

CAPÍTULO 4

IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA PEROXIDASE EM ZEÓLITA NAY POR MÉTODO SONOQUÍMICO



<https://doi.org/10.22533/at.ed.361112504044>

Data de aceite: 26/05/2025

Leonardo Fernandes Rocha

Grupo de Estudos sobre Nanomateriais Estruturados, Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA), Santarém-PA, Brasil
<http://lattes.cnpq.br/2333974803999672>

Ellen Many Costa Duarte Soares

Grupo de Estudos sobre Nanomateriais Estruturados, Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA), Santarém-PA, Brasil
<http://lattes.cnpq.br/1059495921892316>

Paulo Sérgio Taube Júnior

Programa de Pós-graduação em Biociências, Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA), Santarém-PA, Brasil
<http://lattes.cnpq.br/9036985941582601>

Larissa Carla Pinheiro Gatti

Laboratório de óleos da Amazônia, Universidade Federal do Pará (UFPA), Belém-PA, Brasil
<http://lattes.cnpq.br/9013155573104833>

José Arnaldo Santana Costa

Grupo de Estudos sobre Nanomateriais Estruturados, Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA), Santarém-PA, Brasil
<http://lattes.cnpq.br/5913578662870885>

Geraldo Narciso da Rocha Filho

Laboratório de óleos da Amazônia, Universidade Federal do Pará (UFPA), Belém-PA, Brasil
<http://lattes.cnpq.br/7580236895339455>

Alberdan Silva Santos

Laboratório de Investigação Sistemática em Biotecnologia e Biodiversidade Molecular, Universidade Federal do Pará (UFPA), Belém-PA, Brasil

Luís Adriano Santos do Nascimento

Laboratório de óleos da Amazônia, Universidade Federal do Pará (UFPA), Belém-PA, 66075-110, Brasil

Arthur Abinader Vasconcelos

Grupo de Estudos sobre Nanomateriais Estruturados, Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA), Santarém-PA, Brasil

Laboratório de óleos da Amazônia, Universidade Federal do Pará (UFPA), Belém-PA, , Brasil

INTRODUÇÃO

O desenvolvimento da biotecnologia vem ocorrendo desde a consolidação da nanotecnologia em meados da década de 70 quando a pesquisa aplicada a miniaturização de dispositivos passou a ser relevante no aprimoramento do controle de reações e processos em nanoescala, dentre estes destacam-se aqueles envolvendo proteínas com atividade catalíticas, ou seja, as enzimas e suas diferentes formas de imobilização para estabilização e heterogeneização em condições reacionais industriais ou laboratoriais, sendo assim o uso de zeólitas nas diferentes técnicas de imobilização sejam estas físicas ou químicas podem cumprir este objetivo na prospecção (Ezejiofor et al., 2014; Vasconcelos et al., 2023).

As zeólitas são estruturas cristalinas naturais ou sintéticas com fórmula geral $(M^+)_a(M^{+2})_b[Al_{(a+2b)}Si_{n-(a+2b)}O_{2n}] \cdot mH_2O$ e que podem assumir um caráter dual de estrutura com atividade catalítica e como suportes para biomoléculas como diferentes tipos de enzimas como a tirosinase imobilizada em zeólitas NaA e CaA (tirosinase@NaA/tirosinase@CA) como aplicação na produção de L-DOPA (dihidroxifenilalanina); a lipase imobilizada em zeólita Y (lipase@Y) para a hidrolise do óleo de palma; as enzimas α-quimotripsina e termolisin, incorporadas nas estruturas HY, NH₄Y, NaY, HDAY e HNH₄DAY catalisando a formação de ligação peptídica em meio orgânico; a lacase incorporada em Y, DSY e DAY para a remoção do bisfenol A e a enzima formato desidrogenase imobilizada em mordenita para a redução de CO₂ a ácido fórmico (Steeharam & Saville, 2002; Knezevic et al., 1998; Xing et al., 2000; Taghizadeh et al., 2020; Pietricola et al., 2020).

Além das enzimas citadas destaca-se o grupo das peroxidases (E.C. 1.1.11.7-classificação *Enzyme Commission*), que são macromoléculas tipo oxidoreduases que podem apresentar grupo heme, ou seja contendo Fe⁺³ situado em seu sítio ativo, sendo estas classificadas como peroxidase ciclooxygenase, incluindo aquelas produzidas por animais, e peroxidase catalase, que não possuem origem animal podendo ser classificadas em classe 1, classe 2 e classe 3. As peroxidases classe 3 estão presentes em organismos vegetais e cumprem uma série de funções como a maturação de frutos, reparo de danos aos tecidos vegetais, a lignificação, a suberização e o catabolismo das auxinas (Dosoretz & Ward, 2006; Pandey et al., 2017; Rábade et al., 2012). No ciclo catalítico desta classe de enzimas o Fe⁺³ muda sua valência formando compostos radicais e o peróxido de hidrogênio é utilizado para provocar a transferência de elétrons de um substrato orgânico sendo oxidado a uma forma menos recalcitrante ao meio ambiente, a exemplo tem-se a degradação do 2-metoxifenol (guaiacol) a 2,2'-Dimetoxi-4,4'-(2,2'-dimetoxi-4,4'-bifenilileno)bisoxi)bifenil (tetraguaiaçol) (Ullrich & Hofrichter, 2007; Dosoretz & Ward, 2006).

