade lipolítica da enzima livre	68
Equação 3. Cálculo da atividade lipolítica da enzima imobilizada	68
Equação 4. Determinação do teor de ésteres metílicos	71

LISTA DE ABREVIATURAS

ABS	Albumina de Soro Bovino
DRX	Difração de Raios-X
ETS	<i>Engelhard Titanium Silicate</i>
EtSPA	N-Etil-Esparteínum
FAU	Zeólita Faujasita
GIS	Zeólita Gismondina
IZA	<i>International Zeolite Association</i>
Me ₂ SPA	N,N`-Dimetil-Esparteínum
MeSPA	N(1)-Metil-iso-Esparteínum
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MS-ES	<i>Mass Spectrometry- Electrospray</i>
pNP	<i>p</i> -Nitrofenol
pNPP	<i>p</i> -Nitrofenil Palmitato
RML	<i>Rhizomucor miehei Lipase</i>
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SBU	<i>Secondary Bulding Units</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
TLC	<i>Thin Cromatography Layer</i>
U.mg ⁻¹ - suporte	Unidade de atividade enzimática por miligrama de suporte
U.mL ⁻¹	Unidade de atividade enzimática por mililitros

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	22
2.1 Biodiesel	22
2.1.1 Importância e Motivação para o Uso do Biodiesel	22
2.1.2 Aspectos Históricos	24
2.1.2.1 <i>A história do biodiesel no mundo</i>	24
2.1.2.2 <i>A história do biodiesel no Brasil</i>	26
2.1.3 Matérias Primas Utilizadas para Produção de Biodiesel no Brasil	28
2.1.4 Tecnologias Aplicadas para Produção de Biodiesel.....	29
2.1.5 Produção Industrial de Biodiesel	31
2.1.5.1 <i>Catálise homogênea</i>	31
2.1.5.2 <i>Catálise heterogênea</i>	32
2.1.5.3 <i>Catálise enzimática</i>	33
2.2 Catálise Heterogênea de Biodiesel Mediada por Zeólitas	34
2.2.1 Definição de Zeólitas	34
2.2.2 Propriedades Estruturais das Zeólitas.....	35
2.2.3 Síntese das Zeólitas.....	38
2.2.4 Usos de Zeólitas.....	40
2.2.4.1 <i>Trocadores iônicos</i>	40
2.2.4.2 <i>Catálise heterogênea</i>	41
2.2.4.3 <i>Imobilização enzimática</i>	42
2.2.5 Aplicação de Zeólitas na Produção de Biodiesel.....	43
2.2.6 Síntese de Novas Zeólitas com Potencial para Produção de Biodiesel	45
2.2.6.1 <i>Zeólitas a base de titanossilicatos – ETS-10</i>	45
2.3 Produção Enzimática de Biodiesel Mediada por Lipases	47
2.3.1 Lipases	48
2.3.1.1 <i>Aspectos gerais</i>	48
2.3.2 Lipases: Mecanismo de Catálise	49
2.3.3 Ativação Interfacial das Lipases	50
2.3.4 Fontes de Lipases	51
2.3.5 Usos de Lipases	52
2.3.6 Imobilização de Lipases	53

2.3.7 Produção Enzimática de Biodiesel	55
2.3.7.1 <i>Parâmetros físico-químicos que afetam a produção de biodiesel mediado por lipases</i>	57
2.3.7.2 <i>Produção de biodiesel mediada pelo conjugado lipase/zeólita</i>	59
3 JUSTIFICATIVAS	60
4 OBJETIVOS.....	62
4.1 Objetivos Gerais.....	62
4.2 Objetivos Específicos	62
5 MATERIAIS E MÉTODOS	63
5.1 Materiais Utilizados	63
5.2 Sínteses dos SDAs (Agentes Direcionadores de Estrutura).....	63
5.2.1 Procedimento de Síntese do N(1)- Metil-iso-Esparteínum (MeSPA/ SDA 1).....	64
5.2.2 Procedimento de Síntese do N-N'- Dimetil-Esparteínum (Me ₂ SPA/ SDA 2).....	64
5.2.3 Procedimento de Síntese do N-Etil- Esparteínum (EtSPA/SDA 3)	64
5.3 Procedimentos de Sínteses dos Materiais Zeolíticos	65
5.3.1 Síntese da Zeólita Faujasita (FAU).....	65
5.3.2 Síntese da Zeólita Gismondina (GIS).....	65
5.3.3 Síntese dos Vanadiosilicatos.....	66
5.4 Grau de Pureza da Enzima	66
5.5 Imobilização Enzimática em Materiais Zeolíticos	67
5.6 Medida de Atividade Enzimática	67
5.7 Transesterificação para Produção de Biodiesel	68
5.8 Análises do Biodiesel	69
5.8.1 Análises por Cromatografia de Camada Delgada (TLC).....	69
5.8.2 Análises por Cromatografia Gasosa do Teor dos Ésteres Metílicos	69
5.8.2.1 <i>Equipamento e parâmetros de utilizados na análise de ésteres</i>	70
5.8.2.2 <i>Procedimento da análise e cálculo da porcentagem de ésteres metílicos</i>	71
6 RESULTADOS.....	72
6.1 Sínteses das Zeólitas Faujasita (FAU) e Gismondina (GIS).....	72
6.2 Comportamento dos Materiais Zeolíticos após o Pré-Tratamento	75

6.2.1 Troca Iônica da Zeólita Faujasita	75
6.2.2 Troca Iônica da Zeólita Gismondina	76
6.2.3 Tratamento Térmico da Zeólita Gismondina	77
6.3 Inibição da Lipase pelo Cátion Presente na Solução	80
6.4 Grau de Pureza da Enzima.	83
6.5 Imobilização e Atividade Enzimática para Diferentes Suportes Zeolíticos	83
6.6 Curvas de Atividade Enzimática	90
6.7 Estabilidade Enzimática	93
6.8 Produção de Biodiesel.....	95
6.9 Síntese de Novas Zeólitas com Potencial para Produção de Biodiesel e Imobilização Enzimática	99
6.9.1 Síntese dos SDAs Derivados de S-Esparteína	99
6.9.1.1 <i>N(1)- metil-iso-esparteínum (MeSPA/SDA1)</i>	99
6.9.1.2 <i>N-N'- dimetil-esparteínum (Me₂SPA/ SDA 2)</i>	100
6.9.1.3 <i>N-etil-esparteínum (EtSPA/SDA 3)</i>	102
6.9.2 Síntese dos Novos Materiais Zeolíticos Obtidos a Partir dos SDAs Derivados de (S)- Esparteína	104
6.9.2.1 <i>Materiais zeolíticos obtidos a partir dos SDA 1</i>	106
6.9.2.2 <i>Materiais zeolíticos obtidos a partir dos SDA 2</i>	108
6.9.2.3 <i>Materiais zeolíticos obtidos a partir dos SDA 3</i>	109
6.9.3 Morfologia dos Materiais Zeolíticos Obtidos a Partir dos SDAs Derivados de (S)-Esparteína	111
7 CONCLUSÕES	112
8 PERSPECTIVAS FUTURAS.....	114
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	115
ANEXOS	125
ANEXO 1	125
ANEXO 2.....	126

1- 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 atóxico e biodegradável, proporcionando um grande benefício ambiental. Por ser um combustível proveniente de diversas fontes de matérias-primas (óleos vegetais, gorduras animais e óleos de origem microbiana) o biodiesel se destaca juntamente com o etanol como uma importante fonte alternativa de energia no setor de biocombustíveis. Além disso, pode ser utilizado em todos os motores convencionais a diesel com o desempenho e durabilidade do motor semelhante ao diesel de petróleo.

A transesterificação 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.

As reações de transesterificação podem ser catalisadas via catálise homogênea, heterogênea e enzimática. A maior parte da produção de biodiesel é feita por catalisadores homogêneos básicos (hidróxidos de sódio, hidróxido de potássio e metóxido de sódio e de potássio) por serem relativamente mais baratos e apresentarem uma alta reatividade. O uso de catalisadores homogêneos tem inúmeras desvantagens para o processo de produção em termos de separação e recuperação do catalisador. A separação do produto é mais complexa, sendo necessária a purificação (neutralização) do mesmo. A remoção destes catalisadores é tecnicamente mais difícil, pois estão misturados ao meio reacional, trazendo custos adicionais ao produto final. Por outro lado, catalisadores heterogêneos têm grandes vantagens na geração de biodiesel, principalmente pelo fato de serem recuperados ao final do processo, ou seja, menos custosos e ambientalmente menos agressivos (menor geração de resíduos líquidos). O biodiesel pode ser produzido por catalisadores alternativos, tais como as enzimas, em particular as lipases. Suas vantagens estão no fato da transesterificação enzimática ser realizada em condições amenas, ou seja, um menor consumo de energia, e também evita a formação de sabão devido a sua grande especificidade. Todavia, essas enzimas apresentam como principais desvantagens seu alto custo e sua difícil recuperação no meio reacional. A imobilização de enzimas, 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. Com o uso de enzimas imobilizadas, é possível juntar as vantagens da transesterificação enzimática com aquelas da catálise heterogênea.

Devido à importância do processo catalítico e da necessidade de obter processos mais eficientes e com menores danos ambientais, inúmeras pesquisas vêm sendo realizadas com objetivos de aperfeiçoar o processo. Uma boa parte desses estudos lidam ou envolvem melhorias nos processos catalíticos e busca de novas fontes de matérias primas para produção de biodiesel. Estudos buscando substituição de catalisadores convencionais homogêneos por heterogêneos, enzimáticos e enzimas imobilizadas mostram que esta é uma área de grande atividade científica. Assim, o enfoque deste trabalho foi a síntese e a caracterização de duas zeólitas tradicionais: faujasita e gismondina, utilizando-as como matrizes de imobilização para as enzimas lipolíticas com o intuito de, posteriormente, empregar o conjugado enzima/zeólita na reação de transesterificação do óleo de soja a biodiesel.

Em paralelo, novas estruturas zeolíticas foram sintetizadas com o auxílio de direcionadores de estruturas (SDAs) e com a intenção de obter novos catalisadores heterogêneos com potencial para produção de biodiesel e também como potenciais matrizes sólidas para imobilização de enzimas.

2- FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1- Biodiesel

O biodiesel é um combustível renovável, biodegradável e atóxico obtido a partir de matérias-primas biológicas, tais como: óleos vegetais e gorduras de animais (MA; HANNA, 1999).

Este biocombustível tem se mostrado uma promissora fonte de energia alternativa e renovável, pois é considerado por muitos como principal substituinte parcial ou total do diesel de origem fóssil (DE PAOLA et al, 2009; LI; ZONG; WU, 2009).

Juntamente com o etanol, o biodiesel compõe uma importante fonte de energia para o segmento de combustíveis. Ambos são denominados biocombustíveis por serem derivados de biomassa, “matéria orgânica de origem vegetal ou animal que pode ser utilizada para a obtenção de energia” (MA; HANNA, 1999; CHING; RODRIGUES, 2006).

O Art. 6º, inciso XXIV da Lei nº 11.097/2005, que introduz o biodiesel na matriz energética brasileira, define-o como:

Biocombustível derivado de biomassa renovável para uso em motores a combustão interna com ignição por compressão ou, conforme regulamento para geração de outro tipo de energia, que possa substituir parcial ou totalmente combustíveis de origem fóssil (BRASIL, 2005).

De uma maneira sucinta, a Lei nº 11.097/2005 afirma que biodiesel é um biocombustível produzido a partir de lipídeos de ocorrência natural (óleo vegetal ou gordura animal) que visa substituir total ou parcialmente o diesel de petróleo.

2.1.1- Importância e Motivação para o Uso do Biodiesel

Nas últimas décadas, fontes de combustíveis fósseis estão sendo reduzidas devido ao rápido aumento da população e da industrialização em todo o mundo. Essas mudanças têm ocasionado um amplo debate a respeito da preservação ambiental e da conservação das fontes naturais de energia não renováveis, visando o desenvolvimento de fontes alternativas de energia em substituição aos combustíveis de origem fóssil. Desta maneira, grandes esforços estão sendo feitos com o intuito de minimizar a dependência mundial do petróleo (YAGIZ; KAZAN; AKIN, 2007).

Atualmente as fontes alternativas de energias renováveis, por serem mais favoráveis ao meio ambiente, assumem um papel de grande destaque, principalmente pelas seguintes razões: 1) as previsões futuras apontam para a possível finitude das reservas de petróleo; 2) as maiores reservas de petróleo exploradas atualmente estão em áreas geográficas de conflito, o que gera uma insegurança energética no que diz respeito aos constantes aumentos de preço e à irregularidade de fornecimento; 3) as novas jazidas para extração do petróleo estão situadas em áreas geográficas de difícil acesso o que gera uma elevado custo para a sua extração e, 4) as mudanças climáticas causadas pelas emissões de gases precursores do efeito estufa liberados pelas atividades humanas e pelo uso excessivo de combustíveis fósseis, que agravam os problemas ambientais, reorientam o mundo contemporâneo para a busca de novas fontes de energia renováveis que proporcionam uma série de melhorias ambientais, dentre elas a redução das emissões gasosas e que assegurem o desenvolvimento sustentável (LINHARES, 2008; NARASIMHARAO; LEE; WILSON, 2007).

A maior parte da energia consumida no mundo provém do petróleo, combustível de origem fóssil. Essa fonte de energia é limitada, não renovável e de difícil degradabilidade (FERRARI et al, 2005). Além disso, os derivados do petróleo são os principais responsáveis pela geração dos gases do efeito estufa (CO, CO₂, SO_x, NO_x). A atual frota de veículos de transporte de carga no Brasil é movida, principalmente, por motores a diesel. Sua alta eficiência é uma vantagem, no entanto, a grande quantidade de gases danosos ao meio ambiente é um de seus grandes inconvenientes (AMARAL, 2009; KOZERSKI; HESS, 2006; LINHARES, 2008).

As vantagens do biodiesel quando comparado ao petrodiesel são muitas, além de ser fonte de energia renovável e biodegradável. Dentre as vantagens relacionadas ao meio ambiente, podemos citar: apresenta baixas emissões de poluente (SO₂, halogêneos, fuligem e CO), balanço de massa no caso do CO₂ (emissão provocada pela queima do combustível é compensada pela absorção deste gás pelos vegetais), ausência de compostos aromáticos nos gases exauridos e a possibilidade de reciclagem do óleo residual de fritura ou rejeito de gordura animal (amenizando problemas ambientais) (YAGIZ; KAZAN; AKIN, 2007). **Com relação ao desenvolvimento social**, principalmente em países em desenvolvimento, há possibilidade de produção e comercialização de oleaginosas

por pequenos produtores, com fixação do homem no campo, geração de renda e inclusão social pela agricultura familiar (NAVAES et al, 2009). **Relacionado a fonte de matéria-prima** o biodiesel pode ser produzido a partir de várias oleaginosas diversificando a matriz energética para um melhor aproveitamento das potencialidades de cada região (RANGANATHAN; NARASIMHAN; MUTHUKUMAR; 2007). Além do mais, pode ser utilizado em todos motores a diesel convencionais com desempenho e durabilidade do motor semelhante aos combustíveis fósseis.

No entanto, **as principais desvantagens do biodiesel** estão associadas ao alto custo quando comparado com o petrodiesel (LI; ZONG; WU, 2009) e ao processo catalítico, no qual grande parte da produção é feita com catalisadores homogêneos (alcalinos ou ácidos), que requerem matéria-prima de alta qualidade e geram resíduos líquidos (MACARIO et al, 2008).

2.1.2- Aspectos Históricos

2.1.2.1- A história do biodiesel no mundo

A ideia de se usar óleos vegetais como combustível diesel surgiu a mais de 100 anos atrás, e foi proposta por Rudolf Diesel, o próprio inventor do motor movido a diesel, quando ele apresentou na feira mundial, realizada em Paris em 1900, um motor movido a óleo de amendoim como fonte de combustível. A utilização de óleo vegetal no motor diesel foi estimulada pelo governo francês, que tinha a intenção de obter a auto-suficiência energética, diminuindo assim a dependência de suas colônias africanas e também minimizar os custos relativos às importações de carvão e de combustíveis líquidos (BOZBAS, 2008; KNOTHE, 2001).

Durante os 30 anos seguintes houve uma queda no incentivo para uso do óleo vegetal *in natura* como combustível, causada pelo baixo custo do óleo diesel de origem fóssil favorecido pelas descobertas de grandes jazidas no oriente médio, por mudanças políticas no governo francês (incentivador inicial) e por razões técnicas aliadas as suas propriedades físico-químicas (alta viscosidade e baixa volatilidade) (LINHARES, 2008).

Todavia, o primeiro relato do que hoje é conhecido como biodiesel foi em 1937 com a patente depositada pelo cientista G. Chavanne da Universidade de Bruxelas (Bélgica). Esta patente descreveu a alcoólise, atualmente conhecida como transesterificação, obtida pela catálise básica do óleo de palma para separar os ácidos graxos do glicerol pela substituição do glicerol por um álcool de cadeia curta

metanol e etanol. Os ésteres formados puderam ser utilizados como combustível (KNOTHE, 2001).

As primeiras experiências com o uso comercial do biodiesel na Europa surgiram no período da Segunda Guerra Mundial (1939-1945). O início da guerra gerou uma insegurança energética no que diz respeito aos constantes aumentos de preços e a irregularidade de fornecimento dos derivados de petróleo, e os óleos de origem vegetais brutos passaram a ser utilizados nos motores em situações emergenciais. Na China, por exemplo, combustíveis líquidos semelhantes ao diesel de petróleo foram produzidos a partir do craqueamento de óleo de tungue. Já na mesma época, propôs-se o uso de ésteres metílicos e etílicos obtidos a partir da transesterificação de óleos e gorduras, baseado nas ideias do cientista belga G. Chavanne (POUSA; SANTOS; SUAREZ, 2007). No entanto, ao final da guerra, em 1945, com o encerramento do conflito mundial, os preços foram normalizados, o que proporcionou uma desaceleração no incentivo ao uso de biocombustíveis. Entretanto, alguns países como os EUA, Alemanha e Índia mantiveram suas pesquisas com óleos vegetais e atualmente estão entre as nações que lideram a produção mundial de biodiesel (CHING; RODRIGUES, 2006).

As crises do petróleo das décadas de 70 e 80 do século XX, ocasionadas pelo agravamento dos conflitos no Oriente Médio, provocaram novamente insegurança no abastecimento mundial e súbita elevação no preço do barril do petróleo. Além disso, as alterações climáticas decorrentes das emissões de gases causadores do efeito estufa e seus impactos ambientais foram fatores que serviram como incentivos para que os governos buscassem novas alternativas renováveis. A partir desse momento houve a retomada de ideias a respeito das novas fontes energéticas (SUAREZ, 2007).

A década de 1990 ficou marcada pelos importantes avanços no que diz respeito ao notável aumento na oferta de derivados alternativos de biomassa aos combustíveis de origem fóssil e não-renovável. Atualmente, o potencial do biodiesel como fonte energética de combustível é um dos assuntos mais discutidos no âmbito acadêmico e industrial. A União Européia, os EUA e vários outros países, inclusive o Brasil, já produzem o biodiesel em escala mundial. Esses países estão realizando diversos estudos e esforços significativos para implementar o desenvolvimento de novas tecnologias para a geração de biocombustíveis de 2ª geração, com novas

fontes de matérias-primas e diferentes rotas catalíticas para a substituição do óleo diesel derivado do petróleo (DABDOUB; BRONZEL; RAMPIN, 2009).

2.1.2.2- A história do biodiesel no Brasil

No Brasil, a ideia de se estudar combustíveis alternativos surgiu na década de 1970 em função do choque do petróleo. A elevada dependência das importações de petróleo no período motivou o país a iniciar o Programa Nacional de Álcool – PROÁLCOOL. Esse programa tinha como objetivo a substituição de parte da gasolina utilizada como combustível na frota nacional de veículos comuns por álcool hidratado e, ainda, a utilização do álcool como aditivo à gasolina (álcool anidro). Além da diminuição na dependência de fontes de energia não renováveis, haveria um ganho ambiental devido ao fato de que menos poluentes seriam liberados durante o processo de combustão (RATHMANN et al, 2005).

No entanto, no mesmo período surgiu, timidamente, a ideia de incorporar o biodiesel na matriz energética brasileira que começou a ser delineada com o Plano de Produção de Óleos Vegetais para Fins Energéticos (PRÓ-ÓLEO). Na época, a meta estipulava adicionar 30% de óleos vegetais ou derivados ao óleo diesel e, após um longo período de tempo, a meta era a total substituição do mesmo. Infelizmente algumas experiências acabaram não evoluindo na ocasião, por várias razões, incluindo-se a diminuição dos preços do petróleo e o desinteresse da PETROBRAS, juntamente com o alto custo da produção e o esmagamento das oleaginosas. Esses fatores foram determinantes para a desaceleração do programa, que foi abandonado em 1986 (CHING; RODRIGUES, 2006; PARENTE, 2003; POUSA; SANTOS; SUAREZ, 2007).

No final do século XX, acompanhando a tendência mundial, o Brasil direcionou sua atenção para projetos destinados ao desenvolvimento do biodiesel. Em 2002, o programa PROBIODIESEL propôs substituir até 2005 todo o diesel consumido no país por B5, uma mistura de 5% de biodiesel com 95% de diesel, e após 15 anos substituí-lo pelo B20, uma mistura composta de 20% de biodiesel com 80% de diesel (CHING; RODRIGUES, 2006).

O governo federal brasileiro, ao notar a crescente demanda mundial por combustíveis de fontes renováveis e o potencial brasileiro de solo e de clima que atendem grande parte dessas necessidades criou no final do ano de 2003 a Comissão Executiva Interministerial (CEI) e o Grupo Gestor (GG), ambos

encarregados da implantação das ações para produção e uso do biodiesel no país. Os estudos e relatórios da CEI e do GG subsidiaram a formulação do Programa Nacional de Produção e uso do Biodiesel (PNPB), lançado em dezembro de 2004. Este programa visou organizar a cadeia produtiva, definir as linhas de financiamento, estruturar a base tecnológica e editar o marco regulatório do novo combustível (CHING; RODRIGUES, 2006; SUAREZ, 2007).

As principais diretrizes do PNPB são:

1. Implantar um programa sustentável, promovendo inclusão social;
2. Garantir preços competitivos, qualidade e suprimento, e
3. Produzir o biodiesel a partir de diferentes fontes oleaginosas e em regiões diversas.

O biodiesel se insere na matriz energética brasileira como um aditivo, segundo o marco regulatório (Lei nº 11.097/2005, publicada no Diário Oficial da União em 13/01/2005), – Figura 1 – a qual previa o uso opcional de B2 (mistura de 2 % de biodiesel com 98% de diesel) até o início de 2008, e a partir dessa data, passaria a ser obrigatório seu uso até 2013, podendo atingir valores de até 5% de biodiesel na mistura. Após 2013, seria obrigatório o uso de B5, podendo chegar à utilização do biodiesel puro (B100) mediante autorização da Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (BRASIL, 2005). Desde 1º de janeiro de 2010, o óleo diesel comercializado em todo o Brasil contém 5% de biodiesel. Esta regra foi estabelecida pela Resolução nº 6/2009 do Conselho Nacional de Política Energética (CNPE).

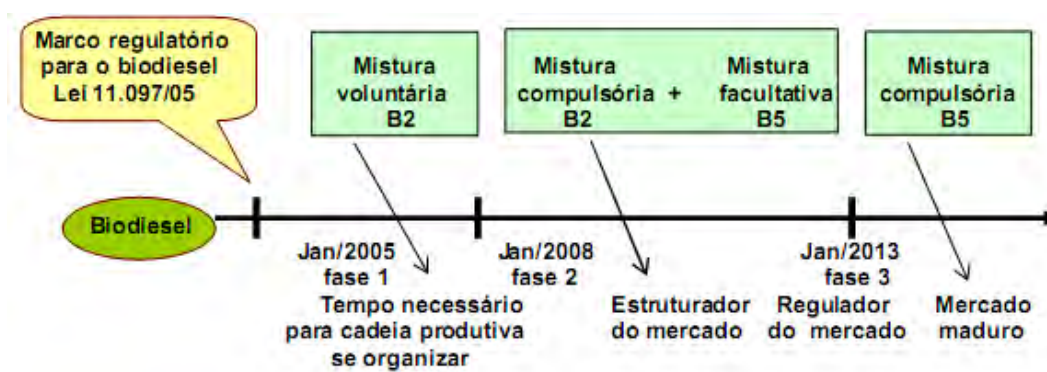


Figura 1. Evolução do marco regulatório do biodiesel na matriz energética brasileira. Fonte: ABIOVE (2005) *apud* Rathmann et al, 2007.

2.1.3 – Matérias Primas Utilizadas para Produção de Biodiesel no Brasil

As matérias-primas para a produção de biodiesel podem ser originadas de óleos vegetais, gorduras de animais e de origem microbiana (algas). Enquadram-se na categoria de matérias primas provenientes de oleaginosas: algodão, amendoim, dendê, girassol, mamona, pinhão manso e soja. As matérias-primas de origem animal comumente transformadas em biodiesel são: o sebo bovino, a banha suína, a gordura de aves, entre outras matérias graxas de origem animal. São também consideradas matérias-primas para biocombustíveis os óleos de descarte, gorduras animais e óleos já utilizados em frituras de alimentos, resultantes de processamentos domésticos, comerciais e industriais (PARENTE, 2003).

No caso das oleaginosas, a sua produção depende de características específicas de cada região na qual é cultivada e está diretamente relacionada às condições climáticas e do solo. Com o intuito de ilustrar a distribuição de cada matéria-prima no território brasileiro, o mapa abaixo (Figura 2) permite a visualização das regiões brasileiras com suas respectivas fontes de matérias-primas (óleos vegetais e gorduras animais) para produção de biodiesel (CHING; RODRIGUES, 2006; LIMA, 2005).

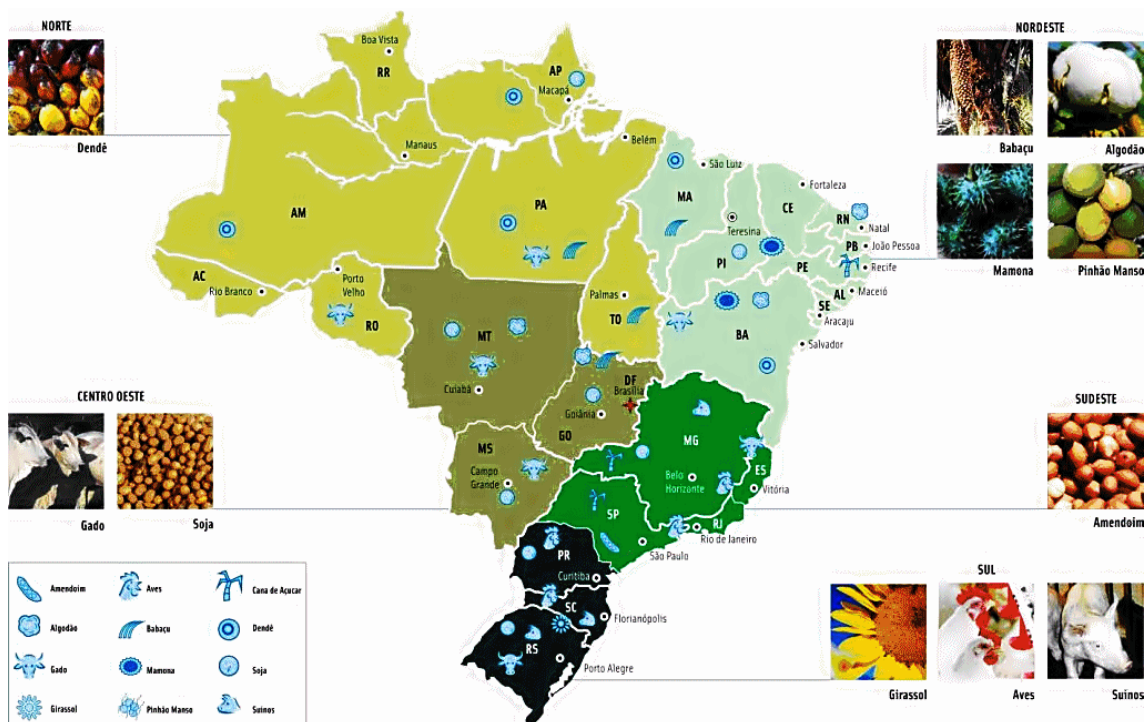


Figura 2. Potencialidade das regiões brasileiras para a produção de plantas oleaginosas e gordura animal. Fonte: BIOLATINA, 2009.

Embora o Brasil apresente excelentes perspectivas de cultivos para oleaginosas em diversas regiões do país, torna-se evidente a necessidade de estudos sobre o zoneamento agrícola de diversas oleaginosas fornecedoras de óleo vegetal para produção de biodiesel, entre elas o pinhão manso, a macaúba, o babaçu, o dendê, dentre muitas outras oleaginosas (CHING; RODRIGUES, 2006).

2.1.4- Tecnologias Aplicadas para Produção de Biodiesel

Segundo Ma & Hanna (1999), existem três técnicas de processamento que podem ser aplicadas para a obtenção de biodiesel a partir de óleos vegetais (puros ou residuais) e de sebo animal: pirólise, microemulsificação e transesterificação.

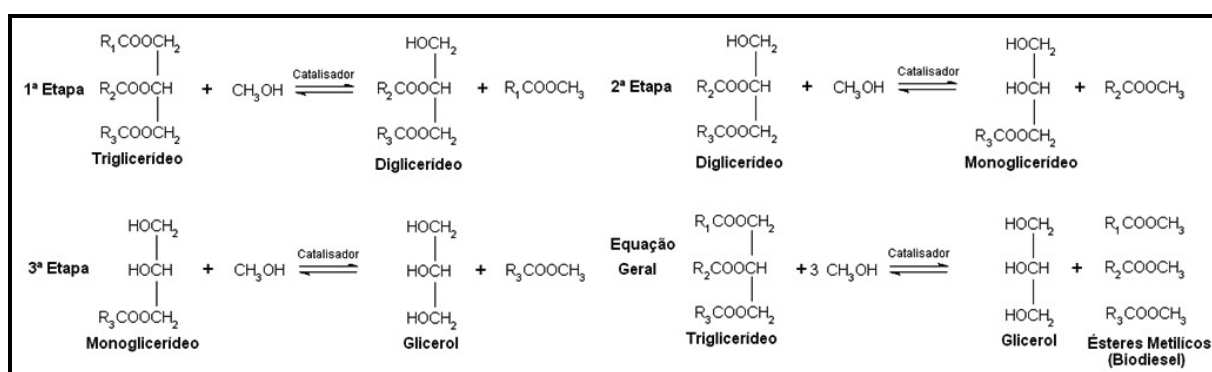
A pirólise refere-se à mudança química causada por aplicação de calor para a obtenção de um composto simples a partir de um composto complexo. Esse processo também é conhecido como craqueamento. Óleos vegetais podem ser craqueados para reduzir viscosidade (MA; HANNA, 1999). A pirólise e o craqueamento de óleos e gorduras resultam na produção de alcanos, alcenos, alcadienos, cicloalcanos, alquilbenzenos, ácidos carboxílicos e pequenas quantidades de produtos aromáticos (DEMIRBAS, 2009). Óleos vegetais e gorduras animais são facilmente craqueados com o uso de um catalisador adequado (RANGANATHAN, 2007), conseguindo-se assim a redução de sua viscosidade e o melhoramento do seu número de cetano. No entanto, as desvantagens desse processo incluem o alto custo do equipamento de destilação para a separação das várias frações. Além disso, a composição química do produto obtido foi similar ao diesel de petróleo contendo enxofre, fazendo com que esse combustível não seja ambientalmente correto (DEMIRBAS, 2009; MA; HANNA, 1999).

A microemulsão é outra técnica que tem sido reportada na literatura para produzir biodiesel e os componentes de uma microemulsão de biodiesel incluem combustível diesel, óleo vegetal, álcool, surfactante e um agente para melhorar o índice de cetano em adequada proporção. Alcoóis de cadeia curta, tais como metanol, etanol e propanol, são usados como aditivos para diminuir sua viscosidade; alcoóis maiores são usados como surfactantes; e nitratos alquílicos são utilizados como agentes para melhorar o índice de cetano (RANGANATHAN, 2007). A redução da viscosidade aumenta o número de cetano e melhora as características spray, o que estimula o uso de microemulsões. Contudo, o seu uso prolongado pode causar

problemas como: entupimento no injetor, formação de depósito de carbono e combustão incompleta (MA; HANNA, 1999).

A tecnologia predominante na produção de biodiesel é a transesterificação metílica de óleos vegetais, dos quais óleos vegetais ou sebo animal são misturados com metanol e, auxiliado por um catalisador, produz biodiesel. O uso de metanol, na maioria dos países, deve-se ao elevado custo do etanol. No Brasil, a rota metílica também é utilizada para produção de biodiesel, porém devido à abundância de etanol proveniente da cana-de-açúcar já existem indústrias que adotaram a rota etílica para esse empreendimento (CHING; RODRIGUES, 2006).

Transesterificação é o termo geral usado para descrever uma importante classe de reações orgânicas na qual um éster é transformado em outro através de troca de grupos alcóxidos (SCHUCHARDT; SERCHELI; VARGAS, 1998). Quimicamente, na transesterificação de óleos vegetais as moléculas de triglicerídeos reagem com o álcool de cadeia curta, metanol ou etanol, na presença de um catalisador. Os produtos dessa reação são uma mistura de ésteres alquílicos (biodiesel) e glicerol, podendo ter como produtos intermediários diglicerídeos e monoglicerídeos. O componente de alta viscosidade, o glicerol, é removido e, portanto, o produto final tem baixa viscosidade semelhante ao combustível fóssil (DE SOUSA, 2010). Sendo assim, a ação química de transesterificação de triglicerídeos é uma série de reações na qual ocorre a quebra de uma molécula de triglicerídeo realizada em três etapas como mostra o **esquema 1**.



Esquema 1 - Representação da reação de transesterificação de uma molécula de triglicerídeo e três moléculas de álcool (metanol) na presença de catalisador para formar ésteres de ácidos graxos e glicerol, com a formação dos possíveis intermediários diglicerídeos e monoglicerídeos.

A reação global apresentada no esquema 1 mostra que três moléculas de CH_3OH reagem com cada molécula de triglicerídeo na presença de um catalisador

para produzir uma molécula glicerol e três moléculas de ésteres metílicos. Todavia a reação ocorre em três etapas com a formação dos possíveis intermediários diglicerídeos, monoglicerídeos e finalmente glicerol. Um mol de éster é liberado em cada etapa e embora a estequiometria da reação seja 1:3 na relação triglicerídeos e álcool, na prática, é necessário um excesso de álcool devido ao caráter reversível da reação (DEMIRBAS, 2009; MA; HANNA, 1999).

O biodiesel apresenta como principais características altos pontos de fulgor e combustão, maior lubricidade e elevada viscosidade quando comparado ao diesel de petróleo. Contudo, sua viscosidade é o único parâmetro que pode afetar o desempenho do motor a diesel. Os diglicerídeos e os triglicerídeos são os principais responsáveis pelo aumento na viscosidade de óleos vegetais puros e o controle da viscosidade do biodiesel é importante para garantir um funcionamento adequado dos sistemas de injeção e bombas de combustível (CABALLERO et al, 2009; ROYON et al, 2007).

2.1.5- Produção Industrial do Biodiesel

A produção de biodiesel pelo processo de transesterificação pode ser realizada industrialmente por três vias: catálise homogênea, catálise heterogênea e catálise biológica.

2.1.5.1 - Catálise homogênea

Hoje em dia o processo mais amplamente usado para fazer biodiesel é a transesterificação alcalina de triacilgliceróis com metanol utilizando catalisadores básicos homogêneos. Os catalisadores homogêneos básicos mais comuns são o hidróxido de sódio (**NaOH**), o hidróxido de potássio (**KOH**), os carbonatos e os metilatos de sódio (**Na₂CO₃** e **CH₃NaO**, **respectivamente**); ao passo que os catalisadores homogêneos ácidos mais comumente usados são os ácidos clorídricos (**HCl**) e ácidos sulfônicos.

Os catalisadores homogêneos apresentam como principais vantagens o baixo custo, o tempo reacional e o rendimento. Segundo De Sousa et al (2010), a produção de biodiesel pela catálise homogênea é realizada em temperatura baixa (60°C) e tempo reacional de 90 minutos, tendo um rendimento de aproximadamente 98%. Todavia, tanto os catalisadores homogêneos ácidos, quanto básicos apresentam uma série de desvantagens e problemas técnicos para o processo de

produção de biodiesel por transesterificação, e a superação dessas desvantagens acaba acarretando custos econômicos e ambientais (GRANADOS et al, 2007; HOYDONCKX et al, 2004; MA; HANNA, 1999). Entre as principais desvantagens ocasionadas pelo uso de catalisadores homogêneos podemos citar:

- a) Difícil separação do catalisador e do produto final;
- b) Ocorrência de saponificação e de emulsão devido à presença de água e ácidos graxos livres presentes tanto nos óleos vegetais como na gordura animal (sebo);
- c) Geração de grande quantidade de resíduo, principalmente água, para limpeza e separação do biodiesel do glicerol;
- d) Catalisadores básicos em geral são altamente sensíveis à presença de água e ácidos graxos livres presentes tanto no sebo animal, quanto nos óleos vegetais;
- e) Catalisadores ácidos são muito mais lentos na reação de transesterificação para produção de biodiesel, e geralmente requerem um grande excesso de álcool para a reação ocorrer na direção da formação de biodiesel.

2.1.5.2- Catálise heterogênea

Na literatura aparecem diversos catalisadores heterogêneos, dentre eles estão as zeólitas, as enzimas (imobilizadas), os óxidos, as argilas, entre outros. Estes materiais, que tem como principal característica o fato de serem sólidos, podem ser divididos em três sub-grupos: catalisadores sólidos alcalinos, catalisadores sólidos ácidos e enzimas imobilizadas. Estes sub-grupos podem apresentar características ácidas ou básicas, dependendo de sua composição (DABDOUB et al., 2009).

Os **catalisadores heterogêneos**, ambientalmente corretos, possuem inúmeras vantagens em relação aos catalisadores homogêneos, e entre elas podemos citar:

- a) Os catalisadores heterogêneos ácidos não são sensíveis à alta presença de ácidos graxos livres e ao conteúdo de água contido no sebo ou no óleo de fritura descartável. Isso implica que problemas sérios como a saponificação e a emulsão seriam menos frequentes;

- b) Os catalisadores heterogêneos podem ser facilmente recuperados no final do processo de transesterificação, simplesmente por uma filtração;
- c) Os catalisadores heterogêneos ácidos apresentam um *turnover* bastante elevado e são bastante específicos para essas reações podendo ser utilizados várias vezes;
- d) No processo final haveria economia de energia (menos energia para eliminar a água e compostos voláteis dos sebos e dos óleos de frituras descartáveis) e menos geração de lixo, principalmente gasto de água para limpeza do biodiesel.

Entretanto, sua problemática ocorre devido a necessidade de altas temperaturas, pressão e elevado tempo de reação, ocasionando uma baixa aplicabilidade industrial neste setor. Apesar destes empecilhos, os catalisadores heterogêneos são a esperança na evolução dos processos de produção de biodiesel (DABDOUB et al., 2009; PINTO et al., 2005).

2.1.5.3- Catálise enzimática

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.

