

UNIVERSIDADE TIRADENTES – UNIT
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE PROCESSOS - PEP

**IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE DE *Burkholderia cepacia* EM
BIOCHAR DERIVADO DE SEMENTE DE GOIABA (*Psidium
guajava* L)**

Autora: Lays Carvalho de Almeida

Orientadores: Prof.^a. Dr.^a. Cleide Mara Faria Soares

Prof. Dr. Álvaro Silva Lima

ARACAJU, SE - BRASIL.
FEVEREIRO DE 2015

IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE DE *Burkholderia cepacia* EM BIOCHAR DERIVADO DE
SEMENTE DE GOIABA (*Psidium guajava* L)

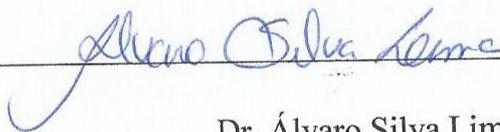
Lays Carvalho de Almeida

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
ENGENHARIA DE PROCESSOS DA UNIVERSIDADE TIRADENTES COMO PARTE
DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM
ENGENHARIA DE PROCESSOS

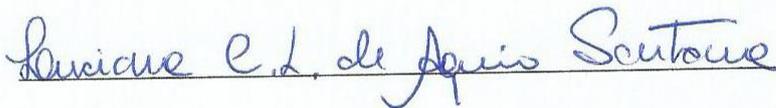
Aprovada por:



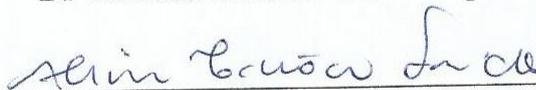
Dr^a. Cleide Mara Faria Soares



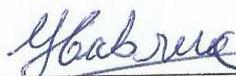
Dr. Álvaro Silva Lima



Dr^a Luciana Cristina Lins de Aquino Santana



Dr^a Alini Tinoco Fricks



Dr^a Rebeca Y. Cabrera-Padilla

ARACAJU, SE - BRASIL
FEVEREIRO DE 2015

Almeida, Lays Carvalho de.

A447i Imobilização de lipase de *Burkholderia cepacia* em biochar derivado de semente de goiaba – *Psidium guajava* L. / Lays Carvalho de Almeida. Orientação [de] Prof.^a. Dr^a Cleide Mara Faria Soares Prof. Dr. Álvaro Silva Lima – Aracaju : UNIT, 2015.

82 p.; il.

Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos)
Inclui bibliografia.

1. Biochar. 2. Lipase. 3. Imobilização. I. Soares, Cleide Mara Faria. (orient.) II. Lima, Álvaro Silva. (orient.) III. Universidade Tiradentes. IV. Título.

CDU: 665.3.092-977:582. 883

“É proibido não rir dos problemas

Não lutar pelo que se quer,

Abandonar tudo por medo.”

Pablo Neruda

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho só foi possível graças:

Ao nosso Deus, que me deu forças e esperanças para atingir mais um objetivo nessa jornada louca que é denominada de vida.

Aos meus pais, Jorge Mota e Maria Aparecida, pelo constante apoio, amor, incentivo e pelo estímulo e encorajamento ocorridos durante o curso, pois sem isto jamais o teria concluído.

A minha Irmã e amigos Layana Carvalho, Hector Dimas, Rafaela Santos, Thiago Brito, Cassia e Harim Tavares pelo companheirismo, compreensão durante todos os momentos difíceis.

A Professora Cleide Mara Faria Soares e ao Professor Álvaro Silva Lima por acreditarem e colaborarem no desenvolvimento deste trabalho, o meu eterno agradecimento.

A professora Lisiane por disponibilizar o laboratório de análise de compostos orgânicos poluentes da UFS e aos seus alunos, Juciara, Jorge e Roberta, pela disposição que sempre tiveram em me auxiliar. E o professor Gabriel pelo o uso do Laboratório de Tecnologias Alternativas da UFS para realizar as caracterizações.

Aos meus amigos de laboratório, em especial a Anderson, Nayara, Flávia, Kênia, Diego, Acácia, Jaci, Felipe, Juliana, Acenini, Vanessa, pelo agradável ambiente de trabalho, pela amizade, paciência e força que muito me ajudaram.

Aos amigos e professores de Pós - Graduação da Unit, por compartilharem comigo cada dia fundamental para a minha formação profissional.

A todas as demais pessoas que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho.

Resumo da Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia de Processos da Universidade Tiradentes como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Engenharia de Processos.

IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE DE *Burkholderia cepacia* EM BIOCHAR DERIVADO DE SEMENTE DE GOIABA (*Psidium guajava* L)

Lays Carvalho de Almeida

O agronegócio é hoje a principal força motriz na economia de diferentes países e envolve atividades voltadas para produção, processamento, armazenamento, distribuição dos produtos agrícolas e pôr fim a constante avaliação do potencial de geração de energia renovável a partir de resíduos agroindustriais. A imobilização de lipases utilizando suportes oriundos de resíduos agroindustriais é uma das alternativas na agroindústria moderna a fim de atender aos conceitos de desenvolvimento sustentável e medidas para reverter à situação do meio ambiente. Na cadeia produtiva da produção de sucos e doces de goiaba, uma das principais atividades de agronegócio do estado de Sergipe, a semente gerada foi utilizada para a produção de bio-óleo a partir da pirólise e o resíduo sólido oriundo deste processo é denominado biochar. A fim de se ter novas alternativas para o desenvolvimento sustentável o objetivo deste trabalho foi avaliar o uso do biochar como suporte para a imobilização da lipase de *Burkholderia cepacia* (BC) por adsorção física (ADS) e ligação covalente (LC). Nas propriedades bioquímicas dos biocatalisadores imobilizados observou-se o pH ótimo 4,0 para a lipase de BC imobilizada por adsorção física e pH 7,0 para a enzima livre e para o biocatalisador imobilizado por ligação covalente. A temperatura ótima para os biocatalisadores imobilizados foi 60 °C, 10 °C acima da temperatura ótima da enzima livre. Os parâmetros cinéticos determinados para a enzima livre e os biocatalisadores imobilizados por ADS ou LC para a V_{max} foram 3333, 2000 e 2500 $\mu\text{mol/g}\cdot\text{min}$, respectivamente. E o valor de K_m para lipase livre foi 665 mM e para os biocatalisadores imobilizados ADS e LC os valores de K_m foram de 219 e 369 mM, respectivamente. A lipase de BC imobilizada por ADS apresentou melhor estabilidade operacional quando comparada com lipase de BC imobilizada por ligação covalente, o reuso máximo foi de 17 vezes considerando a manutenção de 50 % da sua atividade inicial (2000 U/g). Observou-se a partir das análises de MEV do biocatalisador imobilizado que ocorreu a formação de multicamadas na imobilização por ligação covalente corroborando assim para a baixa estabilidade operacional devido a lixiviação destas camadas durante o reuso. A partir dos espectros obtidos na análise de infravermelho por transformada de fouier pode-se confirmar as bandas características do grupamento amida (N-H) indicando assim a imobilização da lipase de BC no biochar imobilizados por ADS e LC.

Palavras-Chave: Biochar, Lipase, imobilização.

Abstract of Dissertation presented to the Process Engineering Graduate Program of Universidade Tiradentes as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science (M.Sc.).

IMMOBILIZATION OF *Burkholderia Cepacia* LIPASE ON BIOCHAR DERIVED GUAVA SEED (*Psidium guajava* L)

Lays Carvalho de Almeida

Currently agribusiness is the main driving force in the economic from different countries and involves activities aimed at production, processing, storage, distribution of agricultural products and put an end to constant evaluation of the potential of renewable energy generation from agricultural residues. Immobilization of lipases using media coming from agro-industrial waste is one of the alternatives in modern agribusiness in order to meet the concepts of sustainable development and measures to reverse the state of the environment. In the production chain from production of sweet juice and guava, the generated seed was used for the production of bio-oil from pyrolysis and the solid residue from this process is called biochar. For the purpose of have new alternatives for sustainable development the objective of this study is to evaluate the use of biochar as support for the immobilization of *Burkholderia cepacia* lipase (BC) by physical adsorption (PA) and covalent bond (CB). In the biochemical properties of immobilized biocatalysts, we observed the optimum pH 4.0 for BC lipase immobilized by physical adsorption and pH 7.0 for the free enzyme and the biocatalyst immobilized by covalent bonding. The optimum temperature for the immobilized biocatalysts was 60 °C, 10 °C above the optimum temperature of the free enzyme. The kinetic parameters determined for the free enzyme and immobilized biocatalysts per ADS or LC for V_{max} were 3333, 2000 and 2500 mmol.g⁻¹.min⁻¹ respectively. And the Km value for free lipase was 665 mM and for the immobilized biocatalysts PA and BC the Km values were 219 and 369 mm, respectively. BC lipase immobilized by PA showed better operational stability when compared with BC lipase immobilized by covalent bonding, the maximum was 17 times reuse whereas maintaining 50 % of its initial activity (2000 U.g⁻¹). It was observed from the SEM analyzes of fixed biocatalyst that occurred multilayer formation in immobilization by covalent corroborating so for low operational stability due to leaching of these layers for reuse. From the spectrum obtained by infrared analysis transform Fourier can confirm the characteristic bands of amide grouping (NH) that indicated the immobilization of lipase BC biochar and immobilized by PA e CB.

Keywords: Biochar, Lipase, Immobilization.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
2.1. OBJETIVO GERAL	3
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
3.1. RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS	4
3.1.1. <i>Composição Química dos Resíduos Agroindustriais</i>	7
3.1.1.1. <i>Celulose</i>	7
3.1.1.2. <i>Hemicelulose</i>	7
3.1.1.3. <i>Lignina</i>	8
3.2. APLICAÇÃO DOS RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS	10
3.3. PIRÓLISE	11
3.4. BIOCHAR.....	12
3.5. IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS	17
3.5.1. <i>Métodos de Imobilização</i>	20
3.5.1.1. <i>Métodos de Imobilização em Suportes Orgânicos</i>	25
3.6. USO DE ENZIMAS IMOBILIZADAS EM DIFERENTES REAÇÕES	28
4. METODOLOGIA	33
4.1. MATERIAIS	33
4.2. PRODUÇÃO DO BIOCHAR	33
4.3. TESTE DE BIODEGRABILIDADE DO BIOCHAR	34
4.4. TRATAMENTO DO BIOCHAR PARA IMOBILIZAÇÃO	34
4.5. ANÁLISE ELEMENTAR (CHN)	35
4.6. IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE EM BIOCHAR	35
4.6.1. <i>Adsorção Física (ADS)</i>	35
4.6.2. <i>Ligação Covalente (LC)</i>	36
4.7. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE HIDROLÍTICA	36
4.8. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS BIOCATALISADORES IMOBILIZADOS	37
4.8.1. <i>Caracterização Morfológica do Biochar e dos Biocatalisadores imobilizados</i>	37
4.8.1.1. <i>Caracterização física em B.E.T.</i>	37
4.8.1.2. <i>Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)</i>	37
4.8.2. <i>Caracterização Físico-Química</i>	38

4.8.2.1. <i>Análise Termogravimétrica (TGA)</i>	38
4.8.2.2. <i>Análise por Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)</i>	38
4.9. PROPRIEDADES BIOQUÍMICAS DA LIPASE LIVRE E IMOBILIZADA	38
4.9.1. <i>Efeito do pH e da Temperatura na Atividade</i>	38
4.9.2. <i>Estabilidade Térmica</i>	39
4.9.3. <i>Determinação dos parâmetros cinéticos</i>	39
4.9.4. <i>Estabilidade Operacional</i>	39
4.10. DETERMINAÇÃO DE ACIDOS GRAXOS TOTAIS	39
4.11. REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA	40
4.12. QUANTIFICAÇÃO DOS ÉSTERES ETÍLICOS	40
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
5.1. ESTRUTURA QUÍMICA DO BIOCHAR DA SEMENTE DE GOIABA	42
5.2. TESTE DE BIODEGRABILIDADE DO BIOCHAR	42
5.3. TRATAMENTO DO BIOCHAR PARA IMOBILIZAÇÃO.....	42
5.4. IMOBILIZAÇÃO	43
5.5. CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E FÍSICO-QUÍMICA DOS BIOCATALISADORES IMOBILIZADOS E BIOCHAR.....	47
5.5.1. <i>Análise Morfológica (B.E.T.)</i>	47
5.5.2. <i>Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)</i>	47
5.5.3. <i>Análise termogravimétrica (TG)</i>	49
5.5.4. <i>Espectroscopia no Infravermelho (FTIR)</i>	50
5.6. PROPRIEDADES BIOQUÍMICAS DA LIPASE LIVRE BIOCATALISADORES IMOBILIZADOS.....	51
5.6.1. <i>Efeito do pH e Temperatura</i>	51
5.6.2. <i>Determinação dos parâmetros cinéticos</i>	53
5.6.3. <i>Estabilidade Térmica</i>	55
5.6.4. <i>Estabilidade operacional</i>	56
5.7. POTENCIAL DE PRODUÇÃO DE ÉSTERES ETÍLICOS.....	58
6. CONCLUSÃO	61
7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	62
8. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	63

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1. (a) Goiaba (b) Semente de goiaba.....	5
Figura 3.2. Representação da cadeia linear da celulose (MOHAN <i>et al.</i> , 2006).....	7
Figura 3.3. Principais componentes da hemicelulose (MOHAN <i>et al.</i> , 2006).....	8
Figura 3.4. Álcoois formadores da molécula de lignina (AMEN-CHEN, PAKDEL e ROY, 2001).	9
Figura 3.5. Estrutura parcial de uma molécula de lignina da madeira de faia europeia (<i>Fagus sylvatica</i>) (MOHAN <i>et al.</i> , 2006).....	9
Figura 3.6. Processos de conversão de biomassa e seus possíveis produtos	11
Figura 3.7. Arranjos estruturais do biochar do sabugo de milho sugerido por	14
Figura 3.8. Estrutura microcristalino do grafite (BOURKE <i>et al.</i> , 2007).	15
Figura 3.9. A fotografia da semente de goiaba no tamanho original (a), e com microscopia óptica com aumento 63x da partícula de semente de 0,63 mm in natura (b) e carbonizada a 600 °C (c) e 1000 °C (d) (GONZALEZ e MONTOYA, 2009).	16
Figura 3.10. Mercado mundial de enzimas em diversos segmentos	18
Figura 3.11. Representação da estrutura da Lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> . A tampa da estrutura cristalina aberta da LBC está representada de cor azul e modelo fechado de cor verde e a esfera do íon Ca ²⁺ de cor amarela. A tríade catalítica que consiste em Ser, His e Asp está na cor vermelha (TRODLER <i>et al.</i> 2009).....	19
Figura 3.12. Adsorção de enzimas num suporte por ligação iônica.....	21
Figura 3.13. A imobilização por meio de ligação covalente: (A) unipontual por meio do braço espaçador e (B), através de fixação multipontual (MILETIC <i>et al.</i> , 2012).....	22
Figura 3.14. Tipos de ligação cruzada (BRADY e JORDAAN, 2009).....	23
Figura 3.15. Micrografia de CLEAs de lacase (CABANA <i>et al.</i> , 2007).....	24
Figura 3.16. Lipase <i>B. Cepacia</i> na matriz híbrida de alginato de sódio e k-carragenano. (A) Vista geral da lipase imobilizada. (B) imagem microscópica de lipase imobilizada com ampliação 45X (ABDULLA e RAVINDRA, 2013).	25
Figura 3.17. Esquema da reação entre grupo do aldeído, presente no suporte, e o grupo amina da enzima (Adaptado LI <i>et al.</i> , 2004).	26
Figura 3.18. Diagrama esquemático da interação de protease neutra, com os grupos hidroxilo e os sulcos presentes no suporte (LV <i>et al.</i> , 2013).	27
Figura 3.19. O procedimento e os mecanismos propostos para a imobilização da lipase PEI multicamadas em fibras de algodão (Adaptado ONDUL <i>et al.</i> , 2012).	28
Figura 3.20. Principais reações catalisadas por lipases (RIBEIRO <i>et al.</i> , 2011).	29

Figura 3.21. Reação de transesterificação do triglicerídeo com álcool envolvendo as três reações consecutivas e reversíveis de formação dos ésteres (GHALY <i>et al.</i> , 2010).....	31
Figura 4.1. Sistema utilizado para a pirólise composto: forno elétrico (1), Reator (2), condensador (3) e balão para coletar o bio-óleo (4)	34
Figura 5.1. Microscopia eletrônica de varredura do biochar (a) e biochar após o tratamento com diclorometano (b).	43
Figura 5.2. Atividade relativa da lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> em função das diferentes concentrações enzima/ suporte.....	44
Figura 5.3. Superfície do biochar após a imobilização por adsorção física (a) e por ligação covalente (b).	45
Figura 5.4. Modelo proposto para a imobilização por adsorção física da Lipase de BC em biochar (adaptado BOURKE <i>et al.</i> , 2007).....	45
Figura 5.5. Modelo proposto para a imobilização por ligação covalente para lipase de BC em Biochar, (a) ativação do suporte com epícloridrina, (b) imobilização da Lipase de BC e (c) influência do PEG 1500 na formação dos agregados de Lipase de BC.....	46
Figura 5.6. Microscopia eletrônica de varredura do biochar e biocatalisadores imobilizados por diferentes técnicas: (a) biochar, (b) Lipase imobilizada por Adsorção física (ADS) e (c) Lipase imobilizada por Ligação covalente (LC).....	48
Figura 5.7. Curvas termogravimétricas da lipase de BC livre, biochar e biocatalisadores imobilizados por ADS e LC.....	49
Figura 5.8. Espectro de FTIR para o biochar e biocatalisadores imobilizados ADS e LC.	51
Figura 5.9. Efeito do pH na atividade da lipase de BC livre e imobilizada por adsorção física (ADS) e ligação covalente (LC).	52
Figura 5.10. Efeito da temperatura na atividade da lipase de BC livre e imobilizada por adsorção física (ADS) e ligação covalente (LC).....	53
Figura 5.11. Estabilidade térmica do biocatalisador livre e imobilizado por adsorção física (ADS) e ligação covalente (LC) incubada a 60 ° C.	55
Figura 5.12. Estabilidade operacional da lipase imobilizada por adsorção física (ADS) e ligação covalente (LC) em biochar.....	57
Figura 5.13. Influência do tempo de reação na conversão de ésteres etílicos.	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1. Composição de minerais da semente de goiaba (<i>Psidium guajava</i> L.) (UCHÔA-THOMAZ <i>et al.</i> , 2014).	6
Tabela 3.2. Composição em percentagem da massa orgânica das sementes de goiaba (RAHMAN e SAAD 2003).....	6
Tabela 3.3. Classificação da pirólise (NICOLINI <i>et al.</i> , 2013).....	12
Tabela 3.4. Vantagens e desvantagens dos diferentes tipos de suportes utilizados no processo de imobilização de enzimas.	20
Tabela 3.5. Aplicação industrial da lipase (KAPOOR e GUPTA, 2012).....	29
Tabela 4.1. Condições dos testes de biodegradabilidade.	34
Tabela 5.1. Área superficial específica, volume e diâmetro dos poros do biochar e biocatalisadores imobilizados.	47
Tabela 5.2. Perda de massa observada para a lipase BC e biocatalisadores imobilizados	50
Tabela 5.3. Parâmetros cinéticos (V_{max} e K_m) da enzima livre e imobilizada.....	55
Tabela 5.4. valores de constante de inativação térmica (K) e tempo de meia vida para a lipase de BC livre e imobilizada ADS e LC	56
Tabela 5.5. Composição de ácidos graxos do óleo de coco.	60

Capítulo 1

1. INTRODUÇÃO

O uso de enzimas como catalisadores em processos industriais vem recebendo destaque, devido às vantagens como condições brandas de reação, e redução da formação de subprodutos indesejáveis nos processos industriais. As lipases apresentam características importantes tais como especificidade, quimiosseletividade, regioseletividade e enantiosseletividade. No entanto, a aplicação industrial é limitada devido a difícil recuperação e reutilização da enzima e a baixa estabilidade operacional. Neste contexto a imobilização de enzimas tem como principal objetivo melhorar o processo enzimático aumentando a atividade catalítica, estabilidade térmica e operacional do biocatalisador.