Assim torna-se fundamental estabilizar o sistema biocatalítico para sua reutilização, minimizando custos e utilizando de forma otimizada uma enzima, que passa por um processo de extração oneroso e dependente de fontes que podem sofrer degradação rápida minimizando sua concentração no extrato bruto, como as matrizes vegetais. O presente

capítulo refere-se a síntese de zeólita NaY a partir de rejeito de caulim, modificação química e imobilização de enzima peroxidase extraída em concentrado proteico dos frutos da pupunheira (*Bactris gasipaes* Kunth) usando sonicação.

MATERIAL E MÉTODOS

Síntese da zeólita NaY

Foram pesadas 2,1000 g de rejeito de caulim ativado termicamente a 700°C por 2 horas, sendo este transferido para um copo de PTFE de aproximadamente 100 mL. Adicionou-se ao precursor uma massa de metassilicato de sódio pentahidratado ($\text{Na}_2\text{Si}_2\text{O}_5 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) e um volume de solução de NaOH 6M previamente padronizada ($f = 0,7633$) suficientes para uma variação e ajuste da razão Si/Al, mantendo a razão $\text{Na}_2\text{O}/\text{Al}_2\text{O}_3$ fixa. A Tabela 1 a seguir mostra os parâmetros ajustados para a rota de síntese hidrotermal para uma temperatura de 90°C.

Ensaio	Si/Al	$\text{Na}_2\text{O}/\text{Al}_2\text{O}_3$	m(silicato)	V (base)	Temperatura	tempo	V (água)
Y(a)	3,0	5,0	2,5899 g	14,9 mL	90°C	20h	40 mL
Y(b)	4,0	5,0	4,5630 g	10,9 mL	90°C	20h	40 mL

Tabela 1. Parâmetros ajustados para a síntese da zeolita em 2 condições.

Caracterizações da zeólita NaY

Os produtos de síntese obtidos foram caracterizados por técnica de difração de raios-X utilizando radiação Cu (ka1,540598 Å), faixa angular ($^{\circ}2\theta$) de 5 a 110°, voltagem do tubo de 40 kV, corrente do tubo de 40 mA, fenda divergente 0,6 mm, fenda Soller de 2,5°, filtro Kβ de Ni, passo angular de 0,02° e tempo por passo de 0,1 s.

A morfologia foi determinada pela técnica de microscopia eletrônica de varredura com canhão de elétrons tipo FEG, sendo as amostras metalizadas com Au por 2 minutos e 30 segundos depositando-se um filme de ouro com espessura média de 10 a 15 nm. As imagens foram geradas por detecção de elétrons secundários com aceleração de voltagem de 10 kV e distância de trabalho de 9 mm realizando-se também análise EDS e EDX.

Para a determinação das assinaturas vibracionais das principais ligações presentes nas estruturas químicas foi realizada análise de espectroscopia vibracional no infravermelho médio no modo de pastilhamento com KBr a 99% e 1% de massa de amostra por pastilha. O registro dos espectros ocorreu sob condições operacionais de resolução 4 cm⁻¹ e 32 varreduras por espectro.

As propriedades texturais foram verificadas usando os métodos BET e BJH a partir de 100 mg de amostra com pré-tratamento a 200°C sob vácuo por 2 h.

Funcionalização da zeólita NaY

Cerca de 1g de cada produto obtido pelos ensaios da tabela 1 foi inserido em um balão de fundo redondo sendo adicionado 15 mL de tolueno e 1,3 mL de 3-aminopropiltrióxido silano (APTES), o sistema ficou sob refluxo a 110°C sob agitação branda durante 95 minutos. Sendo após isto, o sólido lavado com cerca de 15 mL de tolueno e seco a 40°C por 2 horas. A remoção do modificador não incorporado a estrutura foi feita por refluxo do sólido novamente, com 150 mL de tolueno por 2 horas e sua secagem a 40°C por 4 horas.

Extração da peroxidase

Para a obtenção do concentrado proteico com a enzima peroxidase classe 3 foi utilizado cerca de 1 kg de casca e polpa de frutos da pupunheira (*Bactris gasipaes* kunth) sendo a mistura triturada e homogeneizada com 500 mL solução tampão citrato:fosfato pH 4,5 e então filtrada em malha de algodão, o filtrado foi mantido a 4°C em banho de gelo e em repouso para a separação da fração amilácea das frações lipídicas e proteicas. O sobrenadante foi transferido para um frasco de centrífuga modelo CR22GIII (Hitachi®) juntamente com mistura 1:2 de metanol e clorofórmio. O sistema foi centrifugado a 4°C, 10.000 x g por 10 minutos e a fração proteica foi separada das frações lipídicas e coletada em tubos volumétricos de 14 mL. Para confirmar a presença da enzima peroxidase no concentrado foi feito teste de sua atividade com solução de guaiacol 10 mM e peróxido de hidrogênio 50 mM em meio a uma solução de 20 mg/mL do concentrado.

Ensaios de imobilização

Para a imobilização da peroxidase contida no concentrado proteico usou-se banho ultrassônico a 32°C e 40 W durante 3 horas, 6 horas e 9 horas, inserindo-se cerca de 150 mg cada amostra de zeólita modificada e não modificada em microtubos de centrífuga tipo Eppendorf juntamente com 100 μ L de solução enzimática, preparada pela dissolução do concentrado proteico que formou solução 0,04 g/mL. O conjunto foi levado para o ultrassom nos tempos estabelecidos e após o tempo total foram feitas as coletas dos sobrenadantes para verificação da quantidade de enzima que se imobilizou na zeólita de acordo com a reação específica com o reagente de Bradford conforme descrito por Bradford (1976). A carga de peroxidase imobilizada foi estimada a partir da equação a seguir:

$$\text{Carga enzimática (\%)} = [(A_{EL} - A_t) / A_{EL}] \times 100 \quad (1)$$

Em que A_{EL} é a absorbância a 600 nm da solução enzimática 0,04g/mL (enzima livre); A_t é a absorbância a 600 nm da enzima que permaneceu no sobrenadante após cada tempo “ t ” de sonicação.