A utilização de lipases e de enzimas em geral em escala industrial apresenta diversas vantagens comparada à catálise química homogênea. Entre as vantagens da utilização de enzimas podemos citar: a condição de reação moderada, a baixa quantidade de álcool em relação à quantidade de óleo, a fácil recuperação do produto e as operações simples para recuperação do glicerol ou para eliminar o catalisador, sendo este um processo ambientalmente correto (BARON, 2008; YAGIZ; KAZAN; AKIN, 2007). Além disso, a produção de biodiesel por lipases permite o uso de substratos de baixo preço, tais como banha, sebo (enzimas termofílicas) e óleos vegetais descartados de restaurantes e de uso domésticos, os quais apresentam conteúdo de água e de ácidos graxos livres superiores aos normalmente utilizados (MACARIO et al, 2008). Embora as vantagens catalíticas das enzimas sejam muitas, há algumas limitações para seu uso em processos industriais devido, principalmente, ao **alto custo de obtenção da enzima desde o isolamento**

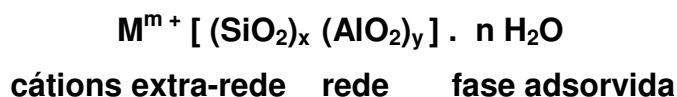
até a purificação e a perda do catalisador ao final do processo (ZANIN; MORAES, 2004).

Conforme podemos notar tanto os catalisadores heterogêneos como os catalisadores enzimáticos apresentam vantagens e desvantagens, porém, quando empregados simultaneamente podem oferecer amplas possibilidades de inovação tecnológica na área de energia renovável, especialmente na geração de bioenergia e na procura de um sistema otimizado ou aperfeiçoado que elimine ou diminua essas desvantagens na produção de biodiesel.

2.2- Catálise Heterogênea de Biodiesel Mediada por Zeólitas

2.2.1- Definição de 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 oxigênios 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 125° a 180° , sendo essa uma das razões da existência de tantas estruturas diferentes. Outros materiais microporosos próximos das zeólitas têm sido 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 (MEYER et al ,1985), Ga e Si (NEWSAM; VAUGHAN, 1986), Ga e Al (PARAISE, 1985), Si , Al e P (LOK et al, 1982) 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:



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 3 mostra a estrutura cristalográfica da zeólita faujasita Y e gismondina. Neste caso, a zeólita faujasita de fórmula molecular $[\text{Na}_{28.8}\text{Ca}_{14.4}][\text{Si}_{134.4}\text{Al}_{57.6}\text{O}_{384}]\cdot 263(\text{H}_2\text{O})$ e a gismondina $[(\text{Ca}^{2+})_4][\text{Al}_8\text{Si}_8\text{O}_{32}]\cdot 16(\text{H}_2\text{O})$ (INTERNATIONAL ZEOLITE ASSOCIATION). A zeólita faujasita Y é uma das zeólitas mais amplamente estudadas, tanto no âmbito acadêmico como no industrial (NERY et al, 1997; NERY et al, 2000).

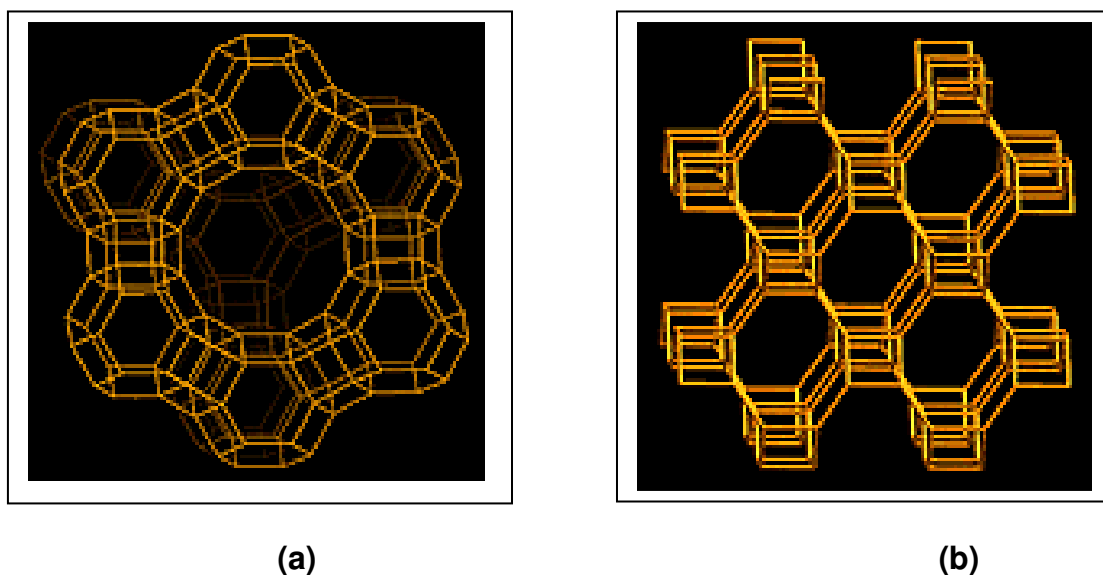


Figura 3. Zeólita Faujasita (a) e Gismondina (b), respectivamente, vista ao longo do eixo [111]. Fonte: INTERNATIONAL ZEOLITE ASSOCIATION (IZA)

2.2.2- Propriedades Estruturais das Zeólitas

A maioria das propriedades físico-químicas das zeólitas está diretamente relacionada 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 4 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 (BAERLOCHER, MEIER, OLSON, 2001; GHOBARKAR, SCHAF, GUTH, 1999).

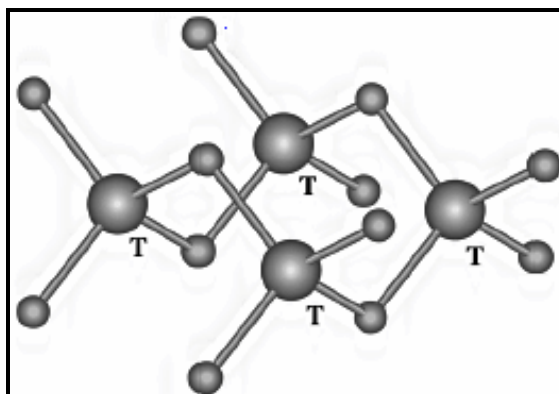


Figura 4. Unidades primárias de construção.

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 Building Units ou SBU). As SBU são 16 unidades propostas por Meier (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 5 e as ligações são ilustradas pelo desenho de linhas retas, que representam as pontes de oxigênios conectando duas unidades tetraédricas (BAERLOCHER, MEIER, OLSON, 2001; GHOBARKAR, SCHAF, GUTH, 1999; SMART, MOORE, 1995).

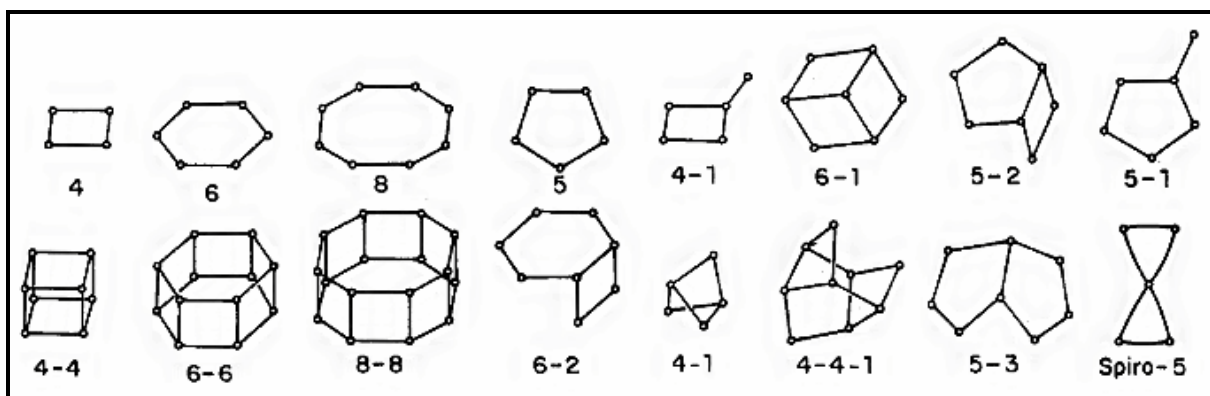


Figura 5. Unidades secundárias de construção.

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 (BAERLOCHER, MEIER, OLSON, 2001; GHOBARKAR, SCHAF, GUTH, 1999; SMART, MOORE, 1995). A figura 6 mostra as diferentes unidades poliédricas de construção existentes.

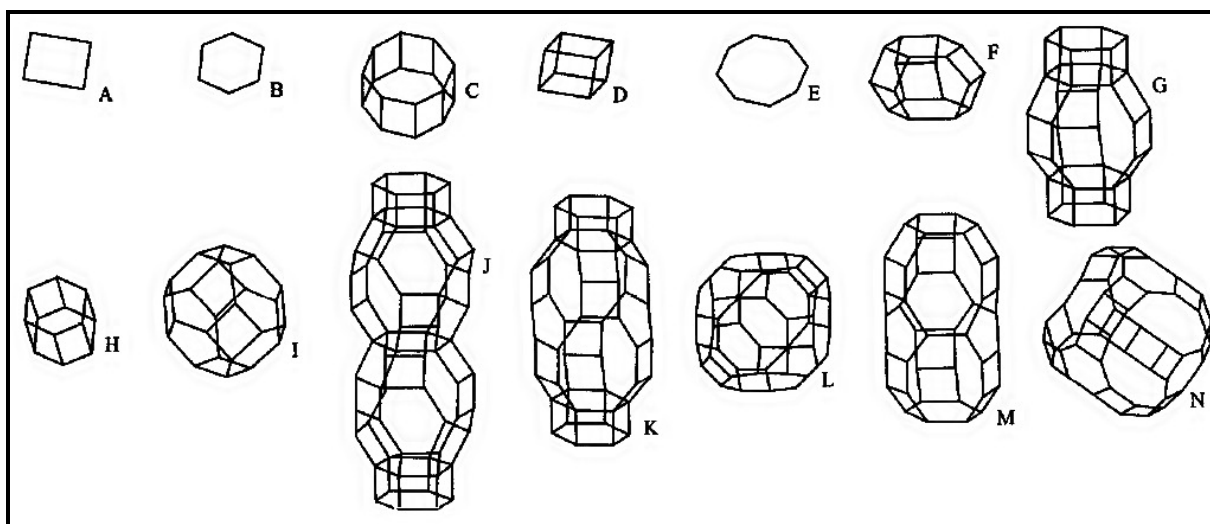


Figura 6. Unidades poliédricas de construção. A = 4-anéis, B = 6-anéis, C = gaiola δ , D = gaiola 4-4, E = 8-anéis, F = gaiola ϵ , G = gaiola γ , H = gaiola 6-6, I = gaiola sodalítica, J = gaiola levina, K = gaiola chabazita, L = gaiola α , M = gaiola erionita, N = supergaiola faujasita (GHOBARKAR; SCHAF;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

Por exemplo, a gaiola sodalítica (figura 6- 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 7.

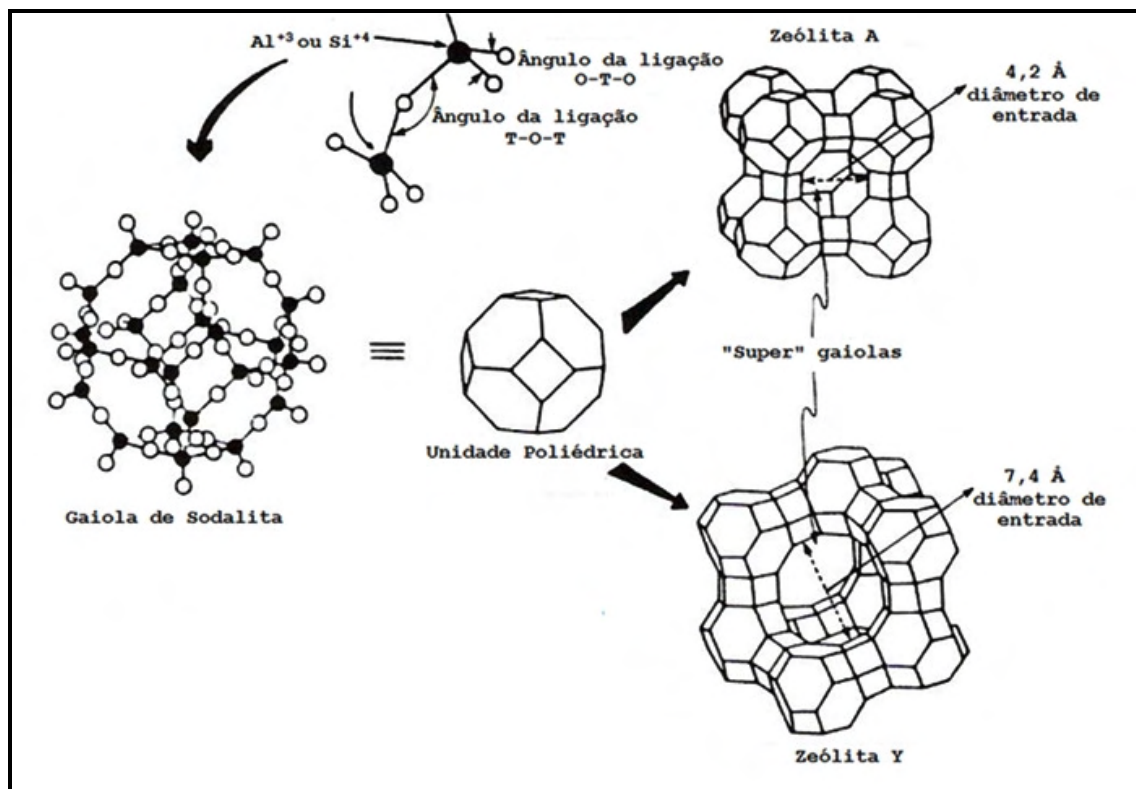


Figura 7. Formação estrutural das zeólitas A e Y. Fonte: (SMART; MOORE, 1995).

Embora a gaiola sodalítica possa ser usada para descrever tanto a zeólita A quanto a Y, podemos observar na figura 7 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 7, 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 (SMART, MOORE, 1995; WEITKAMP, 2000).

2.2.3- 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 8).

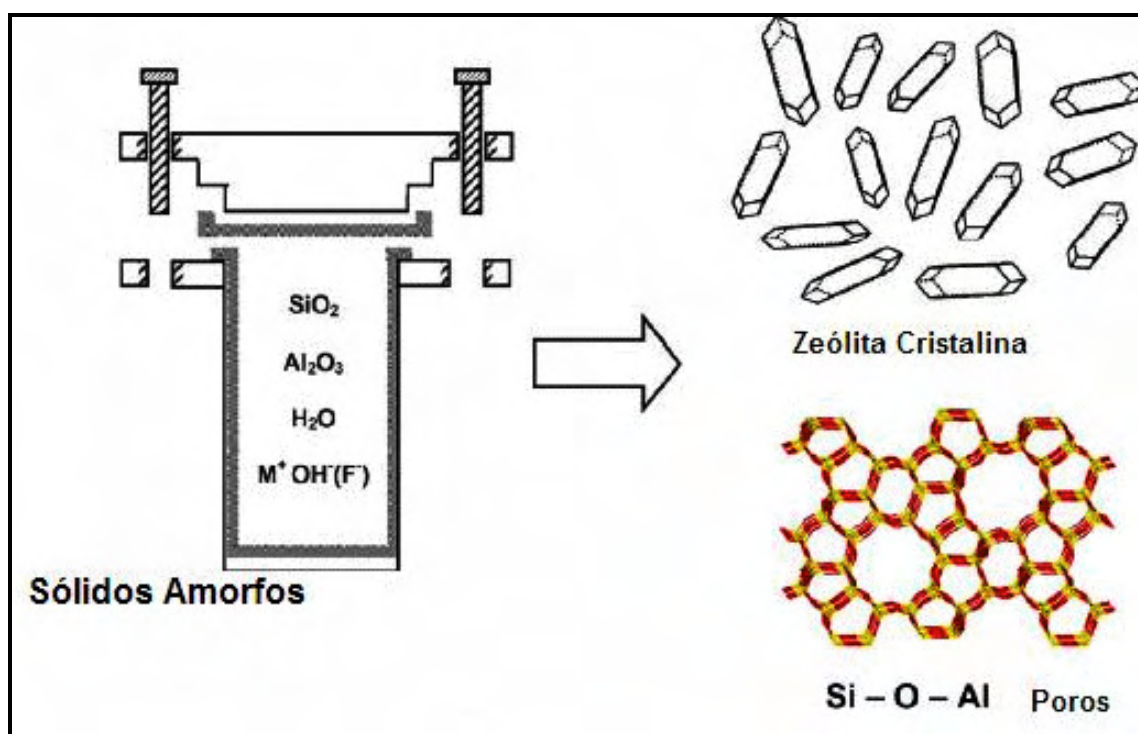


Figura 8. Esquema da formação da zeólita sintética. Fonte: (CUNDY; COX, 2005).

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 durante a síntese as interações entre as espécies orgânicas e inorgânicas são muito complexas (CUNDY; 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; 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, 2007).

2.2.4- 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, dentre elas destacam-se a adsorção a capacidade de troca iônica e a catálise. Entre suas utilizações, podemos citar seu uso como adsorvente, dessecante, descontaminante de material radioativo, suporte para liberação lenta de fertilizantes e fabricação do cimento. Ainda há estudos de sua aplicação na descontaminação de solo e no tratamento de efluentes contendo metais pesados. Outra aplicação importante, porém mais recente, é o uso de zeólitas para imobilização enzimática. Abaixo são apresentados três exemplos de utilização das zeólitas como trocadores iônicos, como catalisadores heterogêneos e como suporte para imobilização enzimática.

2.2.4.1- Trocadores iônicos

Zeólitas têm a capacidade de realizar troca iônica parcial ou total através de tratamento apropriado com uma solução salina. O uso de zeólitas nessa área ocorre principalmente na indústria de detergentes na qual a zeólita A é usada para remover íons de Ca^{+2} de águas duras. A zeólita nesse caso substitui o indesejável

tripolifosfato de sódio. Todavia, apesar de os fosfatos não serem tóxicos para o meio ambiente, quando lançados em rios e lagos eles causam sérios problemas ocasionando um desequilíbrio ecológico, pois são nutrientes para algas (causadoras do fenômeno de eutrofização) que rapidamente se proliferam.

Outras aplicações das zeólitas como trocadores iônicos incluem o tratamento de águas contendo lixo radioativo (KING; CAMPBELL, 1984) e na horticultura onde eles são incorporados aos fertilizantes para o controle do nível de nitrogênio do solo (TORII, 1978).

2.2.4.2- Catálise heterogênea

Outra área de muitas aplicações das zeólitas é em catálise heterogênea. Principalmente por esta razão, as zeólitas se tornaram os principais catalisadores atualmente estudados, agindo de forma bem efetiva em vários tipos de reações. As zeólitas possuem muitas propriedades físico-químicas, interessantes, o que as tornam extremamente úteis nessa área. A alta estabilidade térmica de sua estrutura cristalina à base de aluminossilicato as tornam ideais para serem usadas como catalisadores e suportes, devido ao fato de que a catálise industrial sempre ocorre em condições de altas temperatura e pressão. A grande superfície interna das zeólitas, tipicamente entre $300\text{-}700\text{ m}^2\text{ g}^{-1}$, assegura uma alta concentração de sítios ativos catalíticos e a facilidade de troca iônica fornece uma maneira fácil de mudar a natureza ativa desses sítios. Finalmente, a arquitetura dos poros faz das zeólitas catalisadores com seletividade de forma, uma vez que a estrutura dos poros controla a forma do reagente que entra na zeólita, a forma do produto que vai sair ou a forma do estado de transição dentro das zeólitas. Esse fenômeno da seletividade nas zeólitas pode ser usado para conduzir uma reação catalítica na direção do produto desejado, evitando reações paralelas indesejadas e está ilustrado na **figura 9**.

A seletividade de forma é bem ilustrada na conversão do álcool em produtos olefínicos usando zeólita A trocada com cálcio, **figura 9a**. Nesse caso, apenas os álcoois primários de uma mistura primária e secundária de alcoóis, podem entrar na zeólita e serem convertidos em olefinas (NEWSAM; VAUGHAN, 1986).

A seletividade por produto pode ser exemplificada pelo processo de isomerização do xileno, ilustrado pela **figura 9b**, o qual é catalisado pela zeólita ZSM-5. O produto p-xileno é altamente desejável porque é matéria-prima para a síntese de poliéster. A reação de isomerização ocorre via formação de um íon

carbênio e pode em teoria fornecer o orto-, meta- e para-xileno. O isômero para-xileno é termodinamicamente o menos favorecido dos isômeros, mas devido a sua forma relativamente linear pode se difundir na zeólita mais rapidamente e, portanto, ser o produto predominante (OLSON et al, 1981).

A seletividade do estado de transição pode determinar o curso de certas reações, como ilustrado na **figura 9c**. Por exemplo, a catálise ácida de trans-alquilação do metil-etil-benzeno a 300°C, cujo produto 1-metil-3,5-dietilbenzeno é aproximadamente um terço da composição de equilíbrio e é dificilmente observada quando o catalisador a base de zeólita modernita é utilizado. Presume-se que isso se deva à alta energia do estado de transição precedente para a formação desse produto dentro dos canais da zeólita (CSICSERY, 1984).

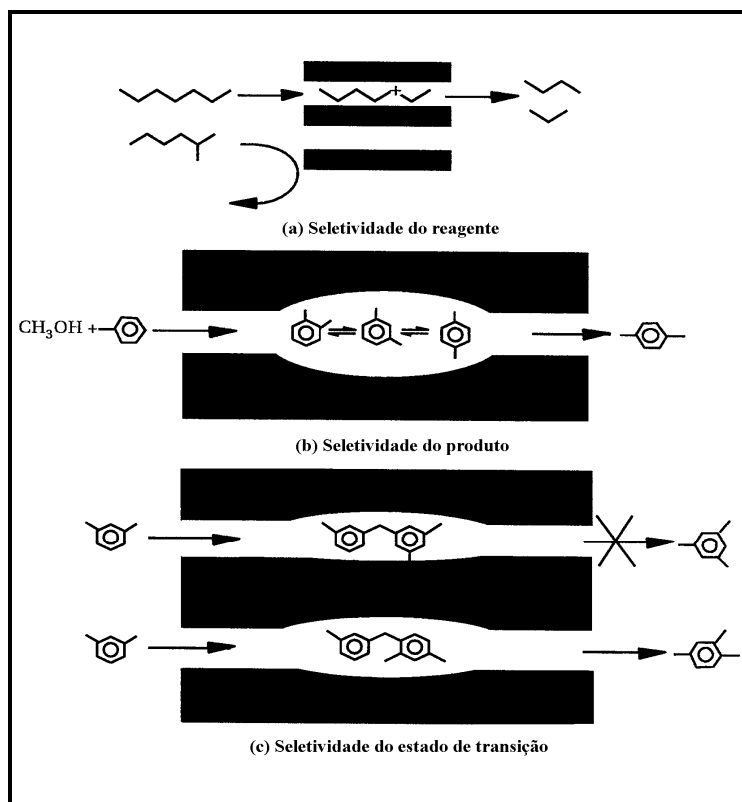


Figura 9. Esquema dos diversos tipos de seletividade de forma exibido por catalisadores com base em zeólitas. Fonte: (SMART; MOORE, 1995).

2.2.4.3- Imobilização enzimática

O uso de zeólitas como suporte de imobilização enzimática é considerado a maneira mais apropriada de combinar as vantagens de ambos catalisadores heterogêneos e enzimáticos. Este processo de imobilização de enzimas em suportes zeolíticos já vem sendo explorado, com sucesso, há cerca de uma década,

principalmente para as zeólitas mais tradicionais (GONÇALVES et al, 1996; GONÇALVES et al, 1997; LIE; MOLIN, 1991; SERRALHA et al, 1998).

As zeólitas em si apresentam propriedades bastante interessantes às quais permitem que essa imobilização possa ser feita. Dentre elas podemos 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 influenciarão drasticamente as características hidrofóbica/hidrofílica e ácido/base da zeólita (SERRALHA et al, 1998).

As zeólitas em sua maioria apresentam poros de abertura de 7-8Å, nessas condições nenhuma enzima (ou outra molécula orgânica maior que o diâmetro e abertura desses poros) podem penetrar nestas cavidades internas. Sendo assim, não há uma imobilização no interior da zeólita e a adsorção da enzima é feita somente na superfície externa do cristal (GONÇALVES et al, 1996). A adsorção de enzimas sobre a superfície sólida pode envolver mudanças conformacionais na molécula da enzima devido às interações entre ela e o suporte. Geralmente as enzimas podem ser adsorvidas tanto em suportes hidrofílicos quanto em suportes hidrofóbicos, sendo que há pouca diferença entre a quantidade de enzima adsorvida em ambos. Em suportes hidrofílicos pode ocorrer uma competição com as enzimas pela água disponível; no entanto, quando ambos são completamente hidratados, os suportes hidrofílicos levam a uma alta concentração de água no microambiente das enzimas e, assim, as reações hidrolíticas são favorecidas em relação à síntese (GONÇALVES et al, 1997).

2.2.5- Aplicação de Zeólitas na Produção de Biodiesel

Atualmente, há um grande interesse em substituir os catalisadores homogêneos ácidos e básicos nos processos de produção de biodiesel. Nesse contexto, há um grande interesse no desenvolvimento de novos catalisadores, com foco principalmente naqueles que seguem um processo catalítico heterogêneo.

Dentre os novos catalisadores estão as zeólitas, às quais trazem uma série de vantagens quando utilizadas no processo de transesterificação dos triglicerídeos (vide **seção 2.1.5.2**).

A aplicação de catalisadores à base de zeólitas no processo de transesterificação para produção de biodiesel é bastante recente, e a maior parte desses estudos estão relacionados a catalisadores zeolíticos na sua forma básica. Corma et al (1998) estudaram a transesterificação do óleo de soja como catalisadores básicos mesoporosos, tais como Cs-MCM-41, e também como Cs-sepiolite, hydrotalcites. Os resultados foram pouco satisfatórios devido a problemas com baixa conversão e saponificação. Leclercq et al (2001) estudaram a zeólita faujasita Y e X tratada com Césio e observaram o mesmo comportamento. O material à base de titânio-silicato ETS-10 também foi estudado para a reação de transesterificação, tendo sido submetido a um processo de troca iônica com metais alcalinos terrosos mais eletropositivos, tais como K^+ , Cs^+ , visando um aumento em sua basicidade (LOPEZ et al, 2005; PHILIPPOU; ANDERSON, 2000). Estes catalisadores apresentam uma alta taxa de conversão dos triacilglicerídios no caso dos óleos vegetais, todavia, problemas como saponificação e emulsificação não foram evitados. Ainda foi possível observar que para os óleos que apresentavam um excesso de ácidos graxos livres acima de 5%, os catalisadores perdiam completamente a sua atividade catalítica.

A literatura traz outros exemplos do uso de zeólitas na reação de transesterificação de óleos vegetais a biodiesel. Entre eles, Suppes et al. (2004) realizaram experimentos bastante detalhados com uma série de zeólitas de diferentes composições química e estrutural. As zeólitas testadas para a transesterificação do óleo de soja foram: NaX, NaY, KX, CsX, (Cs,K)X, ETS-10, K-ETS10, Cs-ETS10 e (Cs,K)ETS10. Os dados obtidos para esses catalisadores, na faixa de temperatura de 150°C resultaram nos seguintes teores de ésteres metílicos, respectivamente: 23,9; 11,1; 31,5; 24,2; 27,3; 95,8; 93,8; 88,5 e 88,1%. Já na faixa de temperatura de 120°C, os teores de ésteres metílicos, respectivamente, foram: 15,4; 9,6; 22,7; 18,7; 20,9; 94,6; 93,5; 85,5 e 83,9%.

A potencialidade do uso de zeólitas e outros catalisadores heterogêneos ácidos para a produção de biodiesel podem ser evidenciados no crescente número de patentes envolvendo novos processos com zeólitas tradicionais (RAMANATH; NAYANTARA, 2007; ZHANG, 2008). No entanto, eles ainda são bastante

específicos para certas fontes de óleos e apresentam problemas técnicos de processamento, deixando assim aberta a questão de novos catalisadores.

2.2.6- Síntese de Novas Zeólitas com Potencial para Produção de Biodiesel

O uso de zeólitas para produção de biodiesel tem se limitado ao emprego de zeólitas tradicionais como as faujasíticas, NaX, ZSM-5, zeólita Beta e aos titaniosilicatos. O emprego destas zeólitas apresenta resultados aceitáveis no tocante a porcentagem de biodiesel formada (RAMANATH; NAYANTARA, 2007; ZHANG, 2008). Porém, para o uso efetivo desses catalisadores em escala industrial para geração de biodiesel é necessário a síntese de novas famílias de materiais zeolíticos que apresentem canais e cavidades maiores, e estes novos tipos de estruturas zeolíticas podem ser obtidos por meio do uso de direcionadores orgânicos de estruturas (Structure Directing Agents, SDAs). A zeólita ETS-10 já foi utilizada como catalisador heterogêneo para produção de biodiesel. Todavia, outros materiais isomorficamente similares à ETS-10, podem ser interessantes e uma possível maneira de obtê-los é usando SDAs no meio reacional (sol-gel), porém, com outros metais de transição em sua rede cristalina.

2.2.6.1- Zeólitas a base de titaniosilicatos – ETS-10

Em 1983, Taramasso e seus colaboradores reportaram a síntese de uma zeólita, isoestrutural à silicalita contendo titânio na rede cristalina e a nomearam de TS-1, que vem de *Titanium Silicate* (titânio silicato), essa possuía baixa porcentagem de titânio (2,5%) e esse apresentava coordenação tetraédrica. O produto titâniosilicato mostrou ser um catalisador extremamente eficiente como catalisador de oxidação, particularmente em conjunto com o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O TS-1 foi o primeiro exemplo de átomos heterosubstituídos em uma zeólita com uma atividade química significativa (CUNDY; COX, 2003). Devido a suas características de grandes poros e estabilidade térmica, a ETS-10 é um dos mais importantes materiais microporosos sintéticos que apresentam estrutura mista de octaédrica e tetraédrica da atualidade. Estes materiais estão entre os primeiros exemplos estáveis de materiais microporosos formados por estruturas com átomos em coordenação superior a quatro (CUNDY; COX, 2003).

No final dos anos de 1980, Kuznicki, nos laboratórios da Engelhard Corporation, sintetizou materiais microporosos que continham titânio em

coordenações não tetraédricas, conhecidos como ETS-4 (KUZNICKI, 1989) e ETS-10 (KUZNICKI, 1990) que significava **Engelhard Titanium Silicate** (CUNDY; COX, 2003).

A estrutura da zeólita ETS-10 $[(Na,K)_2Si_5TiO_{13}xH_2O]$ foi resolvida por Anderson et al em 1995, que é formada por um tetraedro TO_4 contendo um átomo de silício e quatro átomos de oxigênio (SiO_4) e um octaedro TO_6 contendo um átomo de titânio e seis de oxigênio (TiO_6) ligados por pontes formadas pelos átomos de oxigênio.

A estrutura de poros da zeólita ETS-10 é formada por quatro diferentes sistemas de abertura de poros: 3, 5, 7 e 12 átomos T. A abertura de poros formada por 12 anéis dá acesso a um sistema de canais tridimensionais que se apresentam direcionados nas três dimensões, sendo que poucos materiais zeolíticos apresentam esse tipo de estrutura porosa. Dessa forma, a zeólita ETS-10 apresenta excelentes características de difusão (ROCHA; ANDERSON, 2000).

A unidade básica da zeólita ETS-10 apresenta quarenta átomos de silício, oito átomos de titânio e cento e quatro átomos de oxigênio ($Si_{40} Ti_8 O_{104}^{16-}$) o que confere dezesseis cargas negativas a essa unidade. Dessa forma, a mesma pode ser contrabalanceada com dezesseis cátions monovalentes. Um aspecto importante da estrutura da zeólita ETS-10 é que ela contém cadeias $-O-Ti-O-Ti-O-$ com ligações curtas e longas se alternando, as quais são cercadas pela estrutura em forma de anel formada pelo silicato. Essa estrutura combina-se para compor uma haste. A natureza dessa haste confere a zeólita ETS-10 algumas propriedades físicas interessantes (ROCHA; LIN, 2005).

Basicamente, a zeólita ETS-10 é 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^+ . A representação da estrutura da ETS-10 é dada na figura 10.

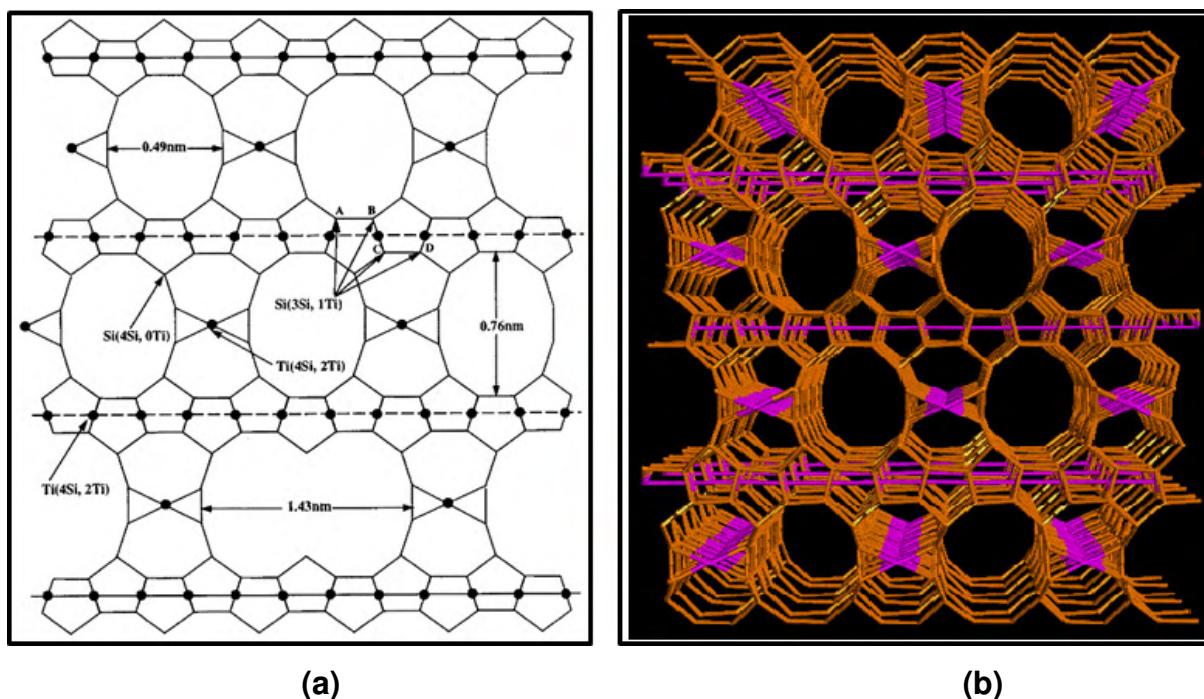


Figura 10. Estrutura da ETS-10 (a) e estrutura tridimensional da ETS-10 (b). Fonte: (ROCHA; ANDERSON, 2000)

A zeólita ETS-10 é considerada um dos mais importantes titaniosilicatos. Isso se deve, dentre outras características, a essa estrutura possuir boa estabilidade térmica (aproximadamente 650°C em ar), alta densidade carga associada ao octaedro de Ti e poros grandes, o que lhe confere aplicação em catálise e troca-iônica (ROCHA; LIN, 2005).

2.3- Produção Enzimática de Biodiesel Mediada por Lipases

Enzimas são catalisadores biológicos cuja principal função é catalisar reações nos organismos (PAQUES; MACEDO, 2006). Os biocatalisadores apresentam as mais variadas funções químicas e estão presentes em diversas vias metabólicas, acelerando reações bioquímicas que ocorrem nos sistemas vivos. As enzimas são catalisadores muito potentes e eficazes que permitem seu uso em diversos setores industriais, tais como indústrias alimentícias, detergentes, farmacêutica, couro, têxtil, cosméticos, papelaria, biodiesel, entre outras (COSTA et al, 2009; SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001). O que diferencia esse biocatalisador de um catalisador sintético (químico) é a sua capacidade de catalisar uma reação em condições brandas de pH, pressão e temperatura, proporcionando uma redução das necessidades energéticas (ZANIN; MORAES, 2004). Além disso, as enzimas são

muito específicas para seus respectivos substratos devido a sua elevada seletividade (quimi-, regio- e enantioseletividade), e isso tem atraído o interesse dos cientistas tanto na academia, quanto na indústria (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006).

2.3.1- Lipases

2.3.1.1- Aspectos gerais

Lipases triacilglicerídicas 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 com solúveis (SAXENA et al, 2003). Elas são únicas em catalisar reações na interface água-lipídeo e revertê-las em meio não-aquoso e sua conformação muda em contato com um substrato insolúvel em água (SAXENA et al, 2003; TREVISAN, 2004).

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 esterificação, alcoólise e transesterificação em meio não aquoso. Quando ésteres são utilizados como substratos as possíveis reações são mostradas na figura 11 (SOTOFTA et al, 2010).

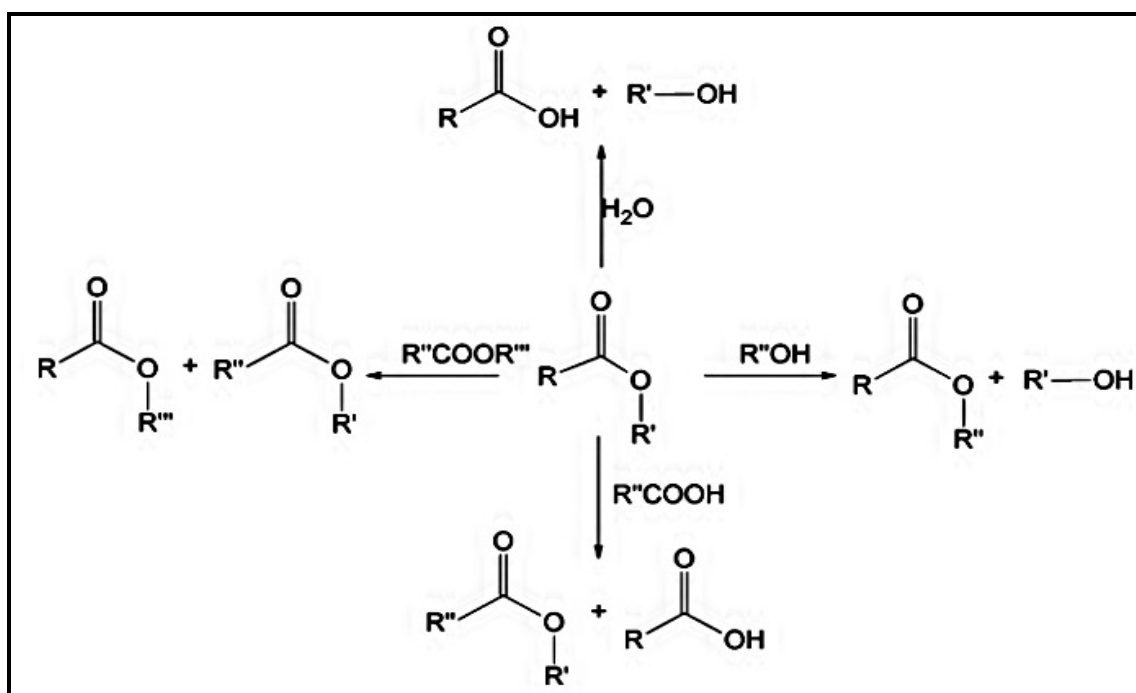


Figura 11. Esquema geral de reações de lipases atuando sobre ligações ésteres. Fonte: (SOTOFTA et al, 2010).

2.3.2- 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 12 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 hidrofílico do grupo hidroxila do resíduo nucleofílico da serina ao carbono da carbonila ativado do éster lipídico (figura 12A). 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 12B). 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 carbonila do intermediário covalente (figura 12C). 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 12D) (JAEGER, DIJKSTRA, REETZ, 1999; TREVISAN, 2004).

