

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO ACADEMICO DE QUÍMICA E BIOLOGIA
BACHARELADO EM QUÍMICA

LETÍCIA TEIXEIRA BERTAGI

**ESTUDO COMPARATIVO DA UTILIZAÇÃO DO PENTÓXIDO DE
NIÓBIO E DAS LIPASES IMOBILIZADAS EM Nb₂O₅/ PVA COMO
CATALISADORES NA SÍNTESE DO OLEATO DE ETILA**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

CURITIBA

2015

LETÍCIA TEIXEIRA BERTAGI

ESTUDO COMPARATIVO DA UTILIZAÇÃO DO PENTÓXIDO DE NIÓBIO E DAS LIPASES IMOBILIZADAS EM Nb₂O₅/ PVA COMO CATALISADORES NA SÍNTESE DO OLEATO DE ETILA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso 2, do Bacharelado em Química Tecnológica do Departamento Acadêmico de Química e Biologia-DAQBI- da Universidade Tecnológica Federal do Paraná- UTFPR- Campus Curitiba, Sede Ecoville, como requisito parcial para obtenção do título Bacharel em Química Tecnológica.

Orientadora: Prof^a Dr^a Roberta Carolina P. Rizzo Domingues

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Cristiane Pilissão

CURITIBA

2015

LETÍCIA TEIXEIRA BERTAGI

**ESTUDO COMPARATIVO DA UTILIZAÇÃO DO PENTÓXIDO DE
NIÓBIO E DA LIPASE IMOBILIZADA EM Nb₂O₅/ ÁLCOOL
POLIVINÍLICO (PVA) COMO CATALISADORES NA SÍNTESE DO
OLEATO DE ETILA**

Trabalho de Conclusão de Curso **aprovado** como requisito parcial à obtenção do grau de BACHAREL EM QUÍMICA pelo Departamento Acadêmico de Química e Biologia (DAQBI), do Câmpus Curitiba, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), pela seguinte banca examinadora:

Membro 1 – Prof. Dr. Pedro Ramos da Costa Neto
Departamento Acadêmico de Química e Biologia (UTFPR)

Membro 2 – Prof. Dr. Paulo Roberto de Oliveira
Departamento Acadêmico de Química e Biologia (UTFPR)

Orientadora – Profa. Dra. Roberta Caroline Pelissari Rizzo Domingues
Departamento Acadêmico de Química e Biologia (UTFPR)

Coordenadora de Curso – Profa. Dra. Danielle Caroline Schnitzler

Curitiba, 10 de dezembro de 2015.

Esta Folha de Aprovação assinada encontra-se na Coordenação do Curso.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos técnicos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, especialmente a Rubia e Olga, por toda a prestatividade durante a execução desse projeto. Ao professor José Domingos Fontana e a Adélia Grzybowski por cederem e auxiliarem no manuseio do reator autoclavado, pertencente ao laboratório de química/biotecnologia de bioamassas, e por todos os conselhos e sugestões que ouvi durante as vezes que realizei as reações.

Agradeço também as professoras orientadoras, Roberta e Cristiane.

Aos meus amigos e familiares que compreenderam os períodos de ausência e me apoiaram em todos os momentos que precisei.

A minha mãe por todas as orações, conselhos, conversas, desabafos e por acreditar nos meus sonhos e objetivos, fazendo o possível e o impossível por mim, e principalmente por ser minha companheira fiel em todas as horas, para você não há agradecimentos suficientes.

Aos meus amigos da química que fizeram das horas mais difíceis momentos de alegria e de risadas. Ao meu namorado pela compreensão, ajuda, amor e apoio incondicional em todos sempre.

E claro, a Patrícia, minha amiga em tempo incondicional companheira de projeto, parceira de laboratório, e muitos outros adjetivos que não foram ditos, mas que expressam o quanto você foi importante para a realização deste projeto.

A todos que participaram direta ou indiretamente durante essa jornada, meu sincero obrigada!

Ninguém poderá construir em seu lugar as pontes que precisarás passar para atravessar o rio da vida, ninguém exceto tu, somente tu. Existe no mundo um único caminho por onde só tu podes passar. Para onde leva? Não pergunte, segue-o.

Friedrich Nietzsche

RESUMO

BERTAGI, Letícia T. **Estudo Comparativo da Utilização do Pentóxido de Nióbio e da Lipase Imobilizada em Nb₂O₅/PVA como Catalisadores na Síntese do Oleato de Etila.** Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Química) – Departamento Acadêmico de Química e Biologia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2015.

Desde meados do século XX, por razões econômicas e ambientais, diversos pesquisadores e algumas indústrias investem no desenvolvimento de tecnologias sintéticas que sejam ambientalmente favoráveis, gerando menos resíduos tóxicos e com economia de energia. O biodiesel tem se destacado na função de substituir total ou parcialmente o diesel de petróleo pois trata-se de um biocombustível renovável, biodegradável, menos tóxico e que gera uma quantidade menor de gases responsáveis pelo efeito estufa. Um dos processos utilizados para obtenção do biodiesel consiste na esterificação de ácidos graxos com álcool, como a reação de esterificação do oleato de etila a partir do ácido oleico etanol, sendo que esse processo pode ocorrer via catálise homogênea, heterogênea ou enzimática. O processo biocatalítico utilizando lipases têm despertado interesse, pois estas enzimas possuem vantagens em relação ao processo químico como o fato de apresentarem alta seletividade, atuarem em condições brandas e minimizarem a ocorrência de reações laterais. Na classe dos catalisadores heterogêneos destaca-se o pentóxido de nióbio (Nb₂O₅) o qual possui propriedades de superfície, tais como acidez de Bronsted-Lowry e área superficial elevada, que o capacitam como excelente catalisador em reações químicas e também como bom suporte para outros catalisadores. O presente trabalho teve como objetivo testar a eficiência da catálise heterogênea e enzimática na síntese do oleato de etila a partir do ácido oléico e etanol. Para a catálise enzimática foram utilizadas as lipases *Aspergillus niger* (AS), *Candida rugosa*, (AY) e *Rhizopus oryzae* (F-AP) imobilizadas em compósitos de pentóxido de nióbio e PVA. A relação ácido oleico/etanol nas análises foi de 1:1, e temperatura reacional de 40°C, retirando alíquotas após 3, 6, 12 e 24 horas de reação. Já para a catálise heterogênea foi utilizado o pentóxido de nióbio calcinado a 500°C em dois sistemas reacionais: Reator autoclavado (relação ácido oleico/etanol 1:1, temperatura de 180°C) e reator em refluxo (relação ácido oleico/etanol 1:20, temperatura de 72°C), variando em ambos os sistemas a massa do catalisador (50, 100 e 200 mg). Todos os catalisadores foram caracterizados por MEV e DRX, que comprovaram as características morfológicas do Nb₂O₅ e a presença das lipases nos filmes com pentóxido de nióbio. A partir dos resultados obtidos avaliou-se o melhor sistema de catálise para a síntese do oleato de etila através dos métodos de Lowry-Tinsley e cromatografia gasosa. O melhor resultado foi de 97% de conversão a oleato de etila, ao utilizar o pentóxido de nióbio como catalisador no reator autoclavado a 10 atm e 180°C, com a massa de 200 mg de Nb₂O₅ durante 1 hora.

Palavras Chave: Lipases, Esterificação, Pentóxido de Nióbio, Imobilização, Oleato de etila.

ABSTRACT

BERTAGI, Letícia T. **Comparative study of Niobium Pentoxide and immobilized lipase utilization in Nb₂O₅/PVA as catalyst on the Ethyl Oleate synthesis.** Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado em Química) – Departamento Acadêmico de Química e Biologia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2015.

Since the mid-twentieth century, for economic and environmental reasons, many researchers and some industries invest in the development of synthetic technologies that are environmentally favorable, generating less toxic wastes and economy of energy. The biodiesel has the function of substitute totally or partially the petroleum diesel, because it is a renewable biofuel, biodegradable, less toxic and generates less greenhouse effect gases. One of the process used to obtain the biodiesel consist in the esterification of fat acids with alcohol, and this process can occur by catalysis homogenous, heterogeneous or enzymatic. The biocatalytic process using lipases has arouse interest, because this enzymes have vantages in comparison with the chemical process as the fact of present high selectivity, act in mild conditions and minimize the lateral reactions. In the heterogeneous catalyst class the niobium pentoxide (Nb₂O₅) stands out, by having surface properties, as Bronsted-Lowry acidity and high surface area, which capacity as an excellent catalyst in chemical reactions and also as support for others catalysts. This paper has the objective test the efficiency of the heterogeneous and enzymatic catalysis in the synthesis of ethyl oleate from oleic acid and ethanol. For the enzymatic catalysis were uses the lipases *Aspergillus niger* (AS), *Candida rugosa*, (AY) and *Rhizopus oryzae* (F-AP) immobilized in niobium pentoxide compounds and PVA. The relation of oleic acid and ethanol in the analyses was 1:1, and the reaction temperature was of 40° C, aliquots was retired after 3, 6, 12 and 24 hours of reaction. For the heterogeneous catalysis was used niobium pentoxide calcined at 500° C in two reaction systems: Autoclaved reactor (relation oleic acid and ethanol 1:1, temperature of 180°C) and reflux reactor (relation oleic acid and ethanol 1:20, temperature of 72°C), changing in both systems the catalyst mass (50, 100 and 200 mg). All catalysts were characterized by MEV and DRX. which comfirmed the morfologic characteristics of Nb₂O₅ and the presence of the lipases in the niobium pentoxide films. With the obtained results the best system for the synthesis of ethyl oleate was evaluate through the methods of Lowry-Tinsley and gas chromatography. The best result was of 97% of conversion to ethyl oleate, obtained by the niobium pentoxide during the heterogeneous catalyst, using the autoclaved reactor at 10 atm and 180°C, with the mass of 200 mg of Nb₂O₅.

Key words: Lipases, esterification, niobium pentoxide, immobilization, ethyl oleate.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|--------------------------------------|
| Figura 1: Estrutura do óxido de nióbio | 16 |
| Figura 2: Estrutura química dos sítios ativos do Nb ₂ O ₅ | 16 |
| Figura 3: Formação da ligação peptídica | 18 |
| Figura 4: Representação das estruturas de uma proteína | 18 |
| Figura 5: Representação esquemática da estrutura tridimensional da lipase de <i>Bulkoderia cepacia</i> obtida por cristalografia de raios-X..... | 22 |
| Figura 6: Mecanismo da reação de hidrólise catalisada por lipase | 23 |
| Figura 7: Esquema dos métodos para imobilização de enzimas | 25 |
| Figura 8: Reação de transesterificação de um triglicérido e metanol para produção de biodiesel e glicerol..... | 26 |
| Figura 9: Cromatógrafo gasoso Shimadzu | 28 |
| Figura 10: Fluxograma das atividades desenvolvidas..... | 29 |
| Figura 11: Imagem do filme da lipase AS imobilizada em Nb ₂ O ₅ e PVA..... | 31 |
| Figura 12: Imagem de um difratômetro de raios x..... | 32 |
| Figura 13: Imagem do Microscópio Eletrônico de Varredura. | 33 |
| Figura 14: Sistema de refluxo para esterificação do ácido oleico com etanol e pentóxido de nióbio como catalisador..... | 34 |
| Figura 15: Reator autoclavado | 34 |
| Figura 16: Micrografia dos catalisadores (a) Nb ₂ O ₅ , (b) AS/Nb ₂ O ₅ /PVA, (c) F-AP/Nb ₂ O ₅ /PVA, (d) AY/Nb ₂ O ₅ /PVA, (e) AY/PVA..... | 38 |
| Figura 17: (a) Presença de Nióbio na amostra, (b) Presença de nitrogênio na amostra, (c) Presença de carbono na amostra, (d) Presença de oxigênio na amostra..... | 39 |
| Figura 18: Difratoograma de Raios-X do Nb ₂ O ₅ calcinado a 300°C por 3 horas e 500°C por 4 horas | Erro! Indicador não definido. |
| Figura 19: Esquema da reação de esterificação do ácido oleico com etanol. | 41 |
| Figura 20: Relação da absorvância de ácido oleico a 715 nm pela concentração de ácido oleico em mmol/mL. | 42 |
| Figura 21: Porcentagem de oleato de etila formado por cada catalisador de acordo com o tempo | 48 |
| Figura 22: Cromatogramas do ácido oleico, oleato de etila, AY/PVA e reator autoclavado 200 mg..... | 52 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1: : Relação entre as classes padrões de enzimas os tipos de reações que catalisam segundo UIBBM..... | 20 |
| Tabela 2: Relação entre a massa do catalisador, tempo reacional e % de conversão em oleato de etila do sistema de refluxo a 72°C | 45 |
| Tabela 3: Porcentagem de conversão em oleato de etila através do sistema do reator autoclavado durante 1 hora a 180°C e 10 atm. | 46 |
| Tabela 4: : Comparação entre as porcentagens de conversão obtidas nos métodos de Lowry-Tinsley e CG..... | 51 |
| Tabela 5: Comparação entre as condições reacionais dos catalisadores estudados na esterificação do ácido oleico com etanol, e as maiores conversões obtidas nas catálises heterogênea e enzimática..... | 54 |

Sumário

| | |
|---|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO | 10 |
| 2. OBJETIVO | 13 |
| 2.1 Objetivo geral | 13 |
| 2.2 Objetivos Específicos | 13 |
| 3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA | 14 |
| 3.1 Catálise Heterogênea | 14 |
| 3.2 Pentóxido de Níobio – Nb₂O₅ | 15 |
| 3.3 Biocatálise | 17 |
| 3.3.1 Lipases | 21 |
| 3.3.2 Imobilização de Enzimas | 24 |
| 3.4 Síntese do Oleato de Etila | 26 |
| 3.5 Quantificação do Oleato de Etila | 27 |
| 3.5.1 Método de Lowry-Tinsley | 27 |
| 3.5.2 Cromatografia Gasosa (CG) | 28 |
| 4. METODOLOGIA | 29 |
| 4.1 Obtenção do oleato de etila via catalise ácida | 30 |
| 4.2 Obtenção do catalisador Nb₂O₅ | 30 |
| 4.3 Imobilização da lipase em compósito de Nb₂O₅/PVA | 30 |
| 4.4 Caracterização dos catalisadores sintetizados | 31 |
| 4.5 Obtenção do oleato de etila via catálise heterogênea | 33 |
| 4.6 Síntese do oleato de etila via catálise enzimática | 35 |
| 4.7 Quantificação das reações | 35 |
| 4.7.1 Método Lowry-Tinsley | 35 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 37 |
| 5.1 Caracterização dos catalisadores | 37 |
| 5.1.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) | 37 |
| 5.1.2 Difração de Raio-X | 40 |
| 6. Quantificação pelo método Lowry-Tinsley | 41 |
| 6.1.2 Catálise heterogênea | 42 |
| 6.1.3 Catálise Enzimática | 47 |
| 7. CONCLUSÃO | 54 |
| 8. SUGESTÕES PARA OUTROS TRABALHOS | 55 |
| 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 56 |

1. INTRODUÇÃO

A catálise é um processo no qual a velocidade de uma reação é influenciada pela adição de uma substância química para diminuir a energia de ativação (E_a), permitindo que as reações ocorram com maior velocidade e em temperaturas mais baixas. Catalisadores são substâncias necessárias em inúmeros processos químicos, sendo que bases, ácidos, metais, enzimas, entre outras substâncias têm o poder de catalisar reações^{1,2}. Existem diferentes tipos de catálise, os quais podem ser divididos em catálise homogênea (reagentes e catalisadores na mesma fase), heterogênea (reagentes e catalisadores em fases diferentes), biocatálise (utilizando enzimas de microrganismos) e organocatálise, que é definida como a utilização de compostos orgânicos isentos de metal em sua constituição, como catalisadores com a finalidade de acelerar uma reação orgânica.³

Na catálise homogênea, reagentes e catalisador encontram-se na mesma fase, proporcionando melhor interação entre esses componentes e, conseqüentemente, resultando em melhor rendimento de reação. Este tipo de catálise é limitado, devido às dificuldades de separação do catalisador do meio de reação.^{2,3}

A catálise heterogênea apresenta-se com fases distintas, na qual em uma delas encontra-se o reagente e na outra o catalisador. Reagentes e produtos, que se encontram nas fases líquida ou gasosa, permanecem ligados a uma superfície sólida (o catalisador) por meio de interações covalentes ou por adsorção.^{3,4} Na catálise heterogênea pode-se destacar a utilização do pentóxido de nióbio (Nb_2O_5), pois os óxidos de nióbio aumentam acentuadamente a atividade catalítica e também prolongam a vida do catalisador quando adicionado em pequenas quantidades.⁴ O elemento nióbio é um metal de transição podendo ser encontrado na natureza quando combinado com outros metais. O Brasil possui a grande vantagem de ter uma das maiores reservas do metal, pois atualmente, as três maiores reservas exploradas de nióbio no mundo estão localizadas no Brasil (Araxá, no Estado de Minas Gerais; Catalão e Ovidor, no Estado de Goiás), seguido por reservas no Canadá e Austrália.⁵ O Nb_2O_5 tem sido largamente estudado como catalisador em vários tipos de reações tais como a esterificação, hidrólise, condensação, alquilação e desidrogenação e também como suporte para outros catalisadores, caracterizando-o como um catalisador versátil.²

A biocatálise pode ser definida como modificações específicas da estrutura molecular de uma substância catalisada por meios biológicos, como células íntegras ou imobilizadas,

enzimas ou seus extratos e microrganismos.³ Atualmente, a biocatálise é um dos processos mais promissores para a síntese de compostos de alto valor agregado e as enzimas e células são os biocatalisadores mais frequentemente utilizados.