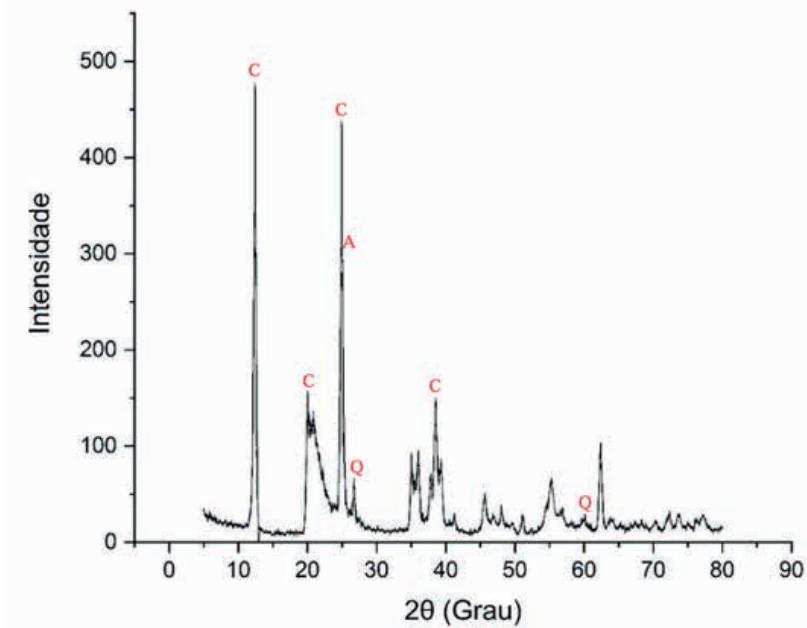
RESULTADOS E DISCUSSÃO

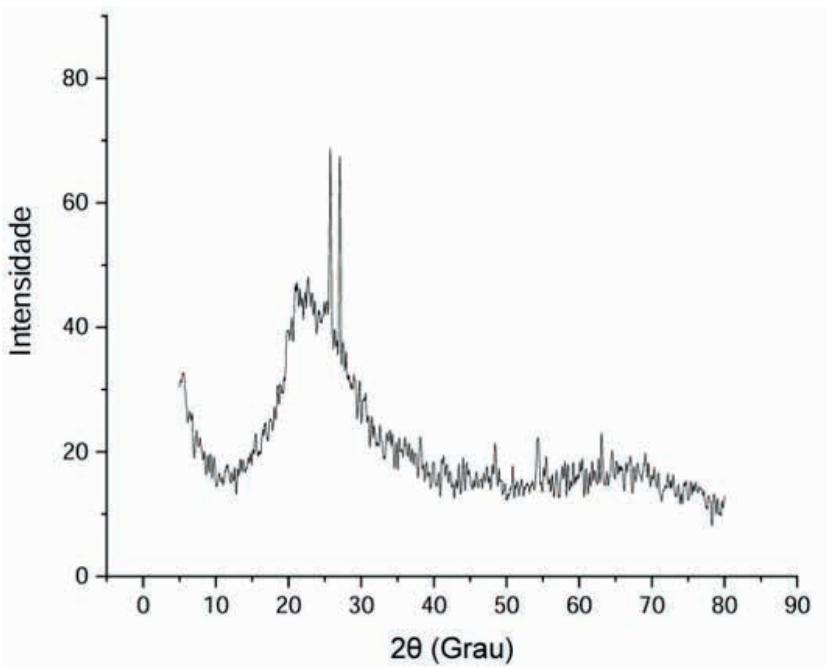
A caracterização da composição percentual dos óxidos presentes no rejeito de caulim é apresentada na Tabela 2 a seguir em comparação com seus valores teóricos.

Componente	Rejeito	Caulinita teórica
Al_2O_3	45,64%	39,50%
SiO_2	45,39%	46,54%
TiO_2	3,86%	-
Fe_2O_3	4,27%	-

Tabela 2. Composição química do rejeito de caulim.

A transformação cristalográfica do rejeito após sua ativação térmica é mostrada pelos difratogramas da Figura 1 a seguir.





*C – Fase da Caulinita; Q – Fase de quartzo; A – Fase de anatásio

Figura 1. Difratogramas do rejeito de caulim sem ativação térmica (A) e com ativação térmica (B).

O difratograma mostra a ocorrência de uma notável perda de cristalinidade do rejeito de caulim após sua calcinação a 700°C , evidenciada pela existência de um pico largo na região de 2θ entre 15° e 30° , além da supressão da maioria dos picos fortes e agudos relacionados às distâncias interplanares atômicas. Este perfil também tem sido observado por Salahudeen et al. (2014), destacando-se a presença de quartzo residual pela ocorrência de um pico a $26,65^\circ 2\theta$. No entanto, esta variação de posição pode ocorrer entre 26 e $27^\circ 2\theta$ (Scherb et al., 2020). Assim os picos em $26,18^\circ 2\theta$ ($d = 3,40 \text{ \AA}$) e $27,14^\circ 2\theta$ ($d = 3,28 \text{ \AA}$) representam a fase de quartzo no metacaulim obtido, mostrando que esta fase é estruturalmente estável ao processo de calcinação, sendo inerte à calcinação até uma temperatura de 1050°C (Salahudeen et al., 2014). Similares perfis de difratogramas foram encontrados por Sun & Vollpracht (2018) e por Avet et al. (2018) para o metacaulim. A Figura 2 a seguir mostra os difratogramas dos produtos de síntese descritos com suas respectivas condições experimentais na Tabela 1.