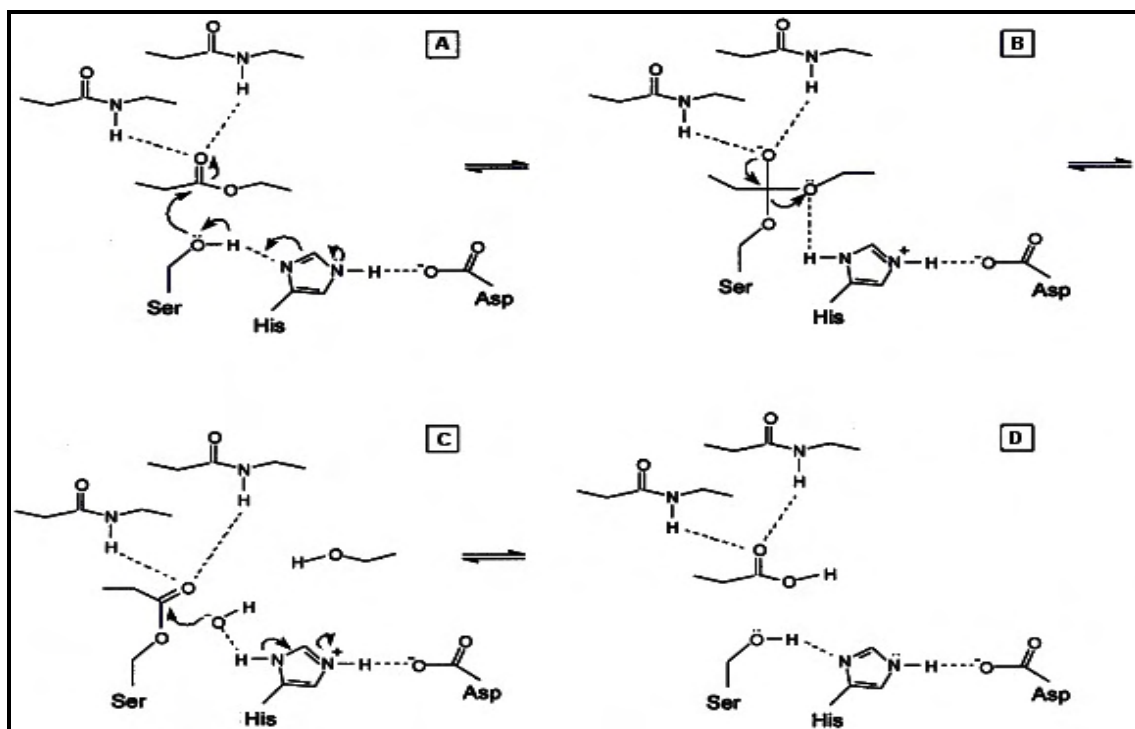


Figura 12. Mecanismo de reação das lipases. Fonte: Jaeger et al. (1999).

2.3.3- 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 et al., 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 & 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 13 apresenta a estrutura de forma aberta e fechada da lipase *Rhizomucor miehei* (RML). 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, REETZ, 1999).

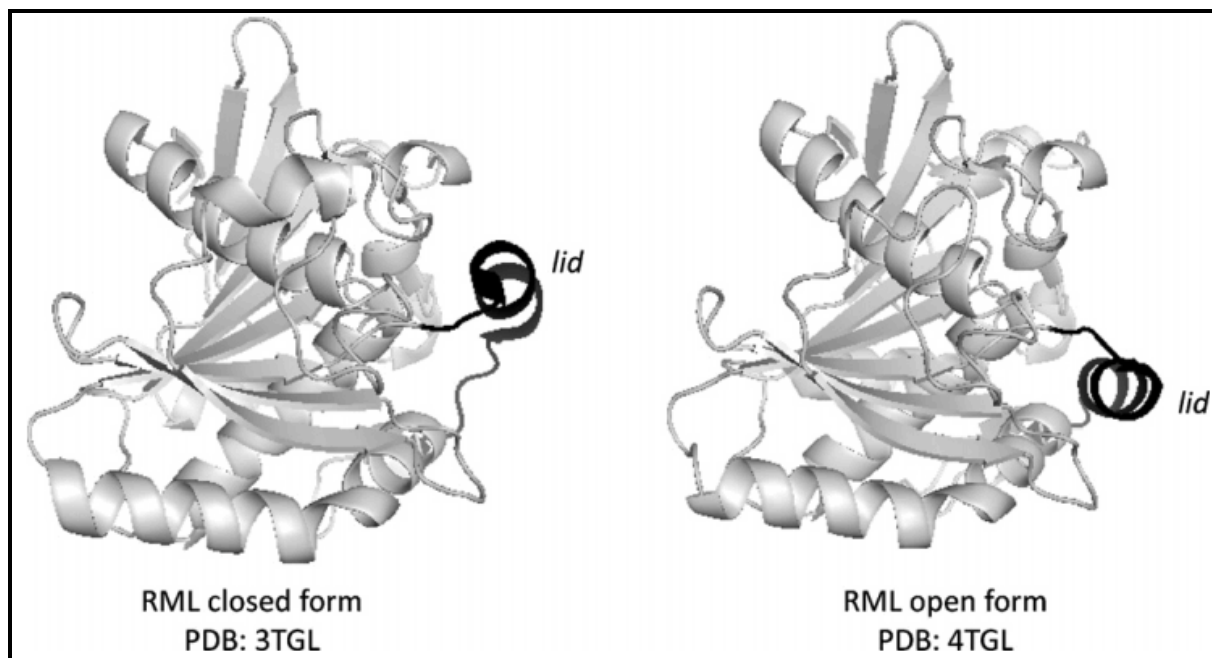


Figura 13. Estrutura das formas aberta e fechada da RML. Fonte: Protein Data Bank (PDB)

Embora este mecanismo funcione bem para a lipase *Rhizomucor 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 aeruginosa*, *Burkholderia glumae* e *Candida antarctica B*, que apresentam a “lid” em suas estruturas, mas não sofrem ativação interfacial (JAEGER; DIKSTRA; REETZ, 1998). 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* e as lipases de *C. antarctica*, *P.aeruginosa* e *Bacillus subtilis* (BARON, 2008).

2.3.4- Fontes de Lipases

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 comerciais 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). Microrganismos produtores de lipases têm sido encontrados nos mais diversos habitats, como resíduos industriais, indústrias de óleos vegetais, laticínios, solo contaminado com óleo, semente de oleaginosas, alimentos em decomposição, pilhas de compostagem (TREVISAN, 2004).

Saxena et al. (2003) apresentaram uma tabela relativamente extensa dos microrganismos produtores de lipases, incluindo bactérias (gram-positivas e gram-negativas), leveduras e fungos. Vários gêneros de microrganismos podem ser empregados para a produção de lipases, tais como as bactérias dos gêneros *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Chromobacterium*, *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Corynebacterium*, *Propionibacterium*, leveduras como gênero *Candida*, *Trichosporon* e fungos dos gêneros *Pichia*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Ustilago*, *Butyris*, *Geotrichum*, *Fusarium* e *Thermomyces*.

2.3.5- Usos de Lipases

O uso comercial de lipases é da ordem de bilhões de dólares em negócios que compreendem uma grande variedade de diferentes aplicações. A maioria das lipases comerciais são de origem microbianas produzidas em fermentação aeróbica convencional, a qual permite um maior controle das condições de crescimento quando comparada com as fermentações no estado sólido (JAEGER, DIJKSTRA, REETZ, 1999; TREVISAN, 2004).

De acordo com Hasan et al (2006), a utilidade de lipases no comércio e na pesquisa origina-se de suas propriedades fisiológicas e físicas. Assim, algumas delas estão descritas abaixo:

- Uma grande quantidade de lipase pode ser obtida, sendo possível devido a fácil produção de massa;
- Lipases de origem microbiana são geralmente mais estáveis que as lipases de origem animal ou vegetal.
- Lipases são ativas em condição ambiente, o que diminui gastos com energia para realizar reações em temperaturas e pressões elevadas. Além disso, reduz a destruição de reagentes e produtos instáveis;

- Microrganismos termofílicos e enzimas estáveis em altas temperaturas e condições químicas adversas podem ser vantagens em usos industriais;
- Devido a especificidade das enzimas, produtos indesejáveis que normalmente aparecem no meio reacional são reduzidos ou eliminados;
- Processos catalisados por lipases oferecem eficácia também no custo, em comparação com as desvantagens dos processos tradicionais;
- Lipases permanecem ativas em solventes orgânicos nas aplicações industriais.

Lipases são amplamente utilizadas no processamento de óleo e gorduras (indústria óleoquímica), detergentes e formulações desengraxantes, processamento de alimentos (indústria de alimentos), síntese de produtos para química fina e fármacos (sínteses orgânicas), manufatura de papel (indústria de polpa e papel), produção de cosméticos e indústria têxtil. Elas também podem ser utilizadas na degradação de efluentes gordurosos, biodegradação de óleo e de poliuretano. Recentemente lipases têm sido utilizadas na produção de biodiesel (TREVISAN, 2004).

2.3.6 - Imobilização de Lipases

Lipases são catalisadores biológicos muito potentes e eficazes que permitem seu uso em diversos setores industriais (SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001). Devido às considerações econômicas, as aplicações enzimáticas requerem sua imobilização e reutilização. De acordo com Zanin et al (2004), a imobilização de enzimas tem como finalidade aproveitar o potencial catalítico das enzimas e reunir as vantagens desses biocatalisadores juntamente com as vantagens dos catalisadores químicos e torná-las insolúveis ao meio reacional, ou seja, ligar as enzimas em suportes sólidos insolúveis ao meio reacional. Para Macario et al. (2008), ao se obter uma enzima imobilizada ativa, estável e com boa especificidade ao substrato, a maioria das desvantagens das enzimas durante o processo catalítico são eliminadas. Até o presente momento, muitas técnicas e diferentes suportes têm sido empregados para imobilização de lipases. Eles têm sido bem sucedidos para a imobilização sobre ambos materiais hidrofóbicos e hidrofílicos, tais como partículas porosas de kaolinita, resinas macroporosas, zeólitas, esferas SiO₂ funcionalizadas em nanoescala, etc.

A definição mais aceita para enzimas imobilizadas é a recomendada pela Primeira Conferência sobre Engenharia Enzimática, realizada em 1971, na qual se estabeleceu que “enzimas imobilizadas são enzimas ou sistemas enzimáticos fisicamente confinados ou localizados numa certa região definida do espaço com a retenção de suas atividades catalíticas, e que podem ser usadas repetida e continuamente”. A enzima pode ser ligada à superfície do suporte ou fisicamente confinada no interior da matriz sólida. Este sistema catalítico pode ser facilmente separado do meio reacional e pode ser utilizado em reatores contínuos ou em sistemas em batelada repetidas, enquanto o sistema enzimático mantiver ativo (ZANIN; MORAES, 2004).

Os métodos para 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 (ZANIN, MORAES 2004; MACARIO et al, 2007). A figura 14 apresenta um esquema dos principais métodos de imobilização de enzimas, tanto em suportes não-porosos, como em porosos, e por encapsulação.

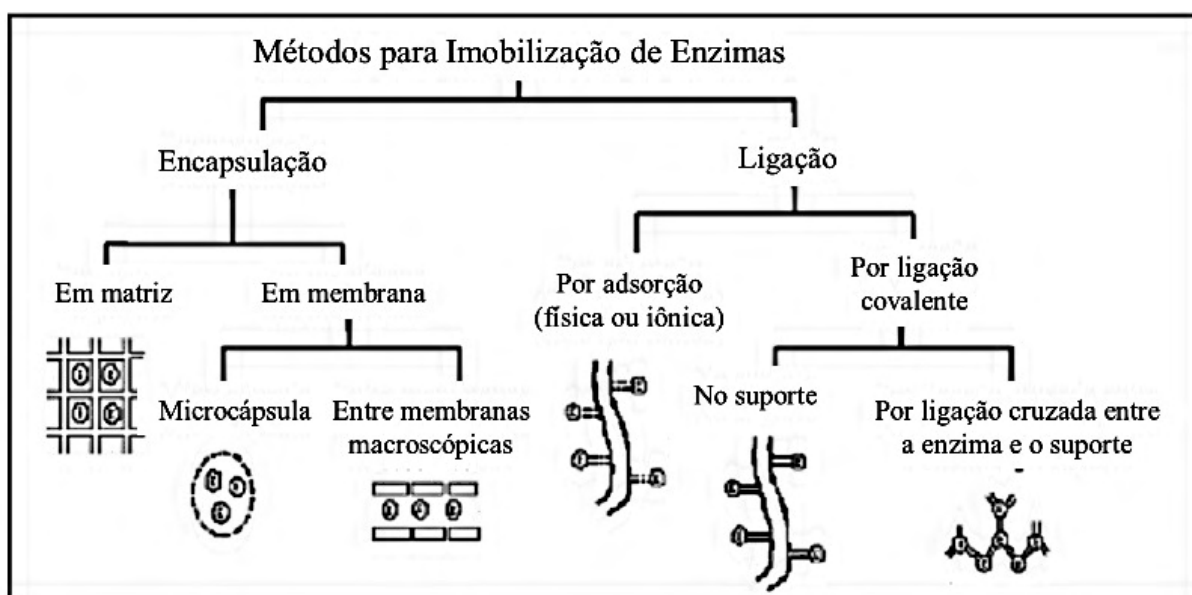


Figura 14. Principais métodos de imobilização de enzimas. Fonte: Dalla-Vecchia et al. (2004).

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 (ZANIN; MORAES, 2004).

A imobilização sobre um 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 anéis fenólicos 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 (BARON, 2008) e, (2) imobilização por adsorção consiste na adsorção da enzima em um suporte inerte, através de ligações eletrostáticas ou hidrofóbicas, tais como interações iônicas, força de Van der Waals, 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).

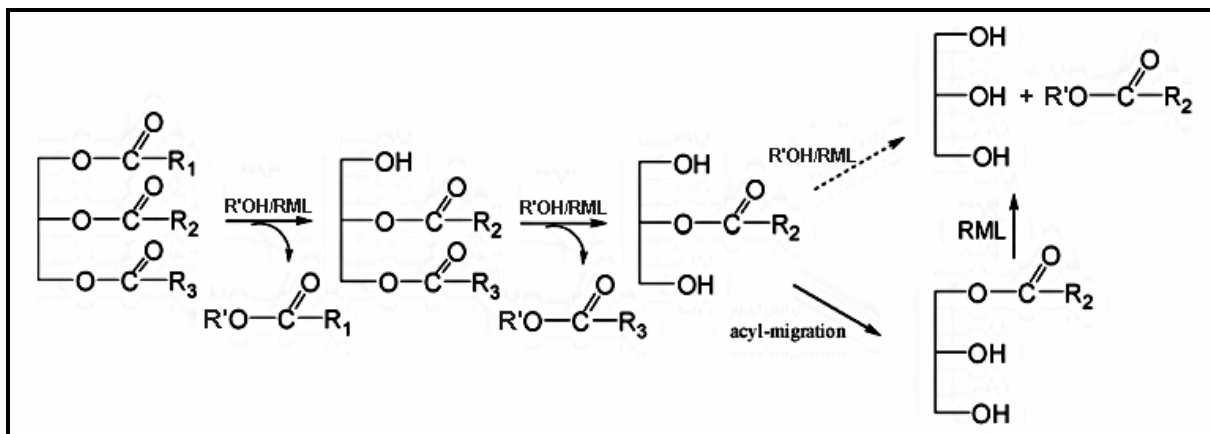
2.3.7 – Produção Enzimática de Biodiesel

Lipases intracelulares e extracelulares são capazes de catalisar efetivamente a transesterificação de triglicerídeos de sistemas aquosos e não aquosos a biodiesel, e são estudadas na forma livre ou imobilizadas em materiais sólidos, tais como cerâmicas, zeólitas, sílicas, etc (YAGIZ; KAZAN; AKIN, 2007).

A produção enzimática de biodiesel foi patenteada por Hass (1997). Contudo, o processo ainda não tem sido implementado devido a certas restrições, como a inibição das enzimas por metanol, a perda da atividade enzimática e o alto custo das enzimas. Vários artigos têm sido reportado na literatura para contornar esses problemas, visando a implementação da produção enzimática de biodiesel em um futuro próximo (RANGANATHAN et al., 2008).

As lipases diferentes obtidas de microorganismos, tais como *Mucor miehei*, *Candida antarctica*, *Thermomyces lanuginosus*, *Geotrichum candidum*, *Pseudomonas cepacia* e *Rhizopus delemar*, realizaram a reação de transesterificação em condições amenas e conseguiram excelentes resultados tanto no rendimento total da reação, como também na qualidade do biodiesel obtido, sendo este de excelente qualidade, principalmente com uso de etanol. O esquema 2

ilustra a reação de transesterificação para a produção de biodiesel catalisada pela Lipase *Rhizomucor miehei* (RML).



Esquema 2. Esquema geral da produção de biodiesel catalisado por RML. Fonte: Adaptada de Rodrigues & Lafuente, 2010.

Na literatura vários artigos têm sido recentemente encontrados a respeito da produção de biodiesel envolvendo a utilização de lipases, principalmente imobilizadas, como novas alternativas de catalisadores com um grande potencial quando comparado a métodos químicos tradicionais. Entre eles, Nelson et al. (1996) compararam o rendimento de transesterificação do sebo com alcoóis de diferentes cadeias carbônicas catalisado com e sem hexano como solvente e por duas diferentes lipases comerciais: lipozima IM60 (*Mucor miehei* e Novozyme SP435 *C. antarctica*). A lipase *Candida antactica* foi adequada para alcoóis secundários (80%) de conversão semelhante para ambos isopropanol e 2-butanol. Já a lipase *Mucor miehei* foi mais eficiente para converter triglicerídeos a ésteres alquílicos em sistema com hexano como solvente utilizando alcoóis primários, tais como: metanol, etanol e isopropanol, sendo que os rendimentos da transesterificação foram maiores que 95%. No entanto, sem o uso de hexano como solvente, os rendimentos da produção de ésteres alquílicos aumentaram de acordo com o comprimento da cadeia de hidrocarboneto do álcool e foram obtidos: 19% para metanol; 65,5% para etanol; e 97,4% para o isobutanol. O baixo rendimento da lipase *Mucor miehei* na ausência de solvente orgânico foi atribuído ao efeito inibitório causado, principalmente, pelo metanol sobre a enzima imobilizada. Este efeito negativo foi novamente confirmado por Abigor et al (2000) que relatou a conversão do óleo de palma a biodiesel usando como solvente metanol e etanol, os teores de ésteres metílicos e etílicos obtidos foram 15% e 72%, respectivamente.

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 alcoóis catalisados por diferentes lipases de vários microorganismos (livres ou 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 relação molar de álcool: óleo, temperatura e tempo da reação. Outro parâmetro importante revela que o uso ou não de solventes orgânicos (os quais protegem a enzima da desnaturação causada pelos alcoóis) afeta a estabilidade operacional da enzima e, assim, o rendimento da reação transesterificação (FUKUDA; KONDO; NODA, 2001; RANGANATHAN et al., 2008; YANG et al, 2009).

2.3.7.1- Parâmetros físico-químicos que afetam a produção de biodiesel mediado por lipases

O excesso de álcool em relação à quantidade de ácidos graxos no triacilgliceróis geralmente aumenta o rendimento da transesterificação, mas pode inativar a enzima principalmente quando o álcool é insolúvel na mistura (ANTCZAK, 2009). Para contornar esse problema, pesquisadores propuseram a 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). 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; NODA, 2001; RANGANATHAN et al., 2008).

A principal razão para a adição de solventes orgânicos na mistura óleo-álcool consiste em aumentar a solubilidade mútua de triacilgliceróis (hidrofóbicos) e alcoóis (hidrofílicos). Estes aumentam a solubilidade dos substratos e protegem a enzima da desnaturação por alta concentração de álcool tais como, metanol e etanol. Neste caso, vários solventes orgânicos podem ser usados para a síntese enzimática de biodiesel, sendo que em sua maioria são hidrofóbicos, tais como isooctano, n-heptano, éter de petróleo, n-hexano, ciclohexano, etc (LI et al, 2006). Solventes orgânicos eliminam a necessidade de adicionar alcoóis em pequenas quantidades (em particular metanol que rapidamente inativa proteína). Contudo a remoção do

solvente orgânico ao final do processo também pode ser difícil. Além disso, a volatilidade, a inflamabilidade e a toxicidade dos solventes orgânicos podem dificultar o aumento de escala na produção de biodiesel, assim, a transesterificação enzimática em sistemas livres de solvente tem sido intensamente investigada (ANTCZAK, 2009).

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 30°C e 55°C. No caso de reações na ausência de solventes orgânicos, a faixa varia de 30°C a 50°C (ANTCZAK, 2009; FJERBAEK; CHRISTENSEN; NORDDAHL, 2009).

Outros parâmetros que afetam a transesterificação enzimática são: a atividade de água e a alta concentração de glicerol (produto reacional). 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 e isto 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 (NIE et al., 2006; KAIEDA et al, 2001).

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 produto. O glicerol é muito 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 et al. (2003) propôs a lavagem da lipase imobilizada com

álcool isopropílico, dessa forma, a atividade é restaurada e ocorre a remoção do glicerol.

2.3.7.2 – Produção de biodiesel mediada pelo conjugado lipase/zeólita

Em geral as enzimas podem ser adsorvidas sobre suportes zeolíticos formando uma estrutura resistente com grande potencial catalítico para produção de biodiesel. O uso de zeólitas com lipases imobilizadas para a preparação de biodiesel é bastante recente e apenas uma pequena quantidade de artigos envolvendo o complexo lipase/zeólita é relatado na literatura. Entre eles, Macario et al, (2007) estudaram a reação de transesterificação utilizando as lipases produzidas pelo fungo *Rhizomucor miehei* imobilizadas em algumas zeólitas tradicionais como catalisador em condições amenas de reação e conseguiram excelentes resultados tanto no rendimento total da reação, como também na qualidade do biodiesel obtido, principalmente com o uso do metanol. No entanto, Yagiz et al, (2007) não obtiveram rendimentos significantes de ésteres metílicos produzidos a partir do óleo residual quando a reação de transesterificação foi realizada à temperatura ambiente com uso do conjugado lipase (Lipozyme-TL IM) imobilizada sobre zeólitas (A, X e MORDENITA) como catalisador.

Conforme foi relatado no texto na **seção 2.1.5.2** é evidente a necessidade de uma nova família de catalisadores heterogêneos para produção de biodiesel, principalmente pelas vantagens potenciais que estes novos catalisadores podem oferecer ao processo como um todo. Esse processo de biocatálise apresenta grande vantagem quando comparado com métodos químicos tradicionais homogêneos, pois com a utilização de uma enzima imobilizada sobre uma matriz zeolítica é possível combinar as vantagens da transesterificação enzimática, a qual evita a saponificação, envolve pH neutro e baixo consumo de energia, com as vantagens apresentadas para catalisadores heterogêneos.

Por outro lado, através da análise da literatura disponível e citada no decorrer do texto, podemos observar que várias questões, no que diz respeito ao mecanismo de imobilização de enzimas em substratos zeolíticos, não estão completamente claras, e estudos experimentais nessa área são importantes para entendermos e dominarmos esta importante interação zeólita-enzima. Esse tipo de interação apresenta boas perspectivas para o futuro da produção de biodiesel proveniente de óleo vegetal.

3- JUSTIFICATIVAS

Atualmente a maior parte da produção de biodiesel é proveniente da transesterificação alcalina homogênea, a qual apresenta uma série de desvantagens, ver **seção 2.1.5.1**. Para contornar estas desvantagens é evidente a necessidade de uma nova família de catalisadores heterogêneos para a produção de biodiesel, principalmente pelas inúmeras vantagens que estes catalisadores podem oferecer ao processo como um todo, das quais já foram discutidas anteriormente na **seção 2.1.5.2**. Porém, suas principais desvantagens são o fato de necessitarem de altas temperaturas e pressões. Em contraste, as enzimas permitem o uso de substratos de baixa qualidade em condições de reação moderada o que confere boas vantagens para o processo (**seção 2.1.5.3**). No entanto, o seu alto custo e o fato de não serem recuperadas ao final do processo são suas maiores desvantagens. Acreditamos que a partir do uso de enzimas imobilizadas há a possibilidade de se combinar as vantagens da transesterificação enzimáticas com aquelas da catálise heterogênea.

Para o desenvolvimento deste trabalho foi proposto um estudo de substituição do processo catalítico tradicional por um processo mais adequado. O fluxograma da figura 15 apresenta a estratégia adotada para produção de biodiesel por esses catalisadores.

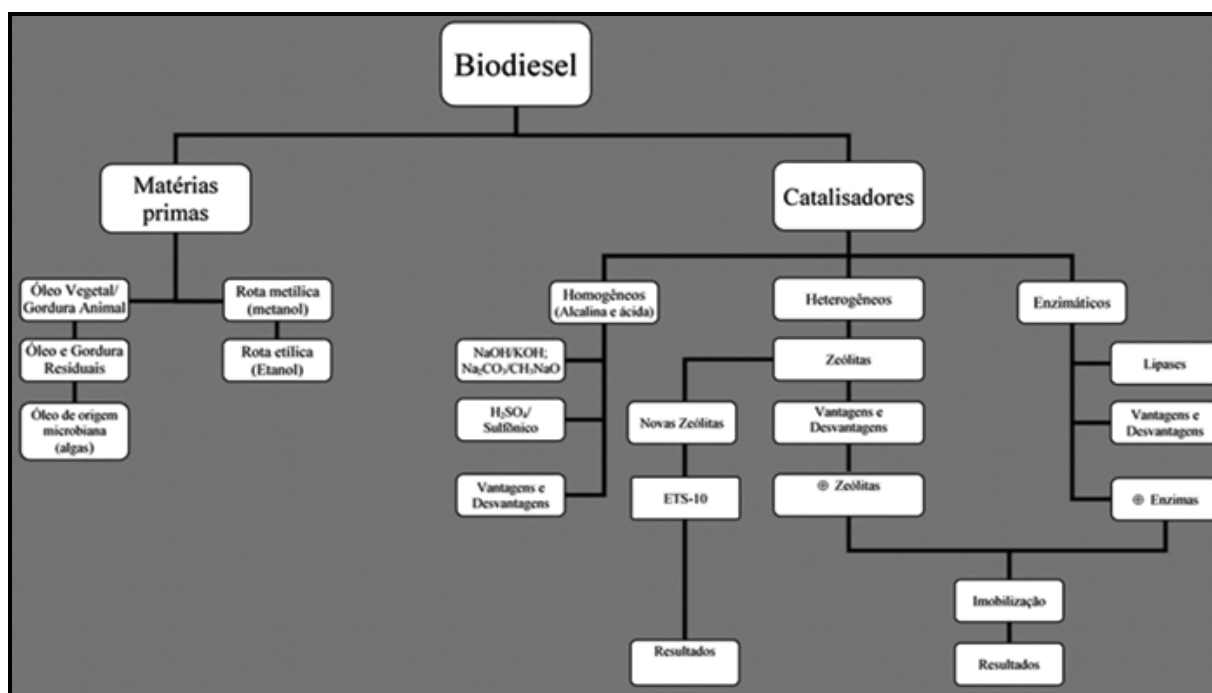


Figura 15. Quadro geral da produção de biodiesel baseada nas fontes de matérias primas e nos catalisadores usados no processo de transesterificação.

O fluxograma da figura 15 apresenta um quadro geral da produção de biodiesel baseado nas fontes de matérias-primas e nos catalisadores usados no processo de transesterificação. O corpo deste trabalho baseia-se na figura 15 para obtenção de novos resultados. Na primeira etapa do nosso estudo, foi feita a produção de biodiesel via catálise enzimática por lipases de (*Rhizomucor miehei*) e verificada as suas vantagens. Na segunda etapa, foi realizada a imobilização das enzimas nas zeólitas (faujasita e gismondina) e, em nível de química de superfície, foi estudada a interação das enzimas (lipases de *Rhizomucor miehei*) com a superfície das zeólitas e avaliada as possíveis vantagens desse biocatalisador na transesterificação do óleo vegetal a biodiesel. Em paralelo, novos catalisadores zeolíticos, à base de ETS-10, foram sintetizados com o objetivo de futuramente serem testados como catalisadores heterogêneos para produzir biodiesel e posteriormente serem usados para imobilizar lipases formando um catalisador “diferenciado” com amplas vantagens tecnológicas para produção de biodiesel. A eficiência catalítica desses novos catalisadores zeolíticos poderá ser estudada no processo de transesterificação de óleos vegetais a biodiesel, sendo que a viabilidade econômica desses catalisadores seria explorada.

4- OBJETIVOS

4.1- Objetivos Gerais

O presente trabalho teve como principais objetivos: sintetizar e caracterizar duas zeólitas de estruturas diferentes (zeólitas faujasita (FAU) e gismondina (GIS)); estudar o uso dessas matrizes para imobilização da Lipase de *Rhizomucor meihei* (RML); avaliar a atividade catalítica da zeólita pura, da enzima pura e do complexo enzima/zeólita para a transesterificação do óleo de soja a biodiesel e; sintetizar e caracterizar novos catalisadores zeolíticos (vanadiosilicatos) baseados na estrutura da zeólita ETS-10 com potencial para a imobilização enzimática e para a produção de biodiesel.

4.2- Objetivos Específicos

Os objetivos específicos a serem alcançados são os seguintes:

- Síntese de zeólitas tradicionais – Faujasita e Gismondina;
- Estudo da imobilização de lipases de *Rhizomucor miehei* sobre zeólitas tradicionais como matrizes de imobilização, ou seja, avaliar a interação entre a superfície da zeólita e da enzima;
- Caracterização da quantidade de proteína adsorvida no suporte zeolítico pela técnica espectrofotométrica em 595nm;
- Avaliação da atividade enzimática na hidrólise do reagente *p*-nitrofenil palmitato pela análise espectrofotométrica em 410nm;
- Avaliação da influência da densidade de cátions na eficiência catalítica da enzima através de troca iônica da zeólita com cátions de diferentes densidades eletrônicas, tais como Na^+ , Cu^{2+} , Ni^+ , Zn^{2+} ;
- Avaliação da influência da quantidade de água cristalográfica da zeólita através do pré-tratamento térmico do suporte na estrutura do material zeolítico e no processo de imobilização da enzima;
- Estudo catalítico do conjugado (zeólita/enzima) para a reação de transesterificação do óleo vegetal a biodiesel usando metanol;
- Avaliação e comparação dos resultados obtidos quando ambos os catalisadores são usados separadamente;
- Análise da qualidade do biodiesel obtido através de cromatografia Gasosa, e
- Síntese de uma nova família de zeólitas baseada na estrutura da zeólita ETS-10 utilizando direcionadores orgânicos derivados de (S)-Esparteína.

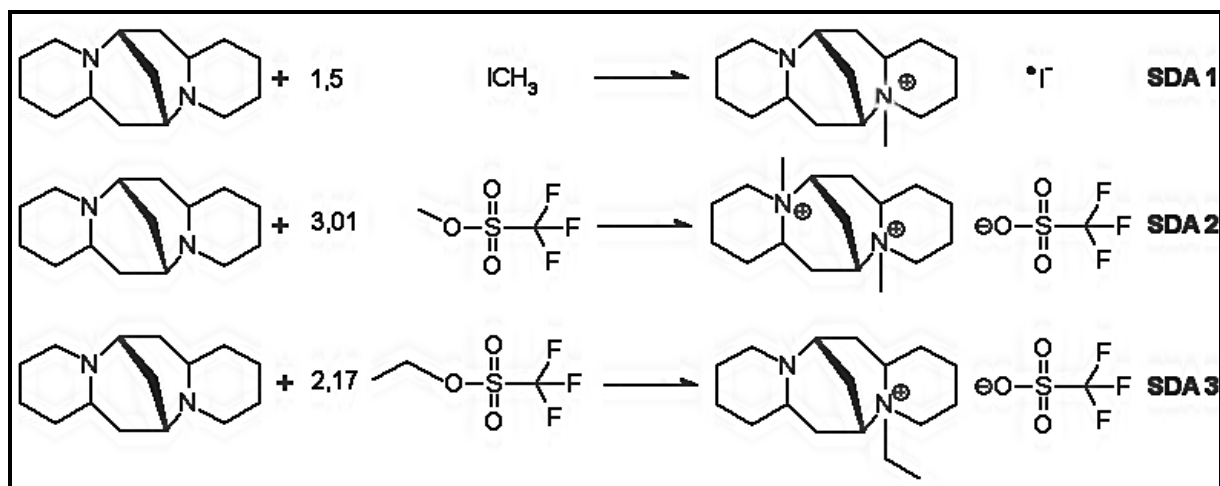
5- Materiais e Métodos

5.1- Materiais Utilizados

Para o desenvolvimento desta pesquisa foram usados o óleo refinado de soja comercial (0,5 wt% de ácidos graxos livres e 1% de água) da Cargill companhia de óleo do Brasil e o metanol anidro (Sigma-Aldrich, 99,8%) para reação de transesterificação. Os reagentes químicos usados para determinação da quantidade de enzimas foram: Coomessie Blue e Albumina de Soro Bovino. Para reações de hidrólise de ésteres foram: 4-nitrofenil palmitato, goma arábica, triton X-100, álcool isopropílico e carbonato de cálcio. Os sais inorgânicos e as bases orgânicas usadas para a preparação das matrizes zeolíticas foram adquiridos da Sigma-Aldrich. A enzima usada foi a PALATASE 20000L (Sigma-Aldrich) uma lipase purificada 1,3 específica de *Rhizomucor miehei* (EC 3.1.1.3), produzida por fermentação submersa de um *Aspergillus oryzae* geneticamente modificado.

5.2- Sínteses dos SDAs (Agentes Direcionadores de Estrutura)

Foram sintetizados três SDAs (SDA 1, SDA 2 e SDA 3), derivados de (S)-Esparteína, segundo os métodos propostos por (ANDY et al, 2000; OKAMOTTO et al, 1982; OGINO, DAVIS 2004). As reações envolvidas na síntese de cada SDA estão descritas no esquema 3.



Esquema 3. Reações envolvidas em cada síntese de SDA preparado a partir de (S)-Esparteína.

5.2.1- Procedimento de Síntese do N(1)- Metil-iso-Esparteínum (MeSPA/SDA 1)

Este composto foi sintetizado da seguinte maneira: 30 mmol de (-) Sulfato de Esparteína Pentahidratado (Aldrich) foram adicionados a 50 mL de uma solução de NaOH (3M). A suspensão foi agitada até a completa dissolução dos cristais em 2 fases. A fase orgânica foi extraída com 25mL de dietil éter (3 extrações) combinadas, lavadas com solução saturada de NaCl, e secadas sobre KCO₃ sólido e posteriormente filtrada. O solvente foi evaporado sob vácuo. O composto (-)-Esparteína foi dissolvido em 100 mL de acetona contendo 1,5 equivalente de iodeto de metila. A reação foi continuada por 48 horas em ausência de luz e acompanhada por TLC. O sólido foi recuperado por filtração e recristalizado em 2- propanol aquecido com adição de uma pequena quantidade de acetato de etila.

5.2.2- Procedimento de Síntese do N-N'- Dimetil-Esparteínum (Me₂SPA/ SDA 2)

Este composto foi sintetizado da seguinte maneira: (-)-Esparteína, 45 gramas foram dissolvidos em 50 mL de tolueno anidro. Uma quantidade de 65 mL de Metil Trifluorometanosulfonato (triflato) foi adicionada gota a gota a esta solução que foi deixada em banho de gelo por um período de 2h. Posteriormente, a mistura reacional foi aquecida a 60°C por 25 horas sob fluxo de ar. O produto começou a precipitar em 30 minutos. A reação foi acompanhada por TLC. Após resfriamento da mistura reacional a temperatura ambiente, o solvente e o triflato que não reagiram foram removidos por evaporação sob pressão reduzida, e o produto bruto foi recolhido. Este produto foi lavado várias vezes com 2- propanol gelado e posteriormente filtrado. O material da filtração foi recristalizado com uma mistura quente de metanol/ acetato de etila.

5.2.3- Procedimento de Síntese do N-Etil- Esparteínum (EtSPA/SDA 3)

Este composto foi sintetizado da seguinte maneira: (-)-Esparteína, 31 gramas foi dissolvida em 50 mL de tolueno anidro. Uma quantidade de 37 mL de Etil Triflorometanosulfonato (triflato) foi adicionada a esta solução e a reação foi feita sob refluxo por 12 horas. A mistura reacional separou em duas fases ao curso de uma hora de reação. Após o resfriamento da mistura reacional a temperatura ambiente, o solvente e o triflato que não reagiram foram removidos por evaporação sob pressão reduzida e o produto bruto foi recolhido. Este produto foi lavado várias vezes com 2-propanol gelado e filtrado. A reação foi acompanhada por TLC. O

produto *EtSPA* foi recristalizado do pó amarelo usando solução de metanol quente e foi coletado como agulhas incolores.

5.3- Procedimentos de Sínteses dos Materiais Zeolíticos

5.3.1- Síntese da Zeólita Faujasita (FAU)

A zeólita faujasita foi sintetizada da seguinte maneira: aluminato de sódio e hidróxido de sódio foram preparados em forma de solução usando água destilada. À solução de aluminato de sódio foi acrescentada uma solução de hidróxido de tetraetilamônio (20% TEAOH em H₂O) com agitação constante durante 15 minutos. Em seguida foi acrescentada a sílica amorfa (Cabosil Grade EH-5) em quantidade suficiente para que a composição molar da reação fosse: 11,3SiO₂: 1,2 Al₂O₃: 4,5 Na₂O: 35,5 TEAOH: 500 H₂O. O gel final foi colocado em reator estático (Parr Instrument Company) e levados à estufa (Lindberg/Blue M MO1440) e a cristalização ocorreu por 10 dias a 75°C. A amostra cristalina foi filtrada e seca a vácuo por 3 dias e, em seguida, foi feita sua análise por difração de raios X. Esta amostra foi denominada de FAU/Na⁺. A zeólita foi convertida para a forma Cu, Zn e Ni por troca iônica com a solução de sal apropriada. Em um típico experimento de troca iônica 1g da Na-Y foi colocado num frasco de teflon junto com 30 mL de solução de 0,5M Cu(NO₃)₂, Ni(NO₃)₂ ou Zn(NO₃)₂ e, depois de 96 horas em 100°C, os produtos foram filtrados, lavados, secos a vácuo, e novamente hidratados dentro de um dessecador. As amostras obtidas foram denominadas FAU/Cu²⁺, FAU/Ni²⁺ e FAU/Zn²⁺.

5.3.2- Síntese da Zeólita Gismondina (GIS)

A zeólita gismondina foi sintetizada de maneira análoga a zeólita faujasita numa reação típica de zeólitas com o uso de aluminato de sódio e hidróxido de sódio, em seguida, foram preparadas em forma de solução usando água destilada, ao contrário da síntese da zeólita faujasita o agente mineralizador foi o hidróxido de tetrapropilamônio. Após dissolução do aluminato de sódio foi acrescentada a solução de hidróxido de tetrapropilamônio (20% TPAOH em H₂O) e agitada por 30 minutos. Em seguida foi acrescentada a sílica amorfa (Cabosil Grade EH-5), em quantidade suficiente para que a composição molar da reação fosse: 1SiO₂: 1Al₂O₃: 4,5 Na₂O: 35,5 TPAOH: 500 H₂O. O gel final foi colocado em reator estático (Parr Instrument Company) e levados à estufa (Lindberg/Blue M MO1440) e a

cristalização ocorreu por 5 dias a 100°C. O precipitado zeolítico foi filtrado, lavado com uma solução contendo NaOH (pH 10) e seco a vácuo. O equilíbrio em constante umidade foi estabelecido em 3 dias (dissecador saturado com KOH, neste caso, obteve-se o produto em uma forma completamente hidratada). Esta amostra foi denominada de GIS/Na⁺. A zeólita foi convertida para a forma Cu, Zn e Ni por troca iônica com a solução de sal apropriada. A troca iônica foi realizada de forma semelhante à descrita no **item 5.3.1** para zeólita faujasita. As amostras obtidas foram denominadas GIS/Cu²⁺, GIS/Ni²⁺ e GIS/Zn²⁺.