Atualmente, existem inúmeros esforços quanto ao uso de lipases imobilizadas para aplicação industrial, visto que muitas vezes não é um benefício econômico significativo o uso destes biocatalisadores imobilizados em processos bioquímicos devido ao custo do tipo de suporte, origem da enzima e método de imobilização. Diversos estudos são realizados no sentido de aprimorar o sistema imobilizado (enzima-suporte) considerando o custo benefício, como por exemplo, tem se ganhado importância a utilização de resíduos agroindustriais como suporte para a imobilização de enzimas devido à grande disponibilidade e o baixo custo econômico.

No que se refere ao uso de resíduos agroindústrias como suporte de baixo custo pode-se citar: fibra de coco, talos de milho e casca de arroz. Até o presente momento não foi verificado na literatura o uso do biochar oriundo da semente de goiaba para a imobilização de enzimas, contudo este tipo de material apresentou resultados promissores na adsorção de corantes ácidos (GONZALEZ e MONTOYA, 2009). O estudo prévio de imobilização por adsorção física de lipase em biochar oriundo da pirólise de aveia foi realizado por GONZALEZ *et al.* (2013), que verificou um bom desempenho do biochar como matriz de imobilização da lipase de *Candida rugosa*.

Neste trabalho julgou-se conveniente uma avaliação detalhada referente ao desempenho de sistemas imobilizados em suportes oriundos da pirólise de outro tipo de resíduo agroindustrial disponível no estado de Sergipe, a semente de goiaba. Tendo em vista que a produção agrícola em especial no sudeste e no nordeste do Brasil tem se expandido

progressivamente no caso de frutas tropicais, o país é considerado um dos principais produtores de goiaba no mundo com colheita crescente (SANTOS *et al.*, 2013). Ao se propor sustentabilidade ambiental no setor agroindustrial deve-se prever também tecnologias inovadoras no sentido de se obter o aproveitamento do resíduo, como por exemplo, a semente de frutos tropicais. A goiaba é um fruto que se destaca na produção e comercialização no mercado interno e externo brasileiro, o qual a semente apresenta cerca de 4% do peso da fruta. No caso desta fruta tropical a produção variou-se de 281 para 345 mil toneladas de 2001 para 2013 (IBGE, 2011 e SANTOS *et al.*, 2013).

Uma das alternativas para aproveitamento dos resíduos agroindustriais é por meio de processos termoquímicos sendo a pirólise uns dos mais utilizados gerando três produtos: gás, bio-óleo e biochar. Recentemente o biochar foi reconhecido como um material multifuncional relacionado à adsorção de compostos orgânicos, fertilização dos solos, imobilização de metal e enzimas (AHMAD *et al.*, 2012). A biomassa utilizada na obtenção de biochar para diferentes aplicações é diversa, das quais pode-se citar: palha de milho, casca de amendoim, da semente de algodão, de pinheiro e de aveia.

Baseando-se nas informações descritas, deve-se salientar que estudos utilizando biochar como suporte para a imobilização de enzimas na literatura são escassos, evidenciando a relevância deste trabalho para o desenvolvimento destes sistemas imobilizados visando à viabilidade de aplicação em escala industrial. Desta forma avaliou-se a caracterização físico-química e morfológica do biochar e dos sistemas imobilizados por ADS e LC. Além da avaliação das características bioquímicas, cinéticas e catalíticas dos sistemas imobilizados em meio aquoso, determinados na reação de hidrólise do azeite de oliva. No estudo da aplicação do sistema em meio orgânico, adotou-se o biocatalisador mais eficiente na reação de hidrólise para a sua aplicação na reação de transesterificação de óleo de coco bruto com o agente acilante etanol.

Capítulo 2

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi imobilizar a Lipase de *Burkholderia cepacia* (BC) em biochar utilizando diferentes técnicas de imobilização e realizar a caracterização destes sistemas imobilizados.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos são:

- Verificar a biodegradabilidade do biochar nos meios reacionais selecionados;
- Determinar o carregamento na imobilização da Lipase de *Burkholderia cepacia* (BC) em biochar por adsorção física e ligação covalente;
- Caracterizar físico-química e morfológicamente o suporte e o biocatalisador imobilizado quanto ao volume de poros, área superficial (Método B. E. T), perda de massa e calor em função da temperatura (TGA) e composição química (FTIR);
- Realizar a caracterização bioquímica do sistema imobilizado;
- Verificar o potencial do biocatalisador imobilizado na produção de ésteres etílicos.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste tópico serão abordados os seguintes itens referentes ao uso do biochar para imobilização de enzimas: resíduos agroindustriais, goiaba, biochar, imobilização de enzimas; lipases, métodos de imobilização em suportes orgânicos naturais.

3.1. RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS

Em diversos processos agroindustriais existe como parte da produção principal a geração de resíduos que representam perdas econômicas no processo produtivo e, se não receberem destinação adequada, geram impactos ambientais negativos. (MENEZES *et al.*, 2012). Segundo Laufenberg *et al.* (2003), os rejeitos gerados ao longo da cadeia produtiva podem conter muitas substâncias de alto valor. Com uma tecnologia adequada, este material pode ser convertido em produtos comerciais ou matérias-primas para processos secundários.

A produção agrícola no Brasil tem-se expandindo desde 2010, aumentou 4,7 % e na mesma intensidade aumentou a geração de resíduos agroindustriais, perfazendo uma estimativa de 250 milhões de toneladas ao ano (SILVA *et al.*, 2014). O Brasil é considerado o terceiro maior produtor de frutas, depois da China e da Índia (FAO, 2012). De acordo com o Instituto Brasileiro de Frutas - Ibraf (Instituto Brasileiro de Frutas, 2013), em 2012 a produção de frutas frescas no Brasil foi de 43,598 milhões de toneladas. Um total de 427.314 toneladas foram importadas e 693.020 toneladas foram exportadas; 22.906.000 toneladas de frutas frescas foram consumidas e 20.692.000 toneladas de frutas foram processados. No mesmo ano 9,162 milhões de toneladas de frutas foram para o lixo e consumo per capita foi de 78,4 kg /habitante / ano.

Além da crescente produção agrícola, o país tem se destacado como potência no beneficiamento de sua produção. Produtos que antes eram exportados *in natura*, hoje são industrializados, e conseqüentemente intensificando a geração de resíduos (MENEZES *et al.*, 2012).

Dentre as frutas tropicais brasileiras, a goiaba (*Psidium guajava L*) ocupa lugar de destaque o que leva o Brasil a ser considerado um dos maiores produtores mundiais da fruta.

Destaca-se no setor de agronegócio devido ao sabor, aparência e nutrientes funcionais que podem promover a saúde (NASCIMENTO *et al.*, 2010). A goiaba pode ser processada e consumida como geleias, doces e sucos. É particularmente rica em minerais e compostos funcionais, tais como vitamina C, fibra dietética, carotenoides e compostos fenólicos (UCHÔA-THOMAZ *et al.*, 2014).

No processo de beneficiamento de frutos o resíduo, que usualmente é descartado, consiste em uma mistura heterogênea de sementes e cascas, no caso da goiaba as sementes representam 4% da massa total (GONZÁLEZ e MONTOYA, 2009). Estima-se que cerca de 202 toneladas de goiaba são processadas a cada ano pelos fabricantes de polpas de frutas congeladas no Brasil, o que corresponde a cerca de 12 toneladas de resíduos que são eliminados e torna-se um passivo ambiental para indústrias de processamento de frutas (UCHÔA-THOMAZ *et al.*, 2014).

A goiaba (Figura 3.1a) pertence à família *Myrtaceae*, é distribuída hoje ao longo das áreas tropicais e subtropicais do mundo. Botanicamente, o fruto é uma baga muito semeada, variando em tamanho de 2.5 a 10 cm de diâmetro e de 50 a 500 g de massa. A forma do fruto pode ser globosa, ovóide, ou em forma de pêra. Os frutos podem ter polpa espessa, com apenas algumas sementes numa pequena cavidade no centro ou polpa fina com numerosas sementes incorporadas em uma grande massa de polpa. As sementes (Figura 3.1b) são pequenas ósseas, em forma de rim, achatado, marrom claro, amarelo ou amarelado, medindo cerca de 3 a 5 mm de comprimento por 2 a 3 mm de largura e ocupa cerca de 1,6 a 4,4% do peso da fruta (YUSOF, 2013).



Figura 3.1. (a) Goiaba (b) Semente de goiaba.

Silva *et al.* (2009) analisaram composição de aminoácidos presentes no resíduo de goiaba obtiveram os seguinte valores: 0,17 % de metionina; 0,32 % de cistina; 0,16 % de

lisina; 0,23 % de treonina; 1,47 % de arginina; 0,32 % de isoleucina; 0,71 % de leucina; 0,39% de valina; 0,25 % de histidina; 0,44 % de fenilalanina; 0,85 % de glicina; 0,42 % de serina; 0,30 % de prolina; 0,35 % de alanina; 0,97 % de ácido aspártico e 1,91 % de ácido glutâmico. Quanto à composição de minerais da semente de goiaba, Tabela 3.1, os minerais ferro e zinco estavam presentes em concentrações mais elevadas e baixo teor de sódio e cálcio (UCHÔA-THOMAZ *et al.*, 2014).

Tabela 3.1. Composição de minerais da semente de goiaba (*Psidium guajava* L.) (UCHÔA-THOMAZ *et al.*, 2014).

Mineral (mg/100g)	Resultados (média ± DP)
Cálcio	0,05 ± 0,14
Magnésio	0,13 ± 0,02
Enxofre	0,09 ± 0,27
Ferro	13,8 ± 2,95
Manganês	0,44 ± 0,47
Zinco	3,31 ± 2,52
Sódio	0,05 ± 0,02
Potássio	0,20 ± 0,02
Fósforo	0.30 ± 0.45

Segundo Rahman e Saad (2003) a semente de goiaba contém elevada quantidade de material lignocelulósico, ou seja, constituídas basicamente por celulose e lignina (Tabela 3.2). Estes resultados mostram a elevada percentagem, aproximadamente 80 %, de material lignocelulósico existente na semente de goiaba.

Tabela 3.2. Composição em percentagem da massa orgânica das sementes de goiaba (RAHMAN e SAAD 2003)

Constituinte	% Massa
Celulose	31,40
Hemicelulose	14,30
Lignina	40,20
Solúveis	6,96
Mistura	6,51
Resíduo	0,10

3.1.1. Composição Química dos Resíduos Agroindustriais

A utilização dos resíduos agroindustriais como matéria-prima depende de seus constituintes químicos e de suas propriedades físicas. Os resíduos agroindustriais são constituídos basicamente de celulose, hemiceluloses e lignina. De acordo com o tipo de resíduo (semente, casca ou polpa) o teor de celulose, hemicelulose e lignina podem variar amplamente, conferindo características diferentes aos resíduos.

3.1.1.1. Celulose

A celulose é o principal componente da parede celular dos vegetais, o composto orgânico mais abundante da natureza, renovável e biodegradável. A celulose em termos estruturais é um polímero linear de alto peso molecular constituída por unidades repetitivas de duas moléculas de D-glicose unidas por ligações glicosídicas do tipo β (1 \rightarrow 4), a unidade repetitiva é conhecida como celobiose (Figura 3.2). Ocorre a degradação térmica da celulose na faixa de temperatura de 240 - 350 °C (MOHAN *et al.*, 2006; LAVOINE *et al.*, 2012).

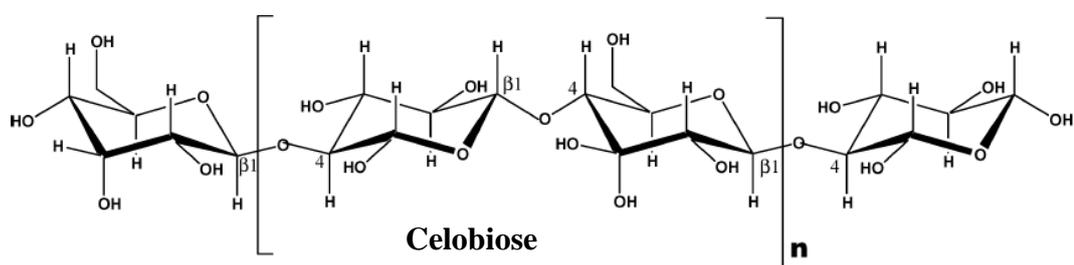


Figura 3.2. Representação da cadeia linear da celulose (MOHAN *et al.*, 2006).

3.1.1.2. Hemicelulose

A hemicelulose é amorfa por causa da sua natureza ramificada e é relativamente fácil hidrolisar aos seus açúcares monoméricos em comparação com a celulose. Em contraste com a celulose, que é um polímero de glicose apenas, a hemicelulose é uma mistura de vários monossacarídeos polimerizados tais como glicose, manose, galactose, xilose, arabinose, 4-O-metilíco de ácido glucurônico e de resíduos de ácido galacturônico (Figura 3.3). As hemiceluloses exibem pesos moleculares inferiores aos da celulose. O número de repetição de monómeros sacarídeos é apenas 150, em comparação com o número de celulose (5000 -

10000) e decompõe-se na faixa de temperaturas de 200 - 260 °C (HUBER *et al.*, 2006; MOHAN *et al.*, 2006).

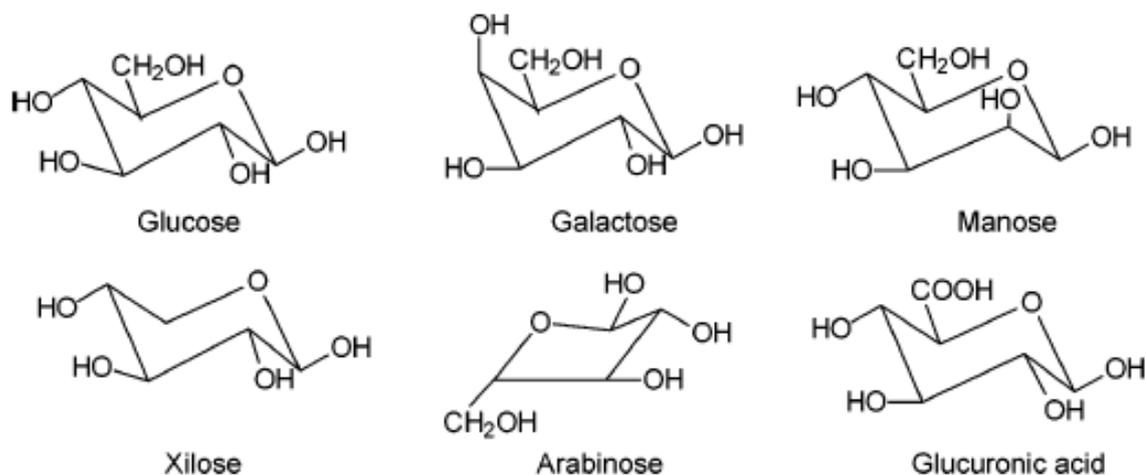


Figura 3.3. Principais componentes da hemicelulose (MOHAN *et al.*, 2006).

3.1.1.3. Lignina

A lignina é um polímero que atua como suporte nas paredes da célula, apresentando peso molecular elevado e muitas ligações cruzadas, características de polímeros termorrígidos. Possui natureza química bem distinta dos carboidratos, sendo caracterizada por uma estrutura preponderantemente aromática e a sua degradação térmica ocorre na faixa de temperatura de 280 - 500 °C. A lignina consiste em uma rede tridimensional formada a partir da condensação de unidades do tipo fenil-propano, com crescimento aleatório em direção a uma macromolécula com diferentes tipos de ligações entre os monômeros, principalmente éter (C-O-C) e/ou carbono-carbono (C-C) (PANDEY e KIM, 2011). A lignina é formada basicamente por três álcoois: p-cumarílico, coniferílico e sinapílico como mostra a Figura 3.4 (AMEN-CHEN *et al.*, 2001). A Figura 3.5 representa a estrutura parcial de uma molécula de lignina da madeira de faia europeia (*Fagus sylvatica*).

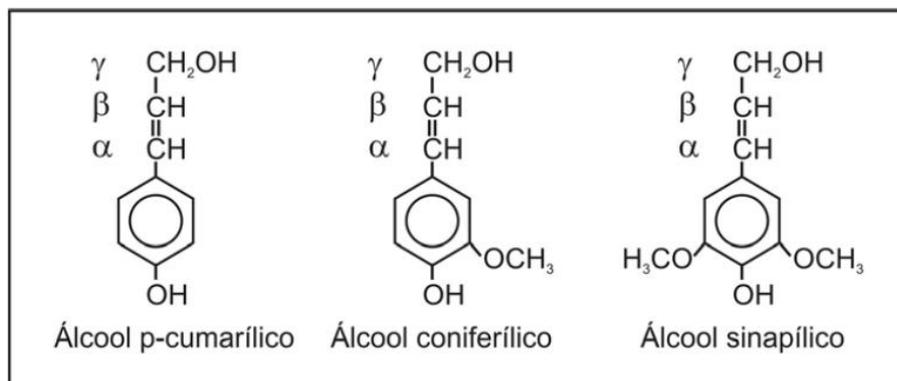


Figura 3.4. Álcoois formadores da molécula de lignina (AMEN-CHEN, PAKDEL e ROY, 2001).