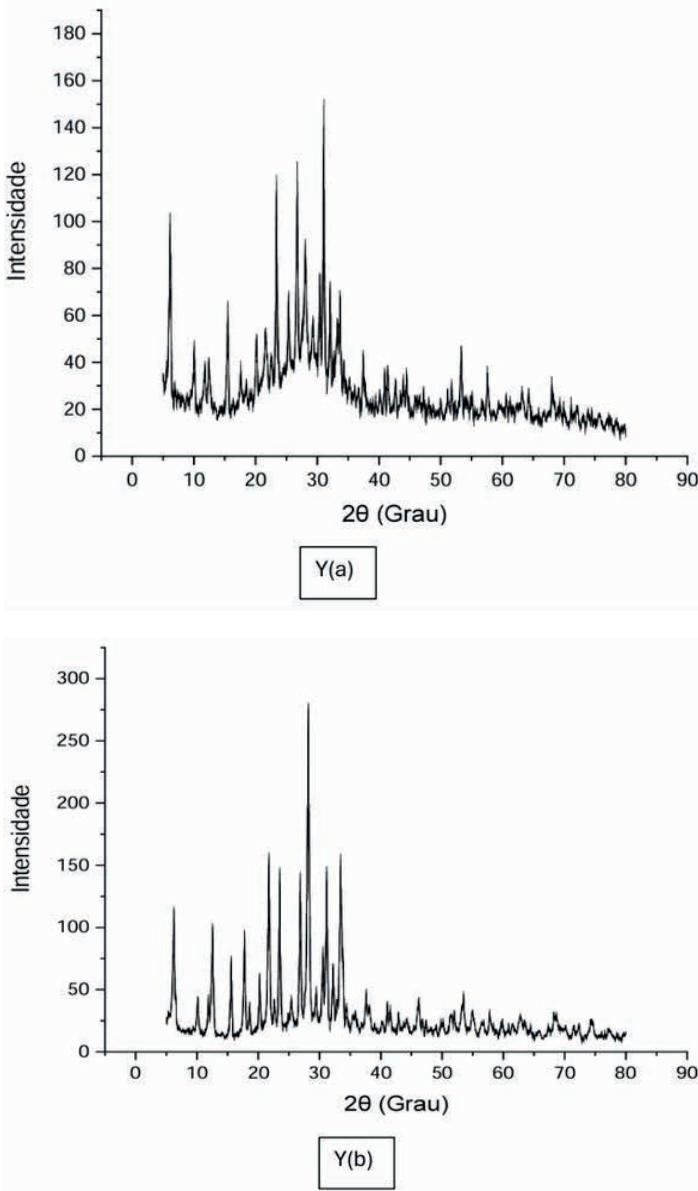


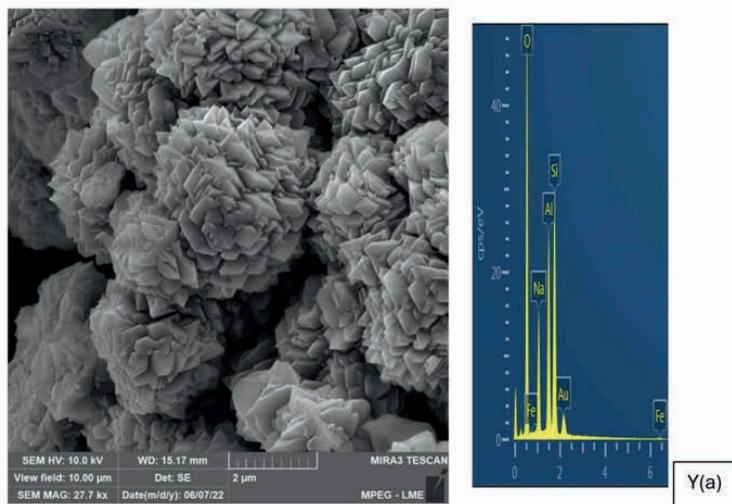
Figura 2. Difratogramas dos produtos de síntese.

Os difratogramas mostrados apresentam o perfil mineralógico dos produtos de síntese obtidos em condição de temperatura ideal para a obtenção de zeólita Y de acordo com Azizi et al. (2013), ou seja, a 90°C . A temperatura de cristalização deve ser um fator preponderante na contribuição para a formação da fase Y pois afeta os processos de nucleação e crescimento de cristais, assim, quanto maior a temperatura do meio, maior a energia e menor o tempo requerido para a cristalização ocorrer (Zhang et al., 2013). Todas os produtos foram obtidas no mesmo tempo (20 h), assim fatores que podem ter afetado a formação da fase Y almejada estão ligados a razão Si/Al.

O primeiro aspecto a ser observado quanto a proximidade para uma fase de NaY é a presença dos picos típicos de acordo com o padrão da ficha PDF 73-1214 em consonância com resultados para uma fase desta zeólita em condições de temperatura, tempo de síntese e composição do gel respectivamente: 30°C, 24h e 2,15 Si/Al (Mastropietro et al., 2015); 100°C e 24h (Ghosh et al., 2013); 60°C, 48h e 7,2 Si/Al (Huang et al., 2010). O pico tipicamente encontrado neste tipo de estrutura é aquele da posição 6,24° 2θ que se encontra presente. O pico referência surgiu em Y(a) no valor de 6,15° e em Y(b) surgiu a 6,23°. Verificando-se também, em Y(a), a presença do pico em 10,02°; 15,48°; 23,37°; 26,74° e 31,02°, valores próximos àqueles estabelecidos na ficha ICDD. O produto Y(b) por sua vez apresentou picos em 10,11°; 15,59°; 18,58°; 23,50°; 26,87° e 31,14°.