As enzimas são em geral de natureza protéica, isto é, são formadas por longas cadeias de aminoácidos ligados por ligações peptídicas que podem ser encontradas em células animais ou de plantas, bem como em microrganismos e possuem algumas vantagens como, por exemplo, o fato de atuarem em condições suaves de temperatura e pressão, além da alta seletividade.^{3;4} Uma classe de enzimas que ganhou muito destaque são as lipases, as quais são consideravelmente utilizadas em síntese orgânica devido à sua grande disponibilidade e baixo custo. Além disso, não requerem cofatores, atuam em uma faixa de pH relativamente grande, são muito estáveis no meio em que atuam, e podem apresentar alta seletividade, tais como regioseletividade, quimiosseletividade e enantioseletividade.⁴

Muitas enzimas são cataliticamente ativas em ambientes hidrofóbicos, com eficiência similar àquela encontrada em solução aquosa. Porém, estes catalisadores estão sujeitos à inativação em meio orgânico, por fatores químicos, físicos ou biológicos.^{5,6} Visando protegê-los das interações com o solvente, técnicas de imobilização tem sido utilizadas com o intuito de aumentar a atividade catalítica das enzimas, foram apresentados na literatura vários procedimentos de imobilização para obter um biocatalisador com atividade e estabilidade que não sejam afetadas durante o processo.^{5,7}

A catálise é um fator importante nas pesquisas para obtenção de combustíveis provenientes de fontes renováveis. Nesse contexto, a produção de biocombustíveis, em especial o biodiesel, tornou-se uma das formas mais eficientes de diversificar a matriz energética, contribuindo para a conservação do meio ambiente, através da redução da emissão de gases do efeito estufa; para o desenvolvimento econômico.¹

Uma reação muito estudada como modelo e, posterior aplicação na produção de biodiesel, é a esterificação do ácido oleico, presente em vários óleos vegetais, resultando em oleato de alquila. As reações de esterificação são, em sua grande maioria, catalisadas por ácidos fortes como, por exemplo, o ácido sulfúrico. Todavia a catálise ácida não é considerada sustentável pois, o ácido pode ser utilizado apenas uma vez e, também, por caracterizar uma catálise homogênea dificultando a purificação do produto.⁶ Portanto existe grande preocupação em otimizar esse processo pois, os produtos dessa reação como, por exemplo, o oleato de etila, são de grande importância em indústrias de cosméticos, detergentes, alimentos e também na produção de biocombustíveis.

A partir dessas considerações, neste trabalho foi realizado o estudo da síntese do oleato de etila, partindo do ácido oleico com álcool etílico, utilizando pentóxido de nióbio como catalisador heterogêneo e lipases imobilizadas em álcool polivinílico e pentóxido de nióbio como biocatalisadores. Os catalisadores foram caracterizados pelas técnicas de Difração de Raios X, Microscopia eletrônica de Varredura. Posteriormente esses catalisadores foram testados na reação de esterificação do ácido oleico com etanol, afim de comparar a eficiência catalítica do Nb_2O_5 , bem como, o compósito formado por Nb_2O_5 /PVA/lipase.

2. OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

Este trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência do Nb_2O_5 puro como catalisador heterogêneo, bem como, o Nb_2O_5 como suporte na imobilização de lipases formando compósitos de pentóxido de nióbio/PVA/lipase como biocatalisadores na síntese do oleato de etila a partir do ácido oleico.

2.2 Objetivos Específicos

1. Sintetizar o oleato de etila via catálise ácida, utilizando ácido sulfúrico PA como caralisador, para a obtenção do padrão a ser utilizado na quantificação dos ésteres obtidos via catálise heterogênea e via catalise enzimática
2. Caracterizar o padrão por cromatografia gasosa (CG).
3. Avaliar a eficiência do pentóxido de nióbio puro como catalisador na síntese do oleato de etila variando os seguintes parâmetros: massa do catalisador, tempo reacional e tipos de sistemas reacionais (reator autoclavado e reação em refluxo).
4. Imobilizar as lipases AY, AS e F-AP em Nb_2O_5 suportadas em álcool polivinílico como biocatalisador na síntese do oleato de etila.
5. Realizar a microscopia eletrônica de varredura (MEV) para comprovar a presença das lipases no suporte (Nb_2O_5 / PVA).
6. Avaliar a eficiência das lipases AS, AY e F-AP imobilizadas em Nb_2O_5 como catalisadores na síntese do oleato de etila em diferentes tempos reacionais.
7. Determinar a conversão do ácido oleico à oleato de etila pelo método de Lowry Tinsley e por cromatografia gasosa.
8. Comparar os resultados entre os catalisadores testados.

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Catálise Heterogênea

Ao introduzirmos um catalisador no meio reacional sabemos que a reação processa-se seguindo um novo percurso energeticamente mais favorável quando comparada à não catalisada. Resumidamente dizemos que a energia de ativação da reação é reduzida na presença do catalisador e, por consequência, a velocidade da reação aumenta.

Do ponto de vista cinético, a reação de transesterificação do biodiesel pode ser realizada usando-se catalisadores básicos, ácidos ou enzimas. A catálise básica é, indiscutivelmente, a mais utilizada em todo mundo¹. A produção industrial é, em sua quase totalidade, conduzida por esta rota¹, portanto é necessário otimizar os processos catalíticos por outras vias, para reduzir o uso de catalisadores básicos, e nesse âmbito destacam-se a biocatálise e catálise heterogênea.

A catálise heterogênea apresenta-se com fases distintas, na qual em uma delas encontra-se o reagente e na outra o catalisador. Reagentes e produtos, que se encontram nas fases líquida ou gasosa, permanecem ligados a uma superfície sólida (o catalisador) por meio de interações covalentes ou por adsorção^{3,8}. Desta forma, é possível separar eficientemente o produto formado do catalisador. Existem algumas vantagens desse tipo de catálise em comparação a catálise tradicional, dentre elas podemos citar⁹:

- Minimização dos custos relacionados aos processos de separação e purificação;
- Reutilização do catalisador;
- Fácil manuseio;
- Minimização de rejeitos;
- Alta estabilidade térmica;
- Maior seletividade perante vários tipos de reações.

Os catalisadores heterogêneos são, em sua grande maioria, sólidos e sua eficiência catalítica está diretamente ligada à sua superfície¹⁰. Dentre os catalisadores heterogêneos mais utilizados estão zeólitas e óxidos metálicos (pentóxido de nióbio, óxido de cálcio, entre outros). Esses catalisadores podem ser utilizados diretamente na reação ou como suporte para

outros catalisadores que estão de alguma maneira ligados a outras substâncias químicas como, por exemplo, enzimas imobilizadas.^{10,11}

Inúmeros catalisadores heterogêneos têm sido estudados nas reações de esterificação e transesterificação destacando-se as enzimas imobilizadas e óxidos de metais, dentre eles o pentóxido de nióbio.

3.2 Pentóxido de Nióbio – Nb_2O_5

O Nióbio é um elemento químico classificado como um metal de transição pertencente ao grupo 5 da tabela periódica. Em condições normais de temperatura e pressão (CNTP) é um metal prateado brilhante com estrutura cúbica de corpo centrado. Quando puro é macio e dúctil, entretanto, impurezas alteram essas propriedades.^{5,11} O mineral nióbio é encontrado na natureza associado a outros minerais sendo que, na maioria das vezes, o elemento associado é o tântalo, devido à forte afinidade geoquímica desses metais.⁵

Os minerais de nióbio não são abundantes na crosta terrestre, no entanto, o Brasil ocupa um papel importante na extração desse metal sendo que a maior parte do mineral disponível para a extração, cerca de 98% de todo nióbio do mundo, está no Brasil onde a maior jazida localiza-se em Araxá –MG.⁵

A possibilidade de formar diferentes tipos de óxidos, com diferentes cores e propriedades, é uma característica do nióbio, sendo que existe uma fórmula geral que determina a estequiometria de formação dos óxidos, sendo essa: $\text{Nb}_{3n+1} \text{O}_{8n-2}$: ($n = 5,6,7,8$). Os óxidos mais conhecidos são: NbO - de cor preta; NbO_2 - de cor cinza e Nb_2O_5 - de cor branca.^{4, 12, 13}

O Pentóxido de Nióbio é o mais estável dos óxidos formados e o estado de oxidação do nióbio nesse composto é +5, formando um pó branco insolúvel em água.² O Nb_2O_5 geralmente possui em sua estrutura cristalina de octaedros de NbO_6 , estrutura esta que pode ser distorcida em diferentes graus. A estrutura química do Nb_2O_5 é considerada complexa visto que esse óxido possui diversos polimorfismos que permeiam entre duas principais fases: amorfa e cristalina. Na fase cristalina o pentóxido de nióbio pode assumir quatro fases de cristalinidade diferentes sendo que, dentro de cada fase ainda possui diferentes formas alotrópicas.¹² O processo de cristalização inicia-se quando o pentóxido de nióbio é submetido ao tratamento térmico, pois quando submetido ao calor as estruturas das ligações do composto

sofrem um rearranjo expondo mais os sítios ativos, e melhorando sua capacidade como catalisador ⁴, como podemos observar na estrutura da **Figura 1**.

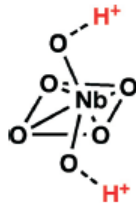


Figura 1: Estrutura do óxido de nióbio ¹³

Em catálise os compostos contendo nióbio são utilizados para diversas reações de interesse industrial e, o interesse pela aplicação desse composto é resultado de inúmeras publicações de trabalhos que demonstraram um aumento considerável da atividade catalítica, seletividade e estabilidade química de catalisadores tradicionais quando pequenas quantidades de nióbio eram adicionadas aos catalisadores.^{12,14} Podendo atuar como fase ativa ou como suporte, os compostos de óxidos de nióbio são catalisadores interessantes, pois apresentam propriedades de sua superfície, tais como acidez e área superficial, variando de acordo com: os teores de nióbio (alguns metais podem se combinar ao nióbio com a finalidade de melhorar o desempenho deste como, por exemplo, o óxido de titânio); natureza do suporte (as interações entre nióbio e suporte na maioria das vezes aumenta o poder catalítico dos compostos de nióbio) e, a temperatura de calcinação (o tratamento térmico ativa os sítios catalíticos).^{11, 12}

O potencial catalítico de um catalisador está diretamente ligado à acidez de seu sítio ativo ¹⁵. O pentóxido de nióbio possui sítios ácidos de Bronsted e Lewis (**Figura 2**), com elevada acidez ($H_0 = -5,6$) e características anfóteras, podendo ser dissolvido tanto em ácidos fortes como em bases fortes. Visto que muitas reações como, por exemplo, as reações de transesterificação de óleos e gorduras para produção de biodiesel, podem ser favorecidas com a presença de catalisadores de caráter ácido e, os materiais a base de nióbio são considerados excelentes opções para essas reações.

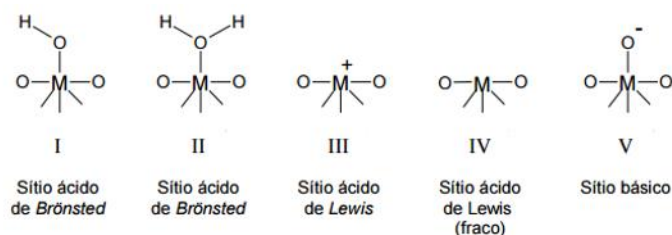


Figura 2: Estrutura química dos sítios ativos do Nb₂O₅ ¹⁵

A acidez relatada caracteriza o Nb_2O_5 , também como fase suportada, pois associado a outros metais pode aumentar a seletividade de outros catalisadores ligados a ele, em diversas reações. Por possuir um elétron extra na camada *d* compostos com nióbio elevam a interação metal-suporte, favorecendo a aplicação como suporte, devido à possibilidade de forte ligação com a fase ativa. O Nb_2O_5 tem sido estudado como catalisador em vários tipos de reações tais como a esterificação, hidrólise, condensação, alquilação e desidrogenação⁴.

Em relação às reações de esterificação e transesterificação, que tradicionalmente tem como catalisadores bases fortes, a utilização do Nb_2O_5 é uma alternativa para evitar um grande problema que ocorre via catalise básica, que é a saponificação.⁸ Além disso, os catalisadores heterogêneos possuem como vantagem a facilidade de separação do catalisador ao final da reação e, exemplificando através da reação de transesterificação do biodiesel, também gera um produto mais puro, no caso, o glicerol com elevado grau de pureza (livre de sais) e eliminação da fase de neutralização do catalisador alcalino.⁸ Apesar do elevado potencial como catalisador nas reações de esterificação, o pentóxido de nióbio ainda é utilizado em menor quantidade para a produção, por exemplo, de biodiesel quando comparado à catálise homogênea.

Além da catálise heterogênea, outra via catalítica que possui grande potencial para substituir catalisadores ácidos e básicos nas reações de esterificação e transesterificação é a biocatálise, que utiliza enzimas provenientes de microrganismos como catalisadores.