5.3.3- Sínteses dos Vanadiosilicatos

A síntese hidrotérmica dos vanadiosilicatos AM-6 isomorfos a zeólita ETS-10 foram adaptadas dos procedimentos experimentais reportados por Rocha et al (1997) e Ismail et al (2009) usando os templates orgânicos derivados de (S)-Esparteína descritos no **item 5.2**. Em uma síntese típica aproximadamente 3 mmol de uma solução aquosa do template orgânico (10,34g, 0,290 mmol OH/g) foram misturados com silicato de sódio (6,26g, Na₂O 8wt%, SiO₂ 27wt%), H₂O (8,03g), NaOH (0,20g), KCl (0,99g) e NaCl (3,08 g). Uma segunda solução foi feita pela mistura de H₂O (7,6g) com VOSO₄.5H₂O (1,5 g). Estas duas soluções foram misturadas e agitadas vigorosamente formando um gel verde. A mistura final foi colocada em um reator estático (Parr Instrument Company) e levadas à estufa (Lindberg/Blue M MO1440) sob a própria pressão gerada pelo sistema por 5 dias em (180°C ou 230°C). Em seguida, os precipitados zeolíticos foram resfriados, filtrados a vácuo e os sólidos foram lavados com água destilada e acetona e, secos à temperatura ambiente. Posteriormente, foram encaminhados para análise de difração de raios X e micrografia eletrônica.

5.4- Grau de Pureza da Enzima

O grau de pureza e a massa molecular aparente 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 SDS. Proteínas conhecidas de baixo peso moleculares (GE) foram utilizadas como padrão de peso molecular. A coloração do gel foi feita utilizando-se Coomassie (SCHÄGGER; VON JAGOW, 1987 e SCHÄGGER, 2006).

5.5- Imobilização Enzimática em Materiais Zeolíticos

A enzima lipase (PALATASE 20000L) foi imobilizada sobre duas zeólitas diferentes: faujasita (FAU) e gismondina (GIS) seguindo o procedimento adaptado das referências (YAGIZ; KAZAN; AKIN, 2007 e MACARIO et al, 2007). Uma quantidade de 0,2g de zeólita foi misturada a uma solução 5mL da lipase de *Rhizomucor meihei* (0,6 mg/mL em 0,3M de tampão fosfato pH 7) e agitada em 200 rpm por 16 horas em temperatura ambiente. O suporte com lipase imobilizada foi separado por centrifugação em 9.300 g, lavado duas vezes com água deionizada e seco a 25 °C “overnight” e armazenado em 4°C por 2 dias 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 et al (2007) pela equação (1).

$$P_g = \frac{C_0V_0 - C_fV_f}{w} \quad (1)$$

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

5.6- Medida de Atividade Enzimática

A atividade enzimática da lipase livre foi determinada pelo método a princípio descrito por Winker & Stuckman (1979) modificado por Kriger (1995) para medir a quantidade em micromoles de *p*-nitrofenol liberada através da hidrólise do *p*-NPP. Uma solução em estoque de *p*-NPP (3 mg/mL) foi preparada em álcool isopropílico (solução A). Outra solução (solução B) foi preparada a partir de goma arábica (0,5%) e Triton X-100 (2%), ambos diluídos em tampão fosfato (pH 7, 0,05 M). Em seguida, 1 mL de solução A foi adicionado a 9 mL de solução B. Em 900 µL da solução final de substrato foram adicionados 100 µL de enzima livre diluída, em seguida, a mistura foi incubada por 1 minuto a 37 °C em banho d' água. O *p*-nitrofenol liberado foi determinado espectrofotometricamente (410 nm) e as medidas foram realizadas em duplicata. Desta maneira, a atividade lipolítica da enzima livre foi calculada de acordo com a equação (2).

$$U = \left(\left\{ \frac{Abs * V_t}{\epsilon * X_e * T} \right\} * 10^3 \right) * D \quad (2)$$

Sendo que,

U = Unidade de atividade enzimática que é expressa em U/mL, no qual uma unidade de atividade é definida como a liberação de 1 µmol de p-nitrofenol liberado a partir de p-NPP/mL.min dentro das condições do ensaio;

Abs = absorbância da amostra à 410nm;

V_t = Volume total da reação (mL);

X_e = Volume da solução da enzima (mL) ou massa da enzima imobilizada;

ε = Coeficiente de Extinção Molar (8,03x10³ L.mol⁻¹.cm⁻¹, pH 7);

T = Tempo de Incubação;

10³ = Fator de correção da unidade de ε ;

D = Diluição da amostra, se houver.

A atividade da lipase imobilizada no suporte zeolítico foi medida utilizando de 2 a 10mg de catalisador misturados a 100 µL de tampão fosfato (pH 7) e 900 µL de substrato e, posteriormente, incubados por 1 minuto a 37 °C em banho de água com paralisação do tempo de incubação por meio de 250 µL da solução de paralisação feita a partir de uma solução de carbonato de sódio (0,1 M) e Triton X-100 (5%) e resfriado em banho de gelo. A atividade lipolítica da enzima imobilizada foi calculada segundo Dizge et al. (2009), equação (3).

$$\text{Atividade da Lipase (U/mg - suporte)} = \frac{\text{atividade da lipase imobilizada}}{\text{quantidade do suporte usado}} \quad (3)$$

5.7- Transesterificação para Produção de Biodiesel

A transesterificação do óleo de soja a biodiesel foi feita com três diferentes catalisadores: enzima livre, zeólitas puras (GIS/Ni²⁺ e GIS/Zn²⁺) e complexo enzima/zeólita (GIS/Ni²⁺/ENZ e GIS/Zn²⁺/ENZ). Vários experimentos foram realizados com o objetivo de obter as melhores condições para as reações e também condições que permitam uma comparação entre os três catalisadores. As

reações de transesterificação com a enzima livre foram realizadas com uma razão óleo/metanol de 1:5 em 37°C que é a temperatura ótima para esta enzima (o metanol foi adicionado lentamente para não ocorrer a inativação da enzima). Após 72 horas de reação, os produtos (biodiesel e glicerol) foram separados por centrifugação em 9.300g. Reações de transesterificação feitas pelo catalisador enzima/zeólita (GIS/Ni²⁺/ENZ e GIS/Zn²⁺/ENZ) foram feitas com uma razão óleo/metanol de 1:5 em 37°C/72 horas. As reações de transesterificação usando as zeólitas (GIS/Ni²⁺ e GIS/Zn²⁺) como catalisadores foram realizadas com uma razão óleo/metanol de 1:10 em 37°C/72 horas. Após a reação, o excesso de metanol foi evaporado sob pressão reduzida e o produto foi separado por centrifugação.

5.8- Análises do Biodiesel

O biodiesel obtido nos experimentos foi submetido à análise cromatográfica para a determinação do teor de ésteres metílicos.

5.8.1- Análises por Cromatografia de Camada Delgada (TLC)

As análises de TLC (*Thin Chromatography Layer*) foram realizadas seguindo a metodologia proposta por Yang et al (2009). Num intervalo de tempo predeterminado, um pequeno volume (100 µL) da mistura reacional foi retirado e misturado com 500 µL de hexano por 2 min. Após a separação por centrifugação, 3 µL 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 mergulhadas na solução de revelação, metanol/ácido sulfúrico (1:1), e finalmente aquecidas em alta temperatura e analisadas.

5.8.2- Análises por Cromatografia Gasosa do Teor dos Ésteres Metílicos

As análises cromatográficas para a determinação dos teores de ésteres metílicos foram realizadas na usina de biodiesel do Grupo Bertin em Lins – SP através de uma cooperação entre o nosso grupo de pesquisa e a empresa. Foram 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 (*metil heptadecanoato*) que é adequado para biodiesel com ésteres metílicos entre C₁₄ e C₂₄. Os reagentes utilizados para a análise de determinação do teor dos ésteres metílicos foram: n-heptano 95% e metil heptadecanoato com pureza conhecida (mínimo 99%).

5.8.2.1- Equipamento e parâmetros utilizados na análise de ésteres

As análises foram realizadas utilizando um Cromatógrafo a gás, modelo 450GC. Foi utilizada a coluna WCOT Fused Sílica (10M x 0,53MM ID) CP 7620. As condições de análise para determinação de ésteres metílicos por cromatografia gasosa estão na tabela 1.

Tabela 1. Condições de análise para determinação de ésteres metílicos por cromatografia gasosa.

<i>Parâmetros de análise</i>		
Coluna Capilar revestida com fase estacionária de polietileno glicol		
Comprimento		30 m
Diâmetro interno		0,33 mm
Espessura do filme		0,25 µm
Injetor tipo <i>Split</i> com fluxo variável		
Fluxo do Split		20 mL/min a 100 mL/m
Temperatura		250 °C
Gás de arraste: hidrogênio ou hélio		
Pressão		30 kPa a 100 kPa
Fluxo		1 mL/min a 2mL/min
Detector de ionização de chama		
Temperatura		250 °C
Forno		
Temperatura		200 °C

5.8.2.2- Procedimento da análise e cálculo da porcentagem de ésteres metílicos

No procedimento usado para a determinação do conteúdo de ésteres metílicos, primeiramente foi pesado 250mg do éster metílico (amostra) em um vial de 10 mL. Posteriormente, foram adicionados 5 mL de uma solução de heptadecanoato de metila (padrão interno). O teor de ésteres metílicos foi calculado conforme a equação (4).

$$C = \frac{(\sum A) - AEI}{AEI} * \frac{CEI * VEI}{m} * 100\% \quad (4)$$

Na qual,

$\sum A$ = Soma da área total dos picos de ésteres metílicos de C14 até C 24:1

AEI = Área do pico correspondente ao metil heptadecanoato

CEI = Concentração do heptadecanoato de metila (mg/mL)

VEI = Volume do heptadecanoato de metila (mL)

m = Massa da amostra (mg)

6- RESULTADOS

6.1- Sínteses das Zeólitas Faujasita (FAU) e Gismondina (GIS)

Seguindo as metodologias descritas anteriormente **nos itens 5.3.1 e 5.3.2** foram feitos alguns experimentos de sínteses de zeólitas tradicionais (**FAU e GIS**) nas condições de química sol-gel. Nas figuras 16 e 17 estão o difratograma de raios-X e a micrografia eletrônica de varredura da zeólita faujasita. Os padrões de DRX e micrografia eletrônica de varredura da zeólita gismondina, respectivamente, estão apresentados nas figuras 18 e 19. Os dados obtidos tanto para zeólita faujasita como para zeólita gismondina estão de acordo com os padrões de difração calculados, conforme reportado na literatura, vide tabelas 2 e 3 (BAERLOCHER; MEIER; OLSON, 2001, e ALBERT et al,1998).

Tabela 2. Dados cristalográficos do ângulo de difração 2 theta ($^{\circ}$) e intensidade relativa de sinal dos padrões de difração calculados para a zeólita faujasita Na-Y.

2 θ	I/I ₀	2 θ	I/I ₀	2 θ	I/I ₀
6,31	100,0	28,26	0,2	40,03	0,2
10,31	18,6	30,66	1,5	41,28	0,4
12,10	12,5	31,29	0,7	41,28	0,2
14,61	0,3	31,29	1,9	42,14	0,6
15,92	16,0	31,95	0,5	42,66	0,1
17,91	0,1	31,95	4,4	43,51	0,1
19,01	4,3	33,03	1,2	44,01	0,1
19,01	0,2	33,06	0,5	44,01	0,5
20,71	6,4	33,87	0,1	44,18	0,2
21,67	0,3	34,69	2,4	44,84	0,3
21,98	0,1	35,29	1,0	44,84	0,7
23,19	1,3	36,28	0,3	46,61	0,1
24,06	7,6	36,87	0,2	48,03	0,1
25,44	0,3	37,82	0,2	48,03	0,2
26,24	1,2	38,38	0,1	48,65	1,1
27,52	4,6	38,57	1,1		

Fonte: Treacy & Higgins (2001).

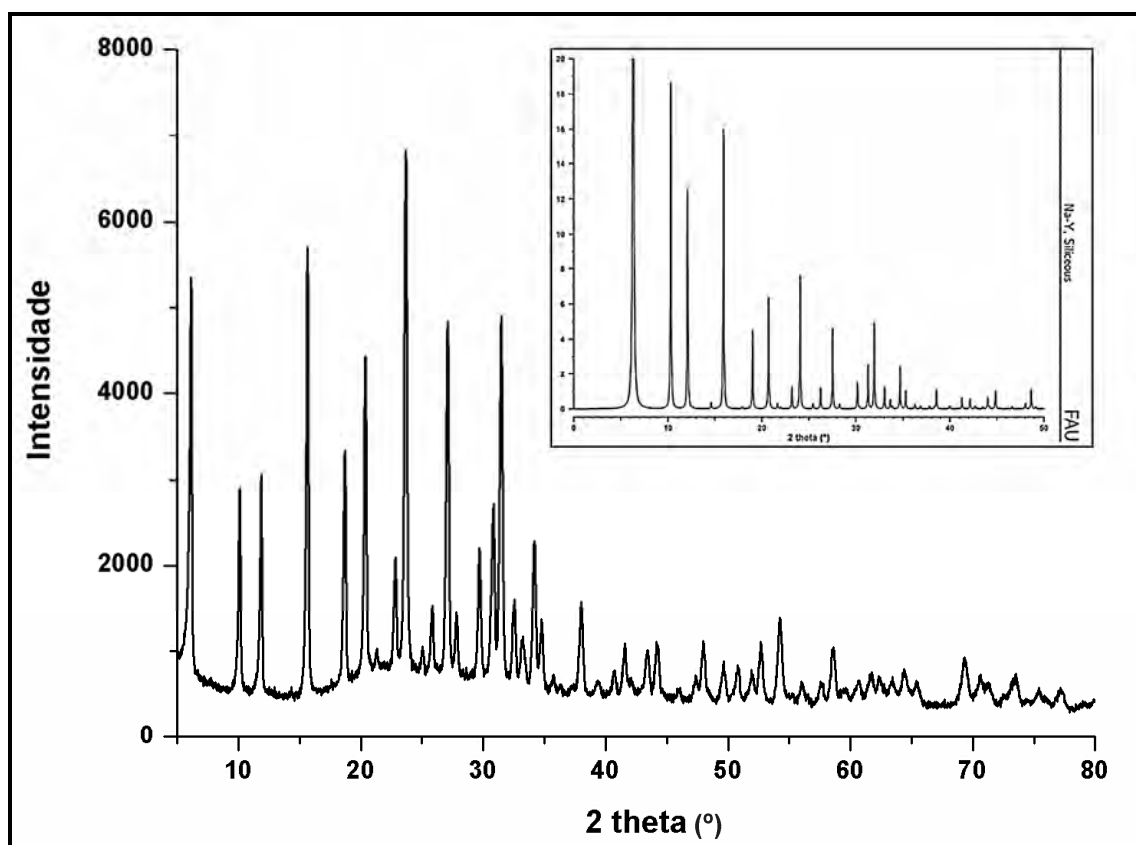


Figura 16. Difratoograma experimental e o padrão simulado da zeólita faujasita.

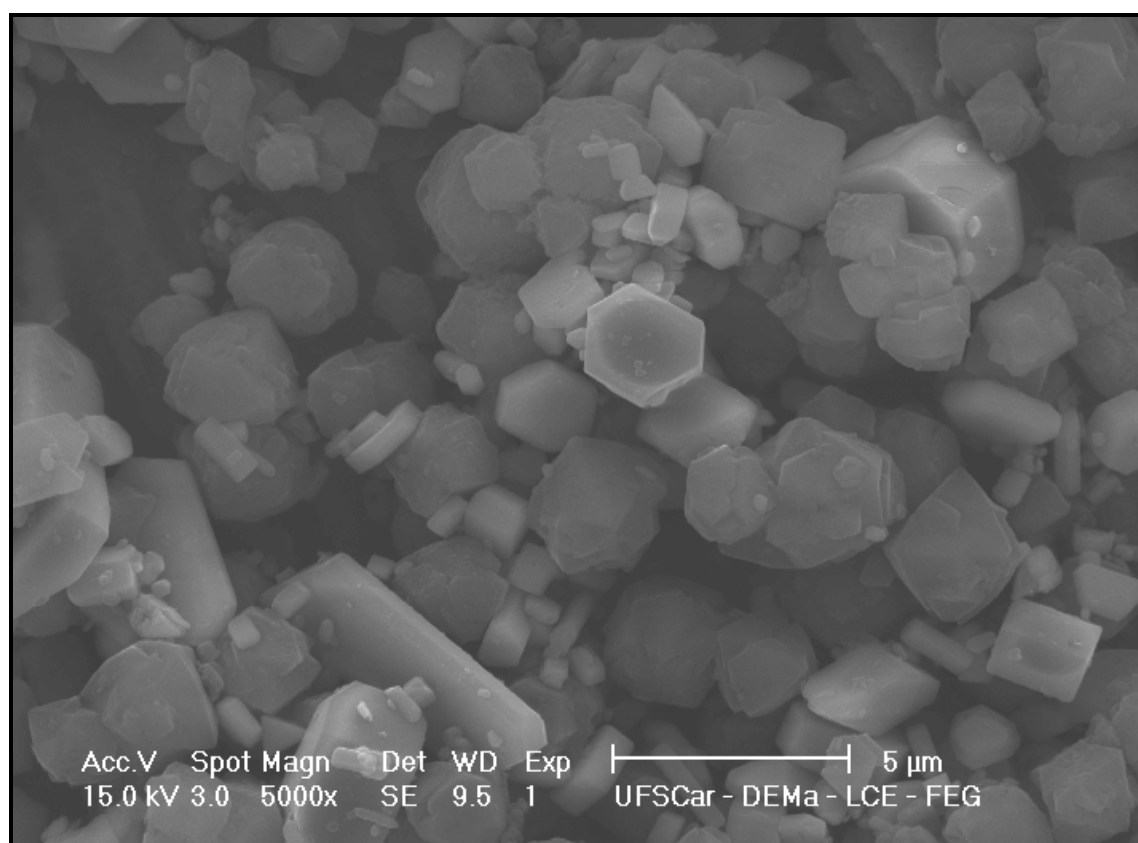


Figura 17. Micrografia eletrônica da zeólita faujasita.

Tabela 3. Dados cristalográficos do ângulo de difração 2 theta ($^{\circ}$) e intensidade relativa de sinal dos padrões de difração calculados para a zeólita gismondina Na-P1.

2 θ	I/I ₀	2 θ	I/I ₀	2 θ	I/I ₀
12,46	92,1	33,38	11,5	44,18	0,5
12,46	1,0	33,38	12,7	44,18	0,4
17,66	60,6	33,38	7,5	46,08	0,2
17,66	2,7	35,76	6,8	46,08	0,1
21,67	13,3	38,01	0,4	46,08	3,3
21,67	66,1	38,01	0,6	46,08	2,2
21,67	7,0	38,01	1,0	46,08	11,1
25,08	0,8	38,01	0,3	46,08	0,9
25,08	1,1	38,01	12,0	46,08	1,6
28,10	1,6	40,15	1,4	46,08	2,0
28,10	100,0	40,15	0,9	46,08	1,8
28,10	34,9	40,15	2,3	49,72	0,2
30,84	9,0	42,20	1,0	49,72	2,9
33,38	3,5	42,20	0,3	49,72	0,7
33,38	45,0	42,20	1,0	49,72	0,3
33,38	1,2	44,18	6,5		

Fonte: Treacy & Higgins (2001).

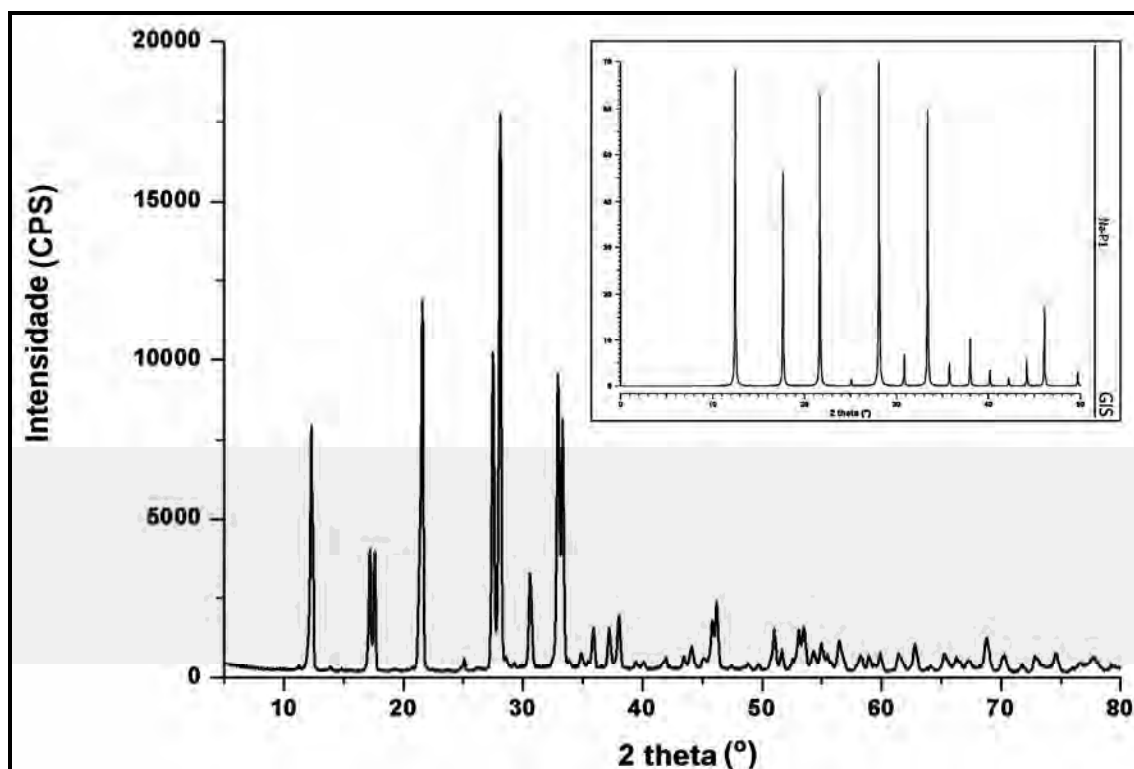


Figura 18. Difratograma experimental e o padrão simulado da zeólita gismondina.

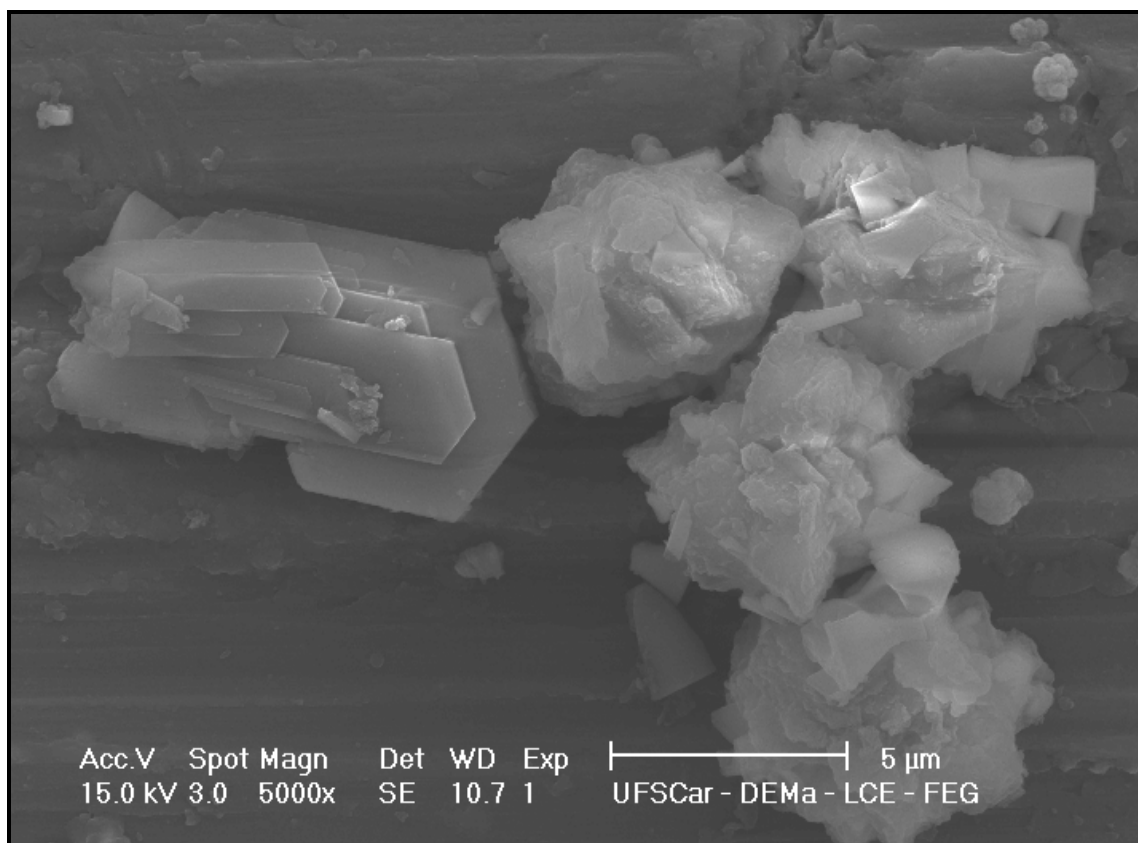


Figura 19. Micrografia eletrônica da zeólita gismondina.

6.2- Comportamento dos Materiais Zeolíticos após o Pré-Tratamento

Após as sínteses, as zeólitas foram submetidas a dois tipos de pré-tratamento antes da imobilização enzimática. Estes tratamentos foram troca iônica e tratamento térmico. Zeólitas em sua maioria encontram-se em fases policristalinas e a DRX é uma técnica essencial para a caracterização estrutural das mesmas. A difração de raios-X de materiais policristalinos é útil na identificação de um material, pois cada material policristalino apresenta um padrão de difração único. A determinação dos parâmetros de cela unitária, monitoração das transições de fase, avaliação de um tratamento pós-síntese na indução, ou não, as mudanças estruturais, verificação de uma amostra se é amorfa ou cristalina, são também possíveis de serem avaliadas usando esta técnica (McCUSKER; BAERLOCHER, 2007).

6.2.1- Troca Iônica da Zeólita Faujasita

De acordo com a metodologia descrita **no item 5.3.1** foi realizada a troca iônica da zeólita faujasita com três diferentes cátions: cobre, zinco e níquel. Após a troca iônica dos materiais foram estudados os difratogramas de raios-X das amostras

faujasitas trocadas com os diferentes cátions (Cu^{2+} , Zn^{2+} e Ni^{2+}) em comparação ao da FAU na sua forma sódica, a fim de observar se ocorreu alguma mudança na estrutura cristalina da zeólita após a realização da troca iônica.

Os difratogramas das amostras da zeólita faujasita trocadas com níquel ($\text{FAU}/\text{Ni}^{2+}$) e com zinco ($\text{FAU}/\text{Zn}^{2+}$) estão apresentados respectivamente nas figuras 20a e 20b. Uma análise dos padrões de DRX das amostras ($\text{FAU}/\text{Zn}^{2+}$) e ($\text{FAU}/\text{Ni}^{2+}$) revela que não houve nenhuma mudança estrutural significativa comparada com a amostra original (FAU/Pura), (figura 20d). Todavia, para a amostra trocada com cobre ($\text{FAU}/\text{Cu}^{2+}$), (figura 20c), ocorreram mudanças devido a incorporação dos cátions de cobre que podem ser percebidas nos DRXs, principalmente nas regiões indicadas pelas setas pretas.

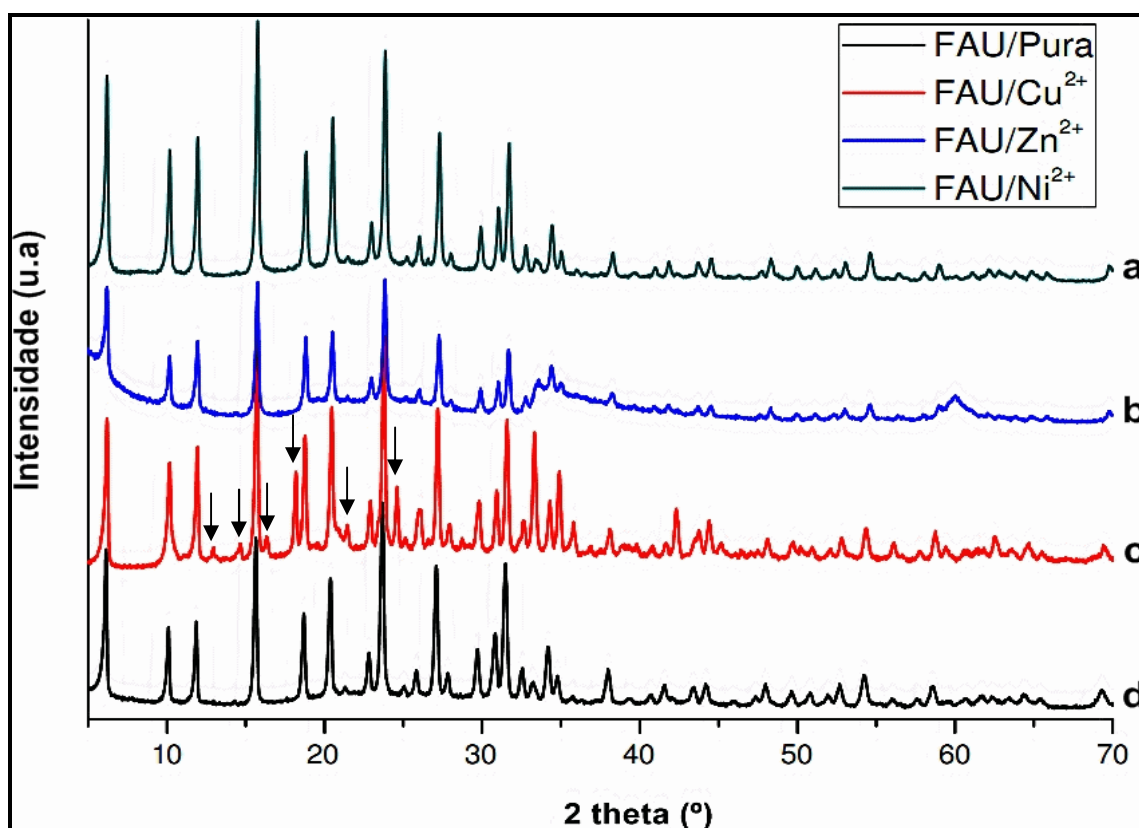


Figura 20. Difratoograma da zeólita faujasita trocada com os cátions de níquel (a), zinco (b) e cobre (c) em comparação com a sua forma sódica (d).

6.2.2- Troca iônica da Zeólita Gismondina

Foram realizados estudos dos difratogramas de raios-X da zeólita gismondina trocada com os cátions (Cu^{2+} , Zn^{2+} e Ni^{2+}) em comparação ao da gismondina na sua forma sódica, a fim de observar se ocorreu alguma mudança na estrutura cristalina da zeólita após a realização da troca iônica.

O padrão de DRX da zeólita gismondina trocada com níquel, (figura 21a), apresenta características semelhantes ao da zeólita GIS na sua forma sódica, (figura 21d). Desta forma, podemos considerar que a troca iônica dessa zeólita com esse cátion não provocou nenhuma mudança estrutural significativa. Todavia, a análise do padrão de DRX para a zeólita trocada com zinco (GIS/ Zn^{2+}), (figura 21a), mostra a ausência de picos de difração anteriormente observados na região de 2 teta (12,0; 17,2; 17,6; 30,0), entre outros picos de difração de baixa intensidade, assim podemos observar que ocorreu uma mudança em comparação com a GIS/pura (figura 21d). No caso da troca iônica realizada com o cátion de cobre (figura 21c) a análise comparativa dos picos de difração mostra uma mudança estrutural significativa em relação a amostra original (GIS/Pura). Nota-se a existência de novos picos no padrão de DRX da amostra, indicando a formação de uma nova estrutura cristalina.

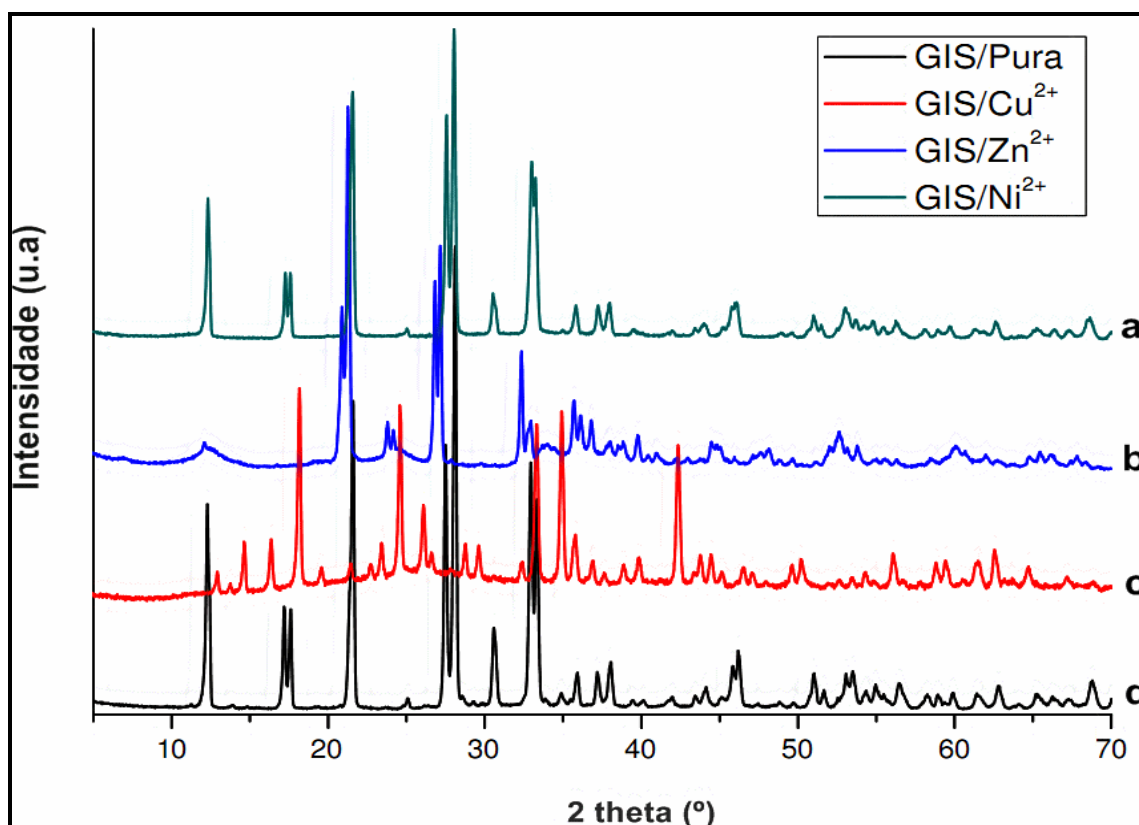


Figura 21. Difratograma da zeólita gismondina trocada com os cátions de níquel (a), zinco (b) e cobre (c) em comparação com a sua forma sódica (d).

6.2.3- Tratamento Térmico da Zeólita Gismondina

As amostras (GIS/ Cu^{2+} , GIS/ Zn^{2+} e GIS/ Ni^{2+}) foram submetidas a um tratamento térmico em duas diferentes faixas de temperatura a 200°C e a 550°C, de

acordo com a seguinte rampa de temperatura para amostra tratada a 200°C: 25-100°C (1hora), 100-150°C (1/2hora) e 150-200°C (1/2hora). Após atingir a temperatura desejada (200°C), a amostra permaneceu nessa faixa de temperatura por 1 hora.

O mesmo procedimento foi adotado para a amostra tratada a 550°C, porém com uma rampa de temperatura diferente: 25-100°C (1/2 hora), 100-150°C (1/2 hora), 150-200°C (1hora) e 200-550°C (3horas). O objetivo desse tratamento térmico é observar a ocorrência de mudanças estruturais em função da remoção de moléculas de águas adsorvidas na superfície das zeólitas e das águas cristalográficas.

A figura 22 mostra os difratogramas da amostra de zeólita GIS/Cu²⁺ a temperatura ambiente e termicamente tratadas a 200°C e a 550°C. A comparação dos padrões DRXs da amostra tratada termicamente a 200°C, com o difratograma da GIS/Cu²⁺ sem tratamento térmico, mostra um idêntico padrão de difração. Todavia, o tratamento térmico a 550°C desse material revela um colapso na estrutura da zeólita GIS/Cu²⁺.

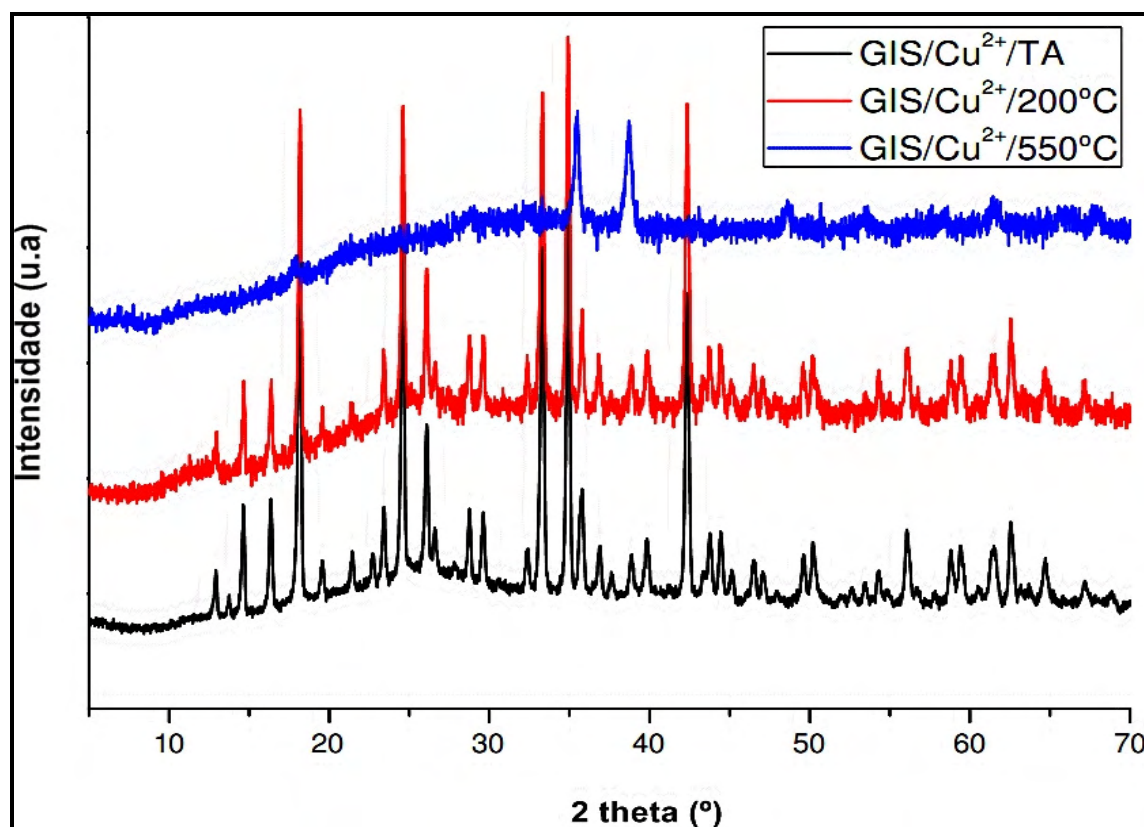


Figura 22. Difratograma da zeólita gismondina trocada com cobre sem pré-tratamento térmico em comparação com a GIS pré-tratada a 200°C e a 550°C.