Assim, Y(b) é o mais próximo dos picos presentes na ficha PDF 73-1214 do ICDD que discrimina os ângulos de 6,24°; 10,13°; 11,82°; 15,57°; 18,58°; 23,48°; 26,82°; 31,13° como os picos que mostram o arranjo estrutural de uma zeólita NaY. Assim, como ocorreu mudança da razão Si/Al do produto Y(a) para Y(b), havendo seu aumento de 3 para 4, isto pode ter favorecido o arranjo cristalino da estrutura, pois os picos da amostra Y(b) são de maior intensidade e menor mistura com possível fase amorfica. O comportamento ideal deste produto pode se dever a uma maior homogeneidade no processo de crescimento de cristais, assim ocorreram menos falhas estruturais e maior integridade do cristal (Lim et al., 2011).

A morfologia da zeólita formada é uma propriedade dependente do grau de cristalinidade desta, sendo que quanto mais pura a fase, mais uniforme a forma dos cristais que para esta estrutura deve ser do tipo bipiramidal octaédrica. A Figura 3 mostra as micrografias e seus espectros EDS mostrando a composição química na região mapeada.



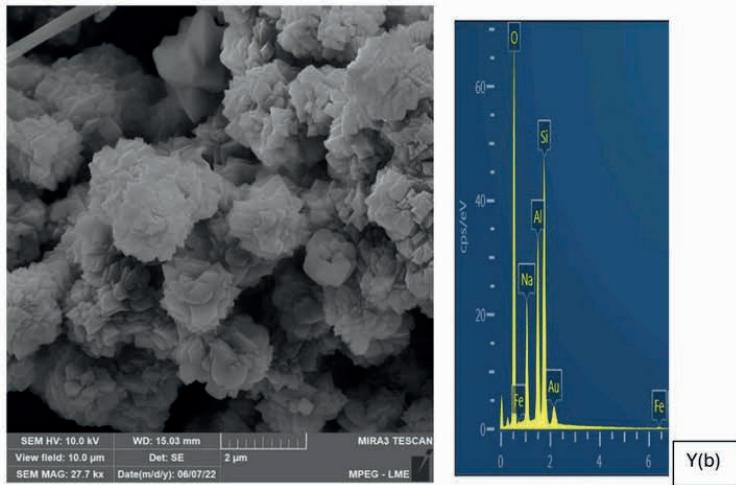


Figura 3. Micrografias e espectros EDS dos produtos de síntese.

Os cristais formados assemelham-se a aqueles encontrados por Kuzniarska-Biernacka et al. (2016). Wang et al. (2021) realizou a síntese de NaY com e sem direcionador de estrutura e à pressão ambiente, a morfologia encontrada pelos autores, sem o uso de direcionador, apresentou menor evidência de uma forma geométrica como a mostrada na Figura 3, as condições de síntese com o uso de semente, ou seja, um material amorfó com composição similar à zeólita pretendida, juntamente com o processo de envelhecimento podem ter favorecido a formação de uma morfologia sem arestas pelos autores. Assim, os parâmetros de síntese permitiram gerar morfologia mais adequada a zeólita Y sem a necessidade de semente, envelhecimento e direcionador de estrutura, mostrando-se um processo verde e pouco oneroso.

Os cristais observados nos produtos Y(a) e Y(b) possuem tamanhos estimados superando $2\text{ }\mu\text{m}$ ou 2000 nm, isto possivelmente determina as áreas superficiais baixas que serão mostradas na seção sobre a análise de fisssorção de N_2 . A alcalinidade do sistema de síntese pode influenciar a cristalinidade do produto, e, portanto, podendo afetar a morfologia dos cristais formados, pois, caso seja muito elevada, pode induzir a formação de uma grande quantidade de núcleos para a formação dos cristais, tornando-os menores em tamanho (Bronic et al., 2012), além disto uma alcalinidade elevada eleva a supersaturação relativa do meio, favorecendo a formação de cristais pequenos. A velocidade de cristalização tende a aumentar com a alcalinidade do meio que também tende a minimizar a formação de um material amorfó causando danos aos componentes de uma fase amorfá que possa surgir (Yuan et al., 2022). Isto justifica os cristais formados em detrimento a um material amorfó que apresentaram mesma alcalinidade no sistema.

A análise EDS dos produtos, revelou uma quantidade percentual em massa muito pequena de ferro, uma impureza indesejável para a estrutura pretendida, isto pode ter sido decorrente da elevada alcalinidade do sistema, impedindo que o íon Fe^{+3} incorporasse nas estruturas dos produtos. Além da composição elementar é importante verificar quais assinaturas vibracionais estão presentes nos produtos obtidos, assim a Figura 4 mostra os espectros no infravermelho médio de cada produto.

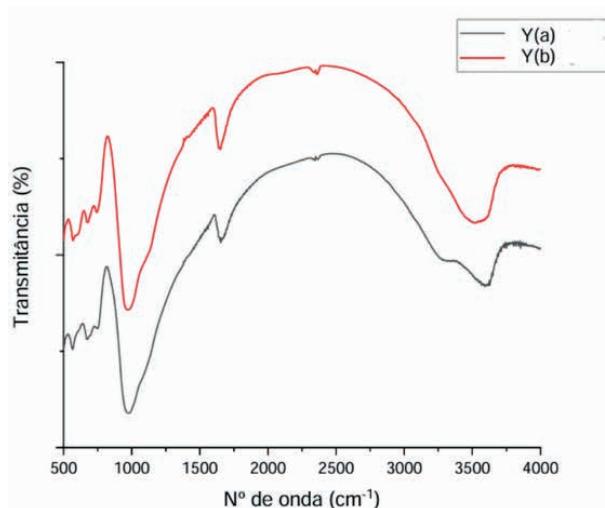


Figura 4. Espectros no infravermelho médio dos produtos de síntese.