3.3 Biocatálise

A biocatálise pode ser definida como a transformação de uma substância em outra utilizando catalisadores biológicos, tais como, células íntegras ou isoladas, enzimas livres ou imobilizadas.³

Enzimas em geral são catalisadores de origem proteica produzidas por organismos vivos.¹⁶ A estrutura das enzimas, bem como a de qualquer outra proteína, é formada por longas sequências de aminoácidos ligados através das ligações peptídicas (**Figura 3**).¹⁷ Ao se estabelecerem a sequência de aminoácidos que formam as proteínas, essas se organizam em quatro diferentes estruturas denominadas estruturas primária, secundária, terciária e quaternária. A estrutura primária (**Figura 4a**) corresponde à sequência de aminoácidos de uma proteína. A estrutura secundária (**Figura 4b**) refere-se ao arranjo dos resíduos dos

aminoácidos formando um padrão estrutural que assume uma forma tridimensional correspondente à estrutura terciária (**Figura 4c**). Algumas proteínas são constituídas por mais de uma cadeia polipeptídica e o arranjo dessas subunidades refere-se a estrutura quaternária (**Figura 4d**).¹⁶

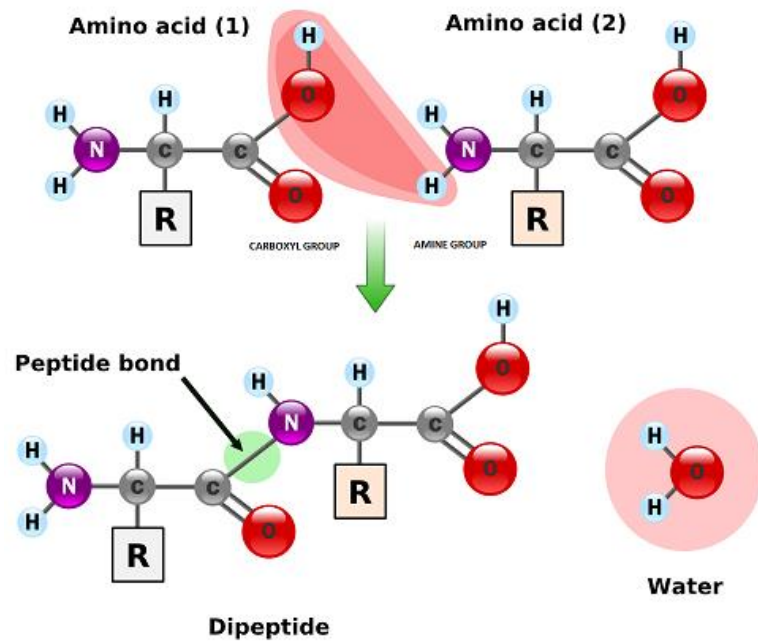


Figura 3: Formação da ligação peptídica¹⁷

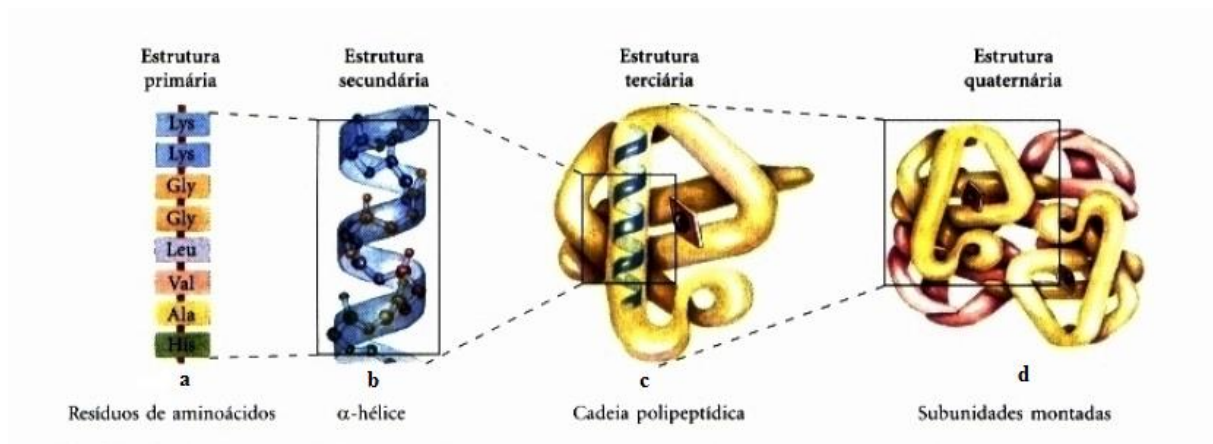


Figura 4: Representação das estruturas de uma proteína¹⁶

A atividade catalítica de uma enzima depende da integridade de sua conformação proteica nativa, portanto se uma enzima tem as suas estruturas nativas (primária, secundária, terciária e quaternária) rompidas, perde-se a atividade catalítica da mesma. A perda da estrutura terciária e quaternária da enzima é denominada desnaturação, processo que ocorre quando a enzima é submetida a variações nas condições nativas, podendo ocorrer por fatores químicos, físicos ou biológicos. Portanto em reações catalisadas por enzimas é imprescindível manter as condições reacionais de forma que não se altere bruscamente fatores como, por exemplo, a temperatura e o pH.¹⁶

A eficiência catalítica das enzimas é muito elevada quando comparada aos catalisadores sintéticos ou inorgânicos, cerca de 10^6 vezes maior, além de atuarem em condições mais brandas.¹⁷ Por isso a aplicação de biocatalisadores na indústria é objeto de muitas investigações, principalmente pelo fato de existir um processo enzimático equivalente para cada tipo de reação orgânica⁶. Dentre as diversas vantagens podemos citar¹⁸:

- **Alta especificidade:** Catalisam substâncias com características químicas específicas raras vezes produzindo subprodutos.
- **Elevada atividade catalítica:** Processos catalisados por enzimas aumentam cerca de 10^{18} a velocidade das reações quando comparadas as não catalisadas.
- **Atuam em condições brandas:** Diferente dos demais catalisadores as enzimas catalisam reações em temperaturas abaixo de 100°C , pH quase neutro e pressão atmosférica.

Visto que as vantagens ao se utilizar a biocatálise são consideráveis é necessário optar adequadamente a classe de enzimas de acordo com a reação que será estudada, especialmente pela característica enzimática de alta especificidade. As diferentes classes possuem um padrão determinado pela União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (UIBBM) e estão descritas na **Tabela 1**, bem como as respectivas reações catalisadas¹⁶.

Tabela 1: Relação entre as classes padrões de enzimas os tipos de reações que catalisam segundo UIBBM ¹⁶

| Classe | Reação Catalisada |
|---------------|---|
| Oxirredutase | Transferência de elétrons (Átomos de hidrogênio ou íons hidreto) |
| Hidrolases | Reações de hidrolise (Transferência de grupos funcionais para a água) |
| Transfereases | Transferências de grupos funcionais |
| Liasas | Adição de grupos as duplas ligações ou formação de duplas ligações removendo grupos |
| Isomerases | Formação de isômeros |
| Ligases | Formação de ligações específicas de condensação acopladas a quebra de ATP |

De uma forma geral as enzimas são encontradas em células animais, vegetais e também em microrganismos, dos quais são isoladas e purificadas com a função de evitar a ocorrência de reações laterais indesejáveis, ou seja, formação de subprodutos.^{6,16}

Especificamente em síntese orgânica a utilização de enzimas vem crescendo e desmistificando a ideia de que somente o meio aquoso era favorável à atividade catalítica, pois com o avanço das técnicas de imobilização, que minimizam os efeitos desfavoráveis ao utiliza-las em ambientes adversos como, por exemplo, o uso de solventes, variações no pH e/ou temperatura, as enzimas são eficientes catalisadores em meio orgânico. Com a utilização das técnicas de imobilização também é possível manter a conformação natural das enzimas com atividade catalítica algumas vezes até superior comparado ao meio aquoso. Os fatores responsáveis para a manutenção da conformação estrutural da enzima em meios orgânicos podem ser ^{4,18}:

- Aumento das interações eletrostáticas entre os grupos integrantes da enzima em solventes orgânicos
- Baixa constante dielétrica da maioria dos grupos integrantes da enzima
- Aumento do número de ligações de hidrogênio intramoleculares

Apesar das vantagens as reações catalisadas por enzimas possuem algumas desvantagens, entre essas podemos citar os mais comuns⁶:

- **Necessidade de utilização de co-fatores:** Substâncias que se ligam ao sítio ativo da enzima permitindo que ocorra a reação com substratos não naturais.
- **Inibição enzimática:** Muitos processos são propensos a inibição pelo produto formado e/ou pelo substrato reduzindo a eficiência.

- **Controle rígido dos parâmetros reacionais:** Existem faixas específicas de pH e temperatura para a catalise enzimática e quando bruscamente alteradas causam a desnaturação e perda da função catalítica das enzimas.

Para que o processo de biotransformação ocorra da melhor forma possível existem maneiras de minimizar as desvantagens citadas, dentre estas fazendo o uso de técnicas de imobilização, que protegem a enzima da ação do solvente, por exemplo, além de fornecer estabilidade e facilitar a recuperação e reutilização de enzimas^{19, 20}.

Com uma vasta aplicação em reações orgânicas as lipases são as enzimas mais estudadas nos últimos anos, pois estas enzimas não necessitam de cofatores e podem atuar em uma ampla faixa de pH e temperatura.

3.3.1 Lipases

As lipases pertencem ao grupo das hidrolases que catalisam a conversão de triacilgliceróis a ácidos graxos livres e glicerol. Como as demais enzimas as lipases podem ser obtidas de animais, plantas, microrganismos, sendo os fungos a melhores fontes de obtenção da enzima, pois esses tendem a produzir enzimas extracelulares facilitando a extração e purificação⁴.

O sítio ativo da lipase é formado por uma tríade catalítica constituída pelos aminoácidos: serina, histina e, ácido aspártico ou glutâmico (Ser-His-Asp/ Glu, **Figura 5**), sendo que a ativação das propriedades catalíticas ocorre na interface lipídeo/água. Normalmente o sítio catalítico é protegido por uma molécula hidrofóbica, comparada a uma “tampa” que exposta à interface lipídeo/água sofre uma mudança conformacional expondo o sítio ativo da enzima²¹.

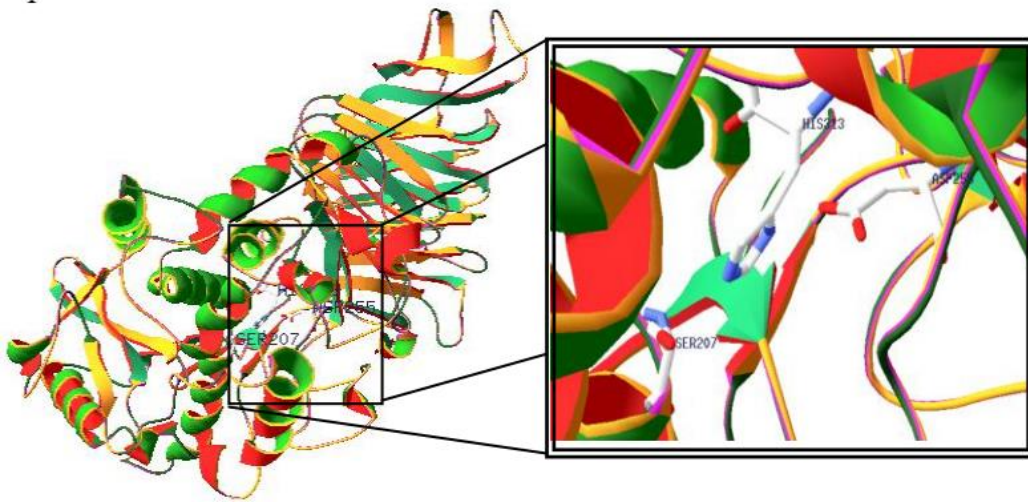


Figura 5: Representação esquemática da estrutura tridimensional da lipase de *Bulkoderia cepacia* obtida por cristalografia de raios-X²²

As lipases têm excelente atividade catalítica e uma maior estabilidade em meios não aquosos em comparação as demais classes, portanto dentro da química orgânica estas enzimas são versáteis e podem catalisar diferentes reações, tais como, reações de transesterificação, esterificação ou hidrólise, acidólise, alcóolise e aminólise^{23,24}.

O mecanismo de esterificação catalisada pelas lipases inicia com a ativação do sítio catalítico, em seguida o ácido graxo forma um complexo acil-enzima, um intermediário de reação, liberando uma molécula de água. Em seguida ocorre a ligação do álcool ao complexo acil-enzima. Este último é então transformado em complexo de éster-enzima liberando o éster e recuperando a enzima. (**Figura 6**).²⁰

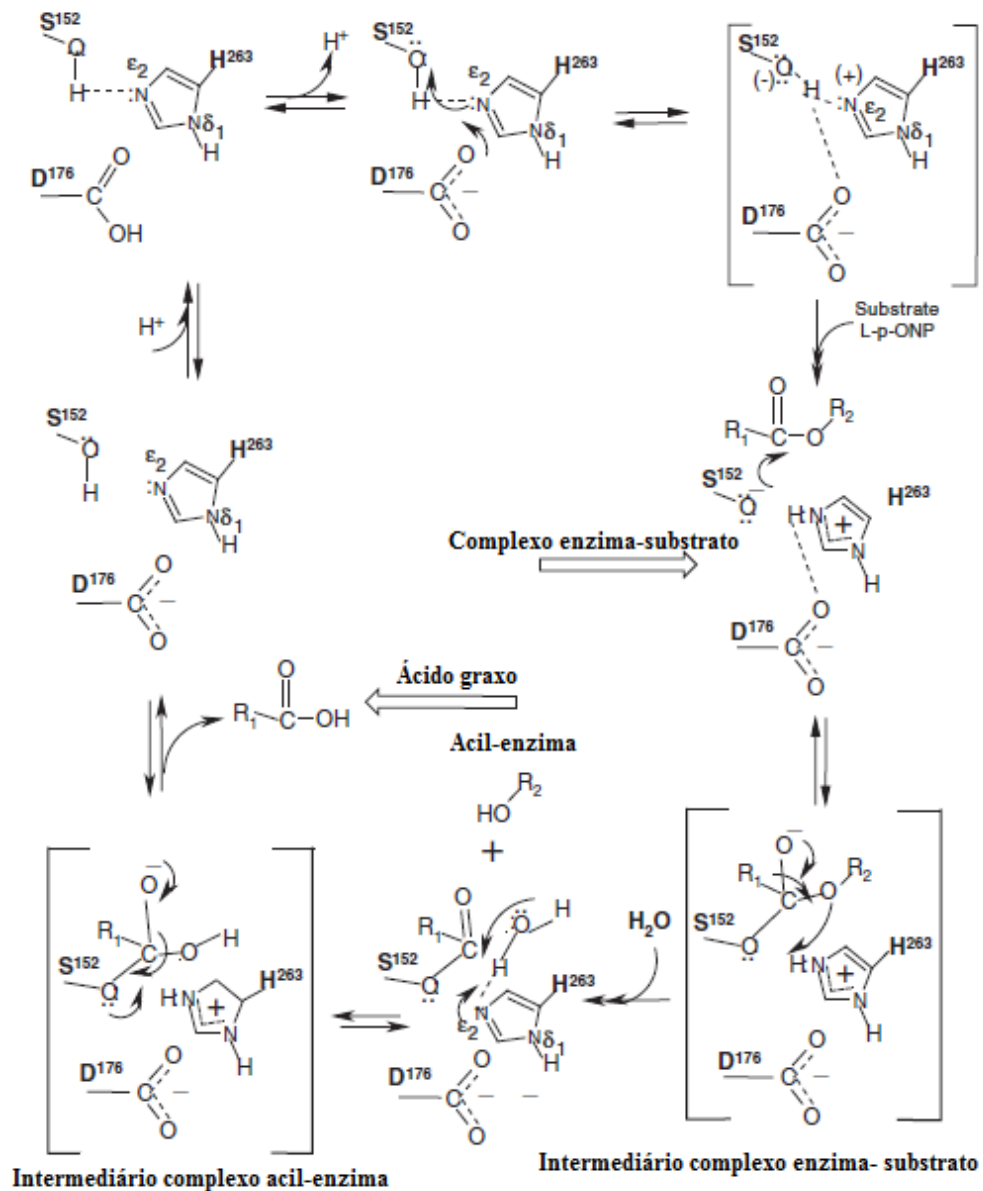


Figura 6: Mecanismo da reação de hidrólise catalisada por lipase ²⁰

O rendimento da reação pode ser controlado variando as concentrações de enzima e substrato, a razão molar, o valor de pH da reação, a temperatura e o teor de água.