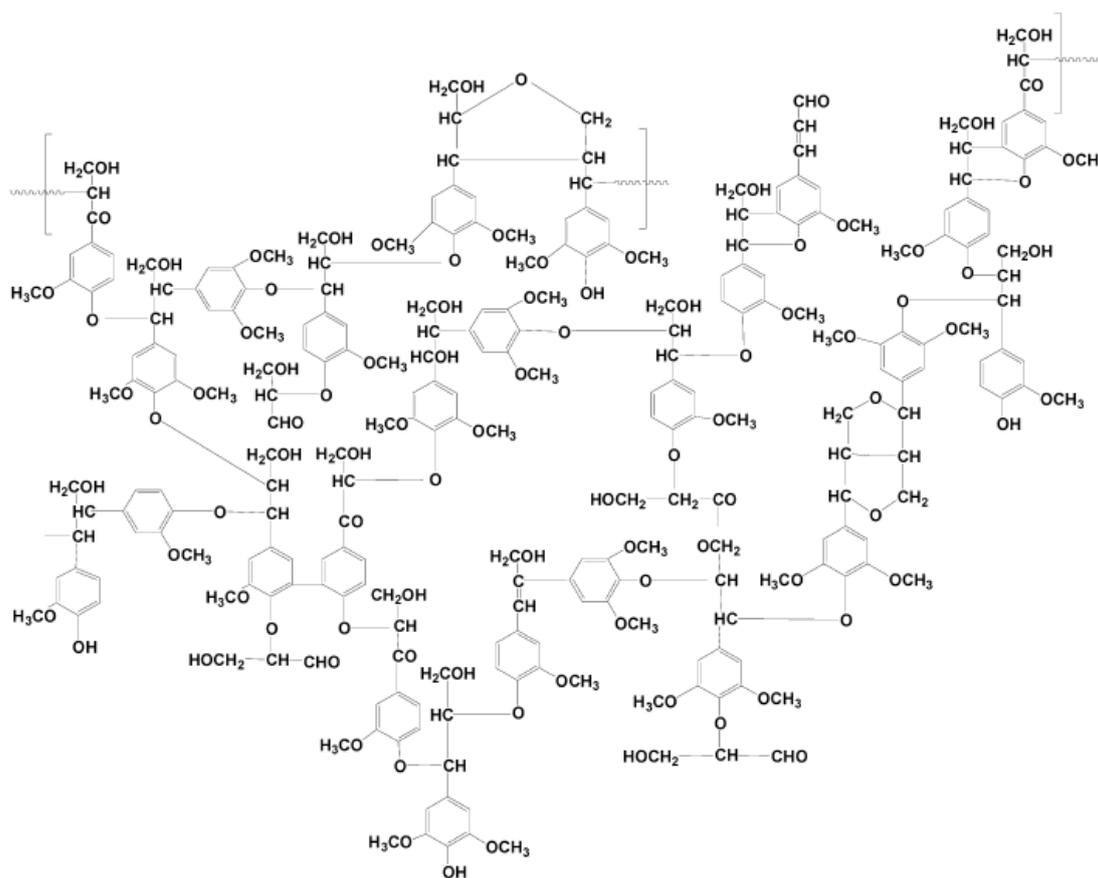


Figura 3.5. Estrutura parcial de uma molécula de lignina da madeira de faia europeia (*Fagus sylvatica*) (MOHAN *et al.*, 2006).

3.2. APLICAÇÃO DOS RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS

Diversos estudos sobre resíduos agroindustriais são realizados com o intuito de aproveitá-los adequadamente. Além disso, a utilização total dos frutos pode beneficiar economicamente os produtores levando a redução no desperdício, maior rentabilidade e diversidade de produtos (SILVA *et al.*, 2014).

KOBORI e JORGE (2005) estudaram as características físico-químicas dos óleos extraídos de semente de tomate, laranja, maracujá e goiaba, utilizados na produção de extratos, polpas e sucos concentrados, como aproveitamento de resíduos industriais. No estudo realizado por Souza *et al.* (2011) avaliaram o potencial do subproduto da indústria processadora de goiaba como fonte de nitrogênio para as plantas, no período avaliado de 126 dias a fração média de mineralização foi de 23 %.

Outro foco de pesquisas científicas é o desenvolvimento e aperfeiçoamento de tecnologias de exploração de fontes de energia renováveis e mais baratas. Nesse contexto, a biomassa de origem vegetal é uma fonte sustentável de carbono orgânico para a produção de biocombustíveis, os quais geram uma menor quantidade de gases que provocam o efeito estufa em comparação aos combustíveis fósseis e podem ser considerados neutros, uma vez que o CO₂ emitido para o meio ambiente foi parcialmente absorvido pelas plantas através da fotossíntese antes da realização do processo para obtenção de biocombustíveis (HUBER *et al.*, 2006).

As principais tecnologias de aproveitamento energético da biomassa são: processos termoquímicos (combustão, gaseificação, pirólise e liquefação), processos biológicos (digestão anaeróbia e fermentação) ou processo mecânico (prensagem). Dentre estes processos, os termoquímicos são amplamente utilizados para a conversão de biomassa em biocombustíveis, destacando-se a pirólise. A Figura 3.6 apresenta os processos de conversão da biomassa e seus respectivos produtos (BRIDGWATER *et al.*, 2012).

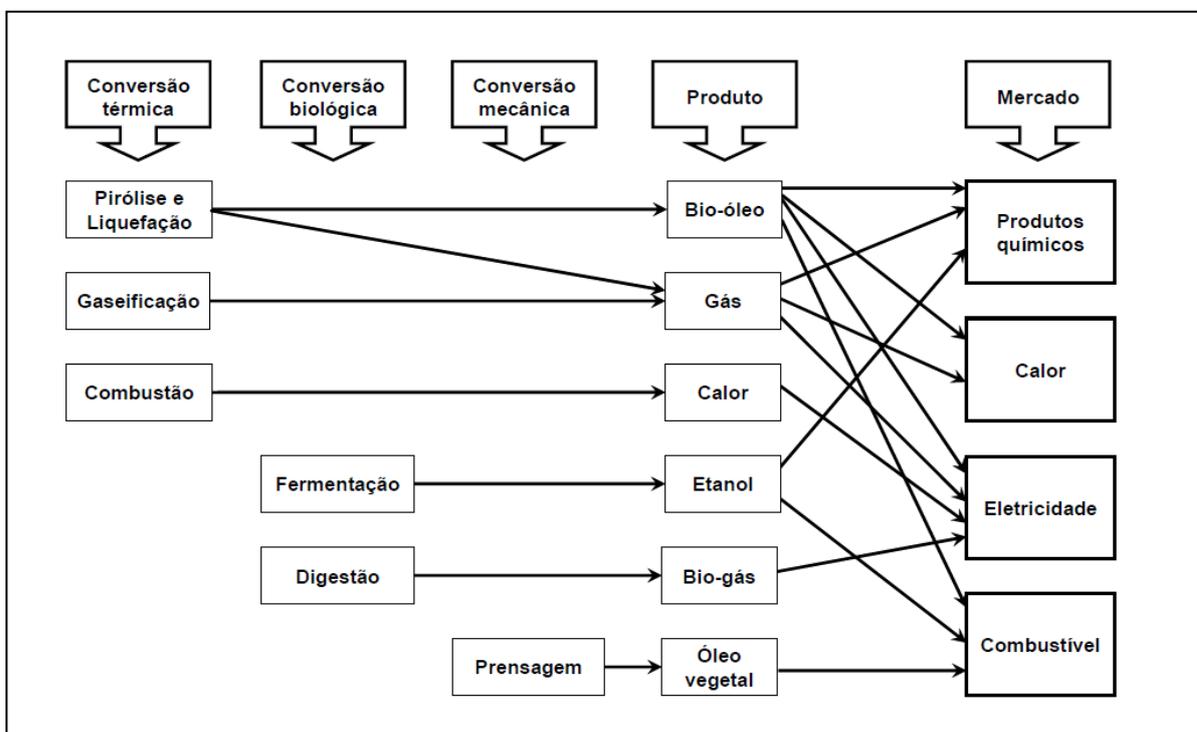


Figura 3.6. Processos de conversão de biomassa e seus possíveis produtos (BRIDGWATER *et al.*, 2012).

3.3. PIRÓLISE

A pirólise é um dos métodos primários de conversão termoquímica, a qual consiste na decomposição térmica da matéria-prima em elevadas temperaturas na ausência de oxigênio, gerando assim três produtos: biogás, bio-óleo e biochar. O rendimento destes produtos e a composição de cada fração dependem das condições de pirólise e da natureza de cada biomassa (MIRANDA *et al.*, 2009). Sendo assim, pode ser considerada uma das tecnologias com melhores perspectivas industriais para aproveitamento da biomassa, uma vez que os parâmetros do processo podem ser otimizados visando um maior rendimento dos produtos (AMUTIO *et al.*, 2012).

A pirólise pode ser classificada como: lenta, rápida e ultrarrápida, dependendo das variáveis utilizadas no processo. Na Tabela 3.1 são mostrados os tipos de pirólise classificados de acordo com os parâmetros tempo de permanência e temperatura, além dos principais produtos obtidos em cada processo (NICOLINI *et al.*, 2013).

Tabela 3.3. Classificação da pirólise (NICOLINI *et al.*, 2013).

Processo	Tempo de permanência	Temperatura (°C)	Produto
Carbonização	Vários dias	400	Carvão
Pirólise lenta	5 a 30 min	500	Gás, bio-óleo e biochar.
Pirólise rápida	0,5 a 5 s	650	Bio-óleo
Pirólise Ultrarápida	< 0,5 s	1000	Gás e líquidos

A fração líquida gerada nestes processos é em geral uma fração oleosa chamada de bio-óleo, conhecido também como óleo de pirólise, alcatrão pirolítico e alcatrão pirolenhoso. O bio-óleo, de cor marrom com aspecto viscoso é formado por frações líquidas e por gases condensados. A composição química e características como viscosidade, pH, densidade e teor de água do bio-óleo, dependem da biomassa que o originou, das condições do processo de pirólise. (HILTEN *et al.*, 2009). O bio-óleo oriundo de biomassa lignocelulósica tem recebido destaque na comunidade científica devido à influência de cada tipo de matriz a qual se pode obter compostos químicos complexos e de alto valor agregado (AMUTIO *et al.*, 2012).

A fração sólida gerada após a pirólise é chamada de biochar, que a partir da composição da biomassa apresenta diferenças nas propriedades como porosidade, área superficial específica, estruturas dos poros, grupamentos fenólicos e carboxílicos a depender do tipo de resíduo agroindustrial (JIMENEZ-CORDERO *et al.*, 2013 e BOURKE *et al.*, 2007).

O biochar é um dos subprodutos gerados durante a produção de bio-óleo e tem estimulado o aumento de pesquisas sobre esta fração sólida, que recentemente foi reconhecido como um material multifuncional devido à capacidade de adsorção de compostos orgânicos, fertilização dos solos, imobilização dos metais Zn^{+2} e Cu^{+2} (AHMAD *et al.*, 2012) e imobilização de enzimas (GONZÁLEZ *et al.*, 2013).

3.4 . BIOCHAR

Biochar é rico em carbono, substância porosa com elevada área superficial, que é produzido pela decomposição térmica da biomassa na ausência de oxigênio e a temperaturas

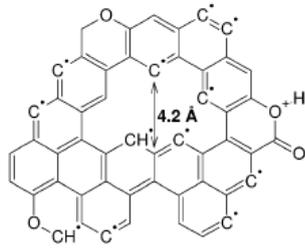
geralmente entre 300 °C a 1000 °C (TANG *et al.*, 2013). As propriedades físico-químicas do biochar estão relacionadas principalmente a dois fatores: a temperatura da pirólise e o material de origem. O aumento da temperatura da pirólise em diversos estudos foi observado uma elevação do pH e na área superficial do biochar (TANG *et al.*, 2013; LEHMANN *et al.*, 2011).

Segundo Lehmann *et al.* (2011), o pH do biochar é altamente variável a depender do tipo de biomassa. O pH apresenta caráter básico em biochar possivelmente devido ao alto teor de minerais, sendo que a diminuição do pH esta provavelmente relacionada com a oxidação de carbono para formar grupos ácidos carboxílicos, enquanto que o aumento do pH está relacionado com a dissolução de minerais alcalinos. A determinação do pH geralmente é obtido pela suspensão da amostra de biochar em água destilada na razão de 1:5 (GONZÁLEZ *et al.* 2013). Alguns exemplos de valores são: pH 9,3 do biochar de palha de milho, pH 7,9 do biochar de madeira de carvalho e pH 10,3 do biochar do resíduo das palhas utilizadas nos galinheiros (LEHMANN *et al.*, 2011).

Estudos demonstraram que as propriedades microporosas do biochar dependem da origem e estrutura do material lignocelulósico, sendo este constituído principalmente por hemicelulose, a celulose e a lignina. Visto que as taxas de decomposição térmica destes constituintes são diferentes e intervalos de temperaturas distintas, tornando a transformação térmica de cada componente altamente dependente das condições experimentais da pirólise (CAGNON *et al.*, 2009).

Bourke *et al.* (2007) propuseram um modelo estrutural através da análise de biochar proveniente do sabugo de milho e lignina. A partir das inúmeras técnicas analíticas empregadas verificaram que a superfície do biochar é microporosa com porosidade média entre 3 e 10 Å, nas temperaturas de pirólise entre 600 e 950 °C. Portanto, no modelo do arranjo estrutural do biochar do sabugo de milho proposto por Bourke *et al.* (2007) uma das maneiras de explicar a presença de microporos foi considerar a possibilidade de vazios dentro dos planos hexagonais como mostra a Figura 3.7 (a - f). O modelo proposto apresenta compostos aromáticos altamente conjugados, presença de radicais livres, heteroátomos de oxigênio.

a)

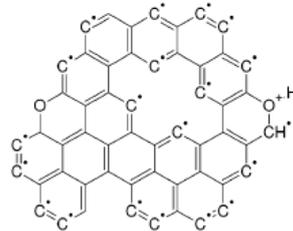


Fórmula Molecular = $C_{52}H_{13}O_4$

Peso Molecular = 701,657

Composição = C(89,01 %) H (1,87%) O (9,12%)

b)

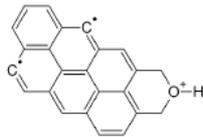


Formula Molecular = $C_{64}H_5O_2$

Peso Molecular = 685,616

Composição = C (94,60%) H (0,74%) O (4,67%)

c)

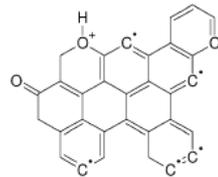


Fórmula Molecular = $C_{24}H_{13}O$

Peso Molecular = 317,316

Composição = C(90,83 %) H (4,13%) O (5,04%)

d)

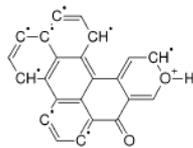


Formula Molecular = $C_{32}H_{13}O_2$

Peso Molecular = 429,444

Composição = C(89,50 %) H (3,05%) O (7,45%)

e)

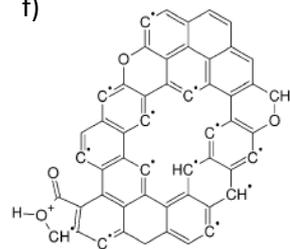


Fórmula Molecular = $C_{23}H_9O_2$

Peso Molecular = 317,316

Composição = C(87,06 %) H (2,86%) O (10,08%)

f)



Fórmula Molecular = $C_{52}H_{13}O_4$

Peso Molecular = 701,657

Composição = C(89,01 %) H (1,87%) O (9,12%)

Figura 3.7. Arranjos estruturais do biochar do sabugo de milho sugerido por Bourke *et al.*, 2007.

Tendo em vista que a biomassa contém lignina uma estrutura aromática tridimensional complexa composta de unidades de fenilpropano, torna-se plausível o modelo proposto do biochar do sabugo de milho possuir diferentes arranjos de anéis hexagonais condensados semelhantes à estrutura do grafite (Figura 3.8).

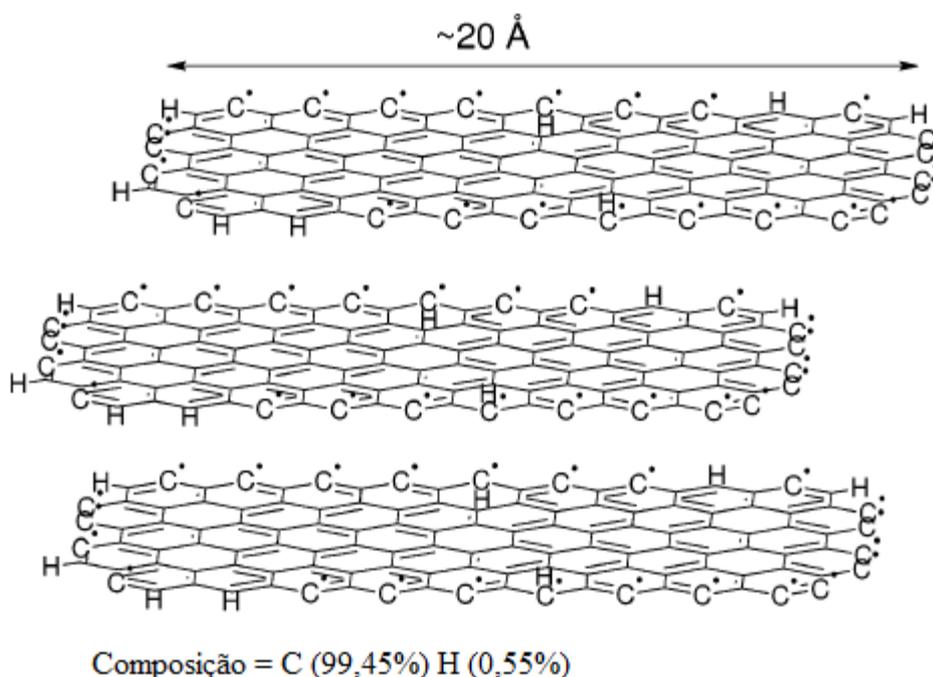


Figura 3.8. Estrutura microcristalina do grafite (BOURKE *et al.*, 2007).