A análise dos DRX, figura 23, demonstra que a amostra da zeólita GIS trocada com zinco tratada a 200°C apresenta características cristalográficas semelhantes em comparação com GIS/ Zn^{2+} a temperatura ambiente, todavia o pré-tratamento térmico a 550°C leva a formação de uma nova estrutura cristalina que se encontra em fase de caracterização.

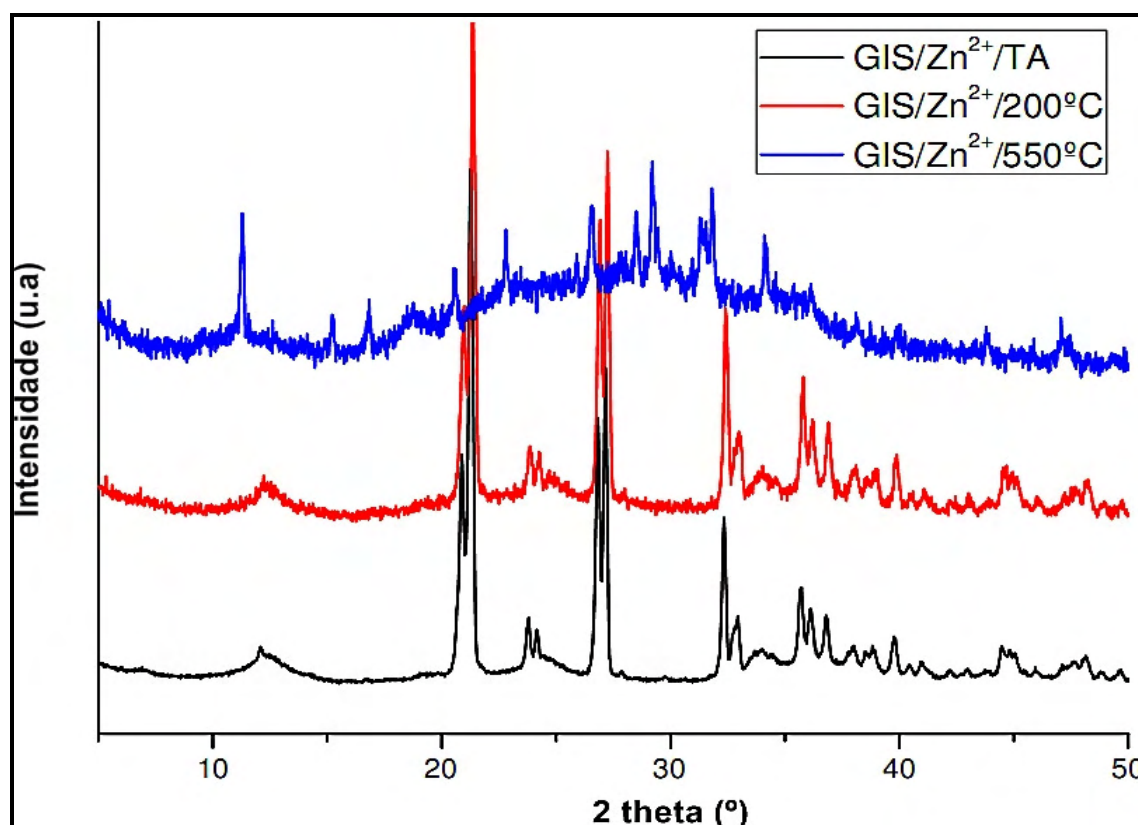


Figura 23. Difratoograma da zeólita gismondina trocada com zinco sem pré-tratamento térmico em comparação com a GIS pré-tratada a 200°C e a 550°C.

A figura 24 apresenta os dados de DRX para a amostra GIS/ Ni^{2+} a temperatura ambiente e as amostras tratadas termicamente a 200°C e a 550°C. Surpreendentemente, os dados de DRX revelam que a amostra GIS/ Ni^{2+} apresenta uma resistência térmica muito interessante, pois o tratamento térmico a 550°C não afeta a cristalinidade da amostra original. Em geral, a zeólita GIS/ Na^+ colapsa em torno de 320°C (Nery et al, 2003; Albert et al, 1998), e mesmo este material trocado com outros cátions tais como Mn^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} (Nery et al, 2003) revelam que o máximo de resistência térmica ocorre em torno de 350°C. O fato do material trocado com Ni^{2+} apresentar esta resistência térmica, o habilita a ser um material

com grande potencial de uso em processos catalíticos industriais visto que os mesmos ocorrem em temperatura em torno de 550-700°C.

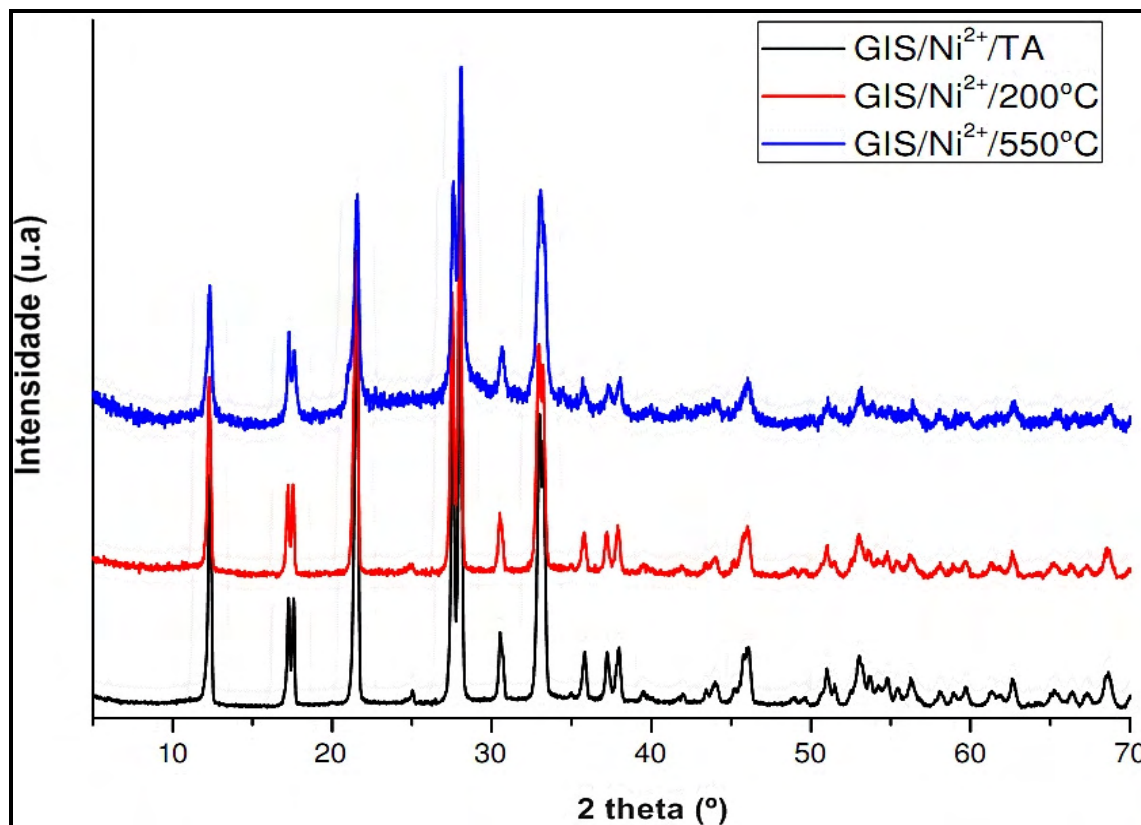


Figura 24. Difratograma da zeólita gismondina trocada com níquel sem pré-tratamento térmico em comparação com a GIS pré-tratada a 200°C e a 550°C.

6.3- Inibição da Lipase pelo Cátion Presente na Solução

A atividade das enzimas é sensivelmente inibida por alguns cátions metálicos. No intuito de compreender e prevenir essa possível inibição, nesta etapa do trabalho, foi feita a análise do efeito inibitório dos cátions de cobre, zinco e níquel na atividade lipolítica da lipase de *Rhizomucor meihei* através da hidrólise do *p*-NPP.

A representação gráfica da atividade enzimática medida para as três diferentes concentrações de solução de cobre (0,001M, 0,01M e 0,02M) está representada na figura 25. Os dados revelam que houve um decréscimo da atividade enzimática com o aumento na concentração de cobre em solução. Observa-se que a atividade enzimática obtida nas concentrações (0,001M, 0,01M e 0,02M) foram (93,8%, 75,3% e 36,9%, respectivamente) em relação a atividade inicial, indicando que o cátion de cobre é um forte agente inibidor da enzima em

questão. Desta forma, caso ocorra a lixiviação do cobre durante o processo de imobilização poderá levar a diminuição da eficiência do catalisador enzimático.

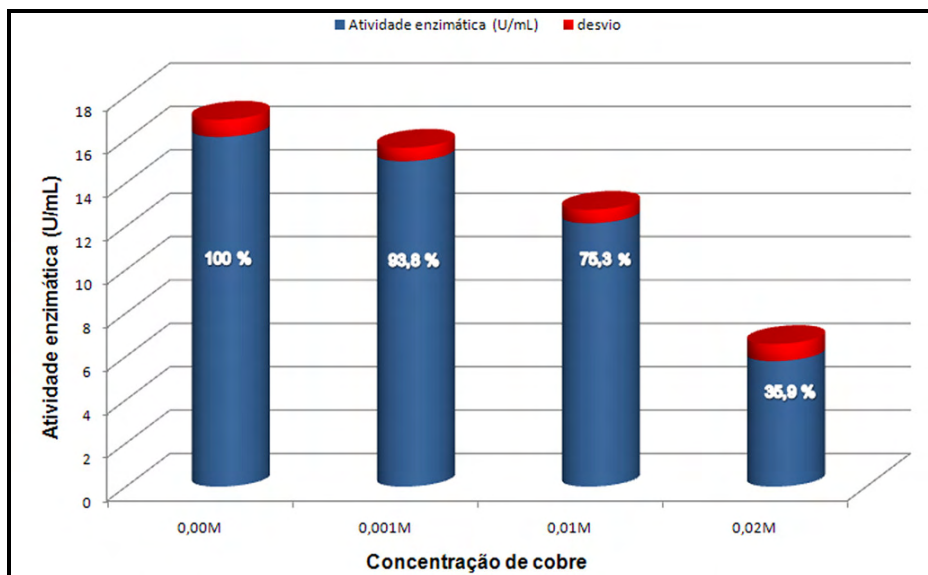


Figura 25. Inibição enzimática pelo cátion de cobre. Os testes de atividade para enzima livre foram realizados conforme descrito no **item 5.6** para enzima 50 (x) diluída.

A análise do gráfico de atividade enzimática para o cátion de zinco nas três diferentes concentrações (0,001M, 0,01M e 0,02M), figura 26, mostra que ocorreu uma pequena diminuição na atividade enzimática que foram 87,8%, 85,5% e 87,4%, respectivamente, da atividade medida na ausência desse cátion em solução. Essa ligeira diminuição indica que o cátion de zinco não é um forte inibidor da enzima em questão. Portanto, se o cátion de zinco for lixiviado do suporte zeolítico no processo de imobilização esse cátion não diminuirá significativamente a eficiência do catalisador enzimático, pois mesmo na concentração de 0,02M de zinco em solução houve pouca interferência do cátion na atividade enzimática determinada experimentalmente.

A figura 27 mostra o gráfico de atividade enzimática para o cátion de níquel nas três diferentes concentrações (0,001M, 0,01M e 0,02M), as porcentagens de atividade enzimática (95,0%, 93,8% e 88,0%, respectivamente) foram bastante semelhantes quando comparadas com a atividade na ausência do cátion, pois mesmo na concentração de 0,02M a perda foi de apenas 12% da atividade inicial, esses dados sugerem que a enzima é levemente inibida pela presença do cátion de níquel na solução.

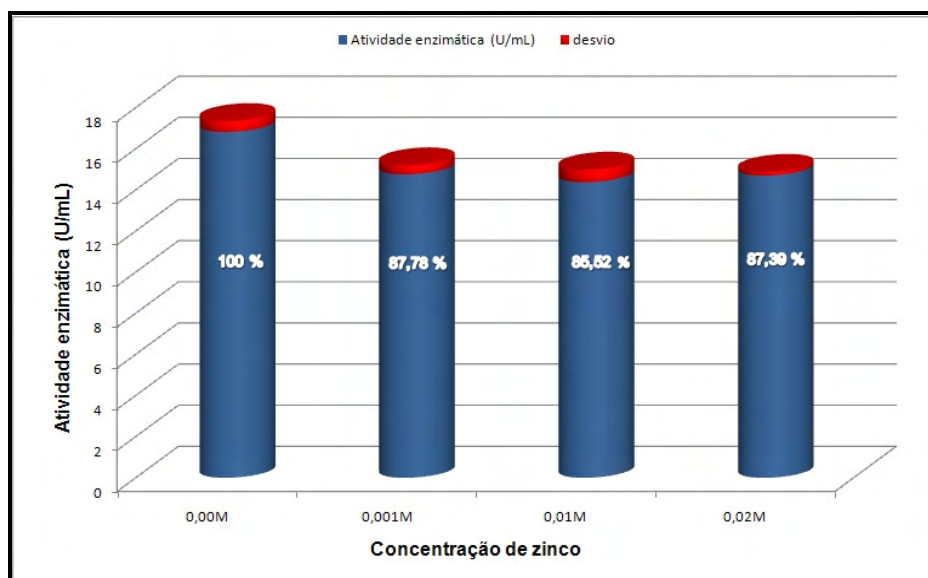


Figura 26. Inibição enzimática pelo cátion de zinco. Os testes de atividade para enzima livre foram realizados conforme descrito no **item 5.6** para enzima 50 (x) diluída.

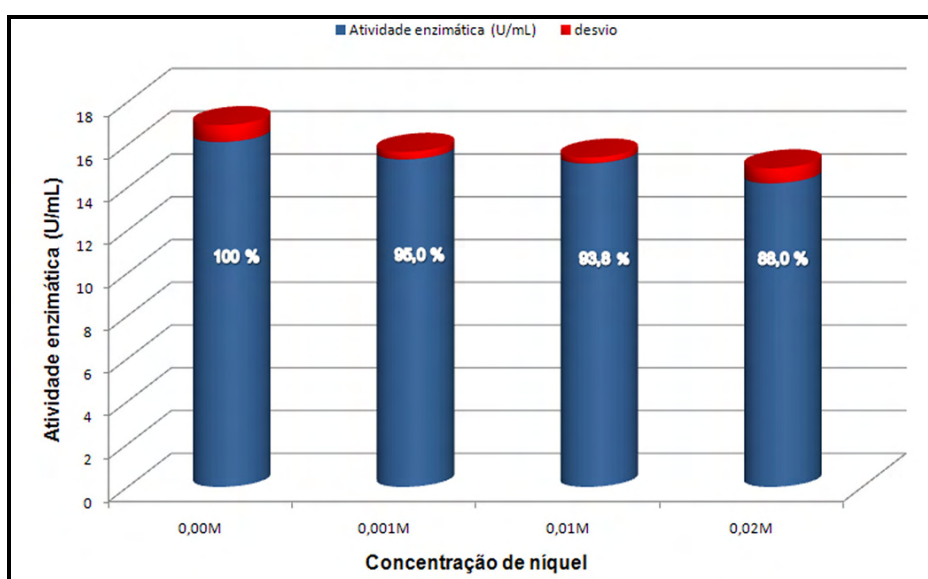


Figura 27. Inibição enzimática pelo cátion de níquel. Os testes de atividade para enzima livre foram realizados conforme descrito no **item 5.6** para enzima 50 (x) diluída.

Sendo assim, em vista do conjunto de dados obtidos para a atividade enzimática na presença dos cátions Cu^{2+} , Zn^{2+} e Ni^{2+} podemos observar que o cobre é um forte agente inibidor da enzima em questão.

6.4- Grau de Pureza da Enzima

O grau de pureza da enzima foi determinado conforme descrito no **item 5.4** pela técnica SDS-PAGE. A figura 28 mostra os dados relacionados à enzima 10 μ L (raia 1) e 5 μ L (raia 2). A seta mostrada na figura indica a banda eletroforética correspondente à lipase produzida por *Rhizomucor miehei*, com peso molecular aproximado de 47 kDa, a raia 3 corresponde a padrões de proteínas de pesos moleculares conhecidos. Nota-se a partir desse ensaio que a lipase utilizada apresenta uma pequena quantidade de impureza, pois uma banda eletroforética, cujo peso molecular estimado foi da ordem de 21 kDa pode ser observada, principalmente, na raia 1, a qual foi adicionada uma quantidade maior da enzima estudada.

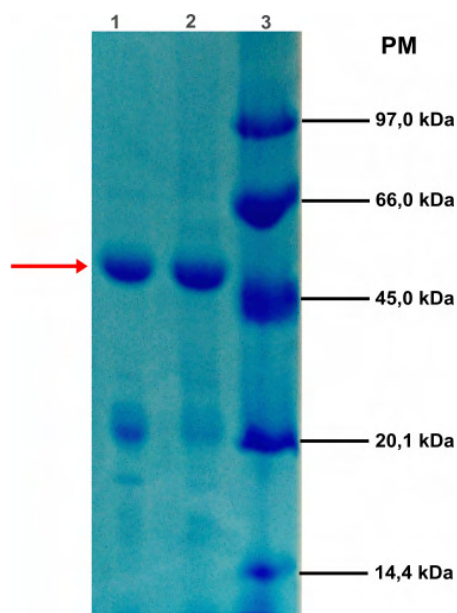


Figura 28. Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida, para a localização e a determinação do grau de pureza da enzima. Raia 1- alíquota de 10 μ L da amostra de enzima, raia 2- alíquota de 5 μ L da amostra de enzima e raia 3- padrões de proteínas de pesos moleculares conhecidos.

6.5- Imobilização e Atividade Enzimática para Diferentes Suportes Zeolíticos

Zeólitas com diferentes estruturas (FAU) e (GIS) foram testadas como suportes para a imobilização enzimática. Os estudos de imobilização foram conduzidos através da variação de dois parâmetros importantes na química de zeólitas: o meio catiônico dominante (troca iônica) e a estabilidade térmica das zeólitas (temperatura de calcinação).

O efeito da natureza dos cátions de compensação foi avaliado através da troca iônica para ambos os suportes zeolíticos (FAU e GIS), de acordo com as **seções 5.3.1 e 5.3.2**, com diferentes cátions: Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} e Na^+ .

O efeito do tratamento térmico do suporte foi avaliado em duas diferentes faixas de temperatura a 200°C e a 550°C. Neste caso o pré-tratamento a 200°C permite a eliminação das águas adsorvidas na superfície da zeólita. No pré-tratamento térmico a 550°C o suporte é calcinado, assim, além da eliminação das águas adsorvidas na superfície ocorre a remoção das águas cristalográficas, a qual ocupa espaços vazios dentro de cavidades e canais das zeólitas, em sítios cristalográficos específicos (GONÇALVES et al, 1997).

A tabela 4 apresenta os valores de imobilizações e atividades enzimáticas em função do tratamento térmico e do meio catiônico dominante na zeólita faujasita.

Os dados revelam que para os suportes FAU/ Na^+ , FAU/ Zn^{2+} , FAU/ Ni^{2+} e FAU/ Cu^{2+} o tratamento térmico, tanto a 550°C como a 200°C, não tiveram nenhum efeito na atividade enzimática. Neste caso, verifica-se que a atividade enzimática é a mesma para os suportes tratados a 200°C e a 550°C. Os dados também indicam que, nesse caso, é possível correlacionar os valores de atividade enzimática com a quantidade de enzima imobilizada e, essa correlação pode ser deduzida nas equações 2 e 3, **seção 5.6**.

A coerência dos dados apresentados na tabela 4 indica que o tratamento térmico não afeta a quantidade de enzima imobilizada e nem a atividade enzimática. Esse padrão é bastante particular para o sistema faujasítico, pois a zeólita faujasita é uma zeólita termicamente estável e sua estrutura cristalográfica resiste a temperaturas acima de 800°C, sendo essa uma das razões para o emprego desses materiais em refinarias de petróleo. Esses dados demonstraram que, a estrutura cristalográfica do suporte em questão tem influência na imobilização das enzimas, pois como veremos adiante no caso da zeólita gismondina os resultados são completamente diferentes em relação aos que foram observados para a zeólita faujasita.

Os dados na tabela 4 também permitem avaliar os parâmetros de imobilização e atividade enzimática, para o sistema faujasítico em função do meio catiônico dominante. Se analisarmos, primeiramente, as porcentagens de imobilização da enzima nos suportes zeolíticos pré-tratados a 200°C, os dados irão indicar que a maior imobilização ocorre para FAU/ Zn^{2+} ($32,0 \pm 1,2\%$), enquanto a

menor imobilização ocorre para faujasita na sua forma sódica FAU/Na⁺ ($10,0 \pm 0,4\%$), e também para o complexo FAU/Ni²⁺ ($10,3 \pm 0,5\%$), enquanto o complexo FAU/Cu²⁺ apresenta valores intermediários ($22,1 \pm 0,6\%$). A análise se torna mais interessante, quando se correlaciona não apenas a porcentagem de enzimas imobilizadas em função do meio catiônico dominante, como também a atividade enzimática. Nesse caso podemos observar que a maior atividade enzimática está no suporte FAU/Ni²⁺ que apresentou uma imobilização de $10,3 \pm 0,5\%$ e uma atividade enzimática de 0,120 U/mg-suporte. Esse dado é diferente em relação ao suporte FAU/Na⁺ que também apresenta uma porcentagem de imobilização de $10,0 \pm 0,4\%$, porém, uma menor atividade de 0,053 U/mg-suporte.

O sistema faujasítico pré-tratado a 200°C permite, seguramente, 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.

A discussão dos dados obtidos para o sistema faujasítico pré-tratados a 550°C (tabela 4) evidencia, fortemente, a correlação entre a porcentagem de enzima imobilizada, a atividade enzimática e a estrutura cristalográfica do suporte zeolítico. Em geral, os dados revelam que não há uma diferença significativa em relação aos dados obtidos a 200°C. Por exemplo, os resultados obtidos para FAU/Na⁺ tanto a 200°C quanto a 550°C são praticamente os mesmos, e um padrão semelhante ocorre para o complexo FAU/Ni²⁺. Todavia, para o sistema FAU/Cu²⁺ e FAU/Zn²⁺, os dados obtidos 200°C e a 550°C apresentam uma diferença significativa entre si.

Para o sistema FAU/Zn²⁺ ocorre uma queda na porcentagem de enzima imobilizada de $32,0 \pm 1,2\%$ para $19,1 \pm 0,6\%$, enquanto para o sistema FAU/Cu²⁺ a situação é oposta, pois nesse caso ocorre um aumento da porcentagem de enzima imobilizada de $22,1 \pm 0,6\%$ para $27,9 \pm 1,2\%$. Uma possível explicação para esses dois comportamentos pode estar relacionada ao comportamento de troca iônica dos cátions Cu²⁺ e Zn²⁺. Vários estudos físico-químicos e cristalográficos a respeito da troca iônica de Cu²⁺ em estruturas zeolíticas revelam que, em geral, os sítios cristalográficos preferenciais pelos cátions de Cu²⁺ são os sítios SI e SII. O sítio cristalográfico SI está localizado no centro do prisma hexagonal do anel duplo (D6R) que permite acesso ao centro da gaiola sodalítica da zeólita faujasita.

É provável que o tratamento a 200°C teria induzido um maior preenchimento do sítio SII, isso implica que os cátions de Cu^{2+} estão mais afastados da superfície da zeólita, e que a 550°C tem ocorrido o maior preenchimento do sítio SI, o que implicaria num maior preenchimento do prisma hexagonal, e uma maior concentração de Cu^{2+} mais próximo a superfície da zeólita (PALOMINO; BORDIGA; ZECCHINA, 2000).

O caso do sistema FAU/ Zn^{2+} poderia ser explicado da mesma maneira, porém, o tratamento a 550°C levaria a um maior preenchimento de sítios cristalográficos SIII e SIV localizados dentro das super gaiolas faujasíticas. Todavia, uma afirmação mais segura só poderia ser feita após um meticuloso estudo cristalográfico das matrizes zeolíticas antes da imobilização. Nesse caso, o estudo envolveria a análise estrutural pelo método de Rietveld com dados coletados com radiação sincrotrônica (FOWKES; IBBERSON; ROSSEINSKY, 2002).

Outro parâmetro bastante relevante apresentado na tabela 4 é a atividade residual, pois através desse parâmetro podemos identificar se ocorreu ou não lixiviação dos cátions durante o processo de imobilização das enzimas nos suportes zeolíticos, visto que lixiviação é um fenômeno bastante comum para determinados sistema zeolíticos. Na **seção 6.3** são apresentados os resultados experimentais para os cátions em estudo no tocante à sua capacidade de inibir a ação das enzimas. Os dados indicam que dos três cátions em estudo, o cobre apresenta maior capacidade de inibição enzimática (35,9% em concentração de 0,02M/ Cu^{2+}). Comparando os dados apresentados na **seção 6.3** com os dados da tabela 4 e correlacionando-os com os parâmetros de atividade residual e porcentagem de enzima imobilizada, podemos afirmar que para o sistema faujasítico não ocorre lixiviação para nenhum dos suportes zeolíticos estudados. O sistema FAU/ Na^+ foi usado como um branco para os outros sistemas, visto que o cátion de sódio não tem nenhuma influência inibidora na enzima e as porcentagens de enzimas imobilizadas se correlacionam com a atividade residual da água mãe. O mesmo padrão se mantém para os demais suportes FAU/ Ni^{2+} , FAU/ Cu^{2+} e FAU/ Zn^{2+} .

Tabela 4. Porcentagem de imobilização e atividade enzimática em função do pré-tratamento da zeólita faujasita. Os testes de atividade para as enzimas imobilizadas foram realizados conforme descrito no **item 5.6**. Quantidade de enzima a ser imobilizada foi de aproximadamente 1,47mg para 100mg de cada suporte.

Suporte Zeolítico	Influência do tratamento térmico antes da imobilização (°C)	Influência do meio catiônico dominante	Imobilização (% proteína)	Atividade residual (U/mL) e porcentagem^(**)	Atividade enzimática (U/mg suporte)
FAU (Si:Al=11)	200	Na ⁺	10,0 ± 0,4	7,54 ± 0,45 (58,5%)	0,053
FAU (Si:Al=11)	550	Na ⁺	9,2 ± 0,2	9,72 ± 0,18 (75,4%)	0,047
FAU (Si:Al=11)	200	Cu ²⁺	22,1 ± 0,6	8,35 ± 0,53 (64,8%)	0,090
FAU (Si:Al=11)	550	Cu ²⁺	27,9 ± 1,2	6,60 ± 0,17 (51,2%)	0,052
FAU (Si:Al=11)	200	Ni ²⁺	10,3 ± 0,5	8,47 ± 0,35 (65,7%)	0,120
FAU (Si:Al=11)	550	Ni ²⁺	10,6 ± 0,3	6,98 ± 0,53 (54,2%)	0,134
FAU (Si:Al=11)	200	Zn ²⁺	32,0 ± 1,2	0,88 ± 0,06 (6,8%)	0,024
FAU (Si:Al=11)	550	Zn ²⁺	19,1 ± 0,6	5,29 ± 0,08 (45,7%)	0,047
Ei ^(*)	-----	-----	-----	12,89 ± 0,62	-----

(*) enzima inicial

(**) porcentagem de atividade residual em relação à atividade inicial.

A tabela 5 apresenta valores de imobilizações e atividades enzimáticas em função do tratamento térmico e do meio catiônico dominante para a zeólita gismondina.

Os dados indicam que o efeito do tratamento térmico para esse suporte zeolítico preparado a 200°C e a 550°C tem diferenças significativas quando comparados ao sistema da zeólita faujasita. Para os suportes GIS/Na⁺, GIS/Zn²⁺, GIS/Ni²⁺ e GIS/Cu²⁺ com pré-tratamento a 200°C observa-se que a porcentagem de enzima imobilizada varia em torno de aproximadamente de 10 a 16%, sendo que a maior porcentagem ocorre para GIS/Cu²⁺ (16,0 ± 0,3%). Esses dados também reforçam a observação de que a estrutura cristalina do suporte zeolítico influencia na porcentagem de enzima imobilizada.

A figura 21 mostra o DRX da GIS/ Na^+ , GIS/ Cu^{2+} , GIS/ Zn^{2+} e GIS/ Ni^{2+} . A zeólita gismondina é caracterizada por sua estrutura altamente flexível e bastante susceptível a variações de temperatura e natureza dos cátions presentes em suas estruturas, assim, quando GIS/ Na^+ é transformada em GIS/ Cu^{2+} por troca iônica as mudanças estruturais são significativas (figura 21), e a mesma observação vale para o cátion de zinco.

Um dado bastante interessante apresentado na tabela 5 para os suportes GIS/ Na^+ , GIS/ Cu^{2+} , GIS/ Ni^{2+} e GIS/ Zn^{2+} , pré-tratados a 200°C, é que as atividades enzimáticas obtidas para os suportes foram às seguintes: 0,959; 2,515; 13,278 e 1,809 U/mg-suporte. Todavia, observa-se que esses valores são reduzidos quando os suportes são tratados a 550°C, pois nessa situação os valores para atividade enzimática no suporte diminuiu de 0,959 para 0,569 U/mg-suporte (GIS/ Na^+); de 2,515 para 0,517 U/mg-suporte (GIS/ Cu^{2+}); de 13,278 para 2,738 U/mg-suporte (GIS/ Ni^{2+}) e de 1,809 para 1,311 U/mg-suporte (GIS/ Zn^{2+}). Este significativo decréscimo é uma forte indicação de que a atividade enzimática da enzima imobilizada está relacionada à estrutura do material zeolítico, pois uma análise dos dados de DRX (figuras 22 e 23) mostra que as estruturas da zeólita gismondina em suas formas GIS/ Cu^{2+} e GIS/ Zn^{2+} , pré-tratadas a 200°C são completamente diferentes das estruturas obtidas a temperatura de 550°C. Na literatura a zeólita GIS/ Na^+ é uma estrutura amorfa à 550°C (Nery et al, 2003; Albert et al, 1998).

Outro forte indício de que a atividade enzimática está relacionada com a estrutura pode ser observado na elevada atividade da enzima imobilizada obtida no sistema gismondina (Na^+ , Cu^{2+} , Ni^{2+} e Zn^{2+}), tabela 5, em comparação com a atividade obtida no sistema faujasita (Na^+ , Cu^{2+} , Ni^{2+} e Zn^{2+}), tabela 4, em ambas faixas de temperatura a 200°C ou a 550°C de pré- tratamento das zeólitas. Esses dados reforçam a ideia da relação entre a atividade enzimática e a estrutura do suporte porque essas duas zeólitas apresentam estruturas completamente diferentes e as suas propriedades estruturais afetam o comportamento da enzima imobilizada.

A análise da atividade residual para o sistema gismondina, diferentemente do sistema faujasita, indica que não é possível obter uma boa correlação devido ao fato da estrutura gismondina ser altamente flexível e a 550°C ocorrer a formação de estruturas completamente diferentes de sua forma padrão. Desta forma, para verificar se ocorreu lixiviação dos cátions durante o processo de imobilização para

os suportes (GIS/Cu²⁺, GIS/Zn²⁺ e GIS/Ni²⁺ pré-tratados a 200°C) foi feita uma análise de espectrometria de emissão atômica (ICP-AES). Os dados obtidos indicam que não houve lixiviação dos cátions presentes nos materiais, pois a porcentagem dos cátions encontrados nessas matrizes de imobilização permaneceu constante mesmo após o processo de imobilização, vide tabela 6. Além disso, pode-se observar que ocorreu uma troca iônica mais efetiva para os suportes trocados com os cátions de cobre e zinco porque estes apresentaram uma quantidade acima de 20% dos respectivos cátions para os suportes (GIS/Cu²⁺, GIS/Zn²⁺) ao passo que a presença de níquel foi aproximadamente 2,3% para o suporte (GIS/Ni²⁺).

Tabela 5. Porcentagem de imobilização e atividade enzimática em função do pré-tratamento da zeólita gismondina. Os testes de atividade para as enzimas imobilizadas foram realizados conforme descrito no **item 5.6**. Quantidade de enzima a ser imobilizada foi de aproximadamente 1,47mg para 100mg de cada suporte.

<i>Suporte Zeolítico</i>	<i>Influência do tratamento térmico antes da imobilização (°C)</i>	<i>Influência do meio catiônico dominante</i>	<i>Imobilização (% proteína)</i>	<i>Atividade residual (U/mL) e porcentagem^(**)</i>	<i>Atividade enzimática (U/mg suporte)</i>
GIS (Si:Al=1)	200	Na ⁺	12,0 ± 0,3	6,23 ± 0,35 (48,8%)	0,959
GIS (Si:Al=1)	550	Na ⁺	11,8 ± 0,3	8,65 ± 0,26 (67,7%)	0,569
GIS (Si:Al=1)	200	Cu ²⁺	16,0 ± 0,3	3,12 ± 0,18 (24,4%)	2,515
GIS (Si:Al=1)	550	Cu ²⁺	20,0 ± 0,4	7,79 ± 0,26 (61,0%)	0,517
GIS (Si:Al=1)	200	Ni ²⁺	11,2 ± 0,6	6,54 ± 0,09 (51,2%)	13,278
GIS (Si:Al=1)	550	Ni ²⁺	10,1 ± 0,6	5,79 ± 0,09 (45,3%)	2,738
GIS (Si:Al=1)	200	Zn ²⁺	12,5 ± 0,6	7,16 ± 0,08 (56,1%)	1,809
GIS (Si:Al=1)	550	Zn ²⁺	19,1 ± 0,4	4,61 ± 0,18 (36,1%)	1,311
Ei ^(*)	-----	-----	-----	12,77 ± 0,09	-----

(*) enzima inicial

(**) porcentagem de atividade residual em relação à atividade inicial.

Tabela 6. Porcentagem dos cátions presentes antes e depois do processo de imobilização nos suportes de imobilização enzimática da zeólita gismondina trocada com os cátions de cobre, níquel e zinco quando pré-tratadas à 200°C antes do processo de imobilização.

<i>Elemento</i>	<i>Antes da imobilização (%)</i>	<i>Depois da imobilização (%)</i>
Cobre	21,98±0,22	23,25±0,07
Zinco	21,70±0,18	21,03±0,05
Níquel	2,24±0,06	2,27±0,04

Em nosso estudo, os resultados obtidos mostram que o tratamento térmico e o meio catiônico dominante influenciam no processo de imobilização e na atividade da enzima. Desta forma, o pré-tratamento do suporte antes da imobilização provoca mudanças na estrutura da zeólita gismondina devido a sua maior flexibilidade em comparação com a zeólita faujasita e, conseqüentemente, influenciam a conformação final da enzima quando ligada ao material zeolítico.

As propriedades físico-químicas das zeólitas afetam significativamente a forma e a força de ligação envolvida no processo de imobilização, e conseqüentemente o comportamento da enzima imobilizada (MACARIO et al, 1997). Estes autores concluíram em seus estudos de imobilização da lipase *Rhizomucor meihei* sobre diferentes suportes zeolíticos que o método mais adequado de imobilização dessa enzima tem que envolver a região “lid” a fim de ativar centro catalítico da enzima. Durante o processo de imobilização os aminoácidos presentes na região “lid” da lipase tem um papel importante, ambos para a ativação e estabilização da enzima imobilizada de forma aberta.

6.6- Curvas de Atividade Enzimática

Conforme foi mencionado anteriormente, as enzimas em sua maioria são sensíveis a elevadas temperaturas, exceção as termofílicas e, o estudo do comportamento da enzima em função da temperatura é essencial para o conhecimento do catalisador enzimático. A curva de atividade enzimática, figura 29, mostra que a atividade máxima da enzima livre na hidrólise do substrato pNPP está

na faixa de 42-44°C. A partir de 45°C inicia-se a diminuição da atividade enzimática. Ao passo que quando atingida a temperatura de 50°C uma grande quantidade de enzima estará inativada por desnaturação.

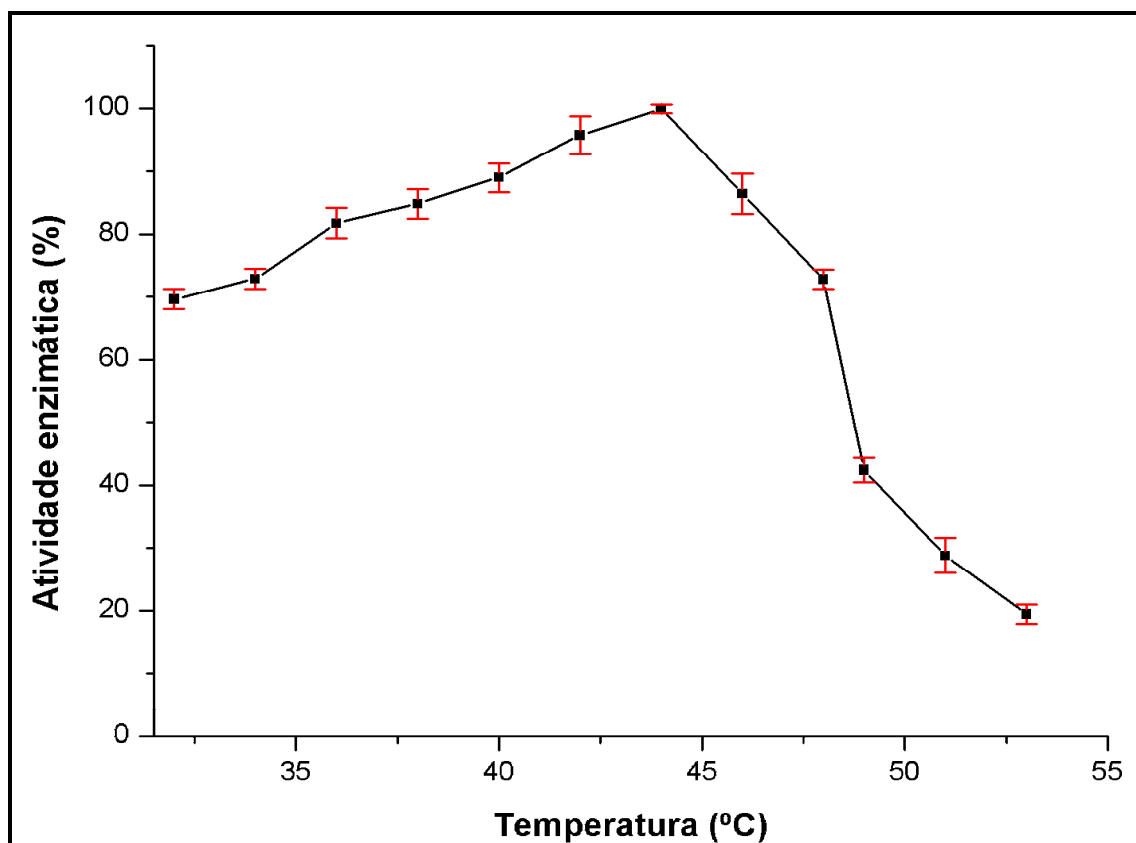


Figura 29. Atividade enzimática em função da temperatura para enzima livre. Os testes de atividade para enzima livre foram realizados conforme descrito no **item 5.6** para enzima 100(x) diluída.