A introdução de fonte de silício bem como íons Na^+ através do ativador alcalino gerou bandas características a um material zeolitizado passam a ser perceptíveis nas diferentes quantidades de Si e Na utilizadas na síntese. A primeira banda característica surge em torno de 3500 cm^{-1} e em 1650 cm^{-1} , mostrando que os produtos de síntese passam a apresentar água na estrutura, característica de um material zeolítico, sendo a segunda frequência relacionada ao dobramento de grupos $-\text{OH}$ (Sayehi et al., 2020). Na região de frequências de 500 a 650 cm^{-1} , as bandas representam estrutura de anéis duplos de 6 tetraedros (D6R), a banda a 580 cm^{-1} possui diferentes intensidades nos produtos obtidos, sendo um fingerprint importante para estruturas tipo FAU, além disto, a banda presente em 500 cm^{-1} representa o anel de 4 membros da estrutura FAU, podendo estar também representado em bandas localizadas em 740 e 668 cm^{-1} (Zhang et al., 2019; Sayehi et al., 2020). A banda presente em 1145 cm^{-1} , representa o estiramento assimétrico das ligações Si-O e Al-O, torna-se importante destacar que o deslocamento de frequências em certas bandas pode ocorrer em função dos teores de Si e Al na estrutura, haja vista que os comprimentos de suas ligações com o oxigênio são diferentes estes deslocamentos podem assumir valores entre 10 e 20 cm^{-1} .

As bandas na faixa de 500-800 cm⁻¹ também foram encontradas por Hildebrando (2012), além de Sayehi et al. (2020) e Koohsaryan et al. (2019), sendo relacionada a vibração de unidades estruturais S4R, S6R, D4R e D6R em materiais zeolíticos, nesta faixa situam-se vibrações relacionadas a ligações dos tetraedros, externas a estrutura de unidades D6R de estrutura FAU, em 600 cm⁻¹ e 610 cm⁻¹. As regiões com bandas de 970 a 1020 cm⁻¹, 670 a 725 cm⁻¹, 565 a 580 cm⁻¹ e de 360 a 385 cm⁻¹ estão relacionadas linearmente a quantidade de átomos de Al na estrutura (Ma et al., 2021).

A Tabela 3 a seguir mostra as propriedades texturais de cada produto.

Produto	ASE (m ² .g ⁻¹) ^a	AP (m ² .g ⁻¹) ^b	V (cm ³ .g ⁻¹) ^c	Dp (nm) ^d
Y(a)	119,4293	0,7395	0,0069	37,3
Y(b)	10,2829	1,6241	0,0109	27

Tabela 3. Propriedades texturais dos produtos de síntese.

^aÁrea superficial específica do método BET; ^bÁrea superficial de poros (1,7 nm – 300 nm) partir da dessorção pelo método BJH; ^cVolume de poros (1,7 nm – 300 nm) a partir da dessorção pelo método BJH; ^dDiâmetro médio de poros a partir da dessorção pelo método BJH

Derkowski et al. (2007) realizaram síntese de estrutura faujasita a partir de cinzas volantes e encontraram volumes de poros de dessorção por BJH em valores maiores, variando de 0,0297 a 0,2186 cm³.g⁻¹. O valor de área superficial BET do produto Y(a) está na faixa daqueles obtidos pelos autores que variaram de 40 m².g⁻¹ a 544 m².g⁻¹, segundo os autores este aumento é esperado após um processo de zeolitização em que o surgimento de uma textura de microporos é responsável por tal fenômeno.

A área superficial específica BET dos produtos possui valores muito inferiores aos valores geralmente encontrados para as principais zeólitas FAU, sendo 889 m².g⁻¹ para zeólita X (Reiprich et al., 2020) e na faixa de 861 a 960 m² g⁻¹ para zeólita Y (Mehlhorn et al., 2018; Galarneau et al., 2018), no entanto, Hildebrando (2012) encontrou valores de propriedades texturais para amostra com fase faujasita majoritária, com área específica BET igual a 101,39 m².g⁻¹, valor próximo ao obtido para o produto Y(a). A capacidade de imobilização da peroxidase, portanto é dependente destas características bem como das demais já discutidas dos materiais com fase de zeólita Y, a Tabela 4 mostra o percentual de imobilização calculado a partir da equação (1) de proteína contendo a enzima peroxidase.

Produto	3h	6h	9h
Y(a)	25%	0%	20%
N-Y(a)	19%	4%	5%
Y(b)	18%	0%	1%
N-Y(b)	0%	25%	0%

Tabela 4. Carga enzimática imobilizada nos suportes tipo zeólita NaY em cada tempo de sonicação.

*N-Y – Zeólita modificada com APTES

Alguns aspectos relevantes que podem ter causado este perfil heterogêneo remetam às propriedades físicas, morfologia e natureza química do suporte utilizado (Lopes et al., 2021). Como todos os materiais possuem a mesma natureza química, a morfologia de cada um foi o fator mais provável de ter causado diferenças de imobilização para cada tempo de sonicação. Destaca-se que o suporte Y(a) e N-Y(a) apresentaram ótimo perfil de imobilização em apenas 3h de sonicação, o suporte Y(b) imobilizou melhor em 3h de sonicação enquanto N-Y(b) teve melhor perfil após 6h de processo.