O biochar é uma alternativa promissora na resolução de problemas ambientais, podendo ser usado para muitas finalidades. O uso primário é como combustível (carvão vegetal) para a produção de calor. Atualmente há estudos para a utilização do biochar como carvão ativado para adsorção de poluentes, uma vez que apresenta uma grande área superficial devido aos microporos desenvolvidos durante a pirólise (LEE *et al.*, 2013).

A adsorção de poluentes sobre biochar recebe destaque nas pesquisas devido ao baixo custo, e a grande quantidade de resíduo agroindustrial disponível. A remoção de metais pesados nos resíduos de processamento industrial é um grande desafio, pois as concentrações elevadas são potencialmente tóxicas no meio ambiente, devido a seu efeito prejudicial para os seres humanos e outros organismos vivos. O método mais eficiente para a remoção é adsorção por carvão ativado, entretanto o alto custo tem impedido o uso em grande escala (REGMI *et al.*, 2012).

Diversos estudos relatam a eficácia do biochar como um adsorvente alternativo para remoção de metais pesados a partir de solução aquosa e solos. Han *et al.* (2013) verificaram que o biochar derivado de gramíneas e madeira, apresentam condições favoráveis para a adsorção dos metais pesados Zn^{+2} e Cu^{+2} em solo.

Outro desafio é o tratamento dos efluentes contendo corantes, uma vez que os corantes são moléculas orgânicas recalcitrantes, resistentes à digestão aeróbica, e são estáveis à luz, ao calor e agentes oxidantes. Uns dos tratamentos que apresenta bons resultados é o método de adsorção, o qual pode ser usado para remover os diferentes tipos de corantes (HAN *et al.*, 2013).

No estudo de Gonzalez e Montoya (2009) verificaram a adsorção de corantes a partir de sementes de goiaba *in natura* e carbonizada, testando a eficiência em corante ácido, a melhor condição apresentada para adsorção dos corantes foi com as sementes carbonizadas a 1000 °C. Visto que a temperatura da pirólise influenciou na área superficial do biochar, desta forma os resultados apresentados na caracterização estrutural constataram uma melhoria de 42 % no valor da área superficial quando a temperatura de carbonização foi alterada de 600 para 1000°C.

De acordo com a Figura 3.9 percebe-se a forma ossea irregular da semente de goiaba, a superfície áspera da partícula de 0,63 mm da semente após carbonização de 600 °C e 1000 °C. Na fração da semente *in natura* fragmentos cristalinos foram observados em conjunto com uma casca fina amarela e um núcleo branco. Nas amostras carbonizadas as diferenças físicas visíveis na superfície não foram verificadas (GONZALEZ e MONTOYA, 2009).

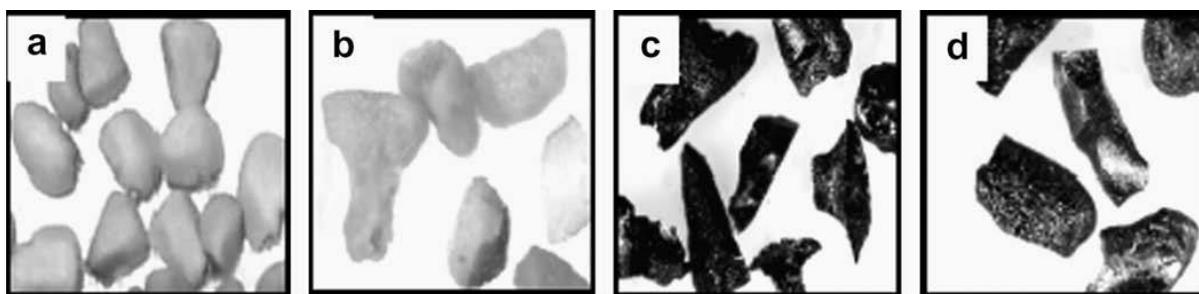


Figura 3.9. A fotografia da semente de goiaba no tamanho original (a), e com microscopia óptica com aumento 63x da partícula de semente de 0,63 mm *in natura* (b) e carbonizada a 600 °C (c) e 1000 °C (d) (GONZALEZ e MONTOYA, 2009).

Uma opção atualmente estudada para o biochar é a aplicação na correção do solo, atuando como fertilizantes e no armazenamento de carbono (REGIME *et al.*, 2012). No solo, o biochar aumenta a capacidade de absorção de água e nutrientes, reduzindo a necessidade de fertilizantes. No entanto, as exigências sobre o efeito do biochar e suas propriedades para correção do solo não foram estabelecidas totalmente, devido a vários parâmetros que influenciam os tipos de biomassa, condições de pirólise, propriedades do solo e mecanismos envolvidos para o crescimento da planta (LEE *et al.*, 2013).

No que se refere à imobilização de enzimas o biochar é uma alternativa promissora de suporte devido às suas propriedades estruturais. Porém, artigos relatando a imobilização de enzimas em biochar ainda são escassos. O único estudo até então encontrado na literatura é o trabalho de GONZÁLEZ *et al.* (2013). De acordo com este estudo o biochar de casca de aveia apresentou propriedades favoráveis para imobilização da lipase *Cândida rugosa*. Verificou-se que na superfície do biochar há grupos hidroxilas e carboxílicos, os quais promovem a imobilização através da interação com o grupamento amino da enzima. Já em relação ao pré-tratamento do biochar sobre a atividade enzimática houve um efeito negativo com os seguintes solventes: n-hexano < etanol < metanol.

3.5. IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

Imobilização de enzimas refere-se às enzimas fisicamente confinadas ou localizadas em uma região definida do espaço com retenção de suas atividades catalíticas (GUISAN *et al.*, 2006). Visa uma boa recuperação da atividade enzimática e uma boa estabilidade térmica e operacional da enzima imobilizada para uma viabilidade de aplicação em escala industrial.

Para viabilizar a aplicação industrial, são necessários equipamentos versáteis e novas tecnologias de imobilização visando à obtenção de suportes mais resistentes, menos custosos, e que culminem em estabilidade térmica e operacional da enzima imobilizada.

A imobilização apresenta como principais vantagens o aumento da resistência das enzimas às condições extremas e reagentes químicos. As enzimas imobilizadas podem ser facilmente separadas do produto, permitindo que as enzimas possam ser empregadas em diversas operações industriais (FERNÁNDEZ - FERNÁNDEZ *et al.*, 2012).

Embora existam vários métodos para a imobilização de enzimas que são descritos na literatura, um número limitado é implantado no mercado. A utilização de enzimas para a

indústria tem despertado interesse por mais de um século e continua a expandir, sendo a imobilização de enzimas uma alternativa viável para as indústrias, pois o uso de enzimas livres muitas vezes torna-se inviável para aplicação industrial (DICOSIMO *et al.*, 2013).

O mercado mundial de enzimas industriais ultrapassou \$US 3.3 bilhões em 2010 e deverá crescer para cerca de \$US 4,5 a 5 bilhões em 2015, ou seja, uma taxa de crescimento anual composta de 7 - 9 %. Este mercado é dominado por uso de enzimas na forma livre, predominantemente hidrolases (por exemplo, amilases, proteases, celulasas e lipases). Os segmentos do mercado para as enzimas são mostrados na Figura 3.10 (DICOSIMO *et al.*, 2013).

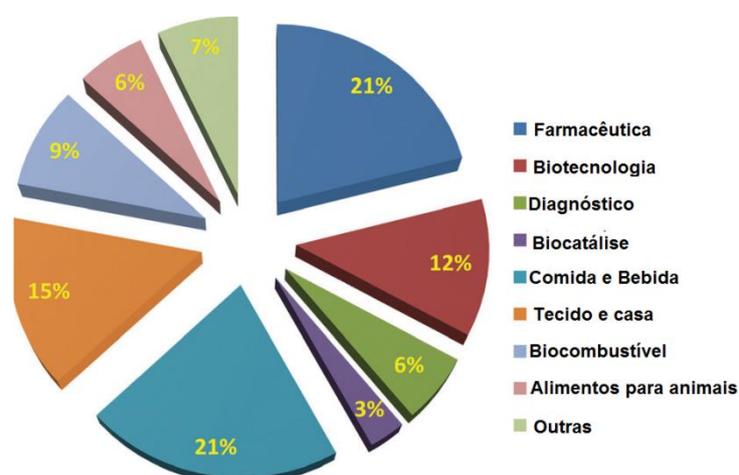


Figura 3.10. Mercado mundial de enzimas em diversos segmentos (DICOSIMO *et al.*, 2013).

As lipases (EC 3.1.1.3) são aplicadas amplamente na indústria, devido à multiplicidade de reações catalisadas tais como a hidrólise de gorduras, síntese de ésteres e de glicerol e modificação de gorduras. Estas enzimas são encontradas em tecidos animais, vegetais e em microrganismos, e têm papel fundamental no metabolismo de lipídios destes seres vivos: como enzimas digestivas, na deposição e mobilização dos tecidos de reserva energética e no metabolismo intracelular, atuando sobre as membranas celulares (KOBBLITZ *et al.*, 2004). A maioria das lipases apresenta um sítio catalítico formado pela tríade catalítica constituída por resíduos de serina, histidina e aspartato, que é frequentemente protegido na molécula por uma “tampa” hidrofóbica que ao interagir com a interface polar/apolar sofre uma mudança conformacional, expondo o sítio ativo da enzima a uma posição favorável para

catalise. Com isso a sua atividade é aumentada quando situada na interface polar/apolar (DALLA *et al.*, 2004).

A Lipase de *Burkholderia cepacia* (anteriormente denominada por *Pseudomonas cepacia lipase*) recebe destaque na aplicação industrial por realizar a catálise em ambos os meios aquosos e não aquosos (ABDULLA e RAVINDRA, 2013). A estrutura cristalina desta lipase (Figura 3.11) se destaca por apresentar algumas características incomuns a outras lipases como um sítio de cálcio que, supostamente, estabiliza a tríade catalítica e a presença de um carboxilato adicional que pode servir como uma alternativa para aceitação de prótons (KIM *et al.*, 1997, SCHRAG *et al.*, 1997).

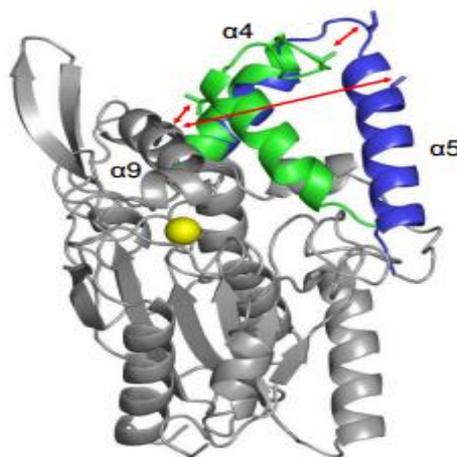


Figura 3. 11. Representação da estrutura da Lipase de *Burkholderia cepacia*. A tampa da estrutura cristalina aberta da LBC está representada de cor azul e modelo fechado de cor verde e a esfera do íon Ca^{2+} de cor amarela. A tríade catalítica que consiste em Ser, His e Asp está na cor vermelha (TRODLER *et al.* 2009).

Diferentes técnicas para a imobilização da lipase são relatadas na literatura em diversos trabalhos, tais como a adsorção ou ligação covalente em suportes sólidos e encapsulação em matrizes poliméricas obtidas pela técnica sol-gel (BARBOSA *et al.*, 2014). A escolha do suporte é um fator importante que influencia a reação enzimática uma vez que estudos comparativos indicaram que a mesma molécula de lipase podem apresentar diferentes propriedades catalíticas após imobilização em diferentes suportes e a maioria dos estudos relata mudanças nas propriedades das enzimas quando imobilizadas (RÓS *et al.*, 2010).

Verifica-se na literatura uma classificação de suportes de acordo com sua composição química podendo ser suportes orgânicos ou inorgânicos. Os suportes orgânicos são divididos em naturais e sintéticos, sendo que os sintéticos exibem variedades de formas físicas e estruturas químicas que podem ser combinadas para formar um suporte ideal, já os naturais apresentam vantagens comparando se aos sintéticos, pois geralmente apresentam baixo custo (MENDES *et al.*, 2011). Ampla gama de diferentes materiais podem ser utilizados como suporte de imobilização (Tabela 3. 4), sendo o biochar uma promissora alternativa de suporte orgânico natural.

Tabela 3. 4. Vantagens e desvantagens dos diferentes tipos de suportes utilizados no processo de imobilização de enzimas.

Suporte	Vantagens	Desvantagens	Exemplos
Suporte inorgânico	Melhor estabilidade	Desgaste em vasos agitados	Sílica e derivados de sílica, alumínio.
Suporte orgânico natural	Boa compatibilidade com enzimas	Estabilidade fraca	Polissacarídeos, biochar
Suporte orgânico sintético	Controle da estrutura física e química do suporte	Difusão limitada	Polímeros sintéticos

Adaptado MILETIC *et al.* (2012)

As propriedades ideais para o suporte incluem resistência física a compressão mecânica, hidrofobicidade, resistência ao ataque microbiano, baixo custo de produção, inerte quimicamente a diferentes solventes e elevada área superficial (GUISAN *et al.*, 2006). Uma nova alternativa que está sendo estudada é o suporte híbrido que apresenta compostos orgânicos e inorgânicos na sua composição melhorando as características do suporte como tamanho dos poros e grupos funcionais disponíveis para uma melhor interação da enzima e suporte (SILVA *et al.*, 2011).

3.5.1. Métodos de Imobilização

As enzimas podem apresentar diferentes tipos de interação com os suportes, como adsorção física que está relacionada à interação da enzima com a superfície do suporte por meio de forças de van der Waals, pontes de hidrogênio, ligação iônica ou ligação covalente.

A adsorção física é um método de imobilização relativamente simples e barato, não modifica a enzima quimicamente, interação fraca enzima/suporte e tendo como desvantagem a lixiviação da enzima principalmente em solventes aquosos (BRADY e JORDAAN, 2009). A ligação iônica (Figura 3.12) ocorre quando os suportes apresentam íons residuais, ocorrendo assim uma interação ion-ion entre a enzima e suporte sendo mais fortes do que as forças de van der Waals. O complexo formado enzima e suporte é reversível, permitindo a reutilização do suporte onde as enzimas desnaturadas podem ser removidas do suporte por alterações do pH ou da força iônica do meio de reação (MILETIC *et al.*, 2012).

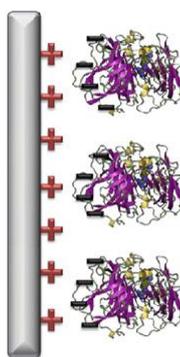


Figura 3.12. Adsorção de enzimas num suporte por ligação iônica (FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ M, *et al.*, 2012).

A ligação covalente baseia-se na formação de uma ligação forte entre o compartilhamento dos pares de elétrons da enzima e do suporte, e é um dos métodos mais utilizados na imobilização de enzima. Tipicamente a ligação covalente ocorre com o grupo amino da lisina presente nas enzimas e grupo aldeído do suporte. Existem dois diferentes métodos de ligação covalente: unipontual e a multipontual (Figura 3.13). A ligação covalente unipontual apresenta como vantagem um único braço espaçador para a fixação da enzima mantendo a sua configuração e mobilidade, enquanto que a fixação multipontual ocorre com vários braços espaçadores ligados aos grupos amina da enzima o que confere maior estabilidade, no entanto, restringe a mobilidade da enzima e evita o seu desenovelamento (MILETIC *et al.*, 2012).

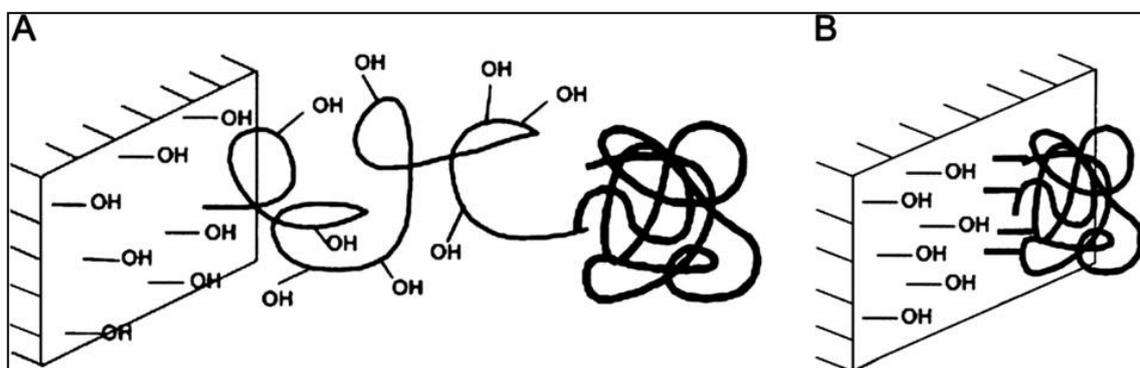


Figura 3.13. A immobilização por meio de ligação covalente: (A) unipontual por meio do braço espaçador e (B), através de fixação multipontual (MILETIC *et al.*, 2012).

A immobilização de enzimas sem a presença de suporte é chamada de reticulação ou cross-linking sendo realizada por meio de ligação cruzada que ocorre através de reação do grupamento amino da superfície da enzima com um reagente bifuncional, tais como glutaraldeído, em que enzimas se ligam umas às outras, sem recorrer a um suporte (MILETIC *et al.*, 2012).

Algumas outras técnicas de immobilização atualmente são desenvolvidas, sem suporte a presença de suporte, tais como cristais de enzima reticulados (CLEC), agregados de enzimas reticulados (CLEA) e Spherezymes (esferas de enzimas) (Figura 3.14). Para a formação dos CLEC requer um elevado grau de pureza, um tipo de enzima que pode ser incorporado na partícula e apenas por enzimas cristalizáveis, já a ligação cruzada formando agregados de enzimas (CLEA) é menos dispendioso comparado ao CLEC, envolve apenas a precipitação da enzima formando os agregados pela adição de sais, solventes orgânicos, polímeros não-iônicos ou ácidos. Spherezymes consiste na formação de partículas esféricas em uma emulsão de óleo (SCHOEVAART *et al.*, 2004; BRADY e JORDAAN, 2009).