Algumas propriedades das lipases justificam a grande aplicação dessa enzima nas reações citadas, como fato de catalisarem reações com elevada especificidade, além de não necessitarem de cofatores, serem de baixo custo e grande disponibilidade. Todavia, um dos gargalos para aplicação industrial da lipase é alto custo do biocatalisador. Portanto os métodos de imobilização foram introduzidos para melhorar a estabilidade das lipases e permitir a reutilização das mesmas, reduzindo assim o custo do processo.

3.3.2 Imobilização de Enzimas

O desenvolvimento de técnicas de imobilização tem sido importante por proporcionar a reutilização das enzimas, facilitar a separação dos produtos e aumentar a estabilidade em solventes orgânicos ²⁰.

Imobilizar uma enzima consiste em confiná-la em um espaço envolto por barreiras que permitem o contato entre o substrato e a enzima durante a reação, porém, ao mesmo tempo, a tornam pouco solúvel em qualquer meio. Ao realizar a imobilização de enzimas tem-se como principal objetivo obter um biocatalisador com atividade e estabilidade que não sejam afetadas durante o processo, quando comparado à sua atuação na forma livre ²³. É importante que ao imobilizar uma enzima não ocorram alterações estruturais ⁴.

Para ser efetivo na imobilização o suporte deve deixar a enzima acessível aos substratos, fornecer uma atmosfera inerte e biocompatível, sem interferir na estrutura nativa da proteína, manter sua atividade por um longo período e permitir que o sistema (suporte/enzima) seja regenerado ao final do processo, sem que ocorram perdas na atividade enzimática ²⁵.

A escolha da matriz é muito importante para uma boa atuação do sistema com a enzima imobilizada. As características desejáveis para um bom suporte são: área superficial grande, boa permeabilidade, características hidrofílicas, estabilidade química, mecânica e térmica, alta rigidez, forma e tamanhos adequados, resistência ao ataque de microrganismos e poder ser reutilizado ^{6,25}.

Dentre as formas de imobilização mais utilizadas podemos citar: adsorção ou ligação da enzima em um material insolúvel; uso de um reagente multifuncional através de ligações cruzadas; confinamento em matrizes formadas por géis poliméricos; encapsulação através de uma membrana polimérica. ^{4,7}, conforme mostra a **Figura 7**.

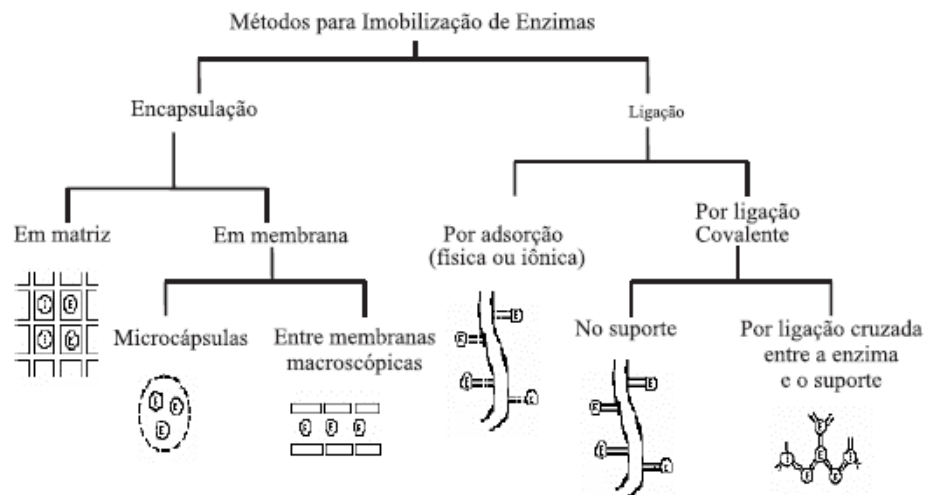


Figura 7: Esquema dos métodos para imobilização de enzimas ²⁵

A imobilização por encapsulação pode ser dividida em membrana ou matriz. A primeira a enzima encontra-se fisicamente separada por uma membrana semipermeável, similar ao modelo biológico que conhecemos, podendo ainda estar encapsulada (enzima permanece dentro de microcápsulas) ou confinadas entre membranas em uma determinada região da solução. Já encapsulamento por matriz a enzima é aprisionada em malhas de um polímero geliforme. Dentre essas formas de imobilização a mais utilizada é a microencapsulação através dos biocatalisadores em polímeros insolúveis (poli-óxido de etileno, poli-álcool vinílico, quitosana, entre outros) formando filmes ou, em microcápsulas. Essa técnica é muito utilizada pois a enzima não está quimicamente ligada ao polímero evitando assim a sua desnaturação.²⁵

Já a imobilização por ligação covalente, como o próprio nome diz, a enzima está covalentemente ligada ao suporte, ou ainda por ligações cruzadas entre grupos presentes no biocatalisador com grupos reativos do suporte. Ao utilizar esse método pode existir perda da atividade catalítica da enzima, visto que as interações entre enzima-suporte são fortes.

E por último há o método de adsorção, em que a enzima é adsorvida em um suporte inerte e se mantém unida através de interações intermoleculares (ligações de hidrogênio, interações dipolo-dipolo, força de van der Waals e interações hidrofóbicas.) ⁷

Ao imobilizar uma enzima a atividade catalítica dela pode ou não ser favorecida, mesmo com a escolha adequada da forma de imobilização ainda podem existir fatores que prejudiquem a biocatálise. Para este trabalho selecionou testar a eficiência dos catalisadores na reação de esterificação entre ácido oleico e etanol.

3.4 Síntese do Oleato de Etila

A preocupação em desenvolver processos de produção de energia renovável cresce cada vez mais visto que a preocupação com o meio ambiente é notável em todas as áreas de pesquisa. Os combustíveis derivados do petróleo são hoje a forma mais utilizada para obtenção de energia, entretanto o fato de gerarem substâncias prejudiciais ao meio ambiente e também não serem renováveis ressalta a importância de pesquisar outras formas e diversificar a matriz energética. O biodiesel é uma saída interessante pois é produzido através da reação de transesterificação de óleos vegetais, óleos usados ou de gorduras animais (triacilglicerol).²⁶

O biodiesel é um combustível constituído por ésteres de ácidos graxos e a reação de transesterificação consiste em reagir o óleo vegetal e álcool, na presença de um catalisador e obter o éster alquílico e glicerol. (Figura 8.¹)

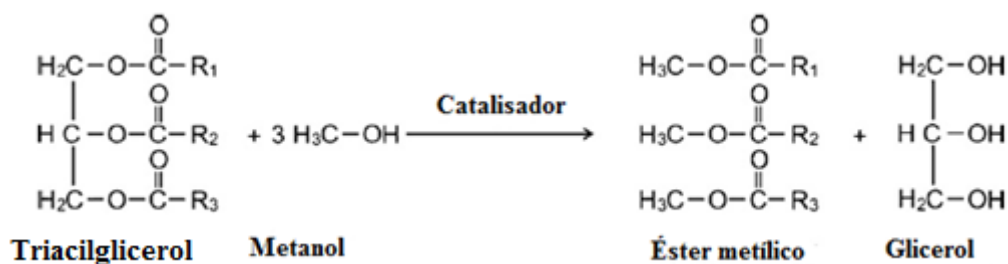


Figura 8: Reação de transesterificação de um triglicerídeo e metanol para produção de biodiesel e glicerol.¹

A composição dos óleos e gorduras utilizados para a síntese do biocombustível é muito variada, sendo que existe diferentes ácidos graxos nas estruturas. Como exemplo, podemos citar o óleo de soja, o qual é composto pelos ácidos palmítico, esteárico, oleico, linoléico, linolênico nas respectivas proporções: 12,36%, 3,70%, 27%, 50,25%, 10,61%, respectivamente.¹

Como normalmente o catalisador utilizado na transesterificação de triglicerídeos é de caráter básico, os ácidos graxos (por exemplo, ácido oleico) irão reagir com os catalisadores alcalinos e formar sabão. O processo de saponificação irá reduzir o rendimento de ésteres, portanto, uma etapa de pré-tratamento é necessária, convertendo os ácidos graxos a ésteres.²⁵ Sabendo que os óleos vegetais utilizados para a produção de biodiesel são misturas de diferentes triacilgliceróis, a reação de transesterificação se torna uma reação complexa a ser estudada, bem como, a definição dos parâmetros operacionais de reação e quantificação.

Portanto é normal adotar um modelo similar à esta reação, tal como a esterificação de um ácido graxo.

As diferentes vias catalíticas utilizadas em reações de esterificação ganharam grande destaque e diversas publicações de trabalhos ressaltam a importância de proceder à reação com melhores rendimentos, mas também com menor produção de resíduos ²².

A partir dessas considerações a proposta desse trabalho é avaliar a eficiência da catálise na síntese do oleato de etila, para isso será utilizada a catálise heterogênea (Nb_2O_5) e a biocatálise (lipase imobilizada em Nb_2O_5 /álcool polivinílico).

Para a quantificação na síntese do oleato de etila, serão utilizados o método de Lowry-Tinsley, cromatografia gasosa e ressonância magnética nuclear de próton.

3.5 Quantificação do Oleato de Etila

3.5.1 Método de Lowry-Tinsley

O método de Lowry-Tinsley é uma análise clássica e de baixo custo, que possui como princípio a quantificação do teor de ácido oléico residual por espectrofotometria, possibilitando a partir da subtração dessa concentração determinar a porcentagem do oleato de etila na solução.²⁷ O ácido oleico restante na solução é complexado com os íons Cobre II (Cu^{2+}), presentes na fase aquosa de uma solução contendo como reativo 5% de acetato de cobre formando um complexo azulado. O desaparecimento do ácido graxo do meio reacional (diminuição da cor azul) corresponderá, desta forma, ao consumo dos ácidos graxos livres.²⁸ O valor da conversão final pode ser determinado a partir da relação entre a concentração de ácido graxo no meio reacional e a absorbância através de uma curva de calibração externa, utilizando ácido oleico nas mesmas condições do ensaio. O comprimento de onda utilizado nas análises é de 715 nm.²⁷

3.5.2 Cromatografia Gasosa (CG)

Cromatografia é uma técnica de identificação e quantificação na qual há uma fase móvel (solvente, podendo ser líquido ou gasoso, como é na cromatografia gasosa, que se move através da coluna) e uma fase estacionária (fixa dentro da coluna). Na cromatografia gasosa, a amostra de um líquido volátil ou gasoso, é injetado através de um septo no injetor, onde é rapidamente vaporizado. O vapor é transportado através da coluna pela fase móvel, conhecida como gás de arraste e os analitos separados fluem pelo detector cuja resposta é observada pelo computador.²⁹

Com base no cromatograma gerado é possível determinar a quantidade do analíto de interesse na amostra analisada.



Figura 9: Cromatógrafo gasoso Shimadzu

4. METODOLOGIA

A metodologia adotada para a realização do projeto foi baseada em diversas publicações científicas que utilizavam catálise heterogênea ou enzimas imobilizadas nas reações de esterificação e também de transesterificação do biodiesel. O fluxograma da **Figura 10** representa as etapas que foram executadas durante o trabalho, as quais estão detalhadas em sequência.

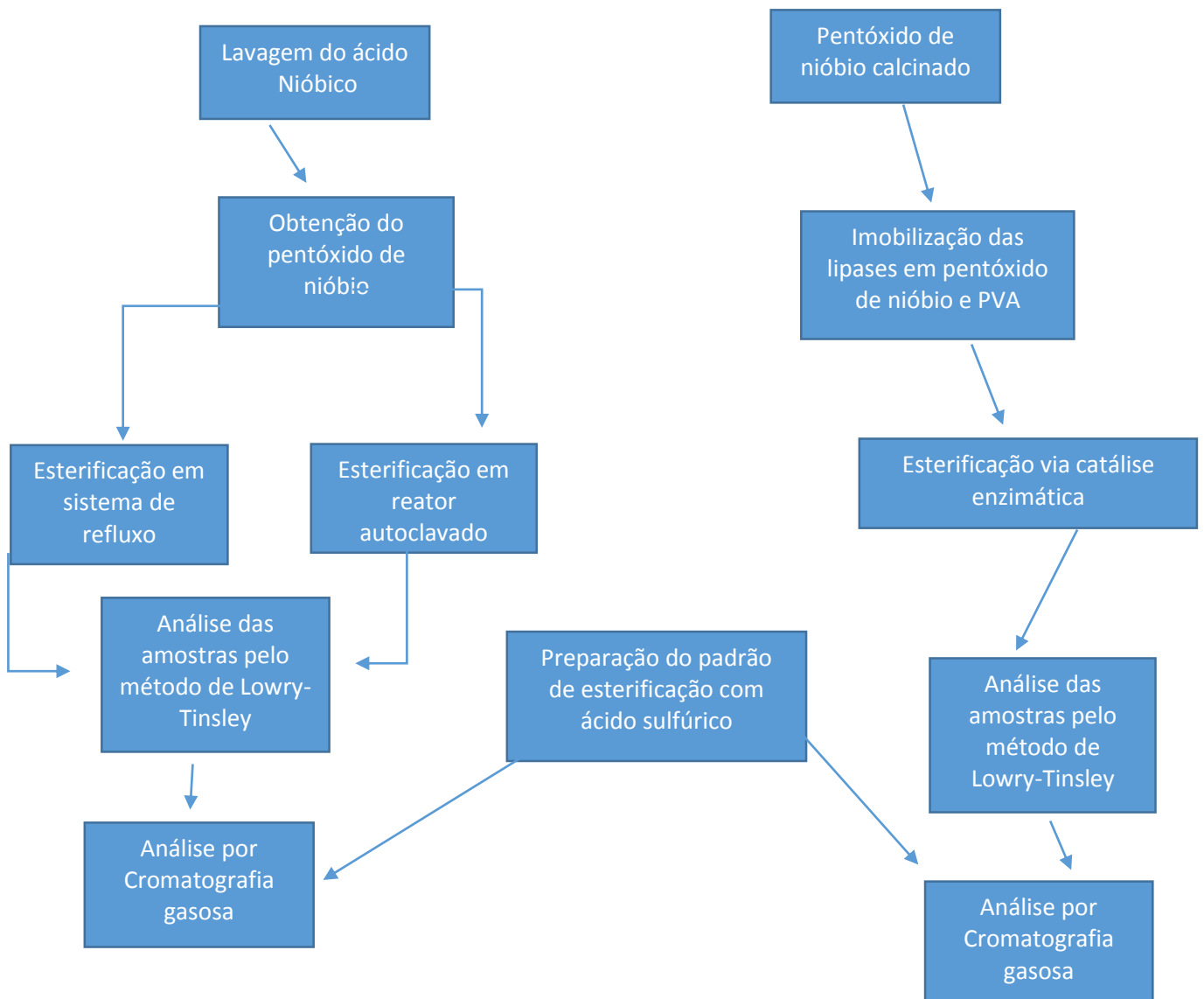


Figura 10: Fluxograma das atividades desenvolvidas.