Os fatores que possibilitaram a imobilização foram as interações hidrofóbicas, forças de Van der Waals, ligação de hidrogênio e interações iônicas entre a enzima e o suporte, configurando assim uma imobilização por adsorção na superfície externa do material, pois consagradamente a imobilização por aprisionamento e encapsulação tende a ocorrer no uso de suportes de natureza maleável como em uma rede polimérica como aqueles obtidos pelo método sílica sol-gel ou por método envolvendo a formação de membranas na forma de fibras oca ou microcápsulas. Como exemplo tem-se os hidrogéis, a quitosana e o alginato (Reis et al., 2019). Além deste aspecto, a interação física por encapsulação ou aprisionamento entre a enzima e o suporte estabelece-se quando a síntese do suporte e a incorporação da enzima são simultâneas, ou seja, é importante que o suporte seja obtido nas condições ideais em que a enzima não desnature (condições de pH, temperatura, pressão, força iônica e de uso de solventes apropriados). A imobilização pelo produto N-Y(b) se deu por ligação covalente.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir da síntese e caracterização dos materiais obtidos sob determinadas condições de temperatura, composição química e alcalinidade do meio verificou-se que o rejeito de caulin possui potencial para a obtenção da zeólita NaY que apresentou perfil cristalográfico com alguns picos de sua fase concorrente NaP. No entanto os produtos de síntese modificados e não modificados conseguiram imobilizar até 25% de enzima em 3h e 6h de sonicação, sendo uma técnica limitada para o referido propósito devido propiciar baixa carga de proteína imobilizada.

REFERÊNCIAS

- TOBIAS I. NDUBUISI EZEJIOFOR1*, U. E. E. AND C. O. Waste to Wealth- Value Recovery from Agro-food Processing Wastes Using Biotechnology : A Review. **British Biotechnology Journal**, v. 4, n. 4, p. 418–481, 2014.
- VASCONCELOS, A. A. et al. Zeolites: A Theoretical and Practical Approach with Uses in (Bio)Chemical Processes. **Appl. Sci.** 13(3), 1897, 2023
- SEETHARAM, G.; SAVILLE, B. A. L-DOPA production from tyrosinase immobilized on zeolite. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, n. 6, p. 747–753, 2002.
- KNEZEVIC, Z.; MOJOVIC, L.; ADNADJEVIC, B. Palm oil hydrolysis by lipase from *Candida cylindracea* immobilized on zeolite type Y. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 22, n. 4, p. 275–280, 1998.
- XING, G. W.; LI, X. W.; TIAN, G. L.; YE, Y. H. Enzymatic peptide synthesis in organic solvent with different zeolites as immobilization matrixes. **Tetrahedron**, v. 56, n. 22, p. 35173522, 2000.
- TAGHIZADEH, T.; TALEBIAN-KIAKALAIIEH, A.; JAHANDAR, H.; et al. Biodegradation of bisphenol A by the immobilized laccase on some synthesized and modified forms of zeolite Y. **Journal of Hazardous Materials**, v. 386, n. December 2019, p. 121950, 2020.
- PIETRICOLA, G.; OTTONE, C.; FINO, D.; TOMMASI, T. Enzymatic reduction of CO₂to formic acid using FDH immobilized on natural zeolite. **Journal of CO₂ Utilization**, v. 42, n. September, p. 101343, 2020.
- DOSORETZ, C. G.; WARD, G. Peroxidases. In: PANDEY, Ashok; WEBB, Colin; SOCCOL, Carlos Ricardo; LARROCHE, Christian (org.). **Enzyme Technology**. Nova Delhi: Springer, 2006, p. 399-432.
- PANDEY, V. P.; AWASTHI, M.; SINGH, S.; TIWARI, S.; DWIVEDI, U. N. A Comprehensive Review on Function and Application of Plant Peroxidases. **Biochemistry & Analytical Biochemistry**, v. 06, n. 01, 2017.
- GONZÁLEZ-RÁBADE, N.; DEL CARMEN OLIVER-SALVADOR, M.; SALGADOMANJARREZ, E.; BADILLO-CORONA, J. A. In vitro production of plant peroxidases - A review. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 166, n. 7, p. 1644–1660, 2012.
- ULLRICH, R.; HOFRICHTER, M. Enzymatic hydroxylation of aromatic compounds. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 64, n. 3, p. 271–293, 2007.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, 72(1-2), 248-254, 1976.
- N. SALAHUDEEN, A. S. AHMED, A. H. AL-MUHTASEB, M. DAUDA, S. M. WAZIRI, B. Y. J. Synthesis and Characterization of Micro-Sized Silica from Kankara Kaolin. **Journal of Engineering Research**, v. 19, p. 27–32, 2014.
- SCHERB, S.; KÖBERL, M.; BEUNTNER, N.; THIENEL, K. C.; NEUBAUER, J. Reactivity of metakaolin in alkaline environment: Correlation of results from dissolution experiments with XRD quantifications. **Materials**, v. 13, n. 10, 2020.
- SUN, Z.; VOLLRACHT, A. Isothermal calorimetry and in-situ XRD study of the NaOH activated fly ash, metakaolin and slag. **Cement and Concrete Research**, v. 103, p. 110–122, 2018.

AVET, F.; LI, X.; SCRIVENER, K. Determination of the amount of reacted metakaolin in calcined clay blends. **Cement and Concrete Research**, v. 106, p. 40–48, 2018.