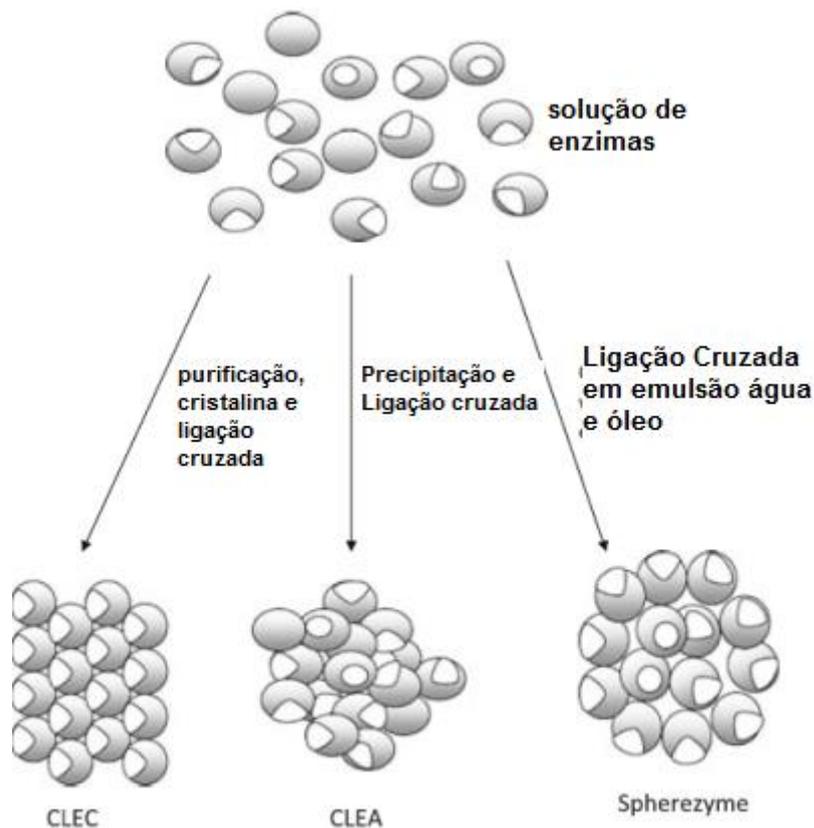


Figura 3.14. Tipos de ligação cruzada (BRADY e JORDAAN, 2009).

Na literatura diferentes tipos de enzimas foram utilizadas para a formação de agregados de enzima reticulada (CLEAs) usando diferentes precipitantes, como PEG 600, PEG200, sulfato de amônio e acetona, o qual verifica-se uma influência na atividade específica total e na recuperação de atividade. Geralmente o agente de reticulação utilizado é o glutaraldeído, uma vez que é barato e facilmente disponível em quantidades comerciais, o passo de reticulação é necessário estabilizar os agregados de modo que eles não podem ser redissolvida quando remover o reagente de precipitação. (DEVI *et al.*; 2009).

Devi *et al.* (2009) avaliaram a formação de CLEAs da lipase de *Candida Antarctica B* (CALB-L) quanto à sua atividade de esterificação, empregando diferentes agentes de precipitação para a agregação seguida pela reticulação com glutaraldeído. Dentre os resultados obtidos utilizando PEG 600, PEG 200, sulfato de amônio e acetona como precipitantes observou-se que o PEG 600 apresentou CLEAs com uma maior recuperação total de atividade de 280 % em comparação com acetona e a melhor atividade específica (139 % em relação à acetona).

No estudo realizado por Cabana *et al.* (2007) avaliaram a formação de CLEAs da lacase utilizando diferentes agentes de precipitação (PEG 1500, sulfato de amônio, metanol ou acetona), o melhor resultado (recuperação de cerca de 130 % da atividade da lacase inicial) foi obtido utilizando 100 % (w/v) de PEG (1000 g/L) como agente precipitante e como agente de reticulação glutaraldeído. Na Figura 3.15 são apresentadas as estruturas de CLEAs de lacase formadas.

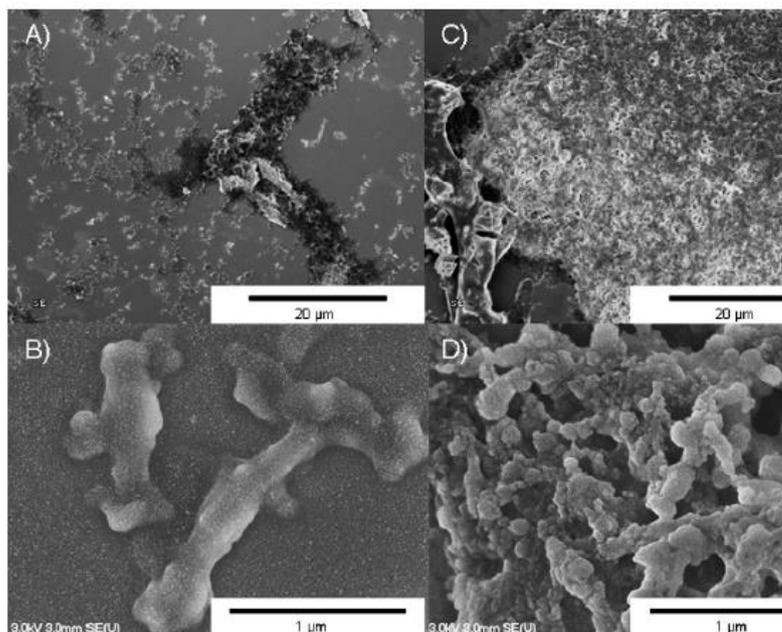


Figura 3.15. Micrografia de CLEAs de lacase (CABANA *et al.*, 2007).

Outra possibilidade de imobilização de enzimas é a encapsulação que consiste no aprisionamento físico da enzima em uma rede polimérica formada geralmente por poliacrilamida, gelatina, alginato, carragenana, resinas de poliuretano e silanos. Tendo como vantagem uma grande área superficial, e a possibilidade de imobilização simultânea de diferentes enzimas em uma única etapa. As desvantagens apresentadas são: limitações de transferência de massa e a possível inativação da enzima durante o procedimento de imobilização (MENDES *et al.*, 2011).

No estudo de Abdulla e Ravindra (2013), a lipase *Burkholderia cepacia* foi imobilizada por ligação cruzada com glutaraldeído seguido por encapsulamento em matriz híbrida de quantidades iguais de polímeros naturais alginato de sódio e k-carragenano. Foram obtidos grânulos esféricos uniformes de lipase imobilizada de 3 mm de

diâmetro (Figura 3.16), verificaram uma menor perda de enzima, uma melhor estabilidade de armazenamento e capacidade de reutilização.

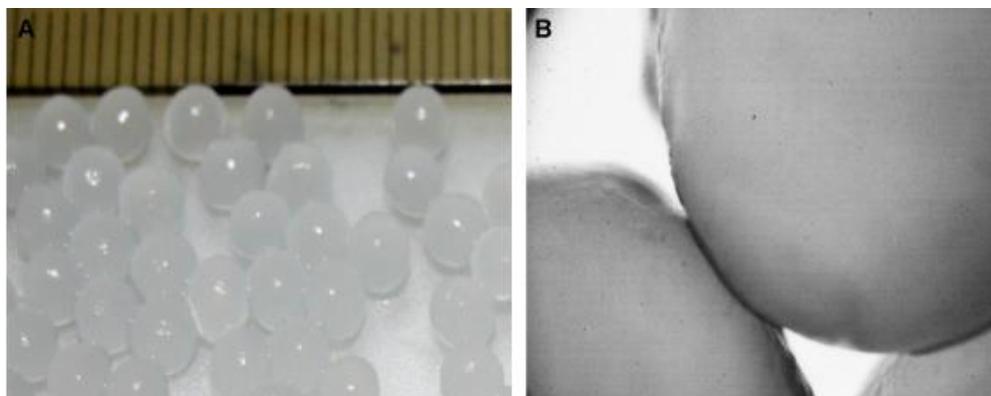


Figura 3.16. Lipase *B. Cepacia* na matriz híbrida de alginato de sódio e k-carragenano. (A) Vista geral da lipase imobilizada. (B) imagem microscópica de lipase imobilizada com ampliação 45X (ABDULLA e RAVINDRA, 2013).

3.5.1.1. Métodos de Imobilização em Suportes Orgânicos

Uma das alternativas para a redução do custo no processo de imobilização de enzimas é a utilização de suportes de baixo custo. Neste contexto, o uso de suportes orgânicos provenientes de resíduos torna-se uma alternativa promissora devido a sua grande disponibilidade principalmente os resíduos agroindustriais.

Os suportes orgânicos de origem vegetal recebem destaque por serem constituído por lignina, celulose e hemicelulose, como por exemplo os suportes de origem naturais: fibra de coco verde, casca de arroz, talos de milho e algodão, os quais apresenta grupos hidroxila e carbonila que possibilita a inserção de grupos funcionais. Na literatura é reportado o uso de resíduos agroindustriais como uma matriz de imobilização para amilase, invertase e lipase. Estes estudos com diferentes tipos de enzimas imobilizadas em suportes orgânicos naturais têm mostrado que os resíduos agroindustriais são uma fonte adequada de matéria-prima para suportes (LV *et al.* 2013; BRÍGIDA *et al.*, 2007; D'SOUZA e GODBOLE 2002).

A fibra de coco é um dos resíduos agroindustriais de grande impacto ambiental na região nordeste, Brígida *et al.* (2007) estudaram a imobilização por ligação covalente da lipase tipo B de *Candida antarctica* em fibra de coco verde funcionalizada com 3-glicidoxipropil-trimetoxissilano, cujo o mecanismo de imobilização consiste da ligação do

grupamento aldeído do suporte com o grupamento amina da enzima por meio da formação de bases de Schiff conforme descrito na Figura 3.17. Os resultados indicaram que o método de imobilização em meio básico (pH 10) a lipase mostrou-se 363 vezes mais estável do que a enzima livre. Brígida, *et al.*(2008) verificou que a lipase *tipo B* de *Candida antarctica imobilizada* o por adsorção física em fibra de coco verde a pH 7 mostrou-se 92 vezes mais estável do que a enzima livre. Cristóvão *et al.* (2011) estudaram a imobilização da lacase utilizando o método de adsorção física em fibra de coco, onde o sistema imobilizado apresentou uma maior estabilidade térmica e operacional quando comparando com a lacase livre.

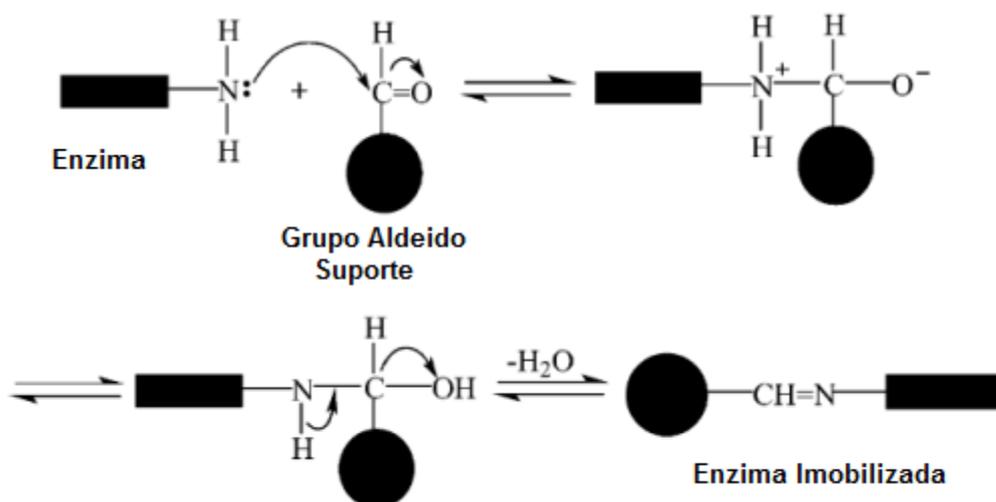


Figura 3.17. Esquema da reação entre grupo do aldeído, presente no suporte, e o grupo amina da enzima (Adaptado LI *et al.*, 2004).

LV *et al.* (2013) avaliaram a viabilidade de usar a lignina proveniente de talos de milho bruto como suporte para imobilizar a protease neutra, amilase maltogênica de *Aspergillus awamori* e a lipase de *Pseudomonas aeruginosa* pelo método de adsorção física, onde a interação entre as enzimas e suporte foi baseada principalmente em ligações de hidrogênio e interações de Van de Waals. Segundo os autores, o suporte formado apresenta superfície irregular e grupos hidroxilas disponíveis para a imobilização, favorecido pelas dimensões dos sulcos do suporte terem um tamanho apropriado para a imobilização da enzima e devido às interações dos grupamentos presentes na enzima e no suporte como descrito na

Figura 3.18. As atividades relativas totais da protease neutra, amilase maltogênica e lipase imobilizadas foram 212,6 %, 124,2 % e 78,23 %, respectivamente.

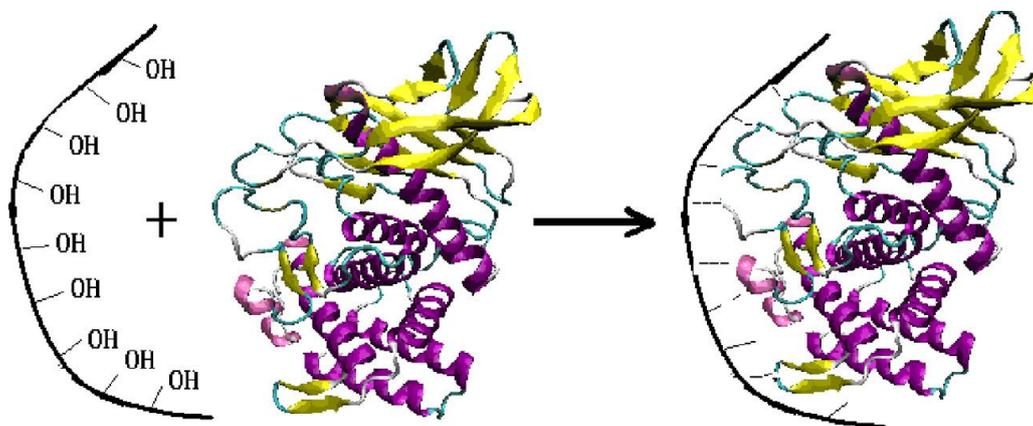


Figura 3.18. Diagrama esquemático da interação de protease neutra, com os grupos hidroxila e os sulcos presentes no suporte (LV *et al.*, 2013).

A casca de arroz é um outro tipo de suporte orgânico utilizado para a imobilização de invertase descrito na literatura, D'souza e Godbole (2002) imobilizaram invertase em casca de arroz revestida com polietilenimina (PEI). A invertase foi imobilizada sob esse suporte através do método de ligação cruzada com a presença do glutaraldeído. A invertase imobilizada apresentou uma maior estabilidade térmica retendo 69 % da atividade catalítica quando comparada com a enzima livre que reteve apenas 6 % e apresentou uma boa estabilidade operacional mantendo sua atividade após 12 ciclos reacionais

O uso de fibras de algodão como suporte orgânico natural para a imobilização das lipases *Thermomyces lanuginosus* e *Candida Antarctica A* apresentou bom potencial possivelmente por ser um material fibroso amplamente disponível, de baixo custo elevada área superficial e alta porosidade (ONDUL *et al.*, 2012). As fibras de algodão foram revestidas com polietileneimina (PEI), cujo procedimento e os mecanismos propostos para a imobilização da lipase PEI em multicamadas de fibra de algodão é ilustrado na Figura 3.19. A imobilização envolveu três passos principais: adsorção do PEI nas fibras de algodão, adição da enzima na fibra de algodão contendo PEI e a reticulação do glutaraldeído em agregados PEI-enzima revestidas nas fibras de algodão. As lipases *T. lanuginosus* e *C. antártica* foram imobilizadas com sucesso com 180 mg/g suporte e 200 mg/g suporte, respectivamente.

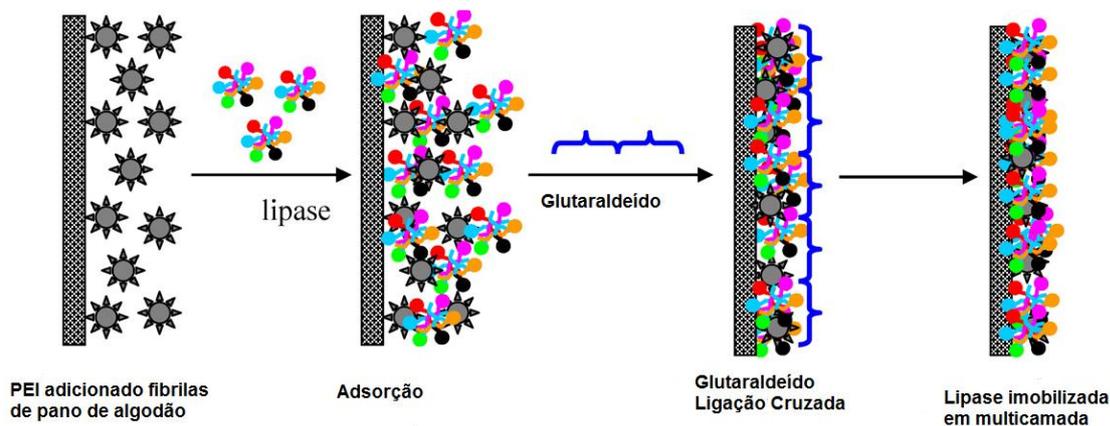


Figura 3.19. O procedimento e os mecanismos propostos para a imobilização da lipase PEI multicamadas em fibras de algodão (Adaptado ONDUL *et al.*, 2012).

Até o presente momento, o único estudo utilizando biochar, oriundo de processos termoquímicos, como suporte para a imobilização de enzimas na literatura foi realizado por González *et al.* (2013) que estudaram a imobilização da lipase *Candida rugosa* em biochar de casca de aveia pirolisado na temperatura de 300 °C, o biochar apresentou superfície hidrofóbica, grupos carboxílicos, baixa área superficial e porosidade. Neste estudo demonstraram que a imobilização da lipase ocorreu através da interação do grupo funcional carboxílico presente na superfície do biochar com o grupo residual de amina presente na superfície da enzima. A literatura relata estudos de obtenção de biochar de diferentes matérias primas como adsorventes alternativos, tais como: palha de milho, casca de amendoim, da semente de algodão, de pinheiro e de aveia (TAN *et al.*, 2013; LEHMANN *et al.*, 2011). Contudo as informações são escassas quanto a este tipo de suporte para a imobilização de enzimas na literatura, evidenciando ainda a necessidade de estudos destes sistemas imobilizados visando à viabilidade de aplicação em escala industrial.

3.6. USO DE ENZIMAS IMOBILIZADAS EM DIFERENTES REAÇÕES

As enzimas são catalisadores biológicos com elevada seletividade sendo cada vez mais utilizados em processos industriais, como mostra a Tabela 3.5. No entanto, o elevado custo das enzimas, muitas vezes faz com que os processos enzimáticos tornem-se economicamente inviável. Desta forma, um importante passo em processos enzimáticos reside na imobilização bem sucedida da enzima, o que vai permitir a sua recuperação e reutilização (GHALY *et al.*, 2010; LAM *et al.*, 2010).