4.1 Obtenção do oleato de etila via catalise ácida

O oleato de etila foi obtido via catálise ácida, utilizando um balão de fundo redondo de 125 mL, onde foram adicionados os reagentes na proporção de 1:20 (mmol), ácido oléico/álcool (etanol 98%), e 1% em massa, do catalisador (ácido sulfúrico- H_2SO_4 PA). Em seguida o balão foi conectado em um sistema de refluxo, permanecendo sob agitação por um período de 6 horas. Após o tempo de reação o balão foi desconectado do sistema e o produto obtido transferido para um funil de separação. Para a purificação inicialmente foi realizada a lavagem do produto com 25 mL de uma solução de bicarbonato de sódio 0,01 M, e em seguida utilizado o sulfato de magnésio (MgSO_4) por 30 minutos para retirar a água, após esse tempo o produto foi filtrado. Posteriormente, foi realizada a evaporação do solvente em um rotaevaporador. Os padrões obtidos foram caracterizados por cromatografia gasosa (GC-FID Coluna capilar HP-INNOWAX 30m x 0,25mm ID x 0,25 μm).

4.2 Obtenção do catalisador Nb_2O_5

Em torno de 50 mg do ácido nióbico ($\text{Nb}_2\text{O}_5 \cdot n \text{H}_2\text{O}$), cedido pela Companhia Brasileira de Metalurgia e Mineração (CBMM), foi lavado com água ultrapura três vezes e levado a estufa por 24 horas. Após a secagem teve início a etapa de calcinação do pentóxido de nióbio pesando 25 g do precursor catalítico que foi levado a mufla a 400°C por 3 horas, e em seguida a temperatura foi elevada a 500°C por 4 horas.

4.3 Imobilização da lipase em compósito de Nb_2O_5 /PVA

O filme no qual foi imobilizado a lipase foi preparado utilizando o álcool polivinílico (PVA) e o pentóxido de nióbio previamente calcinado a 500°C, como descrito no procedimento 4.2. Foram dissolvidos 500 mg de PVA em 15 mL de água e agitação à $\pm 90^\circ\text{C}$ até completa dissolução. Após resfriar a solução com PVA foram adicionados 50 mg das lipases AS, AY e F-AP em agitação contínua, e esta solução mantida em agitação por aproximadamente 1 hora.

Separadamente foi realizada a dispersão de 50 mg de pentóxido de nióbio, utilizando um ultrassom. A solução de Nb_2O_5 em tetraidrofurano (THF, 10 mL), foram levadas ao banho de ultrassom durante 40 minutos e em seguida levadas à agitação por mais 40 minutos, repetindo essa etapa 2 vezes. Ao final a solução de lipase/PVA foi adicionada gota a gota, sob agitação à solução de Nb_2O_5 . A mistura foi então transferida para uma placa de Petri e o solvente evaporado utilizando um banho de areia. Após seco o filme formado (**Figura 11**), foi cortado em pequenas secções para posteriormente ser utilizado na reação de esterificação do ácido oleico com etanol. O mesmo procedimento foi realizado para dois filmes controle, um contendo apenas a enzima AY e PVA e outro contendo apenas Nb_2O_5 e PVA.



Figura 11: Imagem do filme da lipase AS imobilizada em Nb_2O_5 e PVA

4.4 Caracterização dos catalisadores sintetizados

Os catalisadores preparados foram caracterizados através de técnicas de difração de Raio-X e MEV.

Difração de Raios X: Equipamento Shimadzu XRD 7000 pertencente à Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR/DAEM. Por este método de análise pode-se identificar as fases cristalinas presentes, determinar o diâmetro de partícula e o teor das fases cristalinas.

Esta técnica fornece informações sobre o arranjo e a distribuição dos átomos nos materiais sintetizados, possibilitando uma melhor compreensão das propriedades físicas dos materiais, bem como, a identificação qualitativa dos compostos, já que cada substância

cristalina possui um padrão único de difração de raios X, além de fornecer dados quantitativos sobre os mesmos ³⁰.



Figura 12: Imagem de um difratômetro de raios x.

Microscopia eletrônica de Varredura: Realizada em microscópio eletrônico de varredura (MEV – EDX) da marca Zeiss, modelo EVO MA15, pertencente à Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR/DAEM. Na microscopia eletrônica de varredura (MEV), um feixe de elétrons é focado em uma amostra do material e subsequentemente percorre uma pequena área retangular.

O MEV é muito útil na estimativa da influência do modo de preparação da amostra sobre a qualidade da superfície e pode ser, também, usada no estudo das formas de equilíbrio dos pequenos cristalitos metálicos.

A caracterização de metais por microscopia eletrônica é absolutamente satisfatória, pois pode realmente visualizar as partículas metálicas.³¹ Também foi realizado para algumas amostras uma microanálise química de Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS) acoplado ao microscópio de varredura (MEV), com o objetivo de identificar os elementos presentes nas amostras.



Figura 13: Imagem do Microscópio Eletrônico de Varredura.

4.5 Obtenção do oleato de etila via catálise heterogênea

4.5.1 Reação em refluxo: Em um balão de fundo redondo de 125 mL foram adicionados os reagentes na proporção de 1:20 (mmol), ácido oléico/ etanol, ou seja, 1,62 mL de ácido oleico e 50 mL de etanol, e diferentes quantidades de massa do catalisador Nb_2O_5 (50, 100 e 200 mg). Em seguida o balão foi conectado em um sistema de refluxo (**Figura 14**), permanecendo sob agitação constante e temperatura de 72°C nas chapas de aquecimento. Foram retiradas alíquotas da reação em 12, 24, 48 e 72 horas. As alíquotas da reação foram centrifugadas e posteriormente caracterizadas pelo método de Lowry-Tinsley e cromatografia gasosa.

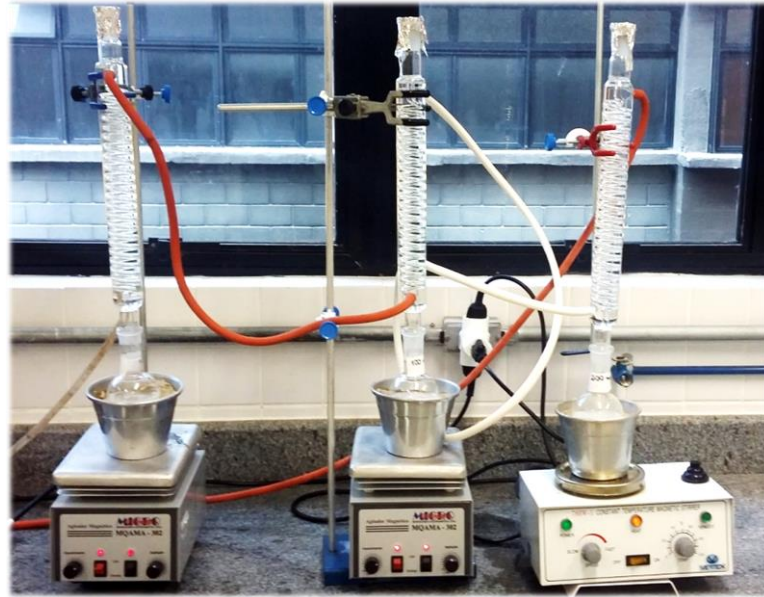


Figura 14: Sistema de refluxo para esterificação do ácido oleico com etanol e pentóxido de nióbio como catalisador.

4.5.2 Reação autoclavada: Em pequenos tubos foram adicionados os reagentes na proporção de 1:1 ácido oleico/etanol (0,32 mL ácido oleico e 4 mL de etanol), e diferentes quantidades de massa do catalisador Nb_2O_5 (50, 100 e 200 mg). Os tubos foram levados ao reator autoclavado (**Figura 15**) durante uma hora a aproximadamente 180°C e 10 atm. Foram retiradas alíquotas das amostras ao final do ciclo reacional. As alíquotas da reação foram centrifugadas e posteriormente quantificadas pelos métodos de Lowry-Tinsley e cromatografia gasosa



Figura 15: Reator autoclavado

4.6 Síntese do oleato de etila via catálise enzimática

Em um erlenmeyer de 125 mL foram adicionados 25 mL de hexano, 50 mg da lipase imobilizada AY/Nb₂O₅/PVA, ácido oléico e etanol nas proporções 1:1 mmol ácido oleico/etanol (0,32 ml ácido e 4 mL de etanol). O mesmo procedimento foi utilizado com as lipases AS e F-AP e os controles dos filmes Nb₂O₅/PVA e AY/PVA. O sistema foi deixado sob agitação de 150 rpm em um agitador tipo Dubnoff, com banho termostatizado, a temperatura de 40°C. Foram retiradas alíquotas nos tempos de 3, 6, 12 e 24 horas e estas foram analisadas pelos métodos de Lowry-Tinsley e cromatografia gasosa.

4.7 Quantificação das reações

4.7.1 Método Lowry-Tinsley

A quantificação pelo método de Lowry-Tinsley por espectrofotometria, necessita primeiramente da preparação de uma solução reativa de acetato de cobre. O preparo da solução do reativo de acetato de cobre II 5%, foi realizado pesando 25 g de acetato de cobre II em um balão volumétrico de 500 mL, ao qual foram adicionados 400 mL de água destilada. O pH da solução foi ajustado para 6,0 (máximo de 6,2) utilizando piridina. O volume foi então completado para 500 mL com água destilada e ficou sob agitação até a completa solubilização durante 24 horas. O reativo foi armazenado em frasco âmbar²⁸.

Para a curva de calibração do ácido oléico foram utilizadas soluções do ácido nas concentrações de 0,1 mmol (0,0315 mL), 0,2 mmol (0,06301 mL), 0,4 mmol (0,1260), 0,6 mmol (0,1890 mL), 0,8 mmol (0,2521 mL), 1,0 mmol (0,3151 mL), 2,0 mmol (0,6302 mL), 3,0 mmol (0,9453 mL), 4,0 mmol (1,260 mL) e 5,0 mmol (1,575 mL). Os volumes necessários de ácido foram adicionados em balões volumétricos de 25 mL, e seus volumes foram completados com hexano. Após foram retiradas alíquotas de 0,5 mL de cada solução e com estas alíquotas foram realizadas novas diluições em hexano, desta vez em balões volumétricos de 10 mL. Em seguida foram retirados 3 mL de cada uma destas soluções, e adicionados 7,5 mL do reativo de acetato de cobre II 5%. Agitou a solução em vórtex por

aproximadamente 30 segundos e depois centrifugou por 5 minutos. O sobrenadante foi utilizado para as medidas de absorvância em espectrofotômetro UV-Vis Cary 50 da marca Varian em comprimento de onda de 715 nm ²⁸.

Para as amostras coletadas em todos os tempos e sistemas reacionais, foram retirados 0,5 mL e esses avolumados para 10 mL com hexano. Dessa solução foram retirados 3 mL e colocados em um tubo de centrífuga, e adicionados 7,5 mL do reativo de acetato de cobre II 5%. A solução foi agitada em vórtex por 30 segundos e centrifugada por 5 minutos. O sobrenadante foi utilizado para as medidas em UV-VIS, assim como a curva de calibração ²⁸.

4.7.2 Cromatografia Gasosa (CG)

As amostras foram analisadas em cromatógrafo gasoso da marca Shimadzu GC-17A com detector FID, equipado com coluna capilar HP-INNOWAX, com 30 m de comprimento, 0,250 mm de diâmetro interno, 0,25 µm espessura do filme. A temperatura do detector FID foi de 260°C, a relação split de 1:9, e a quantidade de amostra injetada igual a 1,0 µL. Como gás de arraste foi utilizado nitrogênio, programação de temperatura utilizada no forno foi de 80°C a 240°C na razão de 10°C/min, permanecendo por 9 min. Fluxo do gás de arraste 1 mL/min, pressão na coluna de 101KPa. O tempo total da corrida foi de 25 min.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização dos catalisadores

Os métodos de caracterização dos catalisadores permitiram compreender melhor a morfologia e a estrutura dos materiais utilizados através de análises da composição química (análise de EDS), da superfície (microscopia eletrônica de varredura) e também da cristalinidade (difração de raios x).

5.1.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Os materiais sintetizados foram caracterizados por MEV, sendo que as micrografias podem ser visualizadas na **Figuras 16**.

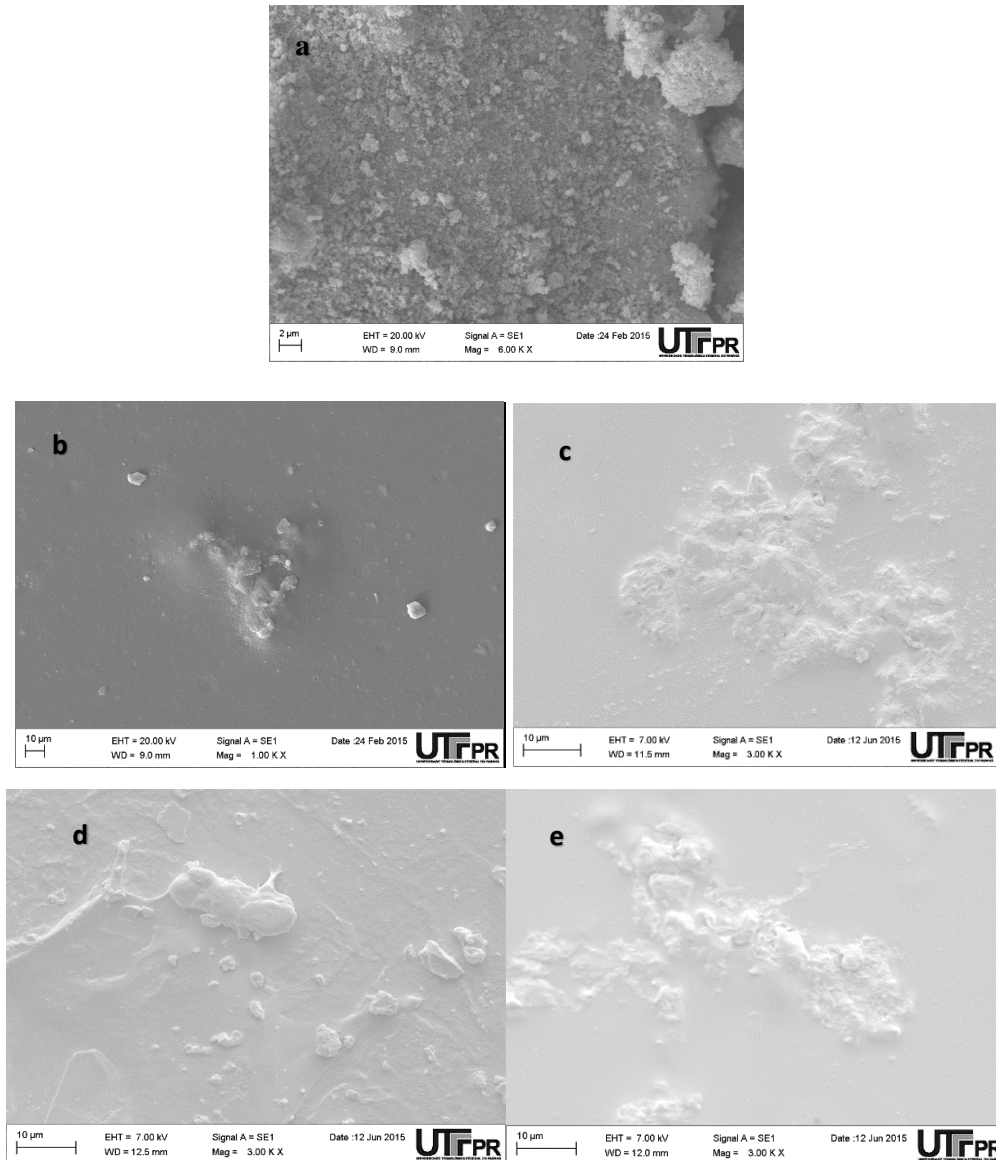


Figura 16: Micrografia dos catalisadores (a) Nb_2O_5 , (b) AS/ Nb_2O_5 /PVA, (c) F-AP/ Nb_2O_5 /PVA, (d) AY/ Nb_2O_5 /PVA, (e) AY/PVA

A **Figura 16 (a)** é a ampliação de 6000 vezes do Nb_2O_5 após o processo de calcinação, na qual podemos notar que a estrutura do catalisador é formada por pequenos cristais de aproximadamente $2\ \mu\text{m}$ e aglomerados de forma dispersa. A partir da **Figura 16 (b)** até a **16 (d)** tem-se as micrografias dos filmes das lipases AS, F-AP e AY preparados com Nb_2O_5 e PVA nas ampliações de 1000 vezes (**16 b**) e 3000 vezes (**16 c e 16 d**). Pode-se observar que de todos os filmes, o de estrutura aparentemente mais homogênea pertence a lipase AS, porém em todos os filmes há um aglomerado que poderia ser acúmulo de nióbio. Entretanto quando se observa a **Figura 13 (e)**, que representa apenas a enzima AY e PVA, ainda há uma forma semelhante, que poderia ser a enzima não dissolvida durante o processo de preparação, fato que pode ocorrer pois os filmes foram dissolvidos em tetrahydrofurano (THF) e não em água,

que é o meio mais adequado para as enzimas ¹⁶ porém, como o Nb₂O₅ não é solúvel em água, optou-se pelo THF para aumentar a solubilidade do suporte e tornar o sistema mais homogêneo.