AZIZI, S. N.; ALAVI DAGHIGH, A.; ABRISHAMKAR, M. Phase transformation of zeolite P to y and analcime zeolites due to changing the time and temperature. **Journal of Spectroscopy**, v. 1, n. 1, 2013.

ZHANG, X. et al. Synthesis of NaX zeolite: Influence of crystallization time, temperature and batch molar ratio SiO₂/Al₂O₃ on the particulate properties of zeolite crystals. **Powder Technology**, v. 235, p. 322–328, 2013.

MASTROPIETRO, T. F.; MOLINARI, R.; ARGURIO, P.; et al. Synthesis of nay-type nanozeolites and their assembling into microporous membranes. **Chemical Engineering Transactions**, v. 43, p. 715–720, 2015.

GHOSH, A.; AHMED, S.; MOLLAH, M. Synthesis and characterization of zeolite NaY using local rice husk as a source of silica and removal of Cr(VI) from wastewater by zeolite. **Bangladesh Journal of Scientific and Industrial Research**, v. 48, n. 2, p. 81–88, 2013.

HUANG, Y.; WANG, K.; DONG, D.; et al. Synthesis of hierarchical porous zeolite NaY particles with controllable particle sizes. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 127, n. 3, p. 167–175, 2010.

LIM, W. T.; SEO, S. M.; OKUBO, T.; PARK, M. Crystallinity of large single crystals of FAUtype zeolites with a wide range of Si/Al ratios. **Journal of Porous Materials**, v. 18, n. 3, p. 305–317, 2011.

KUŽNIARSKA-BIERNACKA, I.; RAPOSO, M. M. M.; BATISTA, R.; et al. Highly efficient heterogeneous catalysts for phenol oxidation: Binuclear pyrrolyl-azine metal complexes encapsulated in NaY zeolite. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 227, p. 272–280, 2016.

WANG, J.; LI, M.; FU, Y.; et al. An ambient pressure method for synthesizing NaY zeolite. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 320, p. 111073, 2021.

BRONIĆ, J.; PALČIĆ, A.; SUBOTIĆ, B.; ITANI, L.; VALTCHEV, V. Influence of alkalinity of the starting system on size and morphology of the zeolite A crystals. **Materials Chemistry and Physics**, v. 132, n. 2–3, p. 973–976, 2012.

YUAN, N.; TAN, K.; ZHANG, X.; ZHAO, A.; GUO, R. Synthesis and adsorption performance of ultra-low silica-to-alumina ratio and hierarchical porous ZSM-5 zeolites prepared from coal gasification fine slag. **Chemosphere**, v. 303, n. P1, p. 134839, 2022.

SAYEHI, M.; GARBARINO, G.; DELAHAY, G.; BUSCA, G.; TOUNSI, H. Synthesis of high value-added Na-P1 and Na-FAU zeolites using waste glass from fluorescent tubes and aluminum scraps. **Materials Chemistry and Physics**, v. 248, p. 2–10, 2020.

ZHANG, J.; CHU, Y.; LIU, X.; et al. Interzeolite transformation from FAU to CHA and MFI zeolites monitored by UV Raman spectroscopy. **Chinese Journal of Catalysis**, v. 40, n. 12, p. 1854–1859, 2019.

HILDEBRANDO, E. A. Síntese de zeólita tipo faujasita utilizando rejeito de caulim da Amazônia como fonte de silício e alumínio: Aplicação como adsorvente. Tese apresentada à Universidade de São Paulo. São Paulo-SP, 2012.

KOOHSARYAN, E.; ANBIA, M. Facile and rapid synthesis of highly crystalline mesoporous zeolite FAU. **Materials Letters**, v. 236, p. 390–393, 2019.

MA, Y. K.; RIGOLET, S.; MICHELIN, L.; et al. Facile and fast determination of Si/Al ratio of zeolites using FTIR spectroscopy technique. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 311, n. September 2020, p. 110683, 2021.

DERKOWSKI, A., FRANUS, W., WANIAK-NOWICKA, H., & CZÍMEROVÁ, A. Textural properties vs. CEC and EGME retention of Na-X zeolite prepared from fly ash at room temperature. **International Journal of Mineral Processing**, 82(2), 57-68, 2007.

REIPRICH, B.; WEISSENBERGER, T.; SCHWIEGER, W.; INAYAT, A. Layer-like FAUtype zeolites: A comparative view on different preparation routes. **Frontiers of Chemical Science and Engineering**, v. 14, n. 2, p. 127–142, 2020.

MEHLHORN, D.; RODRIGUEZ, J.; CACCIAGUERRA, T.; et al. Revelation on the Complex Nature of Mesoporous Hierarchical FAU-Y Zeolites. **Langmuir**, v. 34, n. 38, p. 11414–11423, 2018.

GALARNEAU, A.; MEHLHORN, D.; GUENNEAU, F.; et al. Specific Surface Area Determination for Microporous/Mesoporous Materials: The Case of Mesoporous FAU-Y Zeolites. **Langmuir**, v. 34, n. 47, p. 14134–14142, 2018.

LOPES, M. M.; COUTINHO, T. C.; FARINAS, C. S. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology Modification of zeolite with metallic ions improves the immobilization of phytase. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 36, n. July, p. 102137, 2021.

REIS, C. L. B.; DE SOUSA, E. Y. A.; DE FRANÇA SERPA, J.; OLIVEIRA, R. C.; DOS SANTOS, J. C. S. Design of immobilized enzyme biocatalysts: Drawbacks and opportunities. **Química Nova**, v. 42, n. 7, p. 768–783, 2019.