Tabela 3.5. Aplicação industrial da lipase (KAPOOR e GUPTA, 2012).

Reação	Indústria	Produto/ aplicação
Hidrolise de gorduras	Detergente	Remoção de óleo em tecidos
Transesterificação de óleo/gorduras	Óleos naturais	Manteiga de cacau
Esterificação e transesterificação	Aromas e fragrâncias	Síntese de ésteres de aroma natural
Transesterificação	Combustível	Biodiesel

Dentre as enzimas utilizadas na biocatálise as lipases mostram-se como uma dos principais grupos de interesses tecnológicos, pois são altamente versáteis na catálise de diferentes tipos de reações, tais como hidrólise de triglicerídeos, esterificação, transesterificação, acidólise e interesterificação (KAPOOR e GUPTA, 2012). As principais reações catalisadas por lipases estão esquematizadas na Figura 3.20.

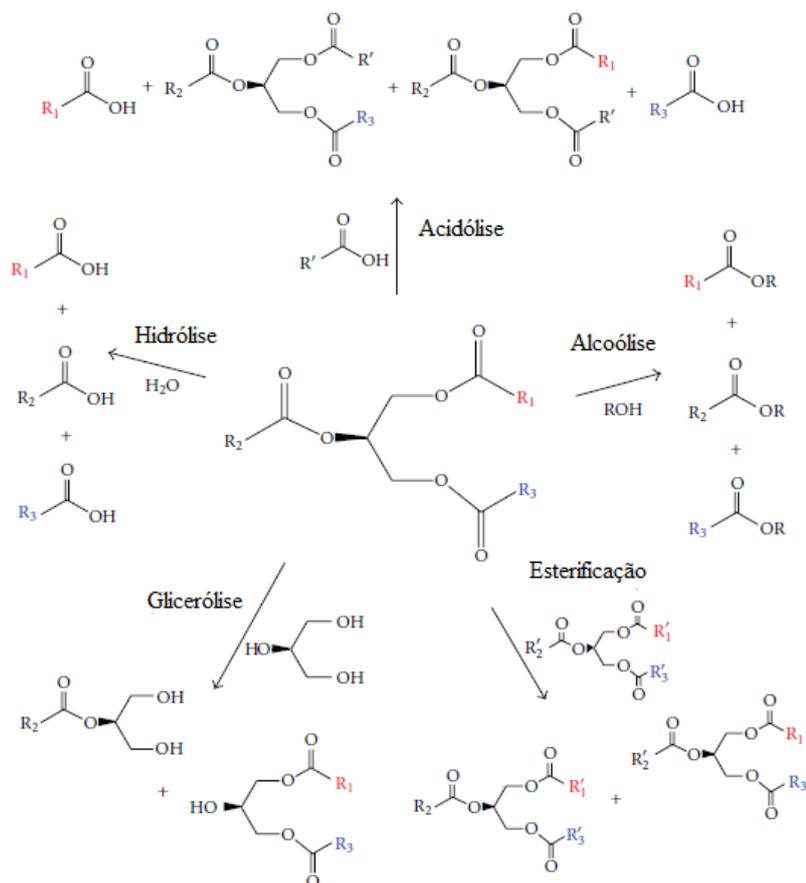


Figura 3.20. Principais reações catalisadas por lipases (RIBEIRO *et al.*, 2011).

A Transesterificação enzimática para a produção de ésteres de alquilo (biodiesel) tem despertado o interesse dos pesquisadores nos últimos dez anos devido às vantagens que estes catalisadores apresentam sobre os processos catalisados quimicamente. Algumas das vantagens oferecidas pelo uso de lipases são condições brandas de reação; versatilidade na utilização de matérias-primas, incluindo a possibilidade de usar óleos ácidos sem a diminuição da eficiência do processo; uma purificação mais fácil os ésteres de alquilo (biodiesel) e separação de coproduto (glicerol). Em contraste, ao processamento por transesterificação química que apresenta alta temperatura de reação, formação de subprodutos, dificuldade na recuperação do produto e geração de efluentes (LAM *et al.*, 2010).

A Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP) define biodiesel como um combustível composto de alquil ésteres de ácidos carboxílicos de cadeia longa, produzido a partir da transesterificação e/ou esterificação de matérias de gorduras de origem vegetal ou animal. Para a comercialização do biodiesel é necessário atender as especificações estabelecidas pela ANP, tais como viscosidade em torno de 3,0 - 6,0 mm²/s, apresentar um teor mínimo de ésteres de 96,5 % e um índice de acidez de 0,5 mg KOH/g.

O método mais difundido para obtenção do biodiesel é a transesterificação, que consiste em uma series de reações consecutivas e reversíveis dos triglicerídeos com álcoois de cadeia curta como metanol ou etanol, como ilustra a Figura 3.21. A primeira etapa é a conversão dos triglicerídeos em diglicerídeos, seguido da conversão dos diglicerídeos em monoglicerídeos, e os monoglicerídeos em glicerol, gerando uma molécula de metil ou etil éster a partir de cada glicerídeo em cada etapa. . A estequiometria da reação requer 3 mols de álcool para cada mol de triglicerídeo, entretanto, um excesso de álcool é necessário para deslocar o equilíbrio no sentido da formação dos ésteres (SHAHID e JAMAL, 2011).

A taxa de rendimento de biodiesel via transesterificação depende de muitos parâmetros, tais como a quantidade e tipo de álcool, quantidade e tipo de catalisador, a temperatura da reação, tempo de reação, os teores de humidade presentes na matéria-prima e da quantidade de ácidos graxos livres também afetam o rendimento (SHAHID & JAMAL, 2011; GHALY *et al.*, 2010). De acordo com Ribeiro *et al.* (2011) na transesterificação enzimática, rendimentos mais elevados são alcançados para a produção de biodiesel, quando o óleo refinado é usado, em comparação com óleos brutos. Devido à presença de fosfolipídios

no óleo não refinado, que afetam a interação entre a lipase e o substrato, uma vez que possivelmente obstruir os poros do suporte, no caso da utilização de uma enzima imobilizada.

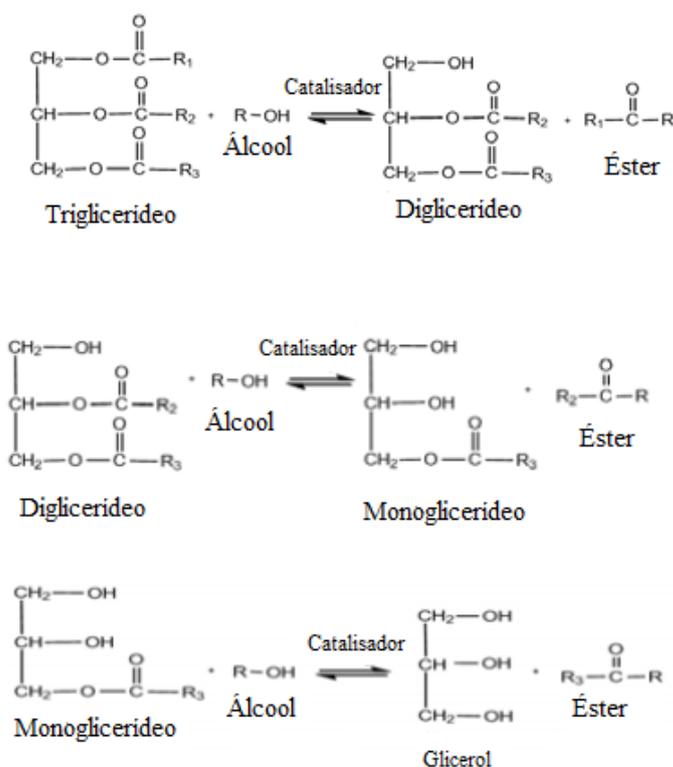


Figura 3.21. Reação de transesterificação do triglicerídeo com álcool envolvendo as três reações consecutivas e reversíveis de formação dos ésteres (GHALY *et al.*, 2010).

Uma variedade de matéria-prima pode ser utilizada para produzir o biodiesel, o qual incluem óleos comestíveis, óleos não comestíveis, óleos silvestres, óleos alimentares usados, e gorduras animais. Os óleos vegetais mais utilizados são: canola, girassol, semente de algodão, palma, soja, linhaça, milho, babaçu, coco e pinhão manso (RIBEIRO *et al.*, 2014; SHAHID e JAMAL, 2011).

A escolha da matéria-prima é um fator-chave para a reação de transesterificação, uma vez que a estrutura molecular do éster de alquilo obtido e as suas propriedades físico-químicas dependem do comprimento da cadeia de carbono, o grau de insaturação e sua ramificação (ILHA *et al.*, 2014; SILVA *et al.*, 2013; CARVALHO *et al.*, 2013). De acordo com Carvalho *et al.*, (2013) o elevado número de insaturações leva a uma queda na estabilidade oxidativa e uma diminuição dos valores de calor de combustão, bem como pontos

de fusão e ebulição, entretanto eleva a fluidez (parâmetros relacionados com a viscosidade e a cristalização de combustível).

Os óleos vegetais que apresentam um alto teor de ácidos láurico torna-se uma potencial fonte de matéria-prima para a produção de éster de alquilo, uma vez que os ácidos láuricos consistem de ésteres de cadeias curtas que interagem de forma mais eficaz com o receptor de acilo e o biocatalisador. Alguns trabalhos reportados na literatura obtiveram elevadas conversões de ésteres utilizando óleos vegetais com elevado teor de ácido láurico, tais como: babaçu, macaúba e coco (MICHELIN *et al.*, 2015; OLIVEIRA *et al.*, 2014).

Oliveira *et al.* (2014) estudaram reações de transesterificação catalisadas pela lipase de *Burkholderia cepacia* encapsulada em matriz hidrofóbica obtida pela técnica sol-gel, usando líquido iônico prótico (pentanoato de N-metilmonoetanolamina) como aditivo e em aquecimento convencional (40 – 56 °C). O maior rendimento de ésteres etílicos (51,90 %) foi obtido utilizando óleo de babaçu e etanol com razão molar (óleo: álcool) de 1:7 e temperatura de 40 °C em 48 h de reação. Entretanto, o processo com aumento do carregamento enzimático em cinco vezes permitiu um rendimento de 98,69 % em ésteres etílicos.

Michelin *et al.* (2015) utilizaram a lipase imobilizada comercial (Novozym 435) na reação de transesterificação enzimática do óleo de macaúba sob a influência de irradiação de ultrassom, Os resultados mostram que a transesterificação catalisada por lipase assistida por ultrassom do óleo de macaúba com etanol em sistema livre de solvente pode ser uma rota alternativa potencial para transesterificação convencional e/ou métodos enzimáticos tradicionais, obtendo rendimentos de reação em torno de 70 %.

Ribeiro *et al.* (2014) alcançaram êxito na reação de transesterificação do óleo de coco catalisada pela lipase comercial (Novozym 435), com rendimento de ésteres etílicos obtidos em 80,5 % utilizando 7 % de enzima, razão molar óleo: etanol (1:10) e temperatura de 60 °C. Nakpong *et al.* (2010) avaliaram o uso de um catalisador alcalino na transesterificação de óleo de coco com metanol, obtendo rendimento de 98,4 % de éster de metílico.

No Brasil o óleo de coco é amplamente produzido tornando-se uma potencial fonte de matéria-prima para produção local de biodiesel (RIBEIRO *et al.*, 2014). Conforme evidenciado em pesquisas financiadas pela CNPq (edital 40/2013 MCTI/CNPq). Baseando-se nestas considerações ainda se faz necessários estudos complementares na avaliação do óleo de coco bruto na biocatálise para produção de biodiesel devido à escassez de estudos nesta área.

Capítulo 4

4. METODOLOGIA

Neste capítulo serão apresentados os principais materiais e a metodologia empregada neste estudo para a imobilização de lipase em biochar, bem como os métodos analíticos empregados na caracterização dos biocatalisadores imobilizados e do biochar.

4.1. MATERIAIS

A lipase microbiana de *Burkholderia cepacia* (BC) foi adquirida da Sigma Chemicals Co. (St. Louis, MO, EUA), com atividade hidrolítica média de 2500 U/g enzima (sólido em pH 7,0). Os outros reagentes utilizados foram: fosfato de sódio dibásico diidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), Hexano p.a. 99 % (Synth, Brasil); polietilenoglicol (PEG 1500, Synth); epicloridrina (EPI) da Sigma Chemicals Co. e Solução e Karl Fisher isenta de Piridina (Merck, Alemanha). O substrato utilizado para as reações de hidrólise foram o azeite de oliva comercial extra virgem com baixa acidez (Carbonell), goma arábica em pó pura (Synth, Brasil). Todos os outros reagentes utilizados foram de grau analítico.

4.2. PRODUÇÃO DO BIOCHAR

A produção do biochar foi realizada pela técnica de pirólise rápida em uma planta piloto montada no Departamento de Química da Universidade Federal de Sergipe, constituída por um forno elétrico, um reator de quartzo equipado com um condensador como mostra a Figura 4.1. Antes de iniciar cada experimento, o reator foi purgado com gás nitrogênio para assegurar que o processo prosseguira na ausência de oxigênio. Quando a temperatura do reator atingiu 500 °C foram adicionados 23 g da semente de goiaba e após 5 min a temperatura foi reduzida lentamente até a 25 °C. Os produtos gerados na fase gasosa da pirólise passam pelo condensador resfriado por um banho termostático a cerca de -10 °C, e o vapor condensado (bio-óleo) foi recolhido. O biochar assim obtido apresentou granulometria entre 1,68 mm e 1 mm. As condições de pirólise da semente de goiaba selecionadas neste estudo foram previamente otimizadas para produção do bio-óleo do grupo de pesquisa coordenado pela Profa. Dra. Lisiane dos Santos Freitas.



Figura 4.1. Sistema utilizado para a pirólise composto: forno elétrico (1), Reator (2), condensador (3) e balão para coletar o bio-óleo (4)

4.3. TESTE DE BIODEGRABILIDADE DO BIOCHAR

Os testes de controle para verificar a estabilidade do suporte (biochar) na presença da lipase *Burkholderia cepacia* foi realizado de forma similar ao descrito por Cabrera-Padilla *et al* (2012) para o biopolímero natural poly (3-hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) (PHBV), como mostra a tabela 4.1.

Tabela 4.1. Condições dos testes de biodegradabilidade.

	Biochar (g)	LBC livre (g)	Tampão fosfato de sódio pH7 (mL)	Solução goma arábica (7 % w/v)(mL)
Teste 1	0,1	0,1	2	5
Teste 2	0,1	0,1	7	-

Os intervalos de tempo foram: 5, 10, 15, 30, 60 min, 24, e 48 h. Todos os testes foram realizados a 37 °C com agitação. As análises dos testes de controle foram efetuadas por titulação com 0,01 M solução de hidróxido de potássio para identificar a presença ou ausência de ácidos produzidos pela biodegradação do suporte.

4.4. TRATAMENTO DO BIOCHAR PARA IMOBILIZAÇÃO

O tratamento do biochar para a retirada dos resíduos do bio-óleo e cinzas presentes na sua superfície consistiu na lavagem do biochar com diclorometano através de ondas

ultrassônicas utilizando o UNIQUE UltraSonic Cleaner por 1 h em temperatura ambiente (25 °C).

4.5. ANÁLISE ELEMENTAR (CHN)

Foram pesados aproximadamente 30 mg do biochar macerado, passados em peneira de 0,149 mm. As amostras foram colocadas em cápsulas de estanho e a digestão do material foi feita em câmara de combustão em temperatura de aproximadamente 975 °C. Os gases foram detectados por um sensor de termcondutividade e convertidos em porcentagem de carbono, em um analisador automático modelo PE 2400 Series II CHNS/O (Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA).

4.6. IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE EM BIOCHAR

4.6.1. Efeito da Concentração da enzima no suporte

Para determinar a concentração ótima de lipase sobre o suporte, testou-se o efeito da concentração variando a quantidade de g enzima / g suporte (0,10, 0,15, 0,225, 0,3, 0,375, e 0,45g) na técnica de imobilização por adsorção física e ligação covalente da lipase *Burkholderia cepacia* em biochar (CABRERA-PADILLA *et al.*, 2012). A atividades relativas para os métodos de imobilização foram calculados como a razão da atividade da enzima imobilizada obtidas nas diferentes concentrações em relação a máxima atividade determinada para a enzima imobilizada conforme descrito anteriormente no item 4.7.

4.6.1. Adsorção Física (ADS)

O procedimento de imobilização da lipase *Burkholderia cepacia* por adsorção física foi realizado com algumas modificações conforme descrito por Soares *et al.* (2004). A técnica consiste no contato 1 g de suporte em 10 mL de hexano durante 15 min com agitação vigorosa à temperatura ambiente (25 °C). Em seguida 10 mL de solução enzimática (massa de enzima solubilizada em 10 mL de 0,1 M de fosfato de sódio tampão pH 7,0) foi adicionado e mantido sob agitação por 3 horas. A solução enzima-suporte foi, então, mantida a 4 °C durante 24 h. Após esse tempo o biocatalisador imobilizado foi lavado com hexano e seco em dessecador à temperatura ambiente durante 24h.

4.6.2. Ligação Covalente (LC)

A imobilização da lipase *Burkholderia cepacia* foi realizada conforme descrito por Simões *et al.* (2011). O suporte foi ativado com solução de epícloridrina 2,5 % (v/v) em tampão fosfato de potássio (0,1M e pH 7,5), na proporção 1g de suporte para 10 mL de solução. Após a homogeneização, a mistura foi mantida sob agitação por 1h à temperatura ambiente e em seguida submetida à filtração a vácuo. Durante a filtração o suporte foi lavado exaustivamente com água destilada e solução tampão de fosfato, e em seguida levado a estufa (60 °C) por 24 h para retirada do excesso de umidade. O suporte ativado foi embebido em hexano numa proporção de 1:10 (sólido:líquido) e mantido sob agitação por 2 h. Após este período, para cada grama de suporte foi adicionado a lipase de BC nas diferentes proporções descritas no item anterior e 100 µL de solução aquosa contendo 5 mg/mL de polietilenoglicol (PEG-1500). A suspensão contendo enzima, suporte e PEG-1500 foi homogeneizada por suave agitação com bastão de vidro, seguida de contato estático por um período adicional de 18 h a 4 °C. A recuperação do biocatalisador imobilizado foi efetuada por filtração à vácuo seguida de lavagens sucessivas com hexano e seco em dessecador à temperatura ambiente durante 24 h.