Com a finalidade de analisar a composição dos filmes, foi realizada a análise semi-quantitativa de espectroscopia de Energia Dispersiva de Raios-X (EDS) que realiza uma emissão de raios x característico provenientes das transições eletrônicas do elemento selecionado, detectando então a sua presença na amostra ³¹. A partir da análise EDS realizado no filme da lipase AS/Nb₂O₅/PVA obteve-se as **Figuras 17 (a), (b), (c) e (d)** que indicam a presença de nióbio, nitrogênio, carbono e oxigênio, respectivamente, na parte analisada.

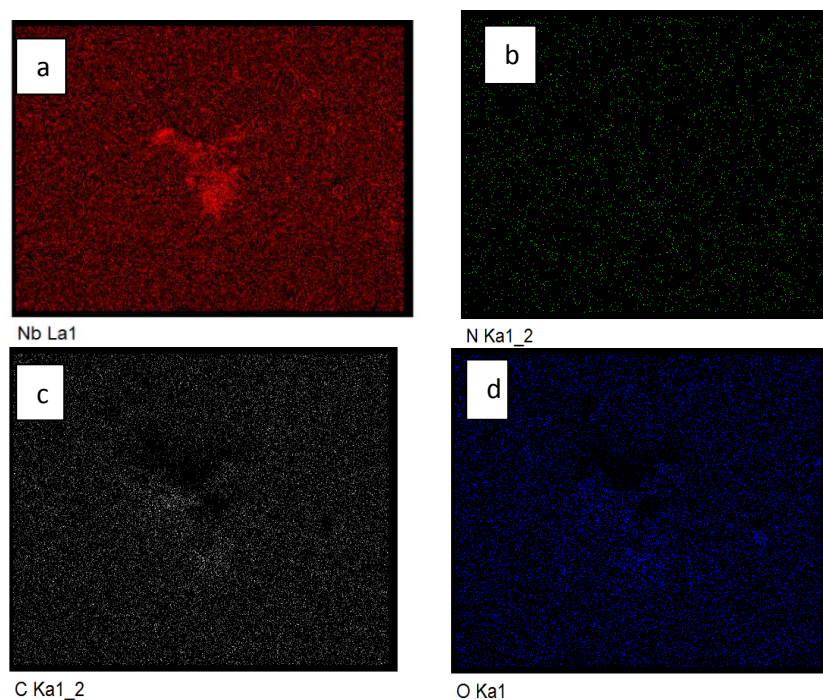


Figura 17: (a) Presença de Nióbio na amostra, (b) Presença de nitrogênio na amostra, (c) Presença de carbono na amostra, (d) Presença de oxigênio na amostra

Com base na **Figura 17** pode-se ver que há uma grande presença de nióbio na parte analisada, todavia não se pode concluir que há apenas nióbio nessa parte do filme pois, analisando as outras imagens, nota-se que há também elementos como carbono e nitrogênio no material analisado. Esses elementos estão presentes na estrutura das enzimas e do PVA, o qual atua como uma “estrutura de mediação” para a imobilização das enzimas no pentóxido de nióbio. Portanto os aglomerados vistos nos filmes são resultados da incompleta dissolução tanto do nióbio quanto das enzimas no solvente THF, gerando um filme não homogêneo.

A técnica de imobilização utilizada foi de adsorção, pois é uma técnica de baixo custo, simples de ser realizada e não causa perdas na atividade enzimática já que suporte e enzima

estão unidos por interações fracas como de van der Waals e/ou interações hidrofóbicas. Em geral, todos os rendimentos das reações de transesterificação dos ácidos graxos para produção de biodiesel utilizando óleo vegetal ou resíduo de óleo de cozinha como matéria-prima, juntamente com lipases imobilizadas por adsorção, são elevados, sendo superiores a 80% ²⁴. Todavia, utilizando o MEV não há como determinar se as lipases estão se ligando ao pentóxido de nióbio ou ao PVA, ou se ambos estão mesmo unidos por adsorção, mas através dos resultados da reação de esterificação é possível compreender se a técnica de imobilização favoreceu ou não a atividade catalítica das enzimas.

5.1.2 Difração de Raios X

O pentóxido de nióbio obtido através da calcinação do ácido nióbio a 400°C por 3 horas e depois a 500°C por 4 horas foi caracterizado através do DRX e apresentou os picos de difração característicos de um material cristalino. Sabe-se que a cristalização do óxido de nióbio se inicia a 500°C, originando principalmente estruturas de sistemas monoclinico, hexagonal e ortorrômbico, ⁴ estrutura essa que possui o propriedades propícias desse material ser utilizado como catalisador.

Os picos obtidos no espectro são semelhantes aos obtidos por Policano (2015), em seu estudo sobre o desenvolvimento de catalisador óxido de nióbio sulfatado para a síntese de ésteres etílicos a partir óleo de elevada acidez, ³⁴ bem como o espectro obtido por De Oliveira (2014), que mesmo utilizando o Nb₂O₅ complexado, ainda obteve picos semelhante ao Nb₂O₅ deste trabalho. A **Figura 18** representa o difratograma de raio x do Nb₂O₅.

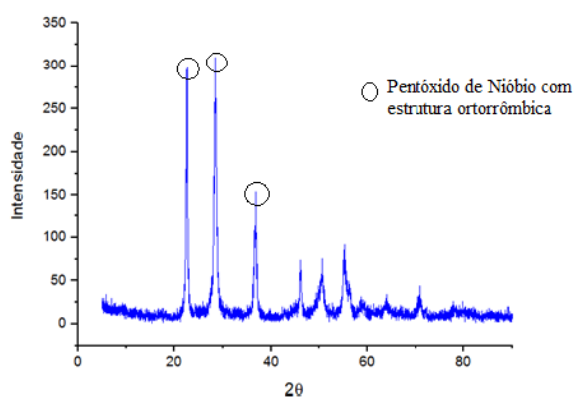


Figura 18: Difratograma de Raios-X do Nb₂O₅ calcinado a 300°C por 3 horas e 500°C por 4 horas

6. Quantificação pelo método Lowry-Tinsley

A reação de esterificação do ácido oleico é muito estudada com a finalidade de otimizar parâmetros reacionais, tais como, relação molar ácido oleico/etanol, sistemas de reação, tipos de catalisadores, entre outros, para posterior aplicação em reações mais complexas como a transesterificação para produção de biodiesel. A esterificação do ácido oleico com etanol, representada pela **Figura 19**, é uma reação reversível usualmente catalisada por ácidos fortes como, por exemplo, o ácido sulfúrico (H_2SO_4). Com a finalidade de substituir o H_2SO_4 por um catalisador ambientalmente mais favorável este trabalho utilizou-se da cromatografia gasosa e do método de Lowry-Tinsley para a quantificação do éster formado através da biocatálise e da catálise heterogênea.

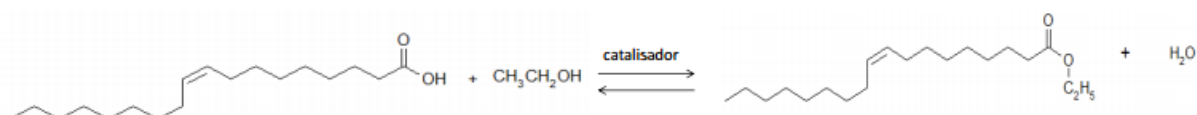


Figura 18: Esquema da reação de esterificação do ácido oleico com etanol.

6.1.1 Curva de calibração

Para a quantificação da reação de esterificação, tanto enzimática quanto heterogênea através do método Lowry-Tinsley, as absorvâncias da curva de calibração foram obtidas no comprimento de onda de 715 nm, utilizando o ácido oléico como padrão, e está representada na **Figura 20**.

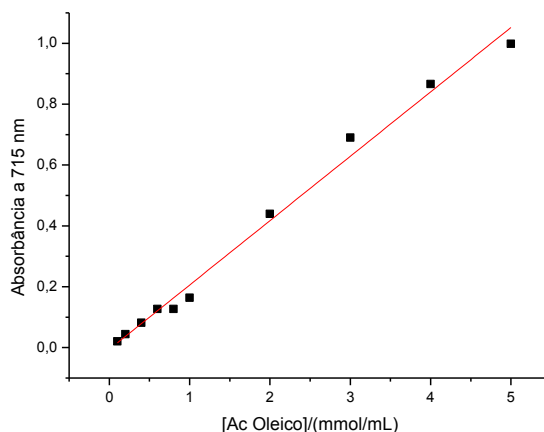


Figura 19: Relação da absorvância de ácido oleico a 715 nm pela concentração de ácido oleico em mmol/mL.

Baseado na curva de calibração, que possui coeficiente de correlação linear (R^2) de 0,9898, foi possível obter a relação entre a concentração de ácido oleico e a absorvância das amostras através da **Equação 2**, na qual *abs* é a absorvância da amostra, e os valores de 0,00591 e 0,21157 são, respectivamente, os coeficientes de correlação linear e angular da reta.

$$[\text{Ácido oleico}] = \frac{abs + 0,00591}{0,21157} \quad \text{Equação 2}$$

Visto que o produto de interesse é o oleato de etila considera-se que todo o ácido oleico que foi consumido na reação se converteu ao éster. Portanto para calcular a concentração de oleato de etila formado em cada sistema reacional é necessário relacionar a concentração final, obtida pela equação 2 e a concentração inicial nos sistemas de catálise heterogênea (reação em refluxo e/ou autoclavada) e da catálise enzimática.

6.1.2 Catálise heterogênea

6.1.2.1 Reação em refluxo

As reações utilizando o Nb_2O_5 como catalisador em sistema de refluxo e também no reator autoclavado partiram, respectivamente, das concentrações iniciais de 5 mmol e 1 mmol

de ácido oléico em todas as amostras. A relação ácido oléico etanol se manteve fixa em 1:20 mmol nas reações em refluxo e 1:1 nas reações autoclavadas. Essas proporções foram adotadas devido as condições reacionais, ou seja, tempo de reação mais elevado e pelo sistema de refluxo necessitar de um volume maior nos balões, visto que as alíquotas durante os tempos determinados são retiradas sem desligar o sistema para retomar o volume inicial. Já para o reator autoclavado, o volume de amostra suportado pelo reator bem como o tempo total de reação é menor, o que acarreta na diferença da proporção ácido/etanol.

Portanto, ao obter as concentrações de ácido oleico e relacioná-las às leituras no espectrofotômetro UV-VIS através da Equação 2, tem-se a possibilidade de encontrar a porcentagem de oleato de etila convertido durante a reação através da **Equação 3**.

$$\% \text{ Oleato de etila} = \frac{[\text{Ácido oleico inicial}] - [\text{Ácido oleico final}]}{[\text{Ácido oleico inicial}]} \cdot 100 \quad \text{Equação 3}$$

A partir dos dados de oleato de etila formado em cada um dos tempos e dos sistemas reacionais, pode-se avaliar dentre as metodologias da catálise heterogênea qual proporciona melhor desempenho do Nb₂O₅ como catalisador. A **Tabela 2** relaciona a massa do catalisador, o tempo reacional e a porcentagem de oleato de etila ao final de cada etapa do refluxo.

Tabela 2: Relação entre a massa de catalisador, tempo reacional e % de conversão em oleato de etila do sistema de refluxo a 72°C

| Massa de Nb ₂ O ₅ (mg) | Tempo (h) | % Oleato de etila |
|--|-----------|-------------------|
| 50 | 12 | 53 |
| 50 | 24 | 70 |
| 50 | 48 | 84 |
| 50 | 72 | 86 |
| 100 | 12 | 44 |
| 100 | 24 | 41 |
| 100 | 48 | 41 |
| 100 | 72 | 41 |
| 200 | 12 | 34 |
| 200 | 24 | 34 |
| 200 | 48 | 35 |
| 200 | 72 | 36 |

Nos sistemas de refluxo, a massa de pentóxido de nióbio que obteve melhor rendimento foi de 50 mg, a qual em todos os tempos foi capaz esterificar mais de 50% do ácido oléico, sendo a maior conversão de 86% em 72 horas. A maior taxa de conversão tendo ocorrido quando se utilizou a menor massa representa uma vantagem catalítica do pentóxido de nióbio, pois sabe-se que bons catalisadores devem ser adicionados ao meio reacional em pequenas quantidades.²

Com base nos dados da **Tabela 2** pode-se notar que conforme se aumenta a quantidade de Nb₂O₅ como catalisador reduz-se a porcentagem de conversão com o passar do tempo. Este fato é explicado pelo princípio Le Châtelier, o qual define que a posição do equilíbrio químico sempre se altera na direção que tende a minimizar o efeito da perturbação aplicada, no caso o aumento da concentração dos produtos.³⁵

O sistema reacional de refluxo pode ser considerado como batelada, ou seja, não houve retirada simultânea do produto com o passar das horas e, como a reação de esterificação é reversível (**Figura 19**) pode-se ter um deslocamento do equilíbrio no sentido dos reagentes.

Como exemplo pode-se observar a massa de 100 mg durante os tempos de 12 e 24 horas, nos quais a porcentagem de conversão foi de 44% e 41%, respectivamente, mostrando um pequeno decréscimo, mas que pode indicar o deslocamento do equilíbrio

Relacionando as massas e tomando como referência o tempo de 24 horas para as três, 50, 100 e 200 mg, as conversões foram de 70%, 41% e 34% respectivamente. Por isso, quanto maior a massa do catalisador, a tendência é que aumente a concentração dos produtos (éster e também da água), deslocando o equilíbrio para o sentido onde há menor concentração das substâncias.

6.1.2.2 Reação em reator autoclavado

Para o segundo sistema de catálise heterogênea obteve-se os dados da **Tabela 3**, os quais mostram a porcentagem de conversão em oleato de etila utilizando as massas de 50, 100 e 200 mg de pentóxido de nióbio no sistema de reação autoclavada.

Tabela 3: Porcentagem de conversão em oleato de etila através do sistema do reator autoclavado durante 1 hora a 180°C e 10 atm.

| Massa de Nb ₂ O ₅ (mg) | % Conversão em oleato de etila |
|--|--------------------------------|
| 50 | 56 |
| 100 | 86 |
| 200 | 97 |

Os resultados da **Tabela 3** mostram que o sistema do reator autoclavado apresentou melhores resultados em comparação ao sistema de refluxo. Mesmo a menor porcentagem alcançada nesse sistema (56% com a massa de 50 mg) foi cerca de 22% maior que a menor conversão nas reações de refluxo (34% com a massa de 200 mg em 12 horas). O resultado obtido vai de encontro com o esperado, visto que o Nb₂O₅ está na classe de catalisadores heterogêneos, portanto necessita de elevada pressão e temperatura para atingir seu maior potencial catalítico. Devido as reações em refluxo serem dependentes da temperatura das chapas de aquecimento, que estiveram em média de 72°C o que não é o indicado para catálise heterogênea. Já para o reator autoclavado, por trabalhar com pressão interna elevada, neste

caso 10 atm, a temperatura durante a reação chegou a 180°C, facilitando a conversão à oleato de etila em 1 hora, muito menor que as 72 horas do sistema de refluxo.