Para a análise do comportamento da atividade enzimática da enzima no material sólido foi escolhida a zeólita gismondina pré-tratada a 200°C antes do processo de imobilização, pois este material apresentou os dados mais representativos e reprodutíveis de atividade enzimática, além disso, foram escolhidas quatro diferentes faixas de temperatura 37, 44, 49 e 52°C de acordo com os pontos mais importantes obtidos com a enzima na sua forma livre. A análise da curva de atividade da enzima imobilizada no sólido, figura 30, mostra um comportamento de atividade enzimática para os diferentes suportes zeolíticos bastante similar ao da enzima em sua forma livre. Elas são similares porque em ambos os gráficos as suas atividades máximas estão na faixa de 42-45°C e acima dessa temperatura pode-se observar uma diminuição na atividade enzimática. Isso,

provavelmente, deve-se ao fato de que a enzima é muito grande para acessar a cavidade interna das zeólitas. A maioria das aberturas de poros observados para zeólitas está na faixa de 7-8 Å, isso implica que nenhuma enzima pode ter acesso a esse diâmetro de poros. Portanto, ela está localizada sobre a superfície externa cristalina das zeólitas o que explica o fato do seu comportamento ser similar quando comparado a enzima livre (GONÇALVES et al, 1996). Além disso, uma possível explicação no ponto de vista cristalográfico para a maior atividade da zeólita trocada com níquel quando comparada com a zeólita trocada com cobre, zinco e na forma sódica, possivelmente, está relacionada à presença de Ni^{2+} nos canais desses materiais, o qual interage de uma maneira que ativa o sítio catalítico enzimático, o que faz com que uma maior atividade enzimática seja observada para o conjugado LIPASE/ZEÓLITA/ Ni^{2+} .

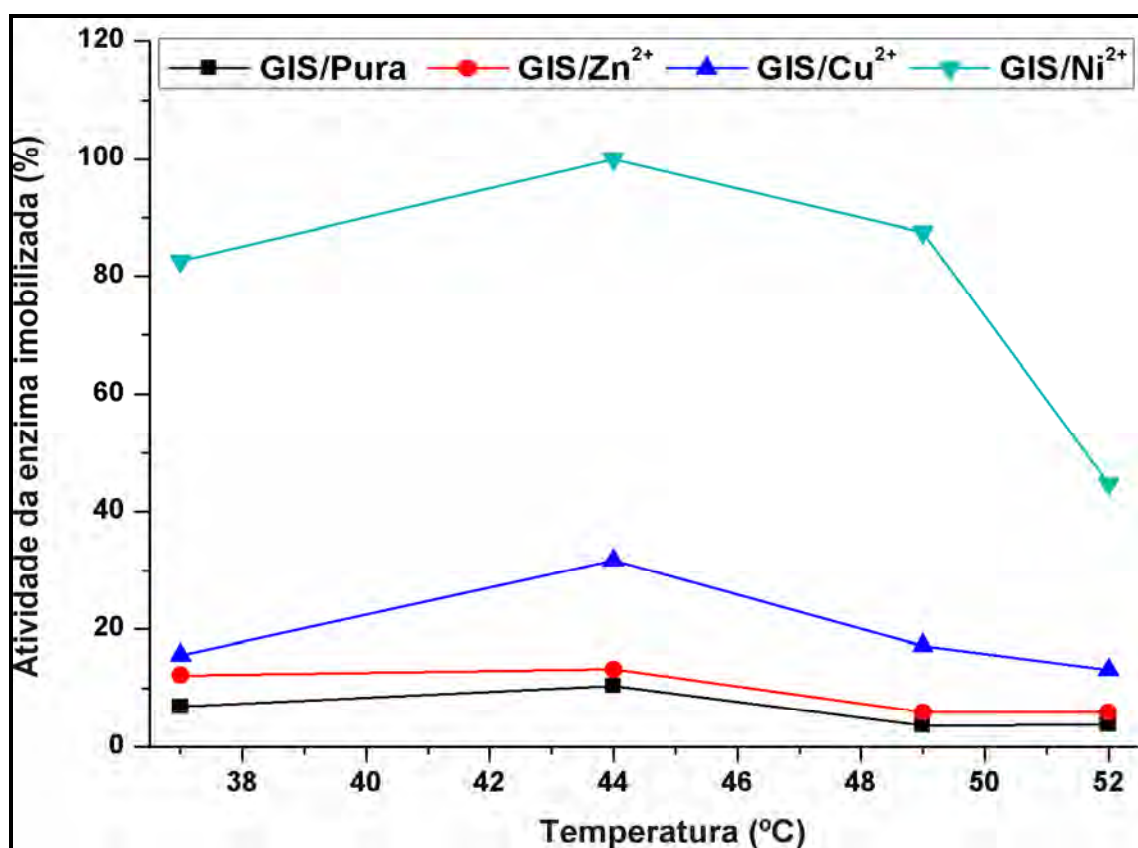


Figura 30. Atividade enzimática em função da temperatura para enzima imobilizada no sólido. Condições de imobilização: 16h em 25°C. Quantidade de enzima a ser imobilizada aproximadamente 1,47mg. Porcentagem de enzima imobilizada em 100mg de cada suporte: GIS/ Ni^{2+} ($11,2 \pm 0,6\%$), GIS/ Cu^{2+} ($16,0 \pm 0,3\%$), GIS/ Zn^{2+} ($12,5 \pm 0,6\%$) e GIS/Pura ($12,0 \pm 0,3\%$).

6.7- Estabilidade Enzimática

Conforme mostrado no item anterior, a atividade máxima medida pela enzima na sua forma livre ou imobilizada foi a 44°C. A fim de avaliar a estabilidade enzimática nesta temperatura em função do tempo foram realizados experimentos em seis diferentes intervalos de tempo (0, 60, 120, 180, 240 e 300 min) para enzima livre e em quatro diferentes intervalos de tempo no caso do material sólido (0, 60, 180 e 300 min). O gráfico de estabilidade da enzima livre, figura 31, mostra o comportamento da atividade enzimática na temperatura ótima (44°C). A atividade lipolítica da enzima nesta temperatura diminui aproximadamente a 60% de sua atividade inicial após o período de 1 hora da enzima na temperatura ótima. No entanto, posteriormente, essa atividade permaneceu inalterada após 5 horas, tempo em que a enzima permaneceu nestas condições.

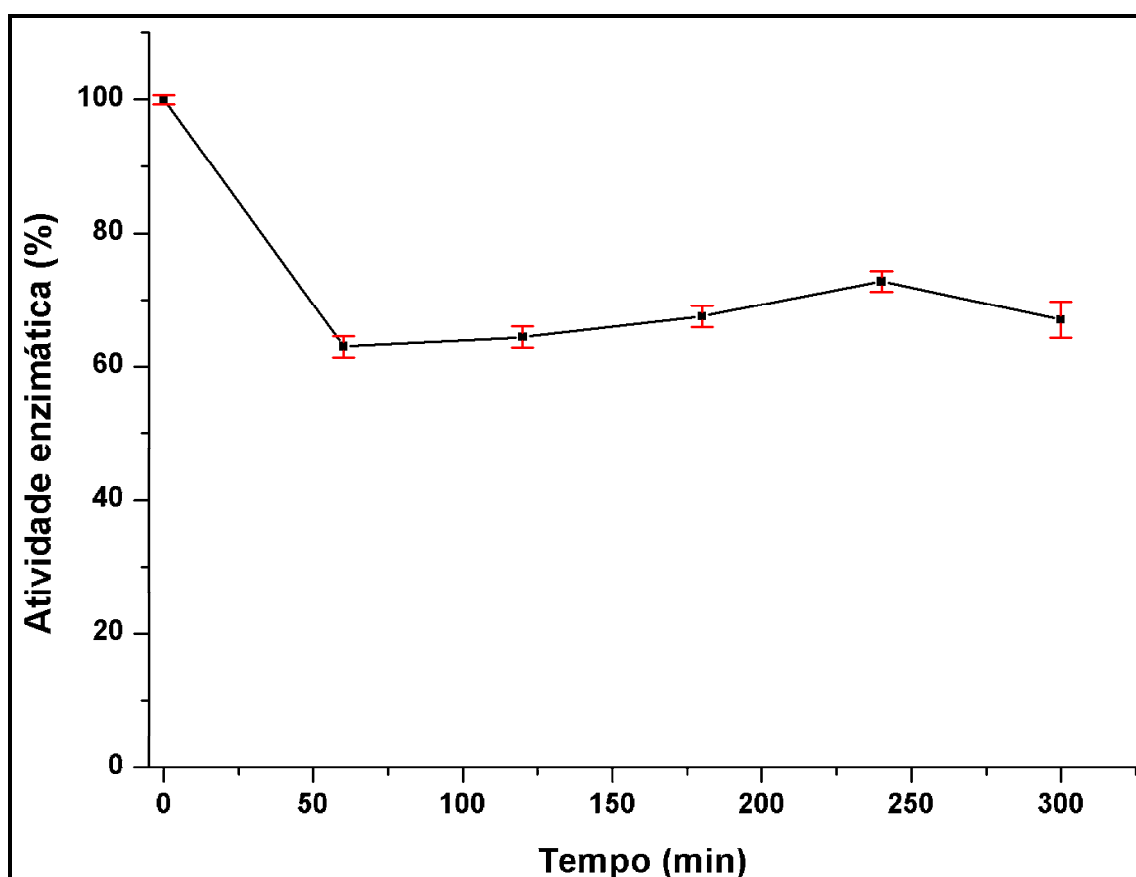


Figura 31. Estabilidade enzimática na temperatura ótima (44°C) para enzima livre. Os testes de atividade para enzima livre foram realizados conforme descrito no **item 5.6** para enzima 100(x) diluída.

A figura 32 mostra o gráfico de estabilidade térmica para os quatro diferentes complexos (GIS/Ni²⁺/Lipase, GIS/Cu²⁺/Lipase, GIS/Zn²⁺/Lipase, GIS/Na²⁺/Lipase) nos

tempos de (0, 60, 180 e 300min) e novamente a zeólita trocada com níquel apresentou atividade bastante superior quando comparada com os demais complexos enzima/zeólita, ou seja, $\text{Ni}^{2+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Na}^+$. Os dados obtidos mostraram que a imobilização das enzimas leva a um aumento na estabilidade enzimática, pois diferentemente ao que foi observado para a enzima livre as atividades das enzimas imobilizadas no suporte se manteve estável durante o período em que permaneceram a 44°C.

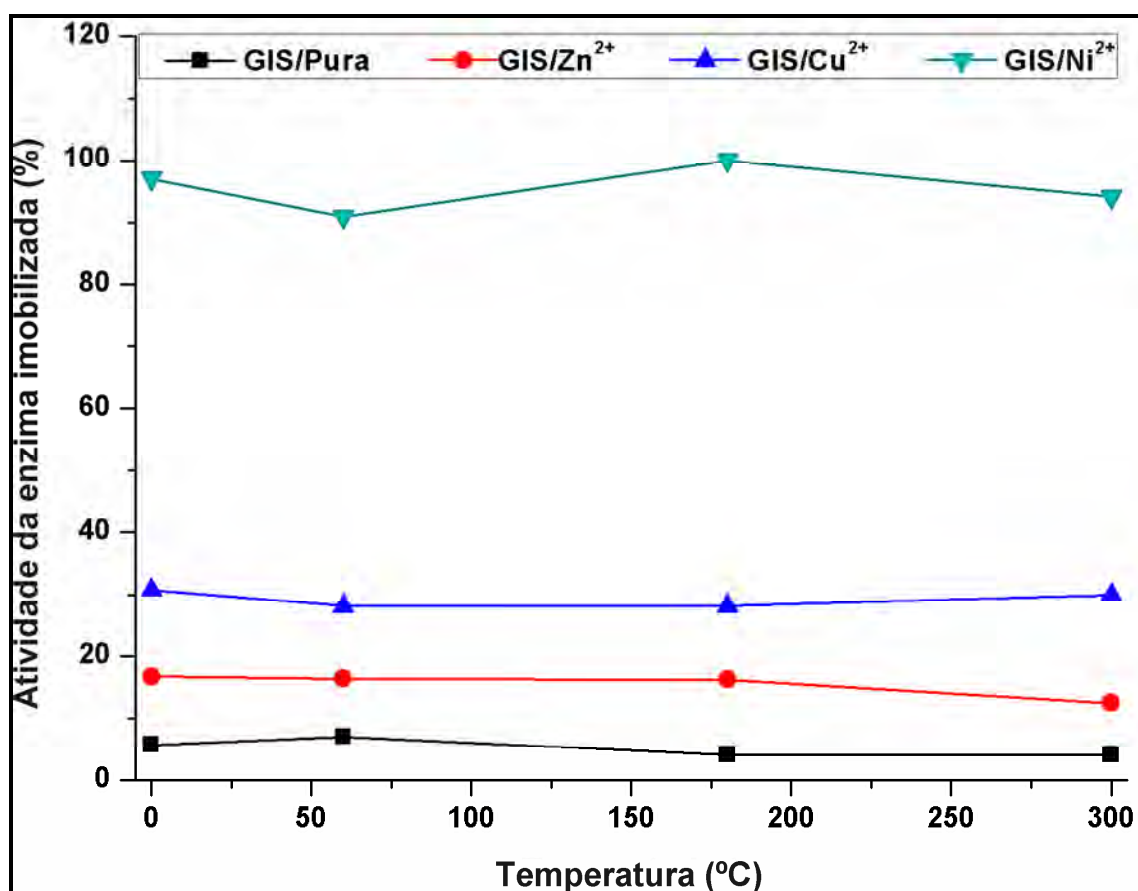


Figura 32. Estabilidade enzimática do sólido a temperatura ótima (44°C) para enzima imobilizada. Condições de imobilização: 16h em 25°C. Quantidade de enzima a ser imobilizada 1,47mg aproximadamente. Porcentagem de enzima imobilizada em 100mg de cada suporte: GIS/Ni²⁺ (11,2 ± 0,6%), GIS/Cu²⁺ (16,0 ± 0,3%), GIS/Zn²⁺ (12,5 ± 0,6%) e GIS/Pura (12,0 ± 0,3%).

6.8- Produção de Biodiesel

As análises de biodiesel dos materiais obtidos pela enzima livre, enzima imobilizada na zeólita e a zeólita pura foram feitas por TLC e GC. A figura 33 ilustra os resultados de produção de biodiesel dos diferentes catalisadores.

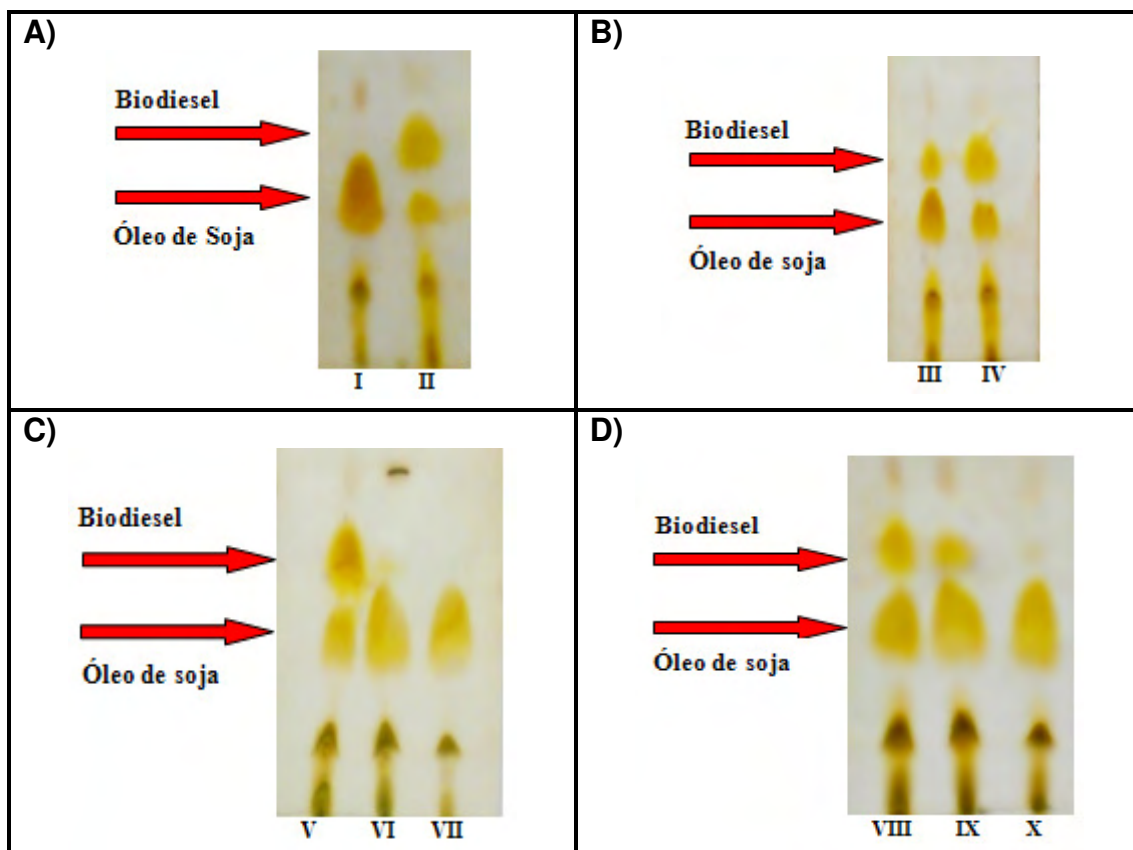


Figura 33- Óleo e biodiesel medido qualitativamente por TLC para diferentes catalisadores. **A)** Óleo de soja puro (I); biodiesel produzido por enzima livre (64,45 U) (II); **B)** biodiesel produzido por enzima livre (9,02 U) (III), biodiesel produzido por enzima livre (7,22 U) (IV); **C)** GIS/ Ni^{2+} /200°C/7,22 U de enzima imobilizada (V), GIS/ Ni^{2+} /550°C/6,51 U de enzima imobilizada (VI), GIS/ Ni^{2+} /200°C (VII) e **D)** GIS/ Zn^{2+} /200°C/ 9,02 U de enzima imobilizada (VIII), GIS/ Zn^{2+} /550°C/7,08U de enzima imobilizada (IX) e GIS/ Zn^{2+} /200°C (X).

Os resultados da análise por TLC do produto com enzimas livres mostraram que a maior parte do óleo vegetal (I) foi convertida a biodiesel (II) para uma quantidade de lipase de 64,45 U (Figura 33A). Quando utilizado a quantidade de 9,02 U de enzima livre, apenas uma parte do óleo de soja foi convertida a biodiesel (III). Com o uso de 7,22 U de enzima livre no processo uma quantidade um pouco inferior do óleo foi convertida a biodiesel (IV), (Figura 33B). Os resultados de análise

de cromatografia gasosa (CG) demonstraram que o processo que utilizou 64,45 U de enzima resultou em 95% de rendimento de conversão depois de 72h de reação e o processo com 9,02 U de enzima livre resultou em 42,5% do rendimento em conversão depois do mesmo período de tempo. Para o processo que envolveu uma quantidade de 7,22 U de enzima o rendimento de biodiesel obtido foi de 39,3% (Figura 34).

Os dados de TLC e CG para enzimas imobilizadas sobre as zeólita gismondina tratada com Zn^{2+} e Ni^{2+} (GIS/ Zn^{2+} e GIS/ Ni^{2+}) foram obtidos em três diferentes condições, para a qual os catalisadores submetidos foram: enzima imobilizada na zeólita (LIPASE/GIS/ Ni^{2+} /550°C e LIPASE/GIS/ Zn^{2+} /550°C), enzima imobilizada na zeólita (LIPASE/GIS/ Ni^{2+} /200°C e LIPASE/GIS/ Zn^{2+} /200°C) e zeólita pura (GIS/ Ni^{2+} /200°C e GIS/ Zn^{2+} /200°C).

Na figura 33C os resultados de TLC para o complexo (LIPASE/GIS/ Ni^{2+} /200°C) mostram que uma boa quantidade do óleo vegetal foi convertida a biodiesel (V), no entanto, para o suporte (LIPASE/GIS/ Ni^{2+} /550°C) uma quantidade mínima do óleo de soja foi convertida a biodiesel (VI). Observa-se que uma quantidade muito pequena de enzima quando imobilizada (7,22 U) pode produzir biodiesel. Porém, quando o suporte zeolítico puro (GIS/ Ni^{2+} /200°C) foi utilizado como catalisador a quantidade convertida foi bem inferior (VII). A figura 35 mostra os teores de ésteres metílicos obtidos por cromatografia gasosa das reações de transesterificação do óleo de soja refinado com os três catalisadores. Para a zeólita pura a produção de ésteres metílicos foi muito baixa (20,3%). Todavia, para o complexo (LIPASE/GIS/ Ni^{2+} /200°C) obtêm-se um percentual elevado de conversão de óleo a ésteres metílicos 56,2%. Neste caso pode observar que há um comportamento sinérgico do complexo catalítico enzima/zeólita quando comparado com a produção de ésteres metílicos para mesma concentração de enzimas livres que produz (39,3%), vide figura 35. No entanto, para o suporte (LIPASE/GIS/ Ni^{2+} /550°C) obteve-se um percentual de 27,6% de produção de ésteres metílicos considerado baixo para esse catalisador.

Na figura 33D as análises prévias de TLC para o complexo (LIPASE/GIS/ Zn^{2+} /200°C) mostram uma quantidade razoável do óleo vegetal foi convertido a biodiesel (VIII), no entanto, quando utilizado o suporte (LIPASE/GIS/ Zn^{2+} /550°C) uma pequena quantidade do óleo de soja foi convertida a biodiesel (IX). Por outro lado quando foi utilizada apenas a zeólita (GIS/ Zn^{2+} /200°C)

como catalisador em ausência de enzimas imobilizadas uma quantidade bem inferior do óleo foi convertida a ésteres metílicos (X). Os resultados de CG (figura 36) mostram a porcentagem de ésteres metílicos obtidos a partir do óleo de soja para os três diferentes catalisadores. Quando utilizada a zeólita ($\text{GIS}/\text{Zn}^{2+}/200^{\circ}\text{C}$) como catalisador a produção de ésteres metílicos foi muito baixa (20,3%). Contudo, quando 9,02U de enzima foram imobilizadas neste suporte ($\text{LIPASE}/\text{GIS}/\text{Zn}^{2+}/200^{\circ}\text{C}$) o percentual de (39,7%) de óleo convertido a biodiesel foi obtido, desta forma, pode-se verificar que a atividade da enzima foi mantida mesmo quando submetida ao processo de imobilização. Sabe-se que para a mesma quantidade de enzima na forma livre converteu-se 42,5% de ésteres metílicos, vide figura 34. No entanto, quando o suporte foi pré-tratado a 550°C ($\text{LIPASE}/\text{GIS}/\text{Zn}^{2+}/550^{\circ}\text{C}$) obtêm-se um percentual de 29,6% considerado baixo indicando que o pré-tratamento do suporte a 550°C influenciou negativamente na catálise da reação.

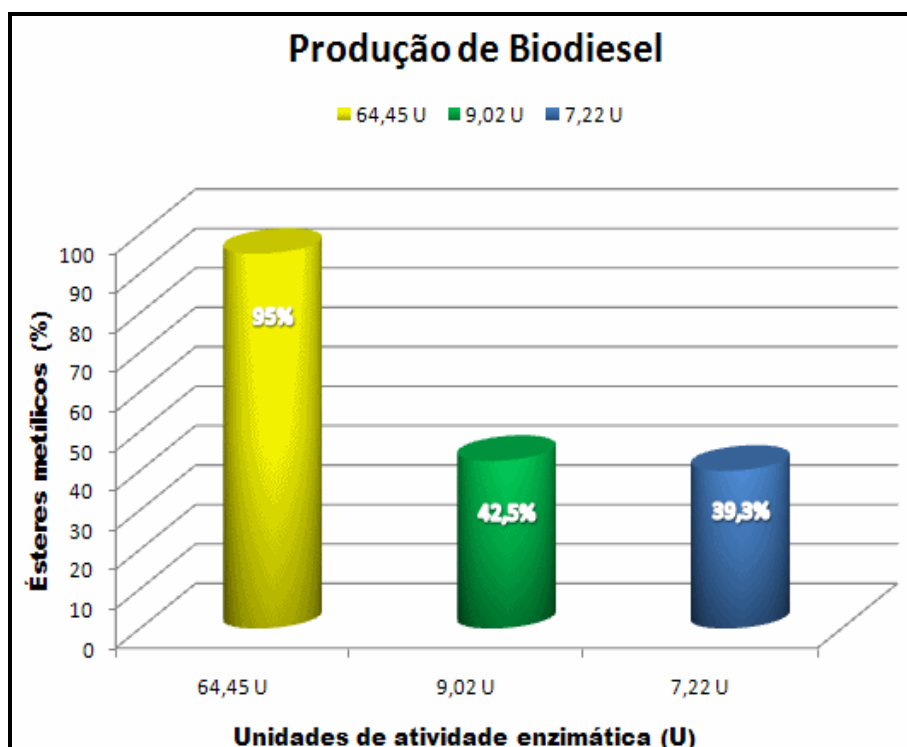


Figura 34. Porcentagem de ésteres metílicos produzidos para diferentes quantidades de enzimas livres utilizadas como catalisadores analisadas por cromatografia gasosa. Condições de Reação: 72h em 37°C razão óleo/metanol igual 1:5. Unidades de atividade enzimática: (64,45U; 9,02U e 7,22U de lipase, respectivamente).

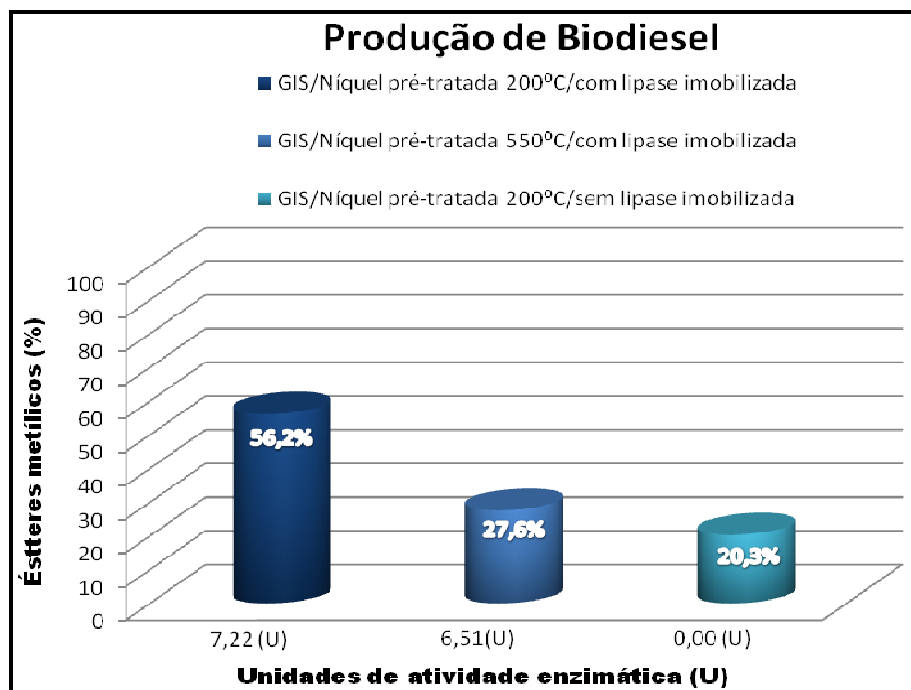


Figura 35. Porcentagem ésteres metílicos produzidos para diferentes catalisadores da zeólita gismondina (GIS) trocada com os cátions de Ni^{2+} analisadas por cromatografia gasosa. Condições de Reação: 72h em 37°C razão óleo:metanol igual 1:5. Quantidade do catalisador: 0,2g Lipase/GIS/ Ni^{2+} /200°C; 0,2g LIPASE/GIS/ Ni^{2+} /550°C e 0,2g GIS/ Ni^{2+} /200°C.

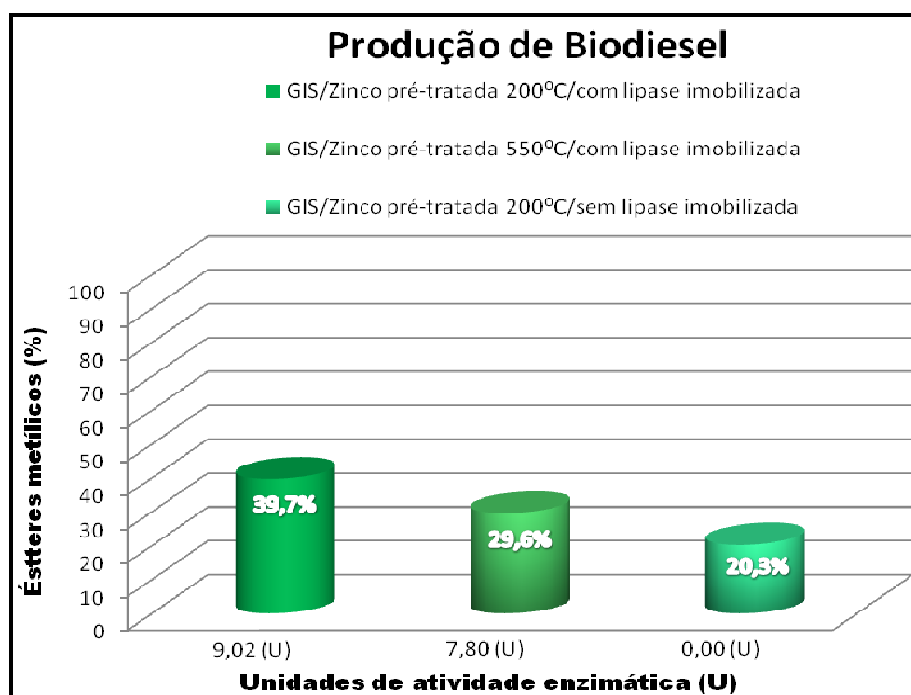


Figura 36. Porcentagem ésteres metílicos produzidos para diferentes catalisadores da zeólita gismondina (GIS) trocada com os cátions de Zn^{2+} analisadas por cromatografia gasosa. Condições de Reação: 72h em 37°C razão óleo:metanol igual 1:5. Quantidade do catalisador: 0,2g Lipase/GIS/ Zn^{2+} /200°C; 0,2g LIPASE/GIS/ Zn^{2+} /550°C e 0,2g GIS/ Zn^{2+} /200°C.

6.9- Síntese de Novas Zeólitas com Potencial para Produção de Biodiesel e Imobilização Enzimática

Após estudos e a caracterização das zeólitas tradicionais descritas nos itens **5.3.1** e **5.3.2**, decidiu-se fazer outro estudo exploratório de síntese de novos materiais zeolíticos com potencial para a produção de biodiesel. Na tentativa de se obter essas zeólitas com poros grandes, foram sintetizados direcionadores orgânicos de estrutura (Structure Directing Agents, SDAs) derivados do composto (S)-Esparteína e explorados no processo sol-gel, visando à obtenção da zeólita contendo vanádio em sua estrutura cristalográfica (vanadosilicatos), e cristalograficamente isomorfa à zeólita ETS-10 descrita anteriormente no **item 2.2.6.1**. A síntese desses novos materiais zeolíticos tem como objetivo a substituição isomorfa do titânio pelo vanádio, uma vez que esse átomo pode ser coordenado de diversas maneiras, assim há um grande interesse na síntese de novos catalisadores contendo vanádio em sua estrutura cristalográfica, o qual poderá ser amplamente utilizado em indústrias químicas, petroquímicas, farmacêuticas e na área de bioenergia para produção de biodiesel.

Para atingir esse propósito vários experimentos foram feitos, tanto no que diz respeito a sínteses dos compostos orgânicos derivados de (S)-Esparteína, descritas nos **itens 5.2.1, 5.2.2 e 5.2.3**, como também algumas sínteses de zeólitas em diversas condições de química sol-gel usando os templates orgânicos derivados de (S)-Esparteína. Todos os derivados de (S)-Esparteína foram caracterizados por análise química de RMN ^{13}C e espectrometria de massa. Os sólidos secos foram trocados ionicamente para a forma hidróxida por tratamento com resina BioRad AG-X8 antes do uso desses materiais como agentes direcionadores de estrutura na síntese dos novos materiais zeolíticos. Os resultados obtidos estão descritos nos próximos itens.

6.9.1- Síntese dos SDAs Derivados de (S)-Esparteína

6.9.1.1- N(1)-metil-iso-esparteínium (MeSPA/SDA1)

A análise do espectro de massa do composto sintetizado (figura 37) indica que os cristais são do composto desejado, devido à coincidência entre a massa molecular teórica do composto e a massa molecular experimental.

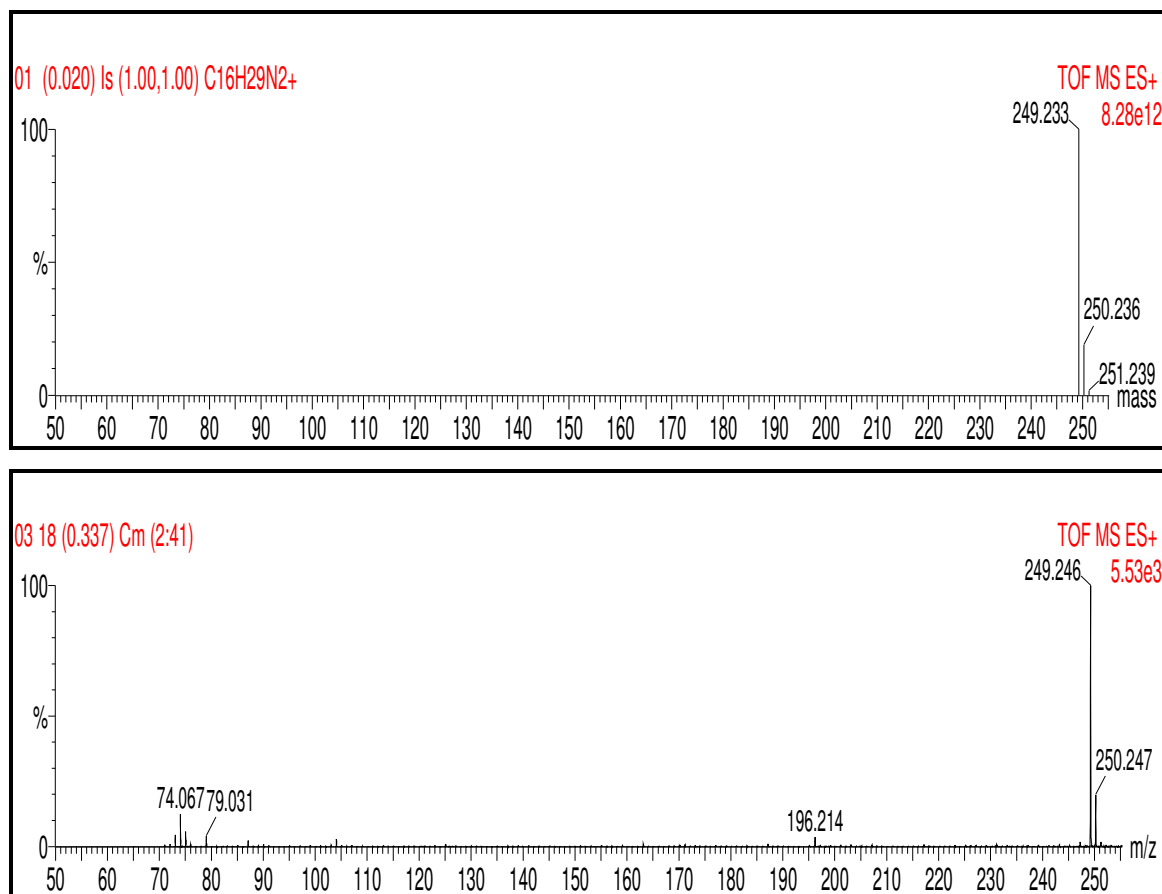


Figura 37. MS-ES teórico e experimental do composto orgânico (1)-Metil-iso-Esparteínum. (02:Erro = 52.1 ppm).

6.9.1.2- N,N'- dimetil-esparteínum (Me₂SPA/ SDA 2)

O espectro de massa, na figura 39, indica que o material obtido era o composto desejado, devido à coincidência entre a massa molecular teórica do composto e massa molecular experimental de alguns dos picos encontrados na análise de MS-ES. Os picos m/z 263,2610 e 413,2270 correspondem aos valores teóricos de massa molecular para Dimetil Esparteínum (263,2610) e N,N'-Dimetil Esparteínum + 1 trifluorometanosulfonato ligado (413,49), respectivamente. Porém, os dados obtidos de MS-ES também indicam que há impureza no produto obtido, por exemplo, o pico m/z 249,2446 acredita-se que corresponde ao peso molecular de Esparteína + 1 grupo metil (249,39).

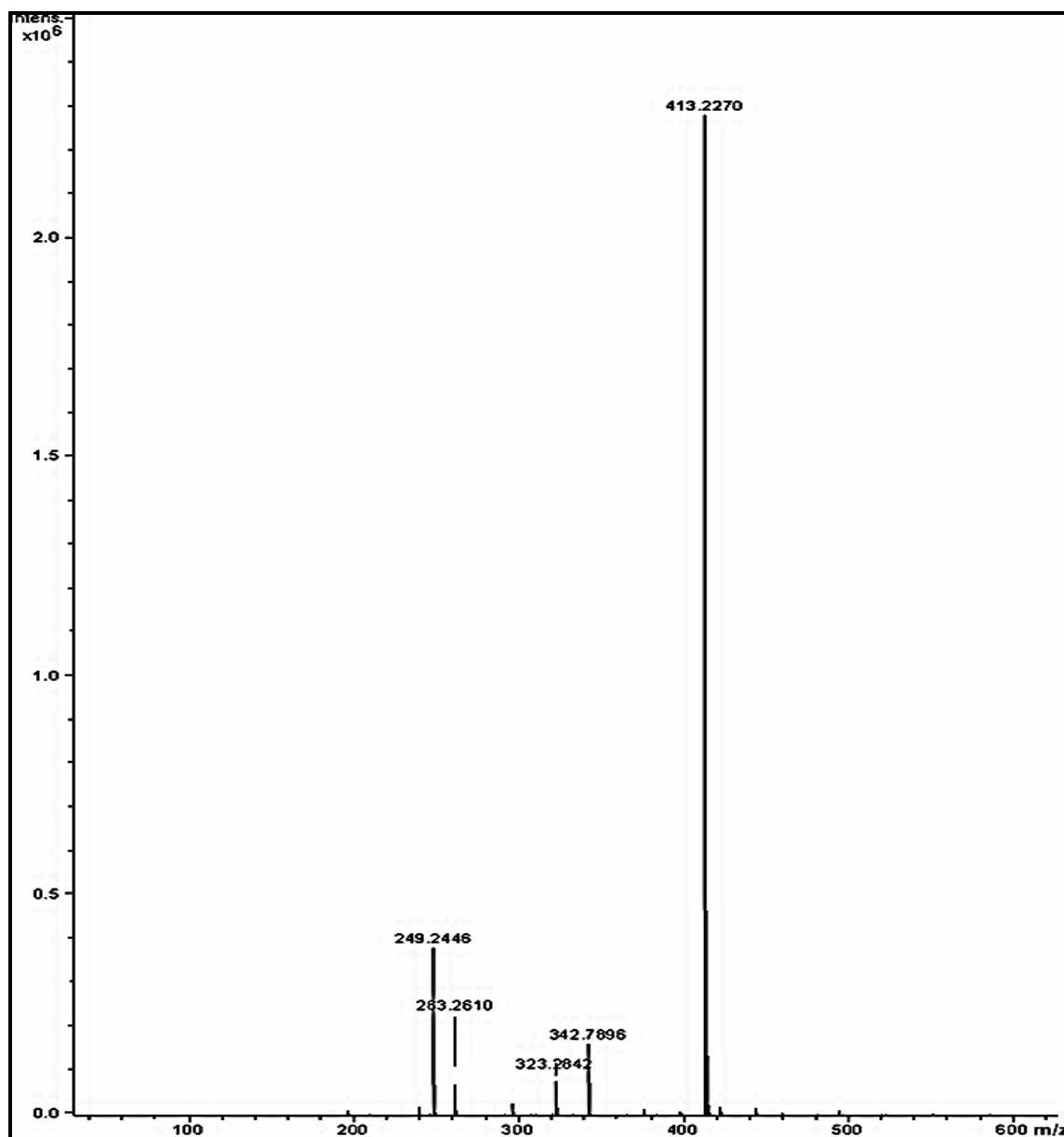


Figura 38. MS-ES experimental do composto orgânico N,N' Dimetil-Esparteínum.