4.7. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE HIDROLÍTICA

A atividade hidrolítica da enzima livre e imobilizada foi determinada por meio de hidrólise descrito por Soares *et al.* (1999). O substrato foi preparado pela emulsão de 50 mL de azeite de oliva e 50 mL de goma arábica a 7 % (p/v). A reação enzimática é formada por 5 mL de substrato, 2 mL de solução tampão fosfato de sódio (0,1M, pH 7,0) e 1 mL da solução enzimática diluída em tampão (0,1 g/mL) ou 0,1 g de enzima imobilizada. A temperatura da reação foi mantida a 37 °C em banho termostático por 10min para o biocatalisador imobilizado ou 5 min para enzima livre, sob agitação constante de cerca de 80 rpm. Após esse período, a reação foi interrompida pela adição de 2 mL de solução acetanólica (mistura de acetona, etanol (99 %) e água destilada (1:1:1)). Os ácidos graxos liberados foram titulados com solução de KOH 0,03 M, utilizando fenolftaleína como indicador. Os cálculos foram realizados pela equação 4.1 e uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima que libera 1µmol de ácido graxo por minuto de reação, nas condições do ensaio. As atividades foram expressas em µmol/g.min (U/g).

$$\text{Atividade } (\mu\text{moles/g.min}) = \frac{(V_A - V_B) \times \mu \times 10^3}{t \times m} \quad (4.1)$$

onde: m = massa da amostra utilizada na reação (g); μ = normalidade da solução de KOH (N); t = tempo de reação (min); V_A = volume de KOH gasto na titulação da amostra (mL); V_B = volume do KOH gasto na titulação do controle (mL).

4.7.1. Recuperação de atividade

A recuperação de atividade (RA %) foi calculada por meio da equação 4.2:

$$RA (\%) = \frac{U_s}{U_o} \times 100 \quad (4.2)$$

Onde: U_0 = unidades de atividade oferecidas para a imobilização; U_s = unidades de atividade enzimática total presente no suporte (atividade x massa de biocatalisador imobilizado – base seca)

4.8. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS BIOCATALISADORES IMOBILIZADOS

Nesta sessão serão apresentados, de forma sucinta, os métodos utilizados para caracterizar o biochar e os biocatalisadores imobilizados.

4.8.1. Caracterização Morfológica do Biochar e dos Biocatalisadores imobilizados

A caracterização morfológica do suporte e dos biocatalisadores imobilizados foram analisada, com a determinação da área superficial, diâmetro e volume de poro, além da microscopia eletrônica de varredura.

4.8.1.1. Caracterização física em B.E.T.

As áreas de superfície do biochar e dos biocatalisadores imobilizados foram calculadas usando o método de Brunauer-Emmett-Teller. Os volumes dos poros e seus diâmetros foram calculados com base no modelo desenvolvido por Barret, Joyner e Halenda (BJH). As áreas superficiais foram avaliadas de acordo com a adsorção de nitrogênio usando o equipamento NOVA 1200 (Quantachrome).

4.8.1.2. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As análises das amostras de biochar e biocatalisadores imobilizados foram realizadas em um microscópio eletrônico de varredura (MEV) (Hitachi S-3000N). As amostras com recobrimento de ouro foram colocadas sobre o porta amostra do microscópio em fitas de carbono e sob vácuo, foram bombardeadas por feixes de elétrons que por sua vez interagem

com os átomos da amostra. A partir da interação entre o feixe de elétrons e a amostra foram produzidas partículas e radiação que foram usadas para formar uma imagem ampliada da amostra.

4.8.2. Caracterização Físico-Química

O biochar e os biocatalisadores imobilizados produzidos foram caracterizados por análise termogravimétrica (TGA) e espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR).

4.8.2.1. Análise Termogravimétrica (TGA)

As amostras de lipase livre, biochar e biocatalisadores imobilizados foram submetidos à Análise Termogravimétrica (Equipamento TGA-50 Shimadzu – Thermogravimetric Analyser), tomando por base a perda da massa em função da temperatura. As seguintes condições operacionais serão empregadas: razão de aquecimento de 10 °C/ min, na faixa de temperatura ambiente a 1000 °C, com variação de massa de 2 a 6 mg.

4.8.2.2. Análise por Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

As amostras de lipase livre, biochar e biocatalisadores imobilizados foram analisados no equipamento de Análise FTIR (IR Prestige 21, Shimadzu). Os espectros foram obtidos na faixa de comprimento de onda de 400 a 4000 cm^{-1} para o acompanhamento dos procedimentos de imobilização.

4.9. PROPRIEDADES BIOQUÍMICAS DA LIPASE LIVRE E IMOBILIZADA

4.9.1. Efeito do pH e da Temperatura na Atividade

O efeito do pH sobre a atividade relativa da lipase BC livre e imobilizada foi verificado utilizando tampões ácido cítrico-citrato de sódio 0,1 M (pH 2,0 - 5,0), fosfato de potássio 0,1 M (pH 6,0 - 8,0) e bicarbonato-carbonato de sódio 0,1 M (pH 9,0 - 10). O efeito da temperatura sobre a atividade relativa do lipase BC livre e imobilizada foi determinada a pH 7,0 com intervalo de temperatura de 25 °C a 80 °C. As atividades relativas para ambos os ensaios, foram calculados como a razão da atividade da enzima livre ou imobilizada obtidas nas diferentes temperaturas em relação a máxima atividade determinada para a enzima livre ou imobilizada conforme descrito anteriormente no item 4.7.

4.9.2. Estabilidade Térmica

O efeito da temperatura na estabilidade da lipase de BC livre e imobilizada foi determinado por meio da incubação de amostras da lipase de BC livre e imobilizada a 60 °C em meio-aquoso (0,1M tampão fosfato, pH 7,0 e 7,5, respectivamente) até 240 min. Em intervalos de 15 min para a enzima livre e imobilizada, foram retiradas as amostras e imediatamente resfriadas. Em seguida, a atividade residual foi determinada em pH e temperatura ótimos. A constante de inativação térmica (k_d) e o tempo de meia-vida ($t_{1/2}$), para a lipase livre, foram calculadas pelas equações. 4.3 e 4.4, respectivamente (ZANIN, 1998).

$$A_{in}=A_{in} \exp (- k_d \cdot t) \quad (4.3)$$

$$t_{1/2}=\ln 0,5/- k_d \quad (4.4)$$

Onde: A_{in} = atividade residual após tratamento térmico durante certo período de incubação (U); A_{ino} = atividade enzimática inicial (U); k_d =constante de desativação (h^{-1}); $t_{1/2}$ = tempo de meia-vida (h).

4.9.3. Determinação dos parâmetros cinéticos

Para o cálculo da constante de Michaelis-Menten (K_m) foram preparados sistemas reacionais contendo ácidos graxos totais em concentrações variando entre 37 a 2604 mM, obtidos a partir de emulsões preparadas em diferentes proporções de azeite de oliva (1 a 70 %) e solução aquosa de goma arábica (7 % p/v). As velocidades iniciais das reações de hidrólise catalisadas pela lipase solúvel foram determinadas de acordo como o descrito no item 4.5. Os valores de K_m e V_{max} aparentes foram calculados de acordo com Lineaweaver-Burk

4.9.4. Estabilidade Operacional

A estabilidade operacional do sistema imobilizado foi determinada em reações de hidrólise (item 4.7) em regime de bateladas consecutivas com reutilização do sistema imobilizado. Neste estudo foi empregada, em todas as bateladas, a mesma massa de biocatalisador imobilizado (0,10 g para o biocatalisador).

4.10. DETERMINAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS TOTAIS

Para análise dos ácidos graxos totais presente no óleo de coco bruto foram pesados 100 mg de óleo em um erlenmeyer de 100 mL e adicionados 5 mL de solução metanólica de

NaOH. A seguir acoplou-se ao erlenmeyer um condensador e deixou o sistema em refluxo por 10 min em ebulição. Então foram adicionados 3 mL de tri-fluoreto de boro (BF₃) dissolvido em metanol. A mistura permaneceu em ebulição por dois minutos, em chapa de aquecimento com agitação, sendo então adicionado 5 mL de heptano. Após 1 min a reação foi deixada esfriar naturalmente e recebeu pela parte superior do condensador 5 mL de solução saturada com cloreto de sódio. Finalmente a agitação foi suspensa, a solução transferida para um tubo de ensaio onde a fase orgânica foi retirada. Essa por sua vez foi filtrada em sulfato de sódio anidro e transferida para um balão volumétrico de 10 mL que continha padrão interno (behenato de metila) para a análise de ésteres realizada por cromatografia gasosa (CG).

4.11. REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA

Todas as reações foram realizadas com 12 g de substrato que consiste em óleo de coco bruto e etanol, sem a adição de solventes e uma proporção fixa de 20 % do biocatalisador imobilizado em relação ao peso total dos reagentes que participam da reação (Freitas *et al.*, 2009). As reações foram conduzidas em frascos hermeticamente fechados imersos em banho termostaticado com agitação a 150 rpm empregando-se etanol e óleo de coco como fonte de triglicerídeos. A condição para transesterificação foi razão molar óleo: etanol (1:12) e temperatura de 40 °C em diferentes tempos de reação (24, 48 e 72h). Ao final da reação a mistura foi centrifugada por 2 minutos para separação da enzima. As amostras foram lavadas por 3 vezes com solução saturada de NaCl para remoção do glicerol formado. Os ésteres etílicos de ambas as fases (aquosa e orgânica) foram extraídas com hexano. A fase orgânica foi tratada com Na₂SO₄ anidro. Após a evaporação do solvente a quantificação dos ésteres foi realizada por cromatografia gasosa (CG).

4.12. QUANTIFICAÇÃO DOS ÉSTERES ETÍLICOS

As amostras foram quantificadas por cromatografia gasosa em equipamento Shimadzu (CG 2010), coluna carbowax (30m X 0,32mm ID X 0,25µm de espessura). A temperatura foi mantida a 170 °C durante 1 min, posteriormente foi aumentada para 210 °C a uma taxa de 10 °C/min e mantida nesta temperatura durante 1 min, por último a temperatura foi aumentada para 225 °C a uma taxa de 6 °C/min e permaneceu nesta temperatura por 5,5 min. H₂ foi utilizado como gás de arraste a uma pressão de 41,9 KPa e fluxo de 1,5 mL/min. O injetor foi mantido em 250 °C no modo splitless (34,5 mL/min). Temperatura do detector FID: 250 °C. O tempo total de corrida foi de 14 min.

As amostras foram preparadas dissolvendo 1g de produto final em 10 mL de heptano. 100 µl dessa solução e 100 µl do padrão interno (heptadecanoato de metilana proporção de 0,0250 g do padrão para 10 mL do solvente) foram transferidos para um balão de 1 mL e completado com heptano. 1 µL dessa amostra foi injetada no sistema CG. A conversão foi calculada por comparação da massa real de éster obtido com a massa de éster teórica obtida. Todas as injeções foram realizadas em duplicata.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste tópico serão descritos os resultados quanto à viabilidade do biochar como suporte para a imobilização da Lipase de BC a partir de estudos quanto a estrutura química, biodegradabilidade do biochar, técnica de imobilização (adsorção física e ligação covalente), caracterização morfológica e físico-química do suporte e dos biocatalisadores imobilizados, e a caracterização bioquímica da lipase de BC livre e biocatalisadores imobilizados.

5.1. ESTRUTURA QUÍMICA DO BIOCHAR DA SEMENTE DE GOIABA

A fim de auxiliar no estudo quanto à estrutura química do biochar de semente de goiaba foi realizada a análise elementar no qual se determinou a composição deste suporte com potencial de aplicação na imobilização de enzima, a composição foi em termos de fração de massa de C (81,23 %), O (13,64 %) e H (3,23 %). Valores similares foram observados por Bourke *et al.* (2007) para o biochar de sabugo de milho, cuja a composição foi de 87,06 % de C, 10,08 % de O e 2,86 % de H. De acordo com a literatura, sugere-se que a estrutura química para biochar de diferentes fontes é composta principalmente por anéis aromáticos (TANG *et al.*, 2013; LEHMANN *et al.*, 2011; BOURKE *et al.*, 2007).

5.2. TESTE DE BIODEGRABILIDADE DO BIOCHAR

Os testes de controle para verificar a estabilidade do suporte (biochar) na presença da lipase *Burkholderia cepacia* foi realizado de acordo com a metodologia descrita no item 4.3. Os testes de controle mostraram a ausência de ácidos produzidos pela degradação do suporte, bem como outros suportes da literatura como PHBV (CABRERA-PADILLA *et al.*, 2012). Neste sentido, podemos afirmar que a lipase BC não provoca a degradação da estrutura do biochar durante o processo de imobilização.

5.3. TRATAMENTO DO BIOCHAR PARA IMOBILIZAÇÃO

Na Figura 5.1 verificou-se a predominância de partículas com poros grandes e de geometria heterogênea conforme também descrito por Gonzales *et al.* (2013) para a casca de aveia. Após o tratamento do biochar com o diclorometano verificamos com base na Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) (Figura 5.1), um aumento dos poros presentes na

superfície do biochar, possivelmente relacionado com a retirada dos resíduos de bio-óleo e cinzas presente na superfície do biochar, desobstruindo os poros presentes na superfície e tornando acessível para adsorção da lipase de *Burkholderia cepacia* (BC) durante o processo de imobilização.

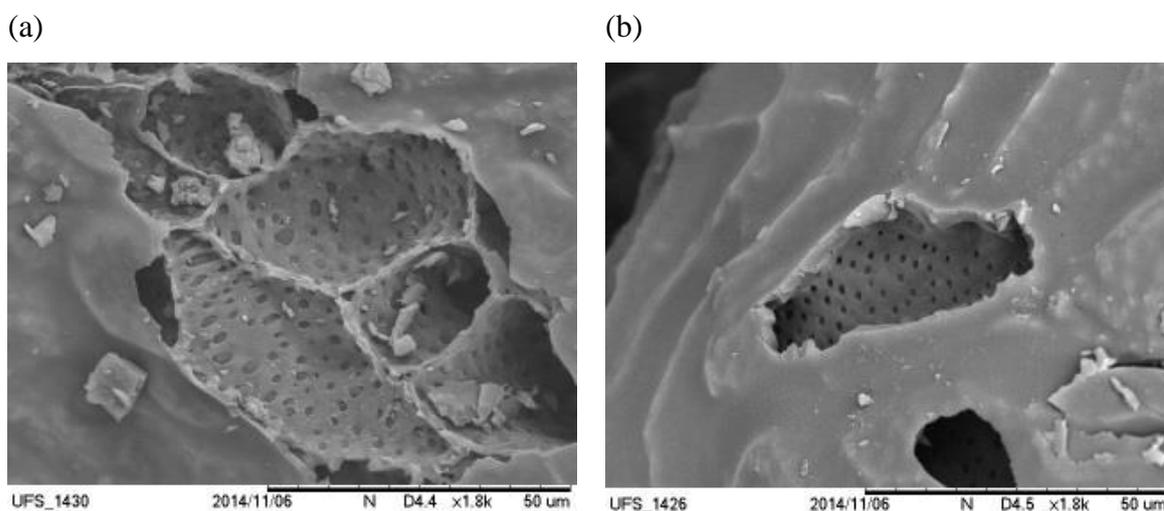


Figura 5.1. Microscopia eletrônica de varredura do biochar (a) e biochar após o tratamento com diclorometano (b).

5.4. IMOBILIZAÇÃO

Nesta seção serão apresentados e discutidos os resultados obtidos no processo de imobilização da lipase *Burkholderia cepacia* (BC) por adsorção física e ligação covalente, quanto à influência da concentração enzima/suporte. Estes ensaios foram conduzidos de acordo com a metodologia descrita no item 4.4. Na Figura 5.2 apresentam-se os resultados obtidos no estudo da concentração enzima/suporte.

A Figura 5.2 mostra que a atividade hidrolítica máxima relativa da lipase de BC imobilizada por adsorção física foi com concentração de 0,15 g enzima/g suporte, com cerca de 54 % de rendimento de imobilização. Acima desta concentração o biocatalisador imobilizado manteve a atividade relativa. Este perfil pode ser devido à saturação do suporte com a lipase, apresentando decréscimo na atividade acima de 0,375 g enzima/g suporte. Já o perfil de concentração da lipase de BC imobilizada por ligação covalente apresentou a saturação enzimática no suporte com uma concentração de 0,3 g enzima/g suporte, com cerca de 89 % de rendimento de imobilização.

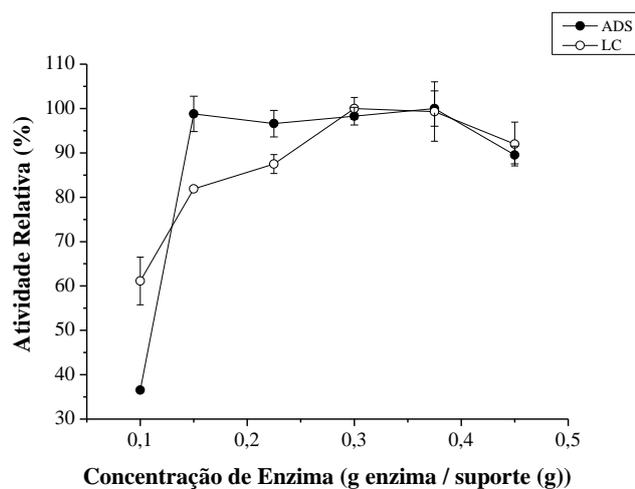


Figura 5.2. Atividade relativa da lipase de *Burkholderia cepacia* em função das diferentes concentrações enzima/ suporte.

Comportamento semelhante foi observado por Brígida *et al.* (2008) na imobilização da lipase de *Candida rugosa* em fibra de coco verde por adsorção física, atribuindo a diminuição da atividade em altos carregamentos a formação de multicamada bloqueando ou inibindo o acesso aos sítios ativos da enzima, após o aumento da concentração de enzima oferecida ao suporte de fibra de coco verde. Já o aumento da concentração ótima apresentado na imobilização por ligação covalente provavelmente está relacionado à ativação do suporte com braços espaçadores fornecendo grupos funcionais para a imobilização da enzima, além da influência do aditivo PEG-1500 na formação de agregados de enzima conforme descrito por Devi *et al.* (2009).

A formação destes agregados na imobilização por ligação covalente conferiu ao suporte uma camada com o aspecto esbranquiçado e à medida que aumentou a concentração de enzima verificou-se uma maior intensidade da cor sobre o biocatalisador imobilizado. O sistema imobilizado por ligação covalente apresentou um rendimento de imobilização superior ao descrito no sistema imobilizado por adsorção física, possivelmente devido ao efeito estabilizante do PEG-1500 na enzima que resulta em um aumento considerável na sua atividade catalítica (SULAIMAN *et al.*, 2014; SHELDON e PELT 2013; DEVI *et al.*, 2009; MENDES *et al.*, 2006). Na Figura 5.3. apresenta a superfície do biochar após as diferentes técnicas de imobilização.