As conversões dos dois sistemas são consideradas excelentes, porém o gasto energético para chegar nos 85% de conversão foi mais elevado e além disso, se projetarmos esses sistemas em escala industrial, o tempo de 72 horas para uma reação torna-se inviável.

Ao analisar outros experimentos com catalisadores heterogêneos também se percebe que a temperatura média varia de 120°C até 300°C dependendo do catalisador utilizado.^{26,32-34} Podemos citar, como exemplos, Bassan, *et.al*³², que utilizou fosfato de nióbio na esterificação de ácidos graxos com álcool, em um sistema em que a temperatura variou de 120°C a 160°C, com conversões que chegaram a 97%³², e Zhang, *et.al*²⁶, que utilizou compostos de zircônio na esterificação de ácido oleico à 110°C.²⁶

Portanto era esperado que o sistema de reação autoclavada, que chegou a 180°C, fosse o de melhor eficiência para a catálise heterogênea. Esse fato se confirmou visto que o sistema teve melhor porcentagem de conversão, 97% de oleato de etila formado com a massa de 200 mg de catalisador, muito semelhante ao resultado obtido por Bassa, *et.al* com o catalisador de fosfato de nióbio.

Já reações em refluxo se processam em temperaturas menores que as habituais para catalisadores heterogêneos e, por isso, a conversão é menor ao utilizar esses sistemas. Sempre que se usam reatores pressurizados as conversões serão maiores, para este tipo de reação, pois trabalham bem acima da temperatura de ebulição do álcool (no caso do etanol, 78°C) e também a maioria dos trabalhos utiliza nióbio com catalisadores suportados, passivados ou com promotores que auxiliam a atividade catalítica nessas condições favorecendo a cinética reacional.³⁶ Observa-se essa conversão reduzida em trabalhos como o de Oliveira³⁶, que estudou o potencial catalítico do Nb₂O₅ obtido de um complexo de nióbio como catalisador da reação de esterificação do ácido oleico com metanol a 60°C com conversão nas condições otimizadas de 22%.³⁶ Todavia a massa de 50 mg foge desse padrão pois se compararmos ao trabalho de Policano, *et. al*³⁴, que utilizou a relação de 5% (m/m) de um catalisador de óxido de nióbio sulfatado para a síntese de ésteres etílicos, o máximo de conversão de 67% à uma temperatura muito maior (cerca de 260°C durante 4 horas)³⁴, notamos que o Nb₂O₅ teve rendimento próximo ao de 50 mg e 48 horas no presente trabalho porém em menor tempo reacional. Isso deve-se ao máximo da temperatura alcançada no refluxo (72°C) chegar próximo da temperatura de ebulição do etanol.

Ao comparar os dois sistemas nota-se que a utilização do pentóxido de nióbio como catalisador heterogêneo é viável e possui bons resultados em ambos sistemas reacionais. Ambos os sistemas têm vantagens e desvantagens, o sistema de refluxo utiliza temperaturas mais brandas e menor quantidade de catalisador porem leva-se 72 horas para conversão de 85%. No sistema autoclavado foi obtido 97% de conversão em 1 hora porem com massa de 200 mg de Nb_2O_5 , temperatura de 178°C e 10 atm. Portanto conclui-se que o reator autoclavado apresenta melhores resultados de conversão em um tempo muito menor de reação em comparação com o sistema de refluxo.

6.1.3 Catálise Enzimática

A reação de esterificação utilizando as lipases foram feitas a partir da concentração inicial de 1 mmol de ácido oleico e mantendo fixas a relação ácido oleico/etanol em 1:1 e a massa do catalisador em 50 mg. Essa proporção foi adotada pois em outros testes utilizando as enzimas imobilizadas, a relação de 1:1 já apresentava resultados satisfatórios. A temperatura de 40°C foi adotada pois é a temperatura ótima de trabalho para todas as enzimas utilizadas. Os testes controle dos filmes contendo apenas pentóxido de nióbio e PVA, e da lipase AY e PVA foram colocados junto com as enzimas imobilizadas no agitador do tipo Dubnoff, nas mesmas condições.

As amostras coletadas ao final de cada período reacional foram analisadas primeiramente pelo método de Lowry-Tinsley, da mesma maneira que as amostras da catálise heterogênea. A **Figura 21** relaciona os catalisadores utilizados, o tempo reacional e a porcentagem de oleato de etila obtida.

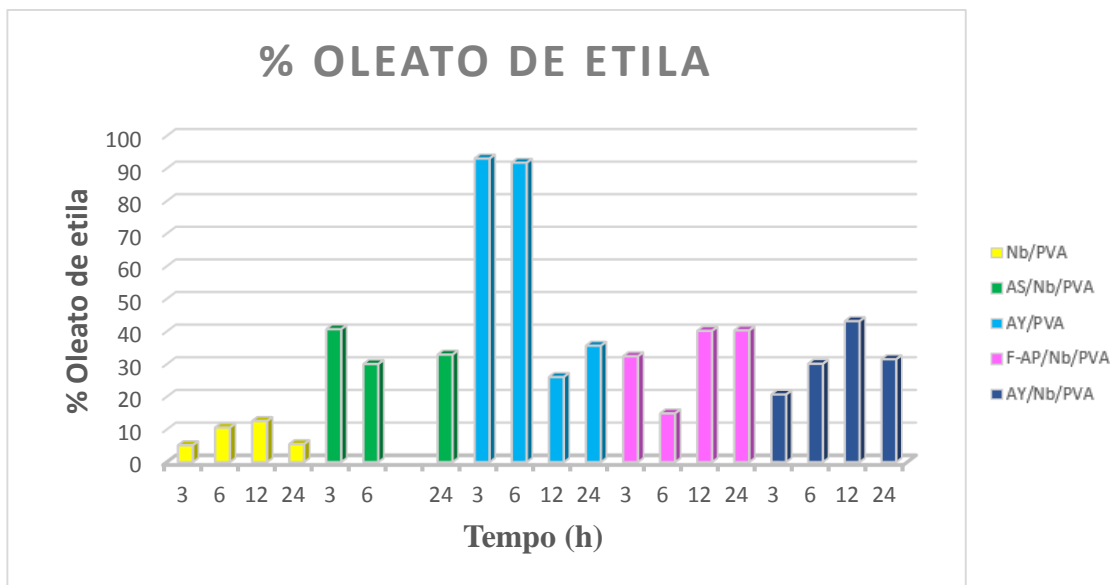


Figura 20: Porcentagem de oleato de etila formado por cada catalisador de acordo com o tempo

A lipase AY foi adotada como controle na avaliação da influência do suporte, pois utilizou esta lipase imobilizada em PVA na ausência do Nb_2O_5 . Sendo que esta lipase apresentou uma melhor solubilidade em THF e Nb_2O_5 , portanto esperava-se que esta tivesse uma maior interação com o suporte.

Na **Figura 21** pode-se comprovar que a lipase AY teve uma interação com o suporte, semelhante às outras enzimas, pois todas elas quando imobilizadas em compósitos de Nb_2O_5 obtiveram resultados semelhantes de conversão. Ao utilizar o sistema $\text{AY/Nb}_2\text{O}_5/\text{PVA}$, as conversões foram de 21% a 43%, sendo o máximo da conversão em 12 horas. Já a lipase $\text{AS/Nb}_2\text{O}_5/\text{PVA}$ teve conversão de 41% em 3 horas, portanto observa-se que essa enzima teve a mesma capacidade de interação com o suporte. Todavia, se comparadas a melhor porcentagem de conversão do filme AY/PVA (93% em 3 horas), nota-se que a presença do pentóxido de nióbio não favoreceu a catálise. Logo o Nb_2O_5 como suporte não apresentou uma boa interação com as lipases.

A imobilização das lipases no pentóxido de nióbio deveria ocorrer por adsorção e as enzimas estariam unidas ao Nb_2O_5 por interações hidrofóbicas as quais ocorrem através de uma interação entre cadeias ou subunidades apolares. Estas cadeias ou subunidades hidrofóbicas presentes tanto no receptor como no ligante encontram-se envoltas por camadas de moléculas de água. A aproximação das superfícies hidrofóbicas promove o colapso da estrutura organizada de água, permitindo assim a interação ligante-receptor através de ganho

entrópico associado à desorganização do sistema.¹⁸ Porém como não ocorrem ligações específicas não há garantia que a enzima esteja realmente ligada ao suporte,³⁷ o que pode ter ocorrido com o Nb₂O₅, pois analisando os EDS dos filmes notamos que existem partículas de nióbio dispersas, que provavelmente não estão ligadas as lipases e, o pentóxido de nióbio não ligado pode competir com o sítio ativo da enzima durante a reação. Além disso, caso ocorra a interação do suporte com a enzima o pentóxido de nióbio ainda pode acarretar em um aumento no impedimento estérico, bloqueando a tampa hidrofóbica das enzimas, o que impediria o sítio ativo da enzima de se ligar ao substrato³⁷.

O pentóxido de nióbio comumente é utilizado como suporte para outros óxidos metálicos que se unem a ele através da impregnação úmida ou troca iônica, interações essas muito mais fortes que as hidrofóbicas e que não podem ser desfeitas. Sendo assim, por comparação com outros trabalhos acredita-se que, devido as características do pentóxido de nióbio, tais como insolubilidade em água, e ácido de Bronsted –Lowry (doador de prótons), interações mais fracas como as hidrofóbicas não são suficientes para fazê-lo interagir com as enzimas da maneira que outros suportes orgânicos fariam^{12, 37, 38}.

6.1.4 Quantificação por Cromatografia Gasosa

A cromatografia gasosa foi realizada neste trabalho com a finalidade de comparar os dados obtidos por esta técnica com o método de Lowry-Tinsley. As análises por CG são muito utilizadas para quantificar reações de esterificação e transesterificação. Nesta técnica verifica-se se há o produto obtido na amostra comparando os tempos de retenção dessas com o padrão de esterificação com ácido sulfúrico.

A análise das amostras por cromatografia gasosa foi realizada no GC-17A Shimadzu, utilizando a coluna capilar HP-INNOWAX 30m x 0,25mm ID x 0,25 µm, e como padrão de esterificação o oleato de etila obtido via catálise ácida.

As amostras do sistema de refluxo e as enzimáticas, no tempo de 12 horas foram analisadas a fim de comparar como a reação que se processa para um mesmo tempo nos diferentes sistemas, bem como as conversões obtidas através do método Lowry-Tinsley. Também foram analisadas as amostras do reator autoclavado, no único tempo reacional possível, que foi de 1 hora. A **Tabela 4** apresenta os dados das conversões obtidas pelo

método de Lowry e por CG para as amostras selecionadas da biocatálise, sistema de refluxo e reator autoclavado.

Tabela 4: Comparação entre as porcentagens de conversão obtidas nos métodos de Lowry-Tinsley e cromatografia gasosa

| Amostra | % de conversão a oleato de etila | % de conversão a oleato de etila |
|---|----------------------------------|----------------------------------|
| | por CG | por Lowry |
| 50 mg/ 12h refluxo | 51 | 53 |
| 200 mg/ 1h reator autoclavado | 78 | 97 |
| AY/PVA/ 12h | 12 | 26 |
| AY/Nb₂O₅/PVA/12h | 11 | 43 |

A cromatografia gasosa apresentou porcentagem de conversão mais baixa quando comparada ao método de Lowry. Essa diferença deve-se ao fato do tempo de armazenamento entre as análises no UV e no CG, pois muitas das amostras evaporaram tendo que ser novamente diluídas em hexano antes de serem injetadas no CG, além disso, como foi discutido anteriormente, a reação de esterificação é reversível, e a presença de água no meio reacional leva ao deslocamento do equilíbrio, reduzindo assim a concentração de oleato de etila no produto.

As outras amostras enzimáticas não tiveram picos detectados do oleato de etila, exceto a da lipase AY imobilizada apenas em PVA, que apresentou o melhor pico para o éster e o resultado da conversão obtido pela área do cromatograma foi de 12%, enquanto que no método de Lowry, no mesmo tempo foi de 26%.

Para as amostras dos catalisadores heterogêneos, entretanto, as conversões foram similares aquelas obtidas no método de Lowry, porém as porcentagens de éster nas amostras também são menores se comparadas as análises no UV. No mesmo tempo reacional que as enzimas, 12 horas, a amostra de 50 mg obteve através da cromatografia uma conversão de 50,9% muito similar aos 53% do método no UV. Todavia para as amostras de 100 e 200 mg no mesmo tempo, as conversões caíram bruscamente sendo essas 4% e 3,5%, respectivamente. Já as amostras do reator autoclavado tiveram uma diferença de conversão entre os métodos em torno de 20%, pois para a amostra de 200 mg a conversão no UV foi de 97% e no CG de 78%, sendo essa porcentagem a maior conversão obtida dentre todas as amostras no CG. Para as massas de 50 e 100 mg as conversões foram de 65% e 71%,

respectivamente, comprovando que o aumento da quantidade de catalisador no meio reacional também aumenta a porcentagem de esterificação.

As amostras da catálise heterogênea se mostraram mais eficientes na conversão do éster também pela cromatografia gasosa, comprovando assim que o pentóxido de nióbio não atuou como um bom suporte para imobilização de enzimas. Por isso os rendimentos baixos via catálise enzimática, ao contrário do que se encontra na literatura, visto que quando o suporte é compatível com a enzima, a atuação das lipases pode chegar até a 100% de conversão, como conseguiram Abdulla e Ravindra, que utilizaram a lipase do microrganismo *Bulkoderia cepacia* imobilizada em polímeros orgânicos na produção de biodiesel do óleo de *Jatropha curcas*.³⁹

Outro fator que pode ter interferido na reação de esterificação é que as lipases AS e F-AP podem não ser tão eficientes quanto a enzima AY, ou demais lipases na reação de esterificação, pois Rosset e Porto⁴⁰ chegaram a obter uma conversão de 96,5% utilizando a lipase *Candida antarctica* livre, enquanto no mesmo trabalho testaram as enzimas *Rhizopus niveus* e *Pseudomonas fluorescens* e também não obtiveram valores para o oleato de etila através de análises por cromatográfica gasosa, mostrando que nem todas as lipases catalisam de forma consideráveis as reações de esterificação, seja livre como no trabalho de Rosset e Porto, ou imobilizadas como neste estudo⁴⁰.

Todas as áreas foram obtidas tomando como padrão o tempo de retenção do oleato de etila via catálise ácida, que apresentou tempos de retenção de 14 e 16 minutos, e o ácido oleico puro, com tempo de retenção de 19 e 23 minutos. Os cromatogramas do ácido oleico, oleato de etila (padrão obtido via catálise ácida), biocatálise da lipase AY imobilizada apenas em PVA, bem como a de 200 mg do reator autoclavado estão dispostos na **Figura 22**.