A figura 39 apresenta os valores de ^{13}C RMN δ (ppm) obtidos da amostra de N,N' Dimetil-Esparteínum. Alguns destes valores são condizentes com os valores reportados na literatura para esse composto δ (ppm): 21.5, 22.0, 24.0, 24.1, 26.3, 27.8, 30.2, 32.6, 35.7, 48.2, 50.8, 62.7, 71.1, 72.5, 72.8, 73.3, 77.3 (OGINO, DAVIS 2004). No entanto, os dados obtidos ^{13}C RMN δ (ppm) também indicam que há impureza no produto, devido ao excesso de picos encontrados com relação ao número de picos relatados na literatura (OGINO, DAVIS 2004). Esse produto foi identificado previamente por TLC e separado por cromatografia em coluna baseada

na polaridade relativa das moléculas envolvidas antes do uso do SDA 2 na síntese dos novos materiais zeolíticos.

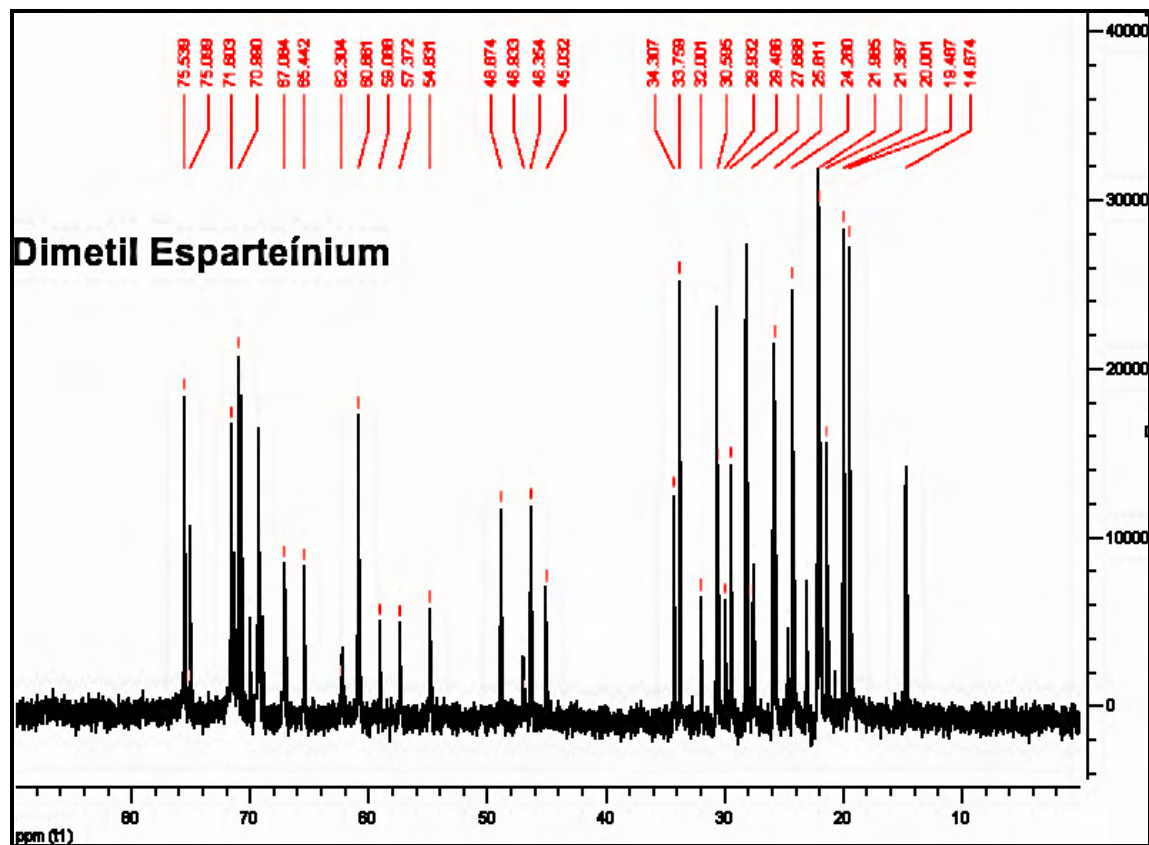


Figura 39. RMN ^{13}C experimental do composto orgânico N,N' Dimetil-Esparteínium.

6.9.1.3- N-etil-esparteínium (EtSPA/SDA 3)

Um espectro de massa obtido (figura 40) indica que o material obtido era o composto desejado, devido a coincidência entre a massa molecular teórico do composto e a massa molecular experimental. Os picos m/z 263,2590 e 413,2240 de massa molecular experimental correspondem aos valores teóricos de massa molecular para (N)-Etil-Esparteínium (263,435) e Esparteína ligada Etil-trifluorometanosulfonato (412,52), respectivamente.

A figura 41 apresenta os valores de ^{13}C RMN δ (ppm) obtidos da amostra de (N)-Etil Esparteínium δ (ppm): 7.463, 8.290, 15.407, 20.246, 22,325, 23.302, 25.165, 26.354, 27.929, 29.538, 33.178, 55.520, 57.197, 60,024, 64.359, 67.890, 68.860. Estes valores são condizentes com os valores reportados na literatura para esses compostos (OGINO, DAVIS 2004).

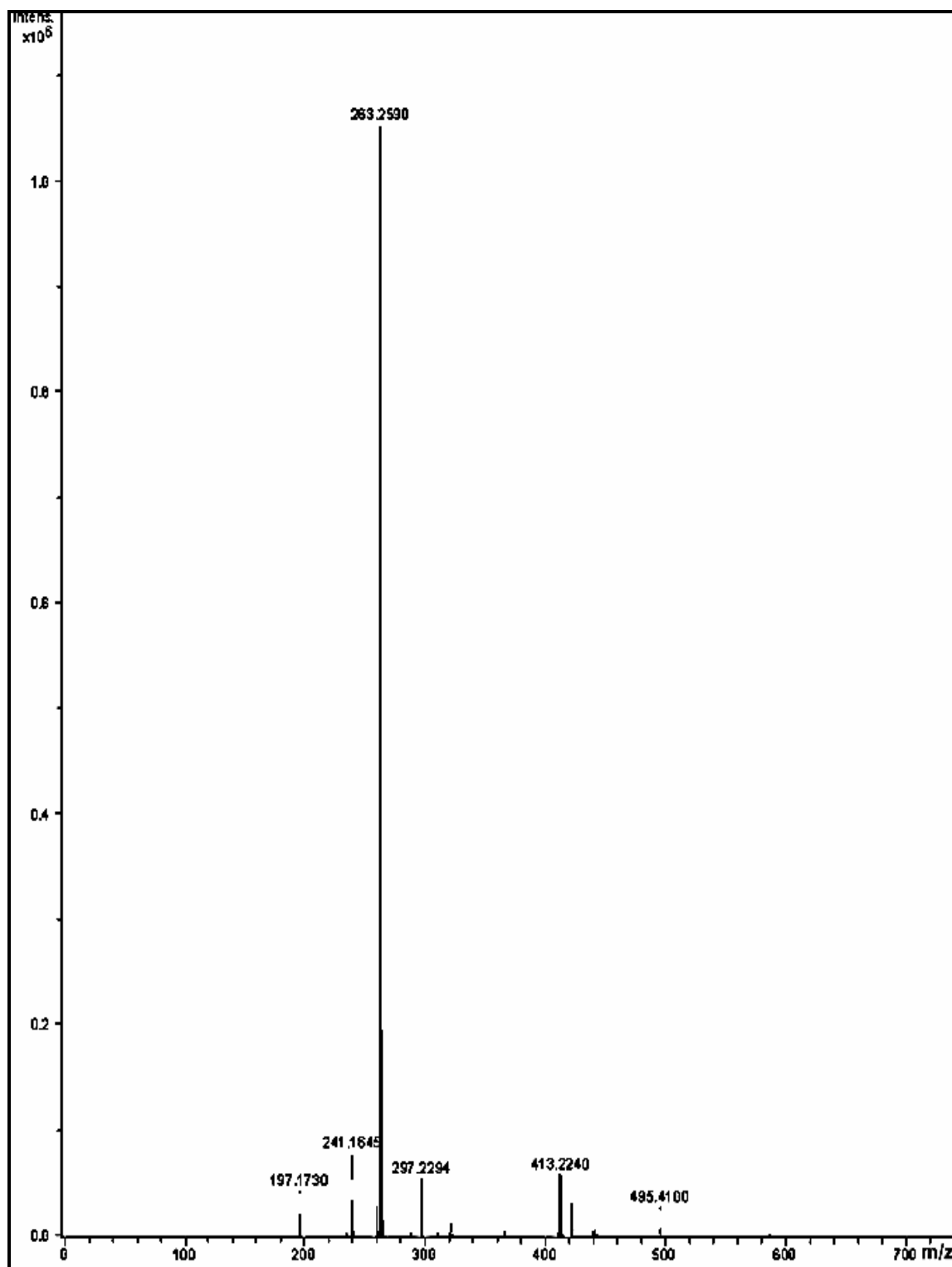


Figura 40. MS-ES experimental do composto orgânico (N)-Etil-Esparteínum.

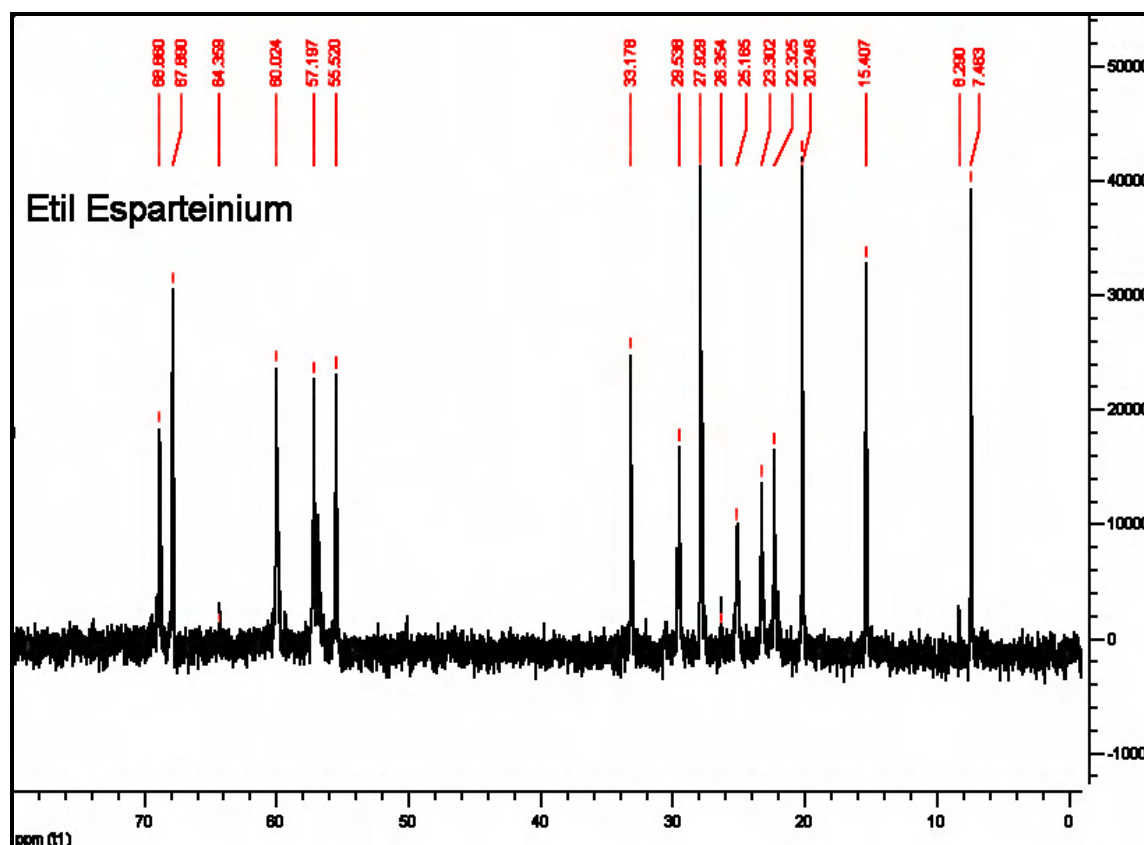


Figura 41. RMN ^{13}C experimental do composto orgânico (N)-Etil-Esparteínum

6.9.2- Síntese dos Novos Materiais Zeolíticos Obtidos a Partir dos SDAs Derivados de (S)-Esparteína

Os derivados de (S)-Esparteína têm sido usados como agentes direcionadores de estrutura em várias condições sol-gel e resultaram em várias zeólitas com diferentes topologias. Por exemplo, Nakagawa (1993) e Davis e Lobo, (1992) mostraram que (16) N-Metil Esparteínum pode ser usado como agente direcionador de estrutura para preparar peneiras moleculares com topologia AFI. Em 1998, Yoshikawa et al prepararam peneiras moleculares com topologia CFI com o uso deste mesmo SDA. Recentemente Corma et al. (2002), utilizaram (N)-Metil Esparteínum em Germânio e cristalizaram uma nova peneira molecular denominada ITQ-21. Essas investigações revelam que esparteína metilada usada como SDA pode ser útil na síntese de novas estruturas zeolíticas. Tsuji et al. (1999), prepararam N(1)-Methyl- α -isosparteínum e N (1), N'(16)-endo-Methylenesparteínum e mostraram que pode servir como um SDA para preparar peneiras moleculares com topologia AFI e CFI, no entanto a molécula não produziu material cristalino.

Em nosso estudo foram realizadas várias sínteses utilizando os SDAs (1, 2 e 3) citados no **item 5.2**, porém os resultados apresentados neste trabalho foram os

mais representativos e reprodutíveis nas condições de química sol-gel estudadas e que apresentavam boa cristalinidade. Todavia, como descrito no **item 2.2.6.1**, a estrutura da zeólita ETS-10 é composta por octaedros de TiO_6 e tetraedros de SiO_4 , **a utilização do sulfato de vanádio na síntese desses materiais zeolíticos tem como objetivo a substituição isomorfa do titânio pelo vanádio**, a AM-6 é o primeiro vanadosilicato cuja estrutura foi isomorfa a ETS-10 (ROCHA et al, 1997). Embora existam vários estudos descrevendo o uso de templates orgânicos na preparação de titaniosilicatos ETS-10 (JI et al, 2008; PAVEL et al, 2004; TURTA et al, 2008; KIM et al, 2002; YLMAZ et al, 2004) e vanadosilicato (ISMAIL et al, 2009), no melhor do nosso conhecimento até o presente momento não há um estudo sintético sistemático sobre o papel dos templates orgânicos derivados da amina quiral (S)-Espaceína nesse sistema.

As sínteses sol-gel das zeólitas ETS-10 foram feitas, principalmente, tendo o íon vanádio como substituinte isomorfo do Titânio (**seção 5.3.3**). Os resultados de sínteses da zeólita ETS-10 e o papel desempenhado pelos derivados de (S)-Espaceína como agentes direcionadores de estruturas (SDA1-3) na formação da AM-6 estão resumidos na tabela 4 e nos padrões de DRX das amostras preparadas.

Tabela 4- Resumo das zeólitas sintetizadas com o auxílio dos direcionadores de estruturas derivados de (S)-Espaceína

SDA	Composição de mistura reacional	T (°C)	Dias	Observações
1-3	0.97SiO ₂ :0.100SDA:0.1 V ₂ O ₅ : 1 Na ₂ O: 0.23K ₂ O:30H ₂ O	180	5	AM-6/SDA1-3
1-3	0.97SiO ₂ :0.200SDA:0.1 V ₂ O ₅ : 1 Na ₂ O: 0.23K ₂ O:30H ₂ O	180	5	AM-6/SDA1-3
1-3	0.97SiO ₂ :0.300SDA:0.1 V ₂ O ₅ : 1 Na ₂ O: 0.23K ₂ O:30H ₂ O	180	5	AM-6/SDA1-3
1-3	0.97SiO ₂ :0.400SDA:0.1 V ₂ O ₅ : 1 Na ₂ O: 0.23K ₂ O:30H ₂ O	180	5	Material cristalino desconhecido (SDA3)
1-3	0.97SiO ₂ :0.500SDA:0.1 V ₂ O ₅ : 1 Na ₂ O: 0.23K ₂ O:30H ₂ O	180	5	Material cristalino desconhecido (SDA3)
1-3	0.97SiO ₂ :0.100SDA:0.1 V ₂ O ₅ : 1 Na ₂ O: 0.23K ₂ O:30H ₂ O	230	5	AM-6/SDA1-3
1-3	0.97SiO ₂ :0.200SDA:0.1 V ₂ O ₅ : 1 Na ₂ O: 0.23K ₂ O:30H ₂ O	230	5	AM-6/SDA1-3
1-3	0.97SiO ₂ :0.300SDA:0.1 V ₂ O ₅ : 1 Na ₂ O: 0.23K ₂ O:30H ₂ O	230	5	AM6/SDA1-3
1-3	0.97SiO ₂ :0.400SDA:0.1 V ₂ O ₅ : 1 Na ₂ O: 0.23K ₂ O:30H ₂ O	230	5	Material cristalino desconhecido
1-3	0.97SiO ₂ :0.500SDA:0.1 V ₂ O ₅ : 1 Na ₂ O: 0.23K ₂ O:30H ₂ O	230	5	Material cristalino desconhecido

O difratograma de raios X da zeólita ETS-10 comercial, está ilustrado na figura 42 para facilitar a comparação desse titâniosilicato com os novos vanadosilicatos obtidos por meio do auxílio dos direcionadores de estrutura derivados de (S)-Esparteína, a fim de observar se ocorreu alguma mudança na estrutura cristalina das amostras ao tentar substituir o titânio pelo vanádio isomorficamente.

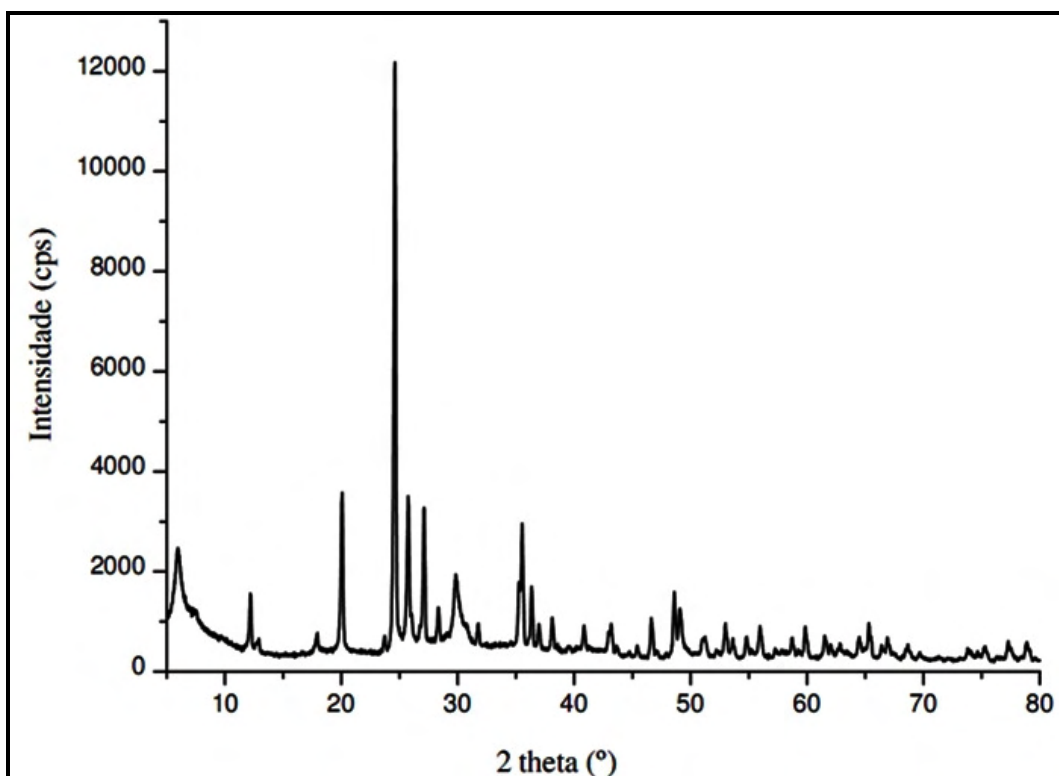


Figura 42. Difratograma da amostra da zeólita comercial ETS-10.

6.9.2.1- Materiais zeolíticos obtidos a partir dos SDA 1 derivados de (S)-Esparteína

A análise do difratograma da síntese com SDA 1 para 5 dias/180°C (figura 43) mostra um idêntico padrão de difração da ETS-10, indicando a formação de um novo polimorfo da zeólita ETS-10 contendo vanádio em sua estrutura (fase pura AM-6). As sínteses com o SDA 1 em 5 dias a 230°C também dirigem a formação de um novo vanadosilicato, a figura 44 mostra o padrão de raios X deste novo material. Nota-se que o material formado pelo SDA1, tanto a 150°C quanto a 230°C, apresenta características cristalográficas idênticas a AM-6 ou ETS-10.

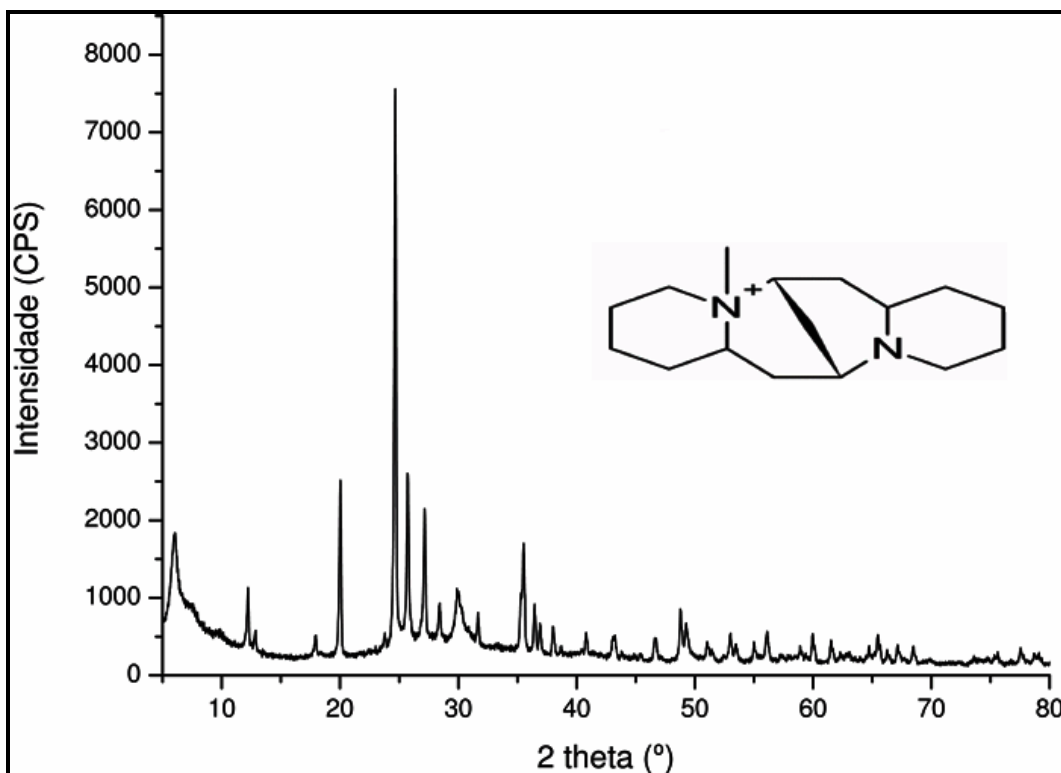


Figura 43. Difratoograma de raios-X da zeólita obtida usando o template orgânico N(1)- Metil-iso-Esparteínum derivado de (S)- Esparteína (180°C).

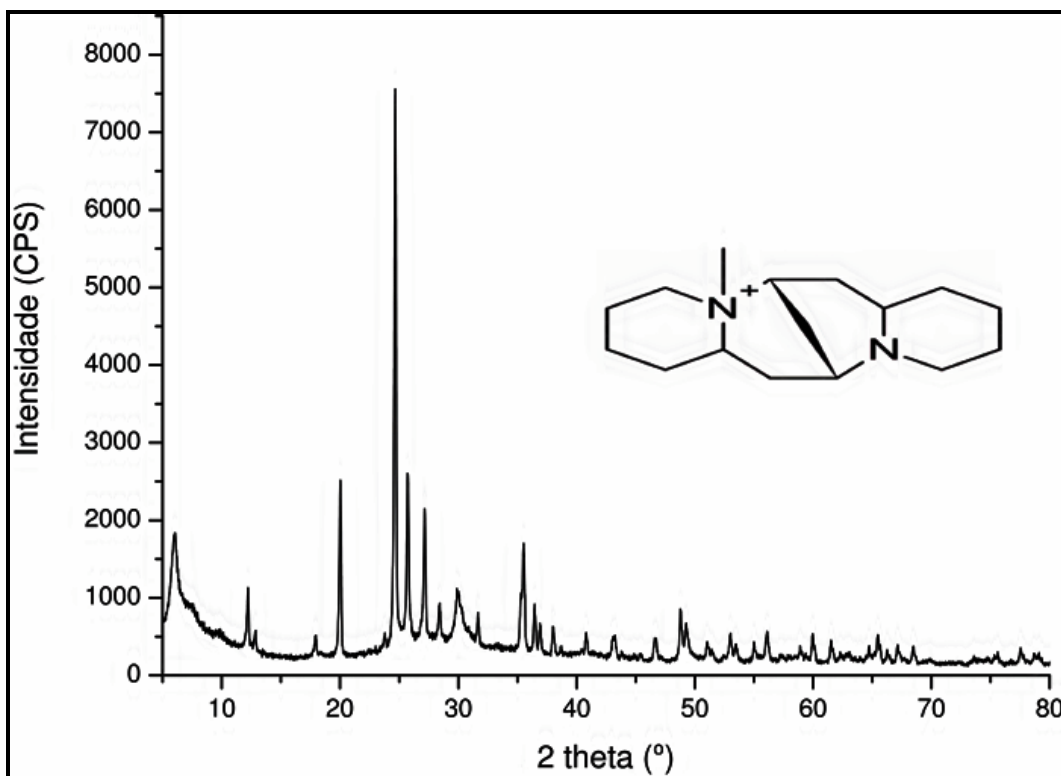


Figura 44. Difratoograma de raios-X da zeólita obtida usando o template orgânico N(1)- Metil-iso-Esparteínum derivado de (S)- Esparteína (230°C).

6.9.2.2- Materiais zeolíticos obtidos a partir dos SDA 2 derivados de (S)-Esparteína

O difratograma de raios-X da síntese com SDA 2 para 5 dias/180°C está ilustrado na figura 45, uma comparação com o difratograma da ETS-10 mostra a presença de vários picos que não estão presentes no padrão de raios-X da ETS-10, indicando a formação de uma zeólita isomorfa à ETS-10 contendo vanádio em sua estrutura (fase pura AM-6). A diferença é que a zeólita ETS-10 é à base de titânio, ao passo que na zeólita sintetizada com o auxílio do template orgânico existe apenas Vanádio. As sínteses com o SDA 2 para 5 dias a 230°C também dirigem a formação de novos vanadosilicatos, figura 38, cuja sua estrutura é ainda desconhecida. Esses dados indicam que o SDA 2 tem o potencial de dirigir a formação de novos materiais zeolíticos isoestruturais a ETS-10.

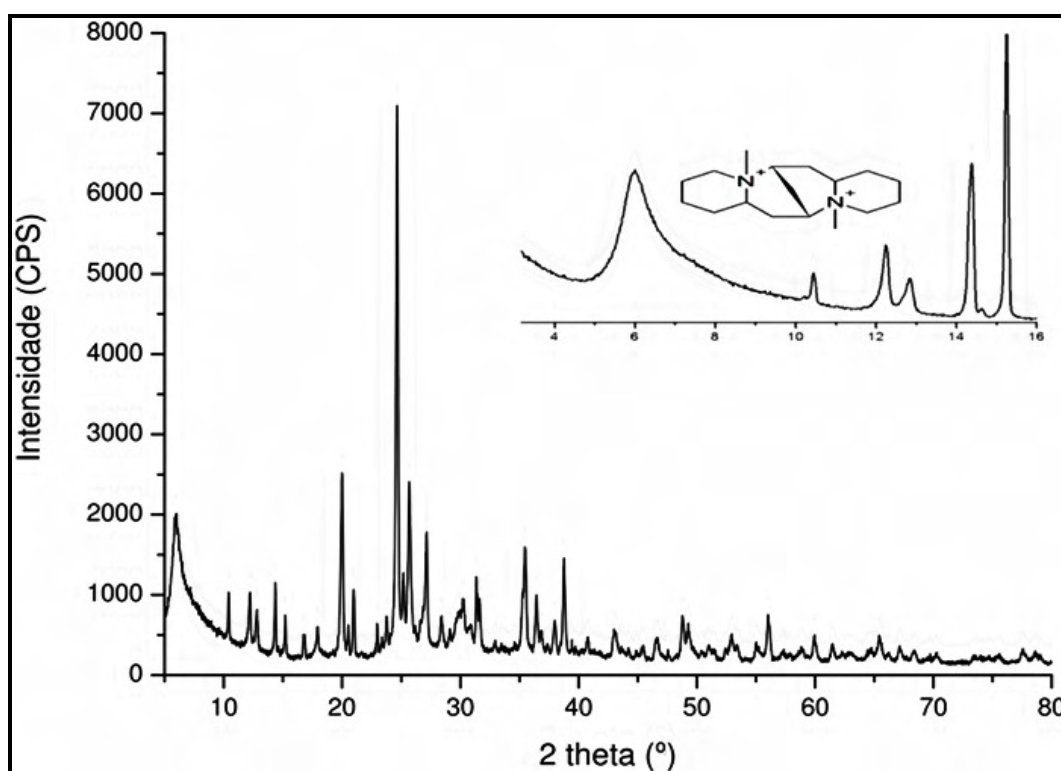


Figura 45. Difratograma de raios-X da zeólita obtida usando o template orgânico N,N'- Dimetil-Esparteínium derivado de (S)- Esparteína (180°C).

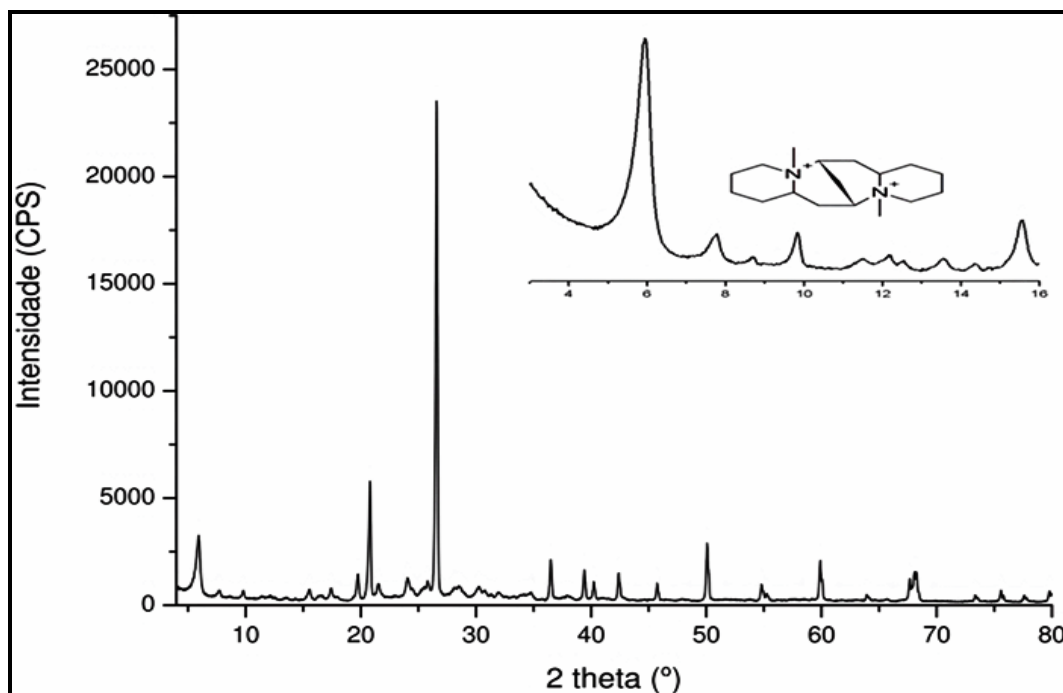


Figura 46. Difratoograma de raios-X da zeólita obtida usando o template orgânico N,N'- Dimetil-Esparteínum derivado de (S)- Esparteína (230°C).

6.9.2.3- Materiais zeolíticos obtidos a partir do SDA 3 derivado de (S)-Esparteína

O difratograma de raios-X representativo da zeólita obtida com o template N-Etil- Esparteínum em 5 dias/180°C, está na figura 47. Uma análise desse material mostrou que foi obtida uma AM-6, indicando que o SDA em questão tem o potencial de dirigir a estrutura da zeólita ETS-10, no entanto para o SDA 3 observa-se resultados muito interessantes, pois os padrões de DRX são completamente diferentes da AM-6 e ETS-10.

Análise dos picos de difração na região 6-10 teta (figura 47) mostra que há uma divisão das reflexões nessa região. Os três novos picos em 6,6°, 7,4° e 7,85° (2 theta) são similares aos do polimorfo quiral A e também similares ao polimorfo B, porém não são exatamente os mesmos. Esta é provavelmente uma nova estrutura de vanadossilicato relacionada ao polimorfo A e B. Os resultados estão em concordância com os que foram relatados recentemente na literatura (ASPIN; ANDERSON; CUNDY, 2004). Esses estudos mostraram que as variações na temperatura de sínteses, o modo de aquecimento (convencional/microondas), reagentes de partida e o uso de agentes direcionadores de estrutura podem influenciar o grau de desordem dentro do produto e novas estruturas a ETS-10

podem ter intercrescimento com a ETS-10. Sínteses com SDA 3 por 5 dias a 230°C também dirigem a formação de um novo vanadiosilicato cuja estrutura é ainda desconhecida, figura 48.

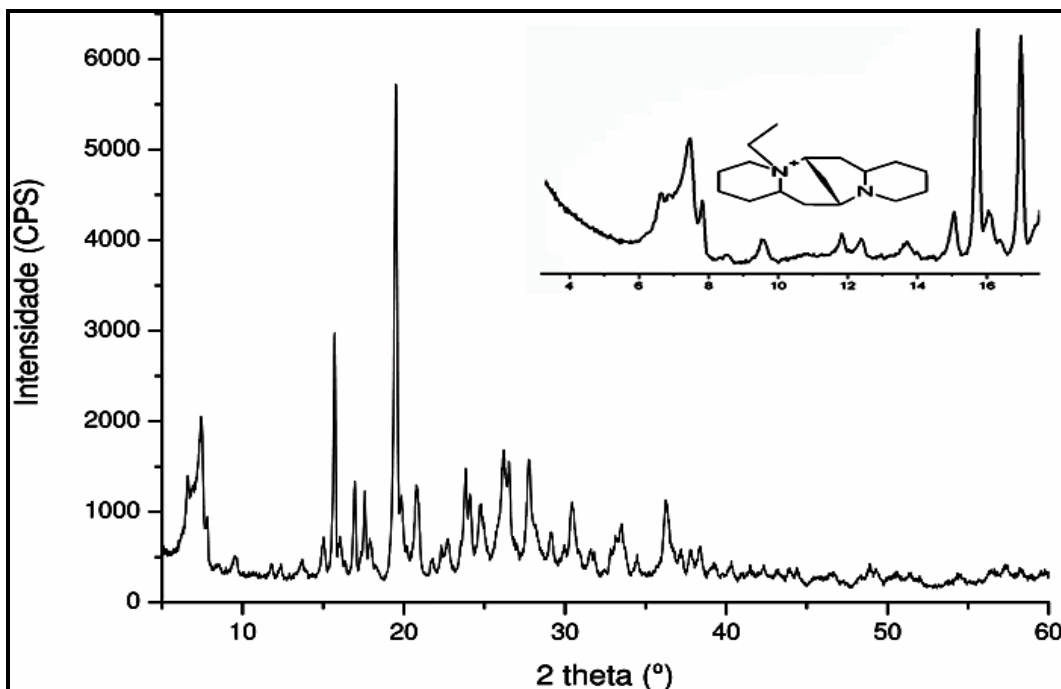


Figura 47. Difratoograma de raios-X da zeólita obtida usando o template orgânico N-Etil- Esparteínum derivado de (S)- Esparteína (180°C).

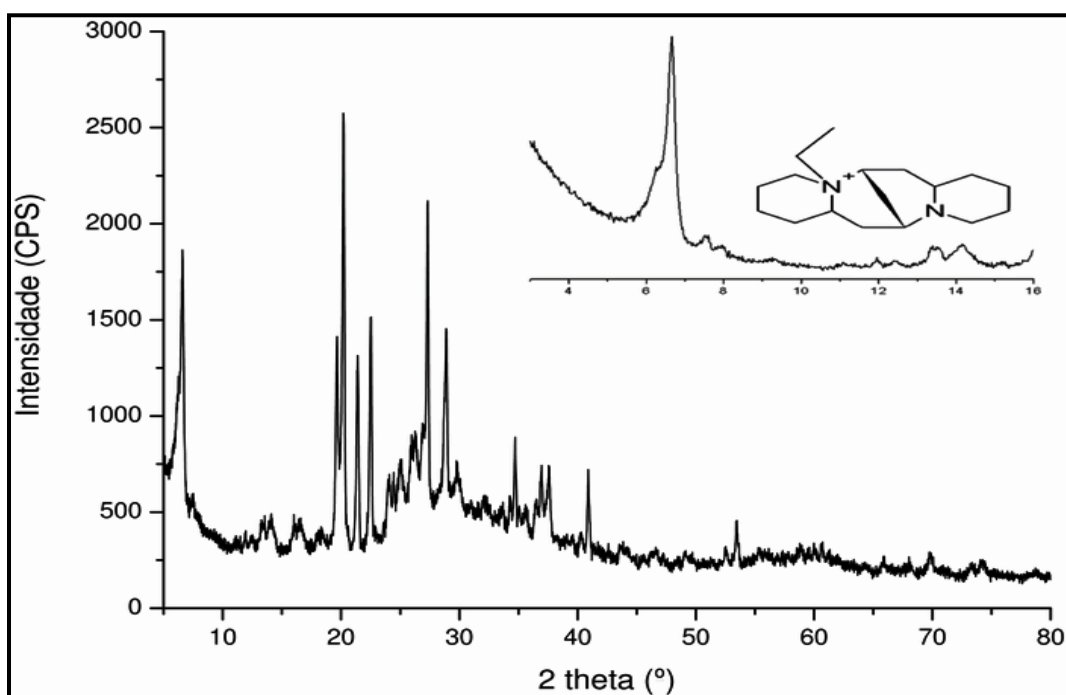


Figura 48. Difratoograma de raios-X da zeólita obtida usando o template orgânico N-Etil- Esparteínum derivado de (S)- Esparteína (230°C).