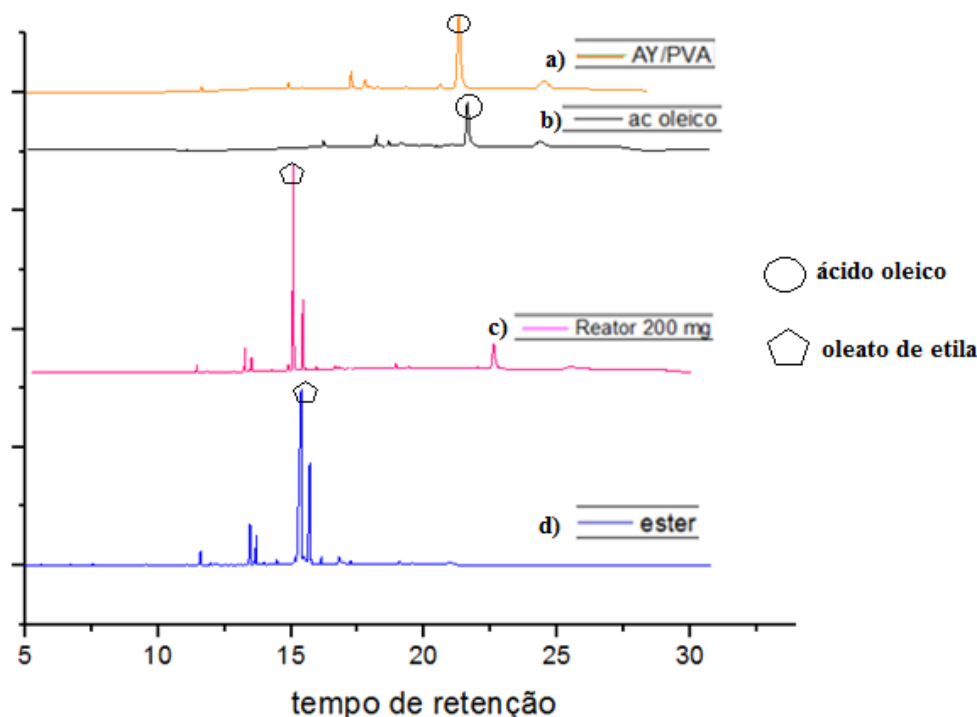


Figura 21: Cromatogramas do ácido oleico, oleato de etila, AY/PVA e reator autoclavado 200 mg.

6.1.5 Análise dos resultados da catálise heterogênea e da catálise enzimática

Partindo dos resultados obtidos através do método de Lowry-Tinsley pode-se fazer uma análise comparativa entre as melhores conversões na catálise enzimática e na catálise heterogênea com a finalidade de facilitar a escolha do melhor método para a síntese do oleato de etila. Tomando como partida que a melhor lipase utilizada no trabalho foi a AY e que a melhor conversão dessa enzima ocorreu quando esta foi imobilizada apenas em PVA na ausência do pentóxido de nióbio, sendo essa selecionada como a melhor lipase testada via catalise enzimática.

Para a catálise heterogênea o melhor sistema foi o reator autoclavado e a massa de Nb_2O_5 de 200 mg, sendo que a conversão foi de 97% em apenas 1 hora de reação. Já na reação em refluxo a melhor massa de Nb_2O_5 puro utilizada foi a de 50 mg.

Sendo assim a **Tabela 5** representa os resultados comparativos entre tempo de reação, massa do catalisador, relação ácido oleico/etanol, temperatura e porcentagem de conversão ao oleato de etila dos melhores resultados em cada sistema, analisado pelo método de Lowry-Tinsley.

Tabela 5: Análise dos melhores resultados obtidos no reator em refluxo, reator autoclavado e biocatálise.

| | <i>Reator autoclavado</i> | <i>Biocatálise</i> | <i>Refluxo</i> |
|------------------------------------|--------------------------------|--------------------|--------------------------------|
| <i>Catalisador</i> | Nb ₂ O ₅ | AY/PVA | Nb ₂ O ₅ |
| <i>Massa (mg)</i> | 200 | 50 | 50 |
| <i>Tempo de reação (h)</i> | 1 | 3 | 72 |
| <i>Temperatura (°C)</i> | 180 | 40 | 72 |
| <i>Relação ácido oleico/etanol</i> | 1:1 | 1:1 | 1:20 |
| <i>% oleato de etila</i> | 97* | 93* | 85* |

*Baseado nos resultados obtidos pelo método de Lowry-Tinsley

Baseado nos dados da **Tabela 5** nota-se que a partir da mesma proporção de ácido oleico e etanol a maior porcentagem de conversão é obtida utilizando o reator autoclavado na catálise heterogênea, sendo esta conversão de 97% em 1 hora de reação. Isso deve-se a elevação temperatura e pressão obtida no sistema.

Todavia o melhor resultado esperado seria o da enzima AY pois a temperatura utilizada é a temperatura ótima da enzima e, também, por se utilizar a menor massa de catalisador para mesma relação do ácido/etanol do sistema de reator autoclavado. O resultado com as enzimas, em alguns trabalhos, pode chegar a 100% de rendimento⁴⁰, o que prova que ainda há modificações a serem feitas para melhorar as condições da biocatálise nessa reação, caracterizando esse sistema também como uma boa via de catálise.

O sistema heterogêneo necessita de um reator pressurizado para alcançar a temperatura de 180°C, logo mais energia será utilizada. Já a catálise enzimática atua em temperatura bem mais baixa, porém as enzimas comerciais, as mesmas utilizadas no trabalho, são de custo mais elevado que o pentóxido de nióbio, e o tempo de preparo para a imobilização do catalisador também pode ser um fator desfavorável para reações em grande escala, por exemplo. Portanto se olharmos apenas para a porcentagem de conversão e a facilidade de preparo do catalisador e tempo reacional, o melhor método para produzir o oleato de etila é utilizando o reator autoclavado e Nb₂O₅ como catalisador, os fatores citados são mais simples quando comparados a catálise enzimática.

7. CONCLUSÃO

O estudo sobre a eficiência catalítica na obtenção do oleato de etila indicou que o pentóxido de nióbio é um excelente catalisador heterogêneo para essa reação e, quando utilizado em temperatura e pressão adequada, como o sistema de reação autoclavada, é capaz de converter 97% do ácido oleico em éster, sendo então a melhor conversão obtida, utilizando a massa de 200 mg do catalisador, em apenas 1 hora de reação.

Apesar das características do Nb_2O_5 e estudos que utilizam o nióbio como suporte para outros catalisadores, o Nb_2O_5 não foi um bom suporte para a imobilização das lipases AS, AY e F-AP, pois todas essas enzimas não apresentaram boas taxas de conversão se comparadas a lipase AY imobilizada apenas em PVA, que chegou a 93% de conversão, valor muito superior àqueles alcançados pelas enzimas com pentóxido de nióbio.

Durante a reação de esterificação foi comprovado que o deslocamento do equilíbrio com o passar do tempo prejudica a formação do produto, portanto é importante retirar a água com o passar do tempo reacional e, também utilizar o etanol em excesso visando maximizar a formação do éster.

O trabalho comprovou que tanto as lipases quanto o pentóxido de nióbio são eficientes na esterificação do oleato de etila e, certamente podem ser utilizadas em outras reações de interesse industrial como a transesterificação de ácidos graxos para obtenção do biodiesel.

8. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Como sugestão para trabalhos futuros é importante realizar testes de reutilização dos catalisadores enzimáticos, bem como do pentóxido de nióbio, pois um catalisador eficiente deve ser reutilizado sem perder a atividade catalítica com o tempo, e com isso definir com maior propriedade qual melhor catalisador para essa reação.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ¹ LOFRANO, R. C. Z. Uma revisão sobre biodiesel. **Pensamento Plural**, vol. 2, n.2, p. 83-89, 2008.
- ² BUSACCA, C. A.; FANDRICK, D. R.; SONG, J. J.; SENANAYAKE, C. H. **Adv. Synth. Catal.** 2011, 353, 1825
- ³ DIAS, F. R. F.; FERREIRA, V. F.; CUNHA, A. C. Uma Visão Geral dos Diferentes Tipos de Catálise em Síntese Orgânica Dias. **Rev. Virtual Quim**, vol. 4, n. 6, p. 840-871, 2012
- ⁴ NOWAK, I.; ZIOLEK, M. Niobium compounds: Preparation, characterization, and application in heterogeneous catalysis. **Chemical Reviews**, v. 99, n. 12, p. 3603-3624, 1999.
- ⁵ JUNIOR, R. F. P. Nióbio. **Departamento Nacional de Produção Mineral**, 2003. Disponível em: <https://sistemas.dnpm.gov.br/publicacao/mostra_imagem.asp?IDBancoArquivoArquivo=3976>. Acesso em: 05 de janeiro.
- ⁶ DALLA-VECHIA, R., NASCIMENTO, M. G., SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, v. 27, n.4, p. 623-630, 2004
- ⁷ STERGIOU, P. Y. et al. Advances in lipase-catalyzed esterification reactions. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 8, p. 1846-1859, 2013.
- ⁸ CORDEIRO, C. S; SILVA, F. R.; WYPYCH F.; RAMOS, L. P. Catalisadores Heterogêneos para a produção de Monésteres Graxos (Biodiesel). **Química Nova**, v. 34, n 3, p. 477-486, 2011.
- ⁹ PRADO, A. G. S. Química Verde, Os Desafios da Química do Novo Milênio. **Química Nova**, v. 26, p. 738-744, 2003
- ¹⁰ INSTITUTO BRASILEIRO DE CATÁLISE. **Levantamento da Situação da Catálise no Brasil**. Rio de Janeiro, 2005. Disponível em: <<http://www.sbcat.org/sbcat/historiaacademia.php>>. Acesso em janeiro de 2015
- ¹¹ ARANDA, D. A. G. et al. The use of acids, niobium oxide, and zeolite catalysts for esterification reactions. **Journal of Physical Organic Chemistry**, v. 22, n. 7, p. 709-716, 2009.

- ¹² LOPES, O. F.; MENDONÇA, V. R.; SILVA, B. F.; PARIS, E. C.; RIBEIRO, C. Óxidos de Nióbio: Uma visão sobre a síntese do Nb₂O₅ e sua aplicação em fotocatalise heterogênea. **Química Nova**, v. XY, n.00, p.1-12, 2014
- ¹³ MARIN, M. L. et al. Synthesis, acid properties and catalysis by niobium oxide nanostructured materials. **Catalysis Science & Technology**, v. 4, n. 9, p. 3044-3052, 2014
- ¹⁴ BRAGA, V. S. et al. Esterification of acetic acid with alcohols using supported niobium pentoxide on silica-alumina catalysts. **Catalysis Today**, v. 133, p. 106-112, 2008.
- ¹⁵ MORAIS, J. F. **Estudo da acidez superficial de catalisadores de óxido de nióbio**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal, f. 84. 1991.
- ¹⁶ NELSON, David L.; COX, Michael M. **Lehninger Princípios de Bioquímica**. 3. ed. São Paulo: Sarvier, 2002.
- ¹⁷ CAMPBELL, Mary K. **Bioquímica**. 3 ed., Artmed, 2006.
- ¹⁸ FABER, K. **Biotransformations in Organic Chemistry**. 6th. New York: Springer, 2011.
- ¹⁹ DALLA-VECHIA, R., NASCIMENTO, M. G., SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, v. 27, n.4, p. 623-630, 2004
- ²⁰ STERGIOU, P. Y. et al. Advances in lipase-catalyzed esterification reactions. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 8, p. 1846-1859, 2013.
- ²¹ Wooley, P.; Petersen, S.B.; Lipases their structure. **Biochemistry and application** 1994, Cambridge University Press, cap. 7, 139-180.
- ²² Protein Data Bank. Disponível em <www.rcsb.org/pdb/>. Acesso em janeiro de 2015
- ²³ KARMEE, S. K. Lipase Catalyzed Synthesis of Fatty Acid Methyl Esters from crude *Pongamia* Oil. **Energy Sources**, vol. 37, n. 5, p.536-542, 2015

- 24 TAN, T. W. et al. Biodiesel production with immobilized lipase: A review. **Biotechnology Advances**, v. 28, n. 5, p. 628-634, Sep-Oct 2010
- 25 SEBRÃO, D.; SILVA, V. D.; NASCIMENTO, M. G.; MOREIRA, M. A. Imobilização de lipases em filme de caseinato de sódio/glicerol: Aplicação na síntese de ésteres. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1182-1187, 2007.
- 26 ZHANG, Y.; WONG, W. T.; YUNG, K. F. Biodiesel production via esterification of oleic acid catalyzed by chlorosulfonic acid modified zirconia. **Applied Energy**, v. 116, p. 191-198, 2014.
- 27 MADALOZZO, A.D. **Síntese de ésteres etílicos utilizando uma lipase recombinante *Rhizopus oryzae***. 2011, 119 f. (Dissertação de mestrado Ciências Bioquímica). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.
- 28 LOWRY, R. R.; TINSLEY, I. J. **Rapid Colorimetric Determination of Free Fatty Acids**. Oregon. 1976
- 29 HARRIS, D. C. **Análise Química Quantitativa**. LTC - Livros Técnicos e Científicos Editora LTDA. 7º ed, Rio de Janeiro, 2008.
- 30 HOLLER, F. James; SKOOG, Douglas A; CROUCH, Stanley R. **Princípios de Análise Instrumental**. São Paulo: Bookman 6ª edição, 2009
- 31 ESQUIVEL, J.M.D. Catalizadores y Microscopia Eletronica, In 2º **Curso Ibero-americano sobre Caracterização de Catalisadores e Adsorventes**, p. 64-61, 2001
- 32 BASSAN, I. A. L. et al. Esterification of fatty acids with alcohols over niobium phosphate. **Fuel Processing Technology**, v. 106, p. 619-624, Feb 2013.
- 33 CHOUHAN, A. P. S.; SARMA, A. K. Modern heterogeneous catalysts for biodiesel production: A comprehensive review. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**, v. 15, n. 9, p. 4378-4399, Dec 2011.
- 34 POLICANO, M. D; MARTIN, L. S; CARNEIRO, L. M.; RIVALDI, J. D; DE CASTRO, J. F. Desenvolvimento de catalisador óxido de nióbio sulfatado para a síntese de ésteres etílicos a partir óleo de elevada acidez. **XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química**, p. 1-8, Out 2015.

- 35 SKOOG, Douglas A; WEST, Donald M; HOLLER, F. James; CROUCH, Stanley R; **Fundamentos de química analítica**, 8ªed. Cengage Learning, São Paulo, 2008
- 36 DE OLIVEIRA, Samuel, A. **Avaliação cinética e potencial do Nb₂O₅ obtido a partir de um complexo de nióbio para formação do oletato de metila através da reação de esterificação do ácido oleico**. 2014. 140f. (Dissertação Mestrado Engenharia Química). Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2014.
- 37 MURTY, Ramachandra V; BHAT, Jayadev; MUNISWARAN, P.K.A. Hydrolysis of Oils by Using Immobilized Lipase Enzyme: A Review. **Biotechnol. Bioprocess Eng.** v.7, n. 2, p. 57-66. Fev. 2002
- 38 MEDEIROS, G.B; CAMILO, F.C; VICENTINI, F.A; FERNANDES-MACHADO, N.R.C; SCALIANTE, M.H.N.O. Preparo de catalisadores suportados em zeólita NaA com diferentes teores de ZnO e Nb₂O₅ para utilização na fotodegradação de corante têxtil. **XI Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica**. Campinas - SP, Julho, 2015.
- 30 ABDULLA, R.; RAVINDRA, P. Immobilized *Burkholderia cepacia* lipase for biodiesel production from crude *Jatropha curcas L.* oil. **Biomass & Bioenergy**, v. 56, p. 8-13, Sep 2013.
- 40 ROSSET, I. G; PORTO, A. L. M. Catálise Enzimática: Transesterificação do óleo de soja e esterificação do ácido oleico via lipases. **Revista Brasileira de Energias Renováveis**, v. 4, p. 64-78, Jul 2015