6.9.3- Morfologia dos Materiais Zeolíticos Obtidos a partir dos SDAs Derivados de (S)-Esparteína

A morfologia do material foi estudada através da microscopia eletrônica de varredura (MEV). Para as amostras preparadas com o (S)-Esparteína derivados (SDA1, SDA2 e SDA3) a 180 °C/5 dias foram todas semelhantes, neste caso foi escolhida a micrografia com a melhor qualidade, para representá-las, figura 49a. Normalmente os cristais desses materiais são um pouco diferentes daqueles obtidos a partir da síntese realizada em 5 dias/230°C. Eles são todos bem cristalizados e as amostras apresentam cerca de 1-3 µm de cristais agregados em quasi-cúbicos alongados, que são muito semelhantes à morfologia do ETS-10. Por outro lado, a morfologia dos materiais obtidos na síntese hidrotermal 230°C tem três níveis: as amostras preparadas com SDA 1 e SDA 2, figuras 49b e 49c, respectivamente, cristalizadas como agregados de longo, fino cristais prismáticos e a amostra sintetizada com SDA 3, figura 49d, cristalizada em forma de micro-folhas aglomeradas.

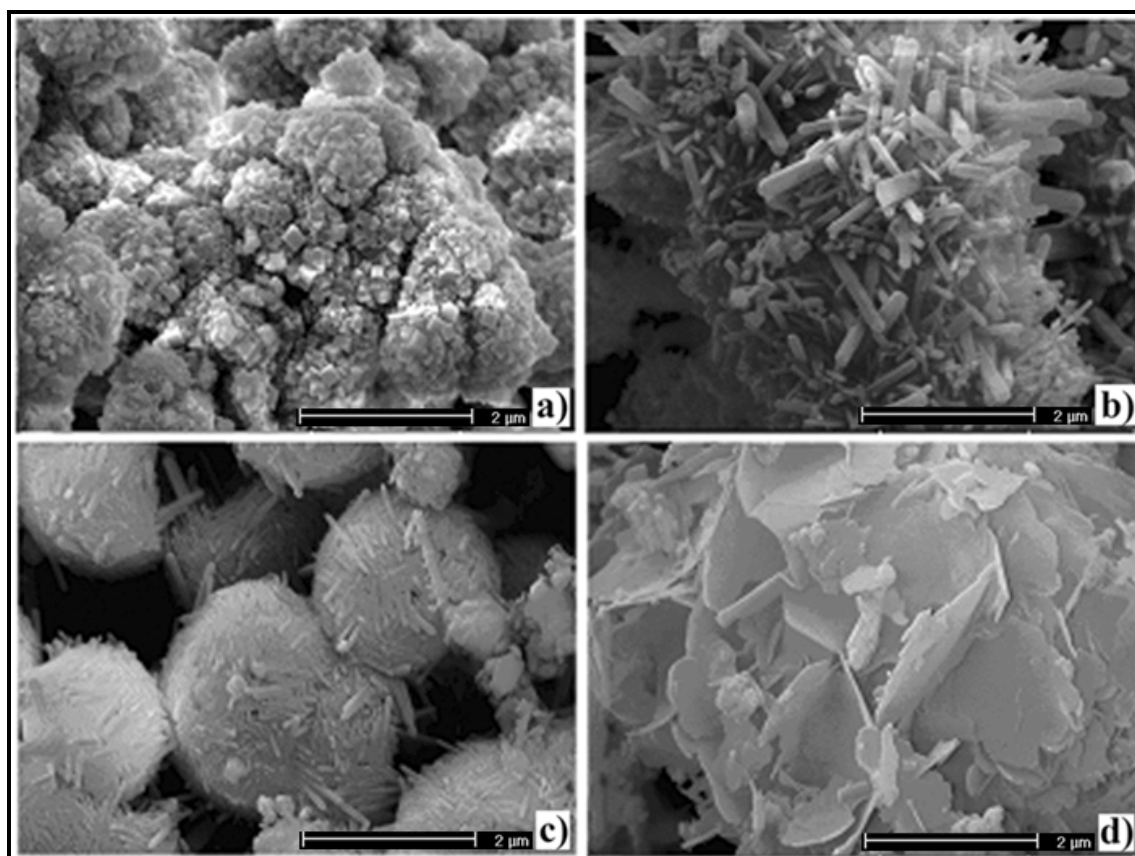


Figura 49- Micrografia eletrônica das amostras obtidas com cátions orgânicos derivados de (S)-Esparteína. a) AM-6/SDA1-3 em 180°C/5dias b) AM-6/SDA1 em 230°C/5dias c) AM-6 /SDA2 em 230°C/5dias d) AM-6/SDA3 em 230°C/5dias.

7- CONCLUSÕES

O primeiro passo do trabalho foi as sínteses das zeólitas tradicionais (FAU e GIS) em condições sol-gel. Os resultados de (DRX) e (MEV) para esses materiais indicam que tanto a zeólita faujasita quanto a gismondina foram sintetizadas, e os dados obtidos estão em concordância com os reportados na literatura (ALBERT et al, 1998; BAERLOCHER, MEIER, OLSON, 2001).

Na segunda etapa foram usadas as zeólitas (FAU e GIS) para imobilização enzimática. Análises quantitativas mostraram que tanto a zeólita faujasita quanto a gismondina foram capazes de imobilizar a enzima em questão. As enzimas imobilizadas apresentam boa atividade enzimática para a maioria dos suportes produzidos, principalmente para a GIS, e cada zeólita tem uma maneira peculiar de interagir com a enzima estudada. Fatores como a natureza do cátion de compensação da matriz zeolítica e o tratamento térmico afetam o grau de imobilização das enzimas e a atividade das enzimas.

Na sequência do trabalho avaliou-se a sinergia apresentada pelo conjugado (zeólita/lipases imobilizadas) frente à reação de transesterificação do óleo de soja para produção de biodiesel. Os teores de ésteres metílicos formados foram analisados por cromatografia gasosa e mostraram que houve uma sinergia entre a enzima estudada e a zeólita GIS/ Ni^{2+} que foi obtida por troca iônica, pois uma quantidade muito pequena de enzima (7,22 U) imobilizada neste suporte pode produzir 56,2% de ésteres metílicos (biodiesel), ao passo que para mesma quantidade de enzima na sua forma livre produziu apenas 39,3%.

Em paralelo foram realizados estudos sintéticos de novos materiais zeolíticos com potencial para produção de biodiesel baseados na estrutura da zeólita ETS-10 em condições sol-gel. Para desenvolver esse estudo o primeiro passo foi a síntese de três SDAs, derivados de (S)-Espaceína, os espectros de massa MS-ES e Ressonância Magnética (^{13}C RMN) indicam que os compostos foram obtidos. Na segunda etapa foram sintetizados materiais zeolíticos a partir dos direcionadores de estrutura derivados de (S)-Espaceína (SDAs 1, 2 e 3). Essas amostras foram caracterizadas por difração de raios-X (DRX) e microscopia eletrônica de varredura (MEV), os resultados foram comparados ao da zeólita ETS-10. Os dados de difração de raios-X dessas amostras indicam que esses novos materiais, a base de vanadossilicatos, são estruturas isomorfas à zeólita ETS-10. Os dados de MEV

mostram que a morfologia desses novos materiais é semelhante à da zeólita ETS-10 para o material sintetizado a 180°C. Os derivados de (S)-Esparteína não somente direcionaram a formação de uma estrutura isomorfa a ETS-10, mas em 230°C/5 dias levou a formação de novas espécies de vanadosilicatos.

Os resultados obtidos indicam que a zeólita gismondina trocada com os cátions Cu^{2+} , Zn^{2+} e Ni^{2+} leva a formação de potenciais matrizes de imobilização da enzima em questão, e o estudo desses materiais em várias condições, principalmente visando a produção de biodiesel, tem valor científico e tecnológico. Além disso, o estudo paralelo mostrou que os templates orgânicos derivados de (S)-Esparteína são potenciais direcionadores de estruturas zeolíticas isomorfas a zeólita ETS-10. Futuramente a eficiência catalítica desses novos catalisadores zeolíticos poderá ser estudada no processo de transesterificação de óleos vegetais a biodiesel e também poderão ser explorados em imobilizações enzimáticas.

8- PERSPECTIVAS FUTURAS

As próximas etapas, para continuidade desse trabalho, e que poderão ser exploradas futuramente são:

1. Aperfeiçoamento das condições de imobilização das enzimas sobre os suportes zeolíticos. Ex: tempo e temperatura de imobilização.
2. Aperfeiçoamento ou melhoramento das condições da reação de transesterificação para produção de biodiesel com os novos biocatalisadores, tais como relação álcool/óleo, óleo/catalisador, temperatura e tempo reacional. Ex: tempo reacional pode ser diminuído, vide **Anexo 1**.
3. Estudos de reaproveitamento do biocatalisador, onde várias reações serão feitas sucessivamente com o mesmo catalisador para determinação do tempo de vida útil de cada catalisador “*turnover*”. Além disso, verificar a quantidade de ésteres produzidos em cada ciclo.
4. Estudos dos biocatalisadores utilizando a rota etílica como solvente e o uso de óleo residual na catálise enzimática para a produção de biodiesel. Ex: Óleo residual e Etanol (95%) pode ser utilizado, vide **Anexo 2**.
5. Estudos de imobilização enzimática e produção de biodiesel com os vanádiosilicatos iso-estruturais a zeólita ETS-10 que foram sintetizados.
6. Estudos de imobilização de diferentes lipases sobre as matrizes zeolíticas objetivando explorar o complexo enzima/zeólita para produção de biodiesel.

9- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIGOR, R.D.; UADIA, P.O.; FOGLIA, T.A.; HAAS, M.J.; JONES, K.C.; OKPEFA, E.; OBIBUZOR J.U.; BAFOR, M.E. Lipase-catalysed production of biodiesel fuel from some Nigerian lauric oils. **Biochem. Soc. Trans.** 28, 979–981, 2000.

ALBERT, B.R.; CHEETHAM, A.K.; STUART J.A.; ADAMS, C.J.; Investigations on P zeolites: synthesis, characterization, and structure of highly crystalline low-silica NaP. **Micropor. Mesopor. Mater.** 21, 133. 1998.

AMARAL, D. F. Desmistificando o **Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel (A Visão da Indústria Brasileira de Óleos Vegetais)**, Associação Brasileira das Indústrias de Óleos Vegetais -ABIOVE, 2009. Disponível em: <http://www.abiove.com.br/palestras/abiove_relatorio_biodiesel_ago09_br.pdf>. Acesso em: 06 de abril de 2010.

ANDERSON, M. W.; TERASAKI O.; OHSUNA T.; O'MALLEY, P. J.; PHILIPPOU A.; MACKAY, S. P.; FERREIRA, A.; ROCHA, J.; LIDIN, S. Microporous titanosilicate ETS-10: A structural survey. **Philosophical Magazine B**, 71, 813, 1995.

ANDY, P.; GARCIA-MARTINEZ, J.; LEE, G.; GONZALEZ H.; JONES, C. W.; DAVIS, M. Acylation of 2 -Methoxynaphthalene and Isobutylbenzene over Zeolite Beta. **Journal of Catalysis**, 192 , 215, 2000.

ANTCZAK M. S., KUBIAK, A.; ANTCZAK, T.; BIELECKI, S. Enzymatic biodiesel synthesis - Key factors affecting efficiency of the process. **Renew Energy**, 34, 1185, 2009.

ASPIN, P.; HANIF, N.; ANDERSON, M.W.; CUNDY, C.S. "Ordered intergrowths of ETS-10." Recent Advanced in the Sciences and Technology of zeolites and related materials, PTSA-C, **Studies in Surface Sciences and Catalysis**, 154, 1303. Part A-C 2004.

BAERLOCHER, CH.; MEIER, W. M.; OLSON, D. H. Atlas of Zeolite Structure Types, **5th ed.; Elsevier: Amsterdam**, 156, 2001.

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.

BIOLATINA: Matéria prima. Disponível em: <<http://www.biodieselatina.com.br>>. Acesso em: janeiro de 2010.

BOZBAS, K. Biodiesel as an alternative motor fuel: production and policies in the European Union. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 12, 542, 2008.

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**, 72, 248, 1976.

BRADY, L, A Serine Protease Triad Forms the Catalytic Center of a Triacylglycerol Lipase, **Nature**, 343, 767, 1990.

BRAGA; A.A.C.; MORGON, N.H. Descrições Estruturais Cristalinas de Zeólitos, **Quim. Nova**, 30, 178, 2007.

BRASIL. **Presidência da República. Lei nº. 11.097/2005.** Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2004-2006/2005/Lei/L11097.htm>. Acesso em: 09 de mar. 2005.

CABALLERO, V.; BAUTISTA, F. M.; CAMPELO, J. M.; LUNA, D.; MARINAS, J. M.; ROMERO, A. A.; HIDALGO, J.M.; LUQUE, R.; MACARIO, A.; GIORDANO, G. Sustainable preparation of a novel glycerol-freebiofuel by using pig pancreatic lipase: Partial 1,3-regiospecific alcoholysis of sunflower oil. **Process Biochem.** 44, 334, 2009.

CHING, W. H.; RODRIGUES, C. W. **Cartilha do SEBRAE sobre biodiesel.** Disponível em: <http://www.biodiesel.gov.br/docs/Cartilha_Sebrae.pdf>. Acesso em: 3 fev. 2010.

CORMA, A.; DIAZ-CABANAS, M.J.; MARTINEZ-TRIGUERO, J.; REY, F.; RIUS, J. A large-cavity zeolite with wide pore windows and potential as an oil refining catalyst. **Nature**, 418, 514, 2002.

CORMA, A.; IBORRA, S.; MIQUEL, S.; PRIMO, J. Catalysis for the Production of Fine Chemicals: Production of Food Emulsifiers, Monoglycerides, by Glycerolysis of Fats with Solid Base Catalysts, **J. Catal.**, 173, 315, 1998.

COSTA L, BRISSOS V, LEMOS F., RAMÔA R. F.; CABRAL J.M. Enhancing the thermal stability of lipases through mutagenesis and immobilization on zeolites. **Bioprocess Biosyst Eng**, 32, 53, 2009.

CSICSERY, S.M. Shape Selective Catalysis in Zeolites. **Zeolites**, 4, 202, 1984.

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

CUNDY, C. S.; COX, P. A. The Hydrothermal Synthesis of Zeolites: Precursors, Intermediates and Reaction Mechanism. **Microporous and Mesoporous Materials**, 82, 1, 2005.

DABDOUB, M. J.; BRONZEL, J. L.; RAMPIN, M A. Biodiesel: visão crítica do status atual e perspectivas na academia e na indústria. **Química Nova**, 32, 776, 2009.

DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. G.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas lipases imobilizadas em polímeros. **Quim. Nova**, 27, 623, 2004.

DAVIS, M.E. Ordered porous materials for emerging applications, **Nature**, 417, 813, 2002.

DAVIS, M.E.; LOBO, R.F. Zeolite and molecular sieve synthesis. **Chem. Mater.**, 4,

756, 1992.

DE PAOLA, M. G.; RICCA, E.; CALABRO, V.; CURCIO, S.; IORIO, G. Factor analysis of transesterification reaction of waste oil for biodiesel production. **Bioresource Technology**, 100, 5126, 2009.

DE SOUSA J.S.; OLIVEIRA, E. A. C.; ARANDA, D. A. G.; FREIRE, D.M.G. Application of lipase from the physic nut (*Jatropha curcas* L.) to a new hybrid (enzyme/chemical) hydroesterification process for biodiesel production. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 2010.

DEMIRBAS, A. Progress and recent trends in biodiesel fuels. **Energy Conversion and Management**, 50,14, 2009.

DIZGE, N.; AYDINER, C.; IMER, D.Y.; BAYRAMOGLU, M.; TANRISEVEN, A.; KESKINLER, B. Biodiesel production from canola oil by using lipase immobilized hydrophobic microporous styrene–divinylbenzene copolymer. **Bioresour. Technol.** 100, 1983, 2009.

DOSSAT, V.; COMBES D.; MARTY, A. Continuous enzymatic transesterification of high oleic sunflower oil in a packet bed reactor: influence of the glycerol production, **Enzyme Microb Technol**, 25, 194, 1999.

DU, W. ; LI,W. ; SUN, T. ; CHEN X. ; LIU D. Perspectives for biotechnological production of biodiesel and impacts. **Appl Microbiol Biotechnol**, 79, 331, 2008.

DU, W.; XU, Y.; LIU. D. Lipase-catalysed transesterification of soya bean oil for biodiesel production during continuous batch operation. **Biotechnol Appl Biochem**, 38, 103, 2003.

FERRARI, R. A.; OLIVEIRA, V. S.; SCABIO, A. Biodiesel de soja – taxa de conversão em ésteres etílicos, caracterização físico-química e consumo em gerador de energia. **Quím. Nova**, 28, 19, 2005.

FJERBAEK, L.; CHRISTENSEN, K. V.; NORDDAHL B. A review of current state of biodiesel production using enzymatic transesterification. **Biotechnol Bioeng.**,102, 1298, 2009

FLANIGEN, E.M.; LOK, B.M.; PATTON, R.L.; WILSON, S.T. Aluminophosphate Molecular Sieves and the Periodic Table. In: New Developments in Zeolite Science and Technology, **Ed. Y.Murakami, A.Iijima & J.W.Ward, Kodansha (ToKyo) & Elsevier (Amsterdam)**, 103, 1986.

FOWKES, A.J. IBBERSON, R.M. ROSSEINSKY, M.J. Structural Characterization of the Redox Behavior in Copper-Exchanged Sodium Zeolite Y by High-Resolution Powder Neutron Diffraction. **Chemistry of Materials**, 14, 590, 2002.

FUKUDA, H.; KONDO, A.; NODA, H. Biodiesel fuel production by transesterification of oil, **J Biosci Bioeng** , 92, 405, 2001.

GHOBAR, H.; SCHAF, O.; GUTH, U. Zeolites – From Kitchen to Space. **Prog Solid State Chem.**, 27, 29, 1999.

GONÇALVES, A.P.V., LOPES, J.M., LEMOS, F., RAMÔA RIBEIRO, F., PRAZERES, D.M.F., CABRAL, J.M.S., AIRES-BARROS, M.R. Effect of the Immobilization Support on the Hydrolytic Activity of a Cutinase from *Fusarium solani* pisi, **Enzyme Microb. Technol.**, 93, 1997.

GONÇALVES, A.P.V.; LOPES, J.M.; LEMOS, F.; RAMÔA RIBEIRO, F.; PRAZERES, D.M.F.; CABRAL, J.M.S.; AIRES-BARROS, M.R. Zeolites as Supports for Enzymatic Hydrolysis Reactions. Comparative Study of Several Zeolites, **J. Mol. Catal. B: Enzymatic**, 53, 1996.

GRANADOS, M.L., POVES, M.D., ALONSO, D.M., MARISCAL, R., GALISTEO, F.C., TOST, R.M., SANTAMARIA, J., FIERRO, J.L.G. Biodiesel from sunflower oil by using activated calcium oxide. **Applied Catalysis B. Environmental**, 73, 317, 2007.

HASAN F., SHAH A.A., HAMEED A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, 39, 235, 2006.

HOYDONCKX, H., DE VOS, D., CHAVAN, S., JACOBS, P. Esterification and Transesterification of Renewable Chemicals. **Topics in Catalysis**, 27, 1022, 2004.

INTERNATIONAL ZEOLITE ASSOCIATION <<http://www.iza-online.org/>> Consulta feita no dia 06/09/2009.

ISMAIL, M.N.; FRAIMAN, N.D.; CALLAHAN JR, D.M.; GRISOY, G.; VIVEIROS, E.; OZKANAT, O.; JI, Z.; WILLEY, R.J.; WARYWODA, SACCO JR, J. A First unseeded hydrothermal synthesis of microporous vanadosilicate AM-6. **Mesoporous Materials**, 120, 454, 2009.

JAEGER K.E., DIJKSTRA B.W.; REETZ, M.T. Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. **Annu. Rev. Microbiol.**, 53, 315, 1999.

JI, Z.; WARZYWODA, J.; SACCO. JR, A. Synthesis and morphological control of large titanasilicate ETS-10 crystals. **Microporous and Mesoporous Materials**, 109, 1, 2008.

KAIEDA, M.; SAMUKAWA, T.; KONDO A.; FUKUDA, H. Effect of methanol and water contents on production of biodiesel fuel from plant oil catalyzed by various lipases in a solvent-free system, **J Biosci Bioeng**, 91, 12, 2001.

KIM, W. J.; KIM, S. D.; JUNG, H. S.; HAYHURST, D.T. Compositional and kinetic studies on the crystallization of ETS-10 in the presence of various organics. **Microporous and Mesoporous Materials**, 56, 89, 2002.

KING, L.J; CAMPBELL, D.O; COLLINS, E.D; KNAUER, J.B; WALLACE, R.M. “**Proc. 6th Int. Zeolite Conf.**”, 660, 1984.

KNOTHE, G. Historical perspectives on vegetable oil-based diesel fuels, **Inform**, 12, 1103, 2001.

KOZERSKI, G. R.; HESS, S. C. Estimativa dos poluentes emitidos pelos ônibus e microônibus de Campo Grande/MS, empregando como combustível diesel, biodiesel ou gás natural, **Engenharia Sanitária Ambiental**, 11, 113, 2006.

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.

LECLERCQ, E.; FINIELS, A.; MOREAU, C. Transesterification of rapeseed oil in the presence of basic zeolites and related solid catalysts, **J. Am. Oil Chem. Soc.**, 78, 1161, 2001.

LI, N.W.; ZONG, M.H.; WU, H. Highly efficient transformation of waste oil to biodiesel by immobilized lipase from *Penicillium expansum*, **Process Biochem**, 44, 685, 2009.

LIE, E.; MOLIN, G. Hydrolysis and Esterification with Immobilized Lipase on Hydrophobic and Hydrophilic Zeolites. **Journal Chem. Tech. Biotechnol.**, 50, 549, 1991.

LIMA, P. C. R. **Biodiesel: Um novo combustível do Brasil**. Consulta Legislativa, 2005. Disponível em: <http://apache.camara.gov.br/portal/arquivos/Camara/internet/publicacoes/estnottec/tema16/2005_177.pdf> Acesso em:15 de fev. 2010.

LINHARES, F.,N. Compatibilidade entre biodiesel brasileiro de mamona e borracha utilizada na industria automobilística. In: Biocombustível para o Mercosul: **edição 2008 do Prêmio Mercosul de Ciência e Tecnologia**, 35, 2008.

LOK, B.M.; MESSINA, C.A.; PATTON, R.L.; GAJEK, R.T.; CANNAN, T.R.; FLANIGEN, E.M. Silico Aluminophosphate Molecular Sieves: Another New Class of Microporous Crystalline Inorganic Solids. **J.Am.Chem.Soc.**, 106, 6092, 1982.

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

MA, F.; HANNA, M.A. Biodiesel production: a review. **Bioresource Technology**, 70, 1, 1999.

MACARIO, A.; GIORDANO, G.; FRONTERA, P.; CREA, F.; SETTI, L. Hydrolysis of Alkyl Ester on Lipase/Silicalite-1 Catalyst, **Catal Lett.**, 122, 43, 2008.

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

MACARIO, A.; MOLINER, M.; DIAZ, U.; JORDA, J.L.; CORMA, A.; GIORDANO, G. Biodiesel production by immobilized lipase on zeolites and related, **Studies in Surface Science and Catalysis**, 174, 1011, 2008.

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.

MEYERS, B.L.; ELY, S.R.; KUTZ, N.A.; KADUK, J.A.; BOSSCHE, V. D. Determination of structural boron in borosilicate molecular sieves via X-ray diffraction. **J.Catal.**, 91, 352, 1985.

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.

NAKAGAWA, Y. Process for preparing molecular sieves using a sparteine template. **US Patent 5,271,922**, 1993.

NARASIMHARAO K.; LEE A.; WILSON K. Catalysts in production of biodiesel: a review. **J. Biobased. Materials Bioenergy**, 1, 19, 2007.

NAVAES, A. M.; MENESES K. F.; MORAES R.A.; ALBUQUERQUE J. L. Arranjo Produtivo Local: Estratégia De Integração Da Agricultura Familiar À Cadeia Produtiva Do Biodiesel. **III Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel: Artigos Técnicos-Científicos**, 09 a 10 de novembro de 2009.

NELSON, L.A.; FOGLIA T.A.; MARMER, W.N. Lipase-catalyzed production of biodiesel, **J Am Oil Chem Soc**, 73, 1191, 1996.

NERY, J.G.; GIOTTO M.V.; MASCARENHAS Y.P.; CARDOSO, D.; ZOTIN, F.M.Z.; AGUIAR, E.F.S.A. Rietveld refinement and solid state NMR study of Nd-, Sm-, Gd-, and Dy-containing Y zeolites. **Microporous and Mesoporous Materials**, 41, 281, 2000.

NERY, J.G.; MASCARENHAS Y.P.; BONAGAMBA T.J.; MELLO, N.C. Location of cerium and lanthanum cations in CeNaY and LaNaY after calcination. **Zeolites**, 18, 44, 1997.

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

NEWSAM, J.M; VAUGHAN; D.E, In: **New Developments in Zeolite Science and Technology, Structural Studies of Gallosilicate Zeolites**. Ed. Y.Murakami, A.Iijima & J.W.Ward, Kodansha (ToKyo) & Elsevier (Amsterdam), 457, 1986.

NIE, K.; XIE, F.; WANG F.; TAN, T. Lipase catalyzed methanolysis to produce biodiesel: optimization of the biodiesel production, **J Mol Catal B: Enzym**, 43, 142, 2006.

OGINO, I.; DAVIS, M. E. Molecular sieve synthesis using alkylated sparteine derivatives as structure-directing agents. **Microporous and Mesoporous Materials**, 67, 67, 2004

OKAMOTTO, Y.; SUZUKI, K.; KITAYAMA, T.; YUKI, H.; KAGEYAMA, H.; MIKI, K.; TANAKA, N.; KASAI, N. Kinetic resolution of racemic .alpha.-methylbenzyl methacrylate: asymmetric selective polymerization catalyzed by Grignard reagent-(-)-sparteine derivative complexes. **J. Am. Chem. Soc.**, 4618, 1982.

OLSON, D. H.; KOKOTAILO, G. T.; LAWTON, S. L.; MEIER, W. M. Crystal Structure and Structure-Related Properties of ZSM-5. **J. Phys. Chem.**, 85, 2238-2243. 1981.

PALOMINO, G.T.; BORDIGA, S.; ZECCHINA, A. XRD, XAS, and IR Characterization of Copper-Exchanged Y Zeolite. **The Journal of Physical Chemistry B**, 104, 8641, 2000.

PAQUES, F. W.; MACEDO, G. A. Lipases de látex vegetais: propriedades e aplicações industriais. **Quim. Nova**, 29, 93, 2006.

PARAISE, J.B. J. Some gallium phosphate frameworks related to the aluminium phosphate molecular sieves: X-ray structural characterization of {(PriNH₃)[Ga₄(PO₄)₄·OH]}·H₂O. **Chem.Soc., Chem.Comm.**, 22, 606, 1985.

PARENTE, E. J. S. Biodiesel: Uma Aventura Tecnológica num País Engraçado. **Unigráfica: Fortaleza**, 2003.

PAVEL, C. C.; NAGY, J.B.; BILBA, N.; NASTRO, A.; PERRI, C.; VUONO, D.; DE LUCA, P.; ASAFTEI, I.V. Influence of the TAABr salts on the crystallization of ETS-10. **Microporous and Mesoporous Materials**, 2004, 71, 77-85.

PHILIPPOU, A.; ANDERSON, M.W. Aldol-Type Reactions over Basic Microporous Titanosilicate ETS-10 Type Catalysts. **Journal of Catalysis**, 189, 395, 2000.

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

POUSA, G. P. A. G.; SANTOS, A. L. F.; SUAREZ, P. A. Z. **Histórico e Política do Biodiesel no Brasil**. Disponível em:<<http://www.biodiesel.gov.br/docs/congresso2007/desenvolvimento/14.pdf>>. Acesso em: 15 de março de 2010.

RAMANATH N. B.; NAYANTARA B. Integrated process for the manufacture of biodiesel, **Patent [0260078]**, USA, 2007.

RANGANATHAN, S.V.; NARASIMHAN S.L.; MUTHUKUMAR K. An overview of enzymatic production of biodiesel. **Bioresource Technology**, 99, 3975, 2007.

RATHMANN, R.; BENEDETTI, O.; PLÁ, J.A.; PADULA, A.D. **Biodiesel: Uma alternativa estratégica na matriz energética brasileira?** Disponível em: <<http://www.biodiesel.gov.br/docs/ArtigoBiodieselGINCOB-UFRGS.pdf>> Acesso em: 13 jan. 2010. Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel, Brazil, DF, 2005.

ROCHA, J.; ANDERSON, M. W. Microporous Titanosilicates and other Novel Mixed Octahedral-Tetrahedral Framework Oxides. Eur. **J. Inorg. Chem.**, 801, 2000.

ROCHA, J.; BRANDÃO, P.; LIN, Z.; ANDERSON, M.W.; ALFREDSSON, V.; TERASAKI O. The First Large-Pore Vanadosilicate Framework Containing Hexacoordinated Vanadium. **Angewandte Chemie International Edition**, 36, 100, 1997.

ROCHA, J.; LIN, Z. Microporous mixed octahedral – pentahedral– tetrahedral framework silicates. **Rev Mineral Geochem**, 57, 173, 2005.

RODRIGUES, R.C.; LAFUENTE, R. F. Lipases from *Rhizomucor miehei* as an industrial biocatalist in chemical process. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 64, 1, 2010.

ROYON D.; DAZ M, ELLENRIEDER G.; LOCATELLI S. Enzymatic production of biodiesel from cotton seed oil using t-butanol as a solvent. **Bioresour. Technol.**, 98, 648, 2007.

SAXENA R.K.; SHEORAN A.; GIRI B.; DAVIDSON W.S. Purification strategies for microbial lipases. **J. Microbiol. Meth.**, 52, 18, 2003.

SCHÄGGER, H. Tricine SDS-PAGE, **Nature Protocols**, 1, 16, 2006.

SCHÄGGER H., VON JAGOW G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for separation of proteins in the range from 1 to 100 KDa. **Analytical Biochem**, 166, 368, 1987.

SCHRAG, J.D., SER-HIS-GLU Triad Forms The Catalytic Site Of The Lipase From *Geotrichum-Candidum*, **Nature**, 351, 761, 1991.

SCHUCHARDT, U.; SERCHELI R.; VARGAS, R.M. Transesterification of vegetable oils: a review, **J Braz Chem Soc**, 9, 199, 1998.

SERRALHA, F.N.; LOPES, J.M.; LEMOS, F.; PRAZERES, D.M.F.; AIRES-BARROS, M.R.; CABRAL, J.M.S.; RIBEIRO F. R. Zeolites as Supports for an Enzymatic Alcoholysis Reaction, **J. Mol. Catal. B: Enzymatic**, 303, 1998.

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U.C. Production, purification, characterization, and application of lipase. **Biotechnology Advances**, 19, 627, 2001.

SMART, L.; MOORE, E. Solid State Chemistry: An Introduction. **2nd ed. Londres: Chapman & Hall**, 257, 1995.

SOTOFTA, L. F.; WESTH, P.; CHRISTENSENA, K. V.; NODDAHL, B. Novel investigation of enzymatic biodiesel reaction by isothermal calorimetry. **Thermochimica Acta**, 501, 84, 2010.

SUAREZ, P.A.Z.; MENEGHETTI, S.M.P. 70º aniversário do biodiesel em 2007: evolução histórica e situação atual no Brasil. **Química Nova**, 30, 2068, 2007.

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

THOMAS, A.; ALLOUCHE, M.; BASYN, F.; BRASSEUR, R.; KERFELEC, B. Role of the lid hydrophobic pattern in Pancreatic Lipase Activity. **J. Biol. Chem.**, 280, 40074-40083, 2005.

TORII, K. Natural Zeolites, Occurrence, Properties, Use, **Pergamon**, 441, 1978.

TREACY M.M.J.; HIGGINS J.B. Collection of Simulated XRD Powder Patterns for Zeolites, **Elsevier**, Amsterdam, 2001.

TREVISAN, H. C. Lipases. In: SAID, S; PIETRO, R. C. L. C. Enzimas com agentes biotecnológicos. **Ed. Legis Summa**, Cap. 4, 35-85, 2004.

TSUJI, K. WAGNER, P. DAVIS, M.E. High-silica molecular sieve syntheses using the sparteine related compounds as structure-directing agents. **Micropor. Mater.**, 28, 461, 1999.

TURTA, N.A.; DE LUCA, P.; BILBA, N.; NAGY, J.B.; NASTRO, A. Effect of crystallization temperature on the synthesis of ETS-4 and ETS-10 titanosilicates. **Microporous and Mesoporous Materials**, 2008, 113, 425-431.

WEITKAMP, J. Zeolites and Catalysis. **Solid State Ionics**, 131, 175, 2000.

WILSON, S. T.; LOK, B. M.; MESSINA, C. A.; CANNAN, T. R.; FLANIGEN, E. M. Aluminophosphate molecular sieves: a new class of microporous crystalline inorganic solids. **J. Am. Chem. Soc.**, 104, 1146, 1982.

WINKLER, F.K., Structure of Human Pancreatic Lipase, **Nature**, 343, 771, 1990.

WINKLER, U. K.; STUCKMANN, M. Glycogen, Hyaluronate, and Some Other Polysaccharides Greatly Enhance the Formation of Exolipase by *Serratia marcescens*. **Journal of Bacteriology**, 138, 663, 1979.

YAGIZ, F.; KAZAN D.; AKIN, A.N. Biodiesel production from waste oils by using lipase immobilized on hydrotalcite and zeolites, **Chem Eng J**, 134, 262, 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, 599, 2009.

YLMAZ, B.; SHATTUCK, K.G.; MIRAGLIA, P.Q.; WARZYWODA, J. SACCO. JR., A. Synthesis of titanosilicate ETS-4 utilizing organic precursors. **Studies in Surfaces Science and catalysis**, 154, 763, 2004.

YOSHIKAWA, M.; WAGNER P.; LOVALLO, M.; TSUJI, K.; TAKEWAKI, T.; CHEN, C.Y.; BECK, L.W.; JONES, C.W.; TSAPATSIS, M.; ZONES, S.I.; DAVIS, M.E. Synthesis, Characterization, and Structure Solution of CIT-5, a New, High-Silica, Extra-Large-Pore Molecular Sieve. **J. Phys. Chem. B**, 102, 7139, 1998.

ZANIN, G. M.; 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.

ZHANG, Z. Branched Biodiesels, **Patent [0045731]**, USA, 2008.

Anexos

Anexo 1

Para avaliar o tempo reacional com o objetivo de monitorar o andamento da reação uma pequena alíquota de 100 μ L foi retirada a cada determinado período de tempo e analisada por TLC. A figura 50 mostra que o tempo reacional pode ser diminuído, ou seja, a partir de 12h de reação pode-se verificar que a maior parte do óleo já tinha sido convertida a biodiesel.

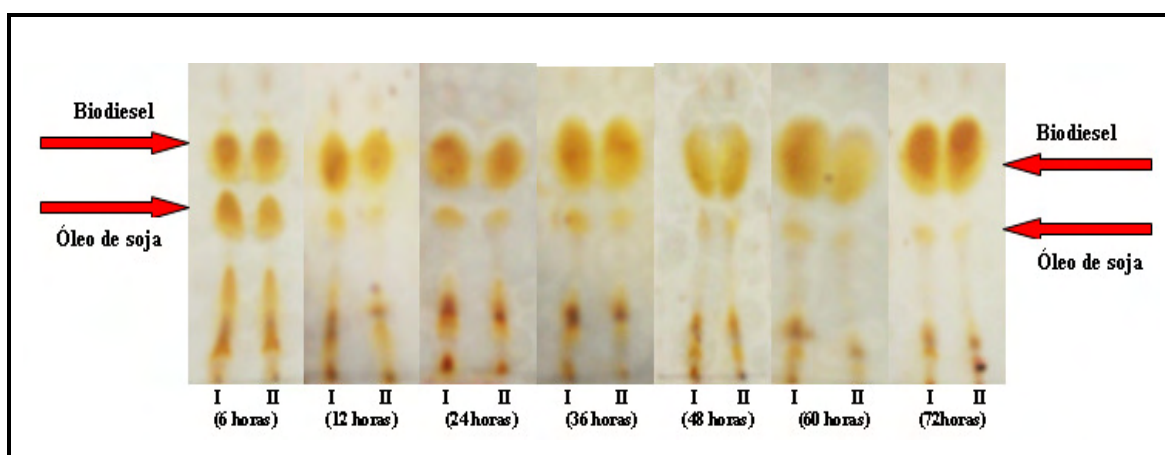


Figura 50- Avaliação do tempo reacional da produção de biodiesel catalisado pela enzima livre. Biodiesel produzido por enzima livre: 38,72 U (I) e 64,45 U (II).

Anexo 2

Para verificar o potencial catalítico da enzima livre na reação de transesterificação de matérias-primas de baixa qualidade foi utilizado óleo residual filtrado proveniente do Restaurante Universitário (RU) – UNESP/IBILCE – São José do Rio Preto - sob mesmas condições utilizadas para a transesterificação do óleo de soja limpo, os resultados aqui ilustrados são bastante animadores e mostram que a maior parte do óleo residual (I) foi convertida a biodiesel (II) para uma quantidade de enzima livre de 64,45U (figura 51A). De acordo com esses resultados a lipase (RML) mostrou ser um eficiente biocatalisador para produção de biodiesel inclusive para óleo residual com impurezas, excesso de ácidos graxos livres e elevado teor de água. Quando o etanol foi utilizado para a produção de biodiesel a partir do óleo de soja comercial a figura 51B mostra que a enzima estudada foi capaz de produzir biodiesel com etanol e converteu a maior parte do óleo de soja a ésteres etílicos produzidos tanto para o etanol absoluto quanto para o etanol (95%).

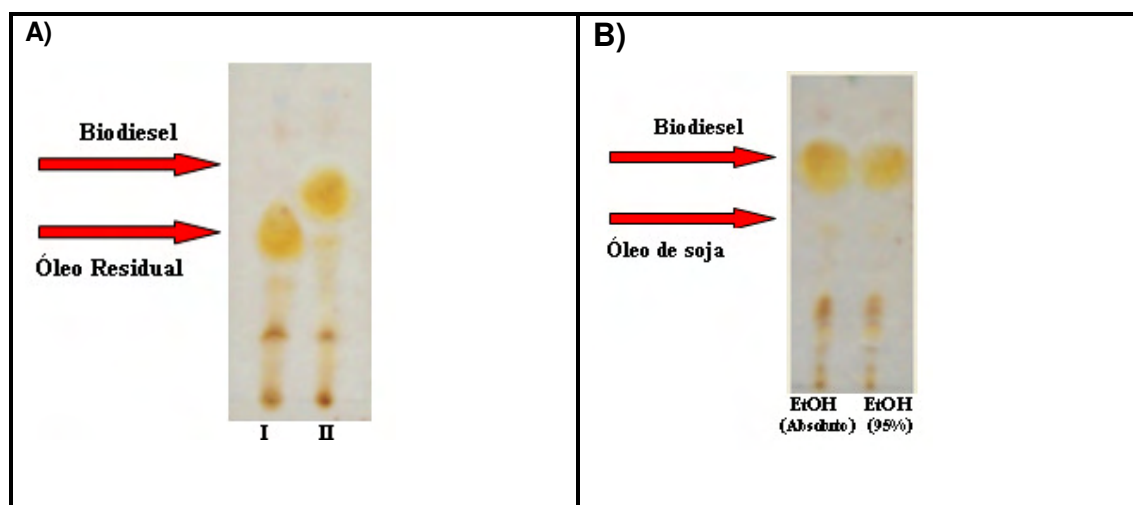


Figura 51- Potencial da catálise enzimática utilizando matéria prima de baixa qualidade. **A)** Óleo residual (I) e biodiesel produzido a partir do óleo residual catalisado por enzima livre (64,45 U) (II). **B)** Biodiesel produzido a partir do óleo soja e etanol catalisado por enzima livre (64,45 U): Etanol absoluto e Etanol (95%).