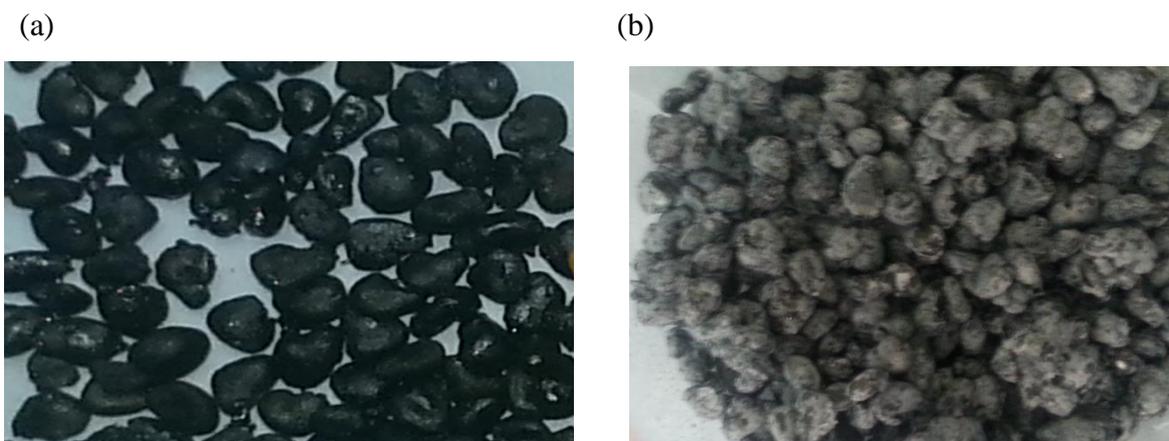


Figura 5.3. Superfície do biochar após a imobilização da lipase de BC por adsorção física (a) e por ligação covalente (b).

Com base no modelo da estrutura química do biochar proposto por Bourke *et al.* (2007), para o qual o biochar apresenta compostos aromáticos altamente conjugados, presença de radicais livres, heteroátomos de oxigênio e microporosidade. A proposta de imobilização da lipase de BC por adsorção física no biochar é sugerido na Figura 5.5, cuja a interação da enzima-suporte possivelmente ocorreu por meio de interações eletrostáticas entre a enzima e o suporte.

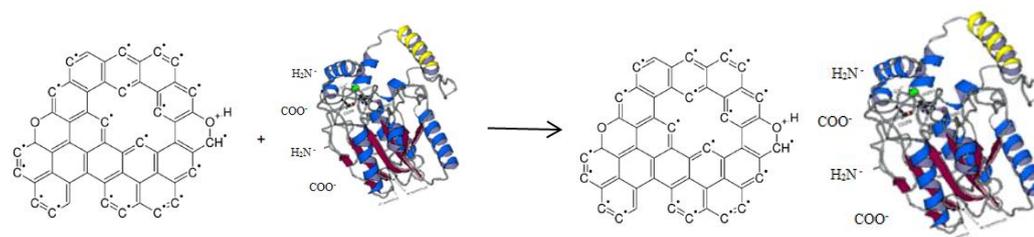


Figura 5.4. Modelo proposto para a imobilização por adsorção física da Lipase de BC em biochar.

A proposta de imobilização por ligação covalente da lipase de BC é sugerida na Figura 5.5.a. e 5.5.b., primeiramente o suporte é ativado com epícloridrina (Figura 5.5.a). Nesta etapa é adicionado o braço espaçador que contém o grupamento epóxi. De acordo com a literatura o suporte ativado com grupamento epóxi é capaz de reagir com grupos nucleofílicos diferentes sobre a superfície da enzima (por exemplo, amino, hidroxilo e tiol) para formar fortes ligações

com mínima modificação da estrutura química da enzima (MENDES *et al.*, 2013). E quanto a formação de agregados de enzimas reticulados ligando-se ao suporte possivelmente ligação cruzada ainda não existe proposta do mecanismo devido à complexidade das ligações entre os grupamentos da enzima, do suporte e do PEG. Portanto, na Figura 5.5.c indica-se um possível mecanismo de imobilização da lipase de BC em biochar na presença de PEG.

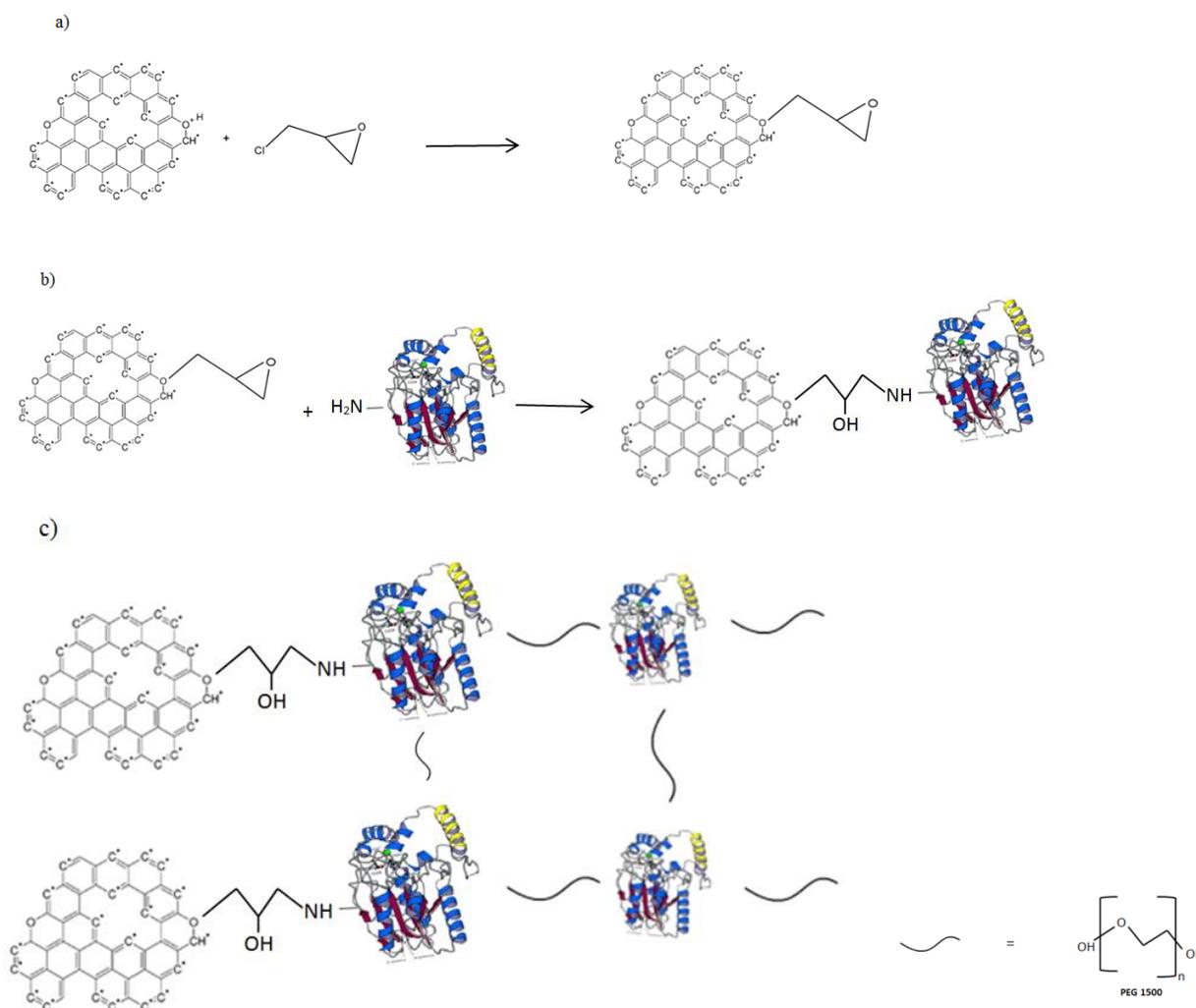


Figura 5.5. Modelo proposto para a imobilização por ligação covalente para lipase de BC em Biochar, (a) ativação do suporte com epiclorigrina, (b) imobilização da lipase de BC e (c) influência do PEG 1500 na formação dos agregados de lipase de BC

5.5. CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E FÍSICO-QUÍMICA DOS BIOCATALISADORES IMOBILIZADOS E BIOCHAR

5.5.1. Análise Morfológica (B.E.T.)

O estudo das propriedades morfológicas de materiais sólidos porosos é mais conveniente em métodos baseados na adsorção de nitrogênio no estado gasoso, utilizando medições volumétricas da quantidade de gás adsorvido. A área superficial específica, volume e tamanho médio de poros correspondentes ao biochar e biocatalisadores imobilizados estão resumidos na Tabela 5.1. A Área superficial específica do biochar foi de 77 m²/g, cujo o valor foi superior ao obtido por Gonzales *et al.* (2013) para a casca de aveia, e possivelmente deve-se a diferença as temperaturas de produção do bio-óleo e do biochar. Nos biocatalisadores imobilizados por adsorção física e ligação covalente observou-se redução da área superficial e no volume dos poros comparados ao biochar, provavelmente a redução está relacionada a saturação da superfície do suporte com as moléculas de enzimas. A redução da área superficial para os biocatalisadores imobilizados ADS e LC foram de 1,29 e 1,23 vezes, respectivamente. Resultados semelhantes foram obtidos por Rodrigues *et al.*(2008) na imobilização da lipase *Candida antarctica* tipo B em carvão ativado, observaram uma redução de 1,4 vezes na área superficial após a imobilização, indicando que ocorreu a imobilização da enzima na superfície do carvão ativado.

Tabela 5.1. Área superficial específica, volume e diâmetro dos poros do biochar e biocatalisadores imobilizados.

Ensaio	Área superficial específica (m ² /g)	Volume dos poros (cm ³ /g)	Diâmetro dos poros (Å)
Biochar	77	0,05	18
Adsorção Física (ADS)	60	0,04	18
Ligação Covalente (LC)	63	0,04	18

5.5.2. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) foi usada para caracterizar a morfologia do suporte (biochar) e dos biocatalisadores imobilizados, as micrografias

resultantes são mostradas na Figura 5.6. Pode-se observar que o biochar apresenta uma estrutura superficial porosa (Figura 5.6.a). Na Figura 5.6.b verifica-se o preenchimento parcial dos poros do biochar possivelmente por camadas simples de lipases no biocatalisador imobilizado por adsorção física. Na Figura 5.6.c e 5.6.d correspondente ao biocatalisador imobilizado por ligação covalente o qual pode se observar a possível formação de agregados de lipase na superfície do suporte semelhantes aos relatados por Schoevaart *et al.* (2004) para agregados enzimáticos reticulados (CLEAs) da lipase *Candida rugosa*. A camada com o aspecto esbranquiçado indicado na Figura 5.6.c e a possível formação dos agregados mostrados na Figura 5.6.d indicam a influência do aditivo PEG na formação dos agregados.

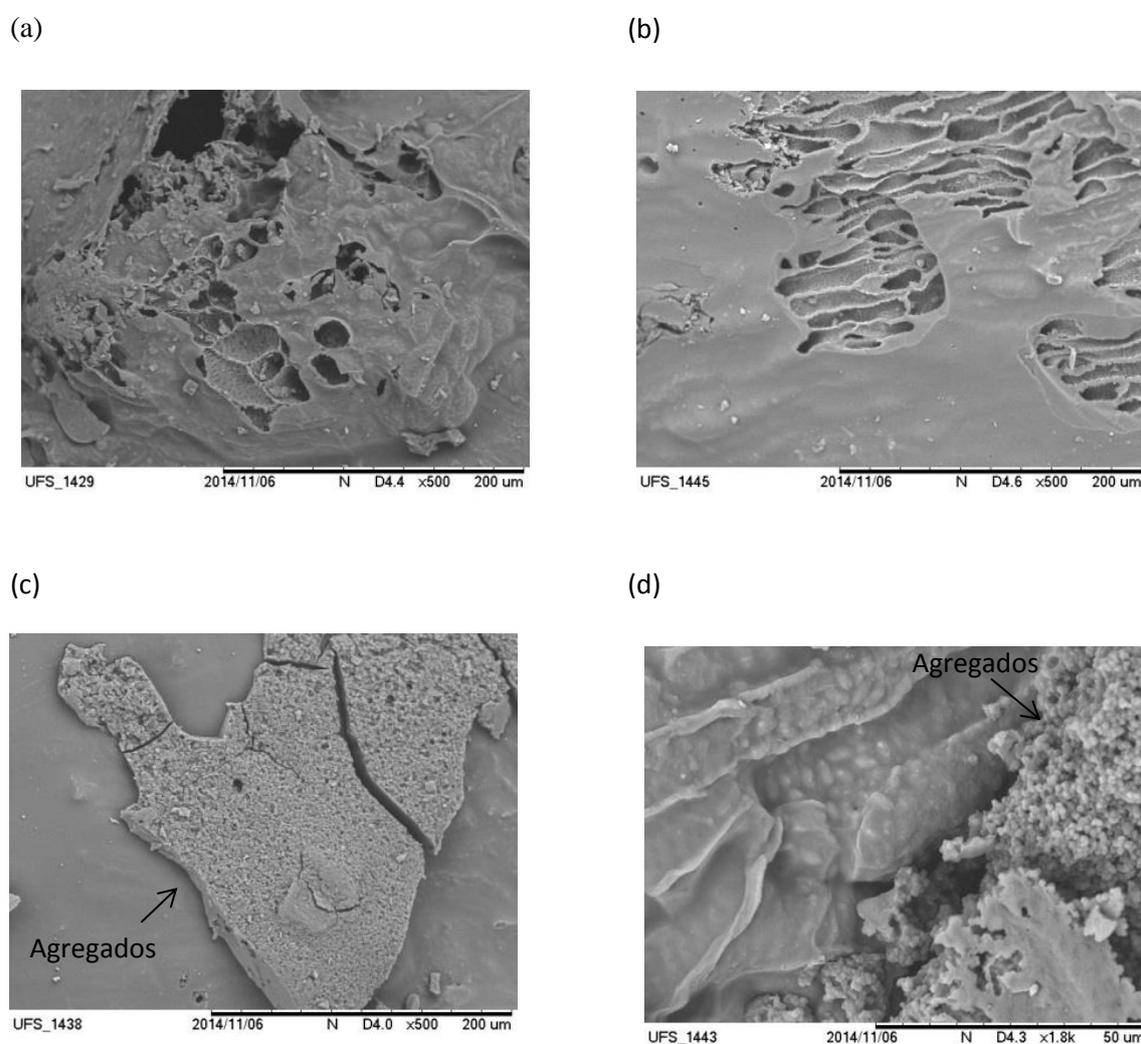


Figura 5.6. Microscopia eletrônica de varredura do biochar e biocatalisadores imobilizados por diferentes técnicas: (a) biochar, (b) Lipase imobilizada por Adsorção física (ADS) e (c-d) Lipase imobilizada por Ligação covalente (LC).

5.5.3. Análise termogravimétrica (TG)

A análise termogravimétrica é uma técnica que determina o intervalo de temperatura em que a amostra sofre degradação ao ser submetida a aquecimento, fornecendo um perfil de perda de massa. Os termogramas referentes à enzima livre, biochar e aos biocatalisadores imobilizados são mostrados na Figura 5.7. A fim de facilitar as discussões dos resultados os termogramas foram divididos em três regiões e a perda de massa de cada amostra foi expressa na forma de tabela distinguindo-se as três regiões de perda de massa (tabela 5.2). A Região I onde a temperatura chega até aproximadamente 200 °C, ocorre a perda de massa associada principalmente a desidratação. A Região II, que compreende entre 200 e 600 °C, está vinculada à decomposição de compostos orgânicos (C, H, O e N) sob a forma de compostos voláteis (MUKHERJEE *et al*, 2009). Na região III, ocorre a perda de massa, a qual está associada com as reações desidroxilação finais e de carbonização final de compostos orgânicos, acarretando na degradação completa do material ou sua estabilidade térmica (acima de 600 °C) (SOARES *et al.*, 2004 a).

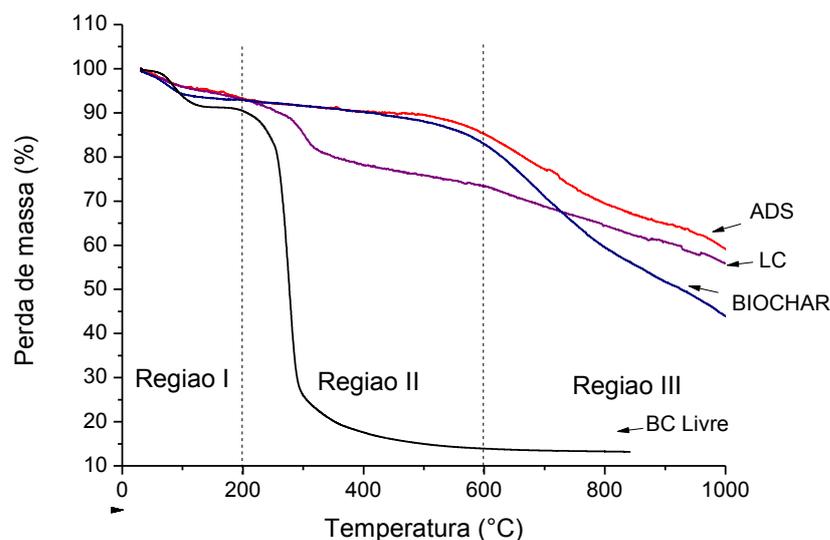


Figura 5.7. Curvas termogravimétricas da lipase de BC livre, biochar e biocatalisadores imobilizados por ADS e LC.

Na Tabela 5.2 observou-se que na região I a perda de massa, foi cerca de 7% para o biochar e os biocatalisadores imobilizados que pode ser atribuída à perda de água. Na região II está associado à degradação de compostos orgânicos, onde o biocatalisador imobilizado por ligação covalente apresentou uma maior perda de massa quando comparado com o ADS,

possivelmente influenciada pela presença das multicamadas de lipase de BC na superfície conforme sugerido no modelo proposto de imobilização e na micrografia do biocatalisador imobilizado. Na região III se verifica a perda de massa associada possivelmente à degradação de carbonato de cálcio (CaCO_3) e grupos aromáticos ($\text{C}=\text{C}$; $\text{C}=\text{O}$) (TAN *et al.*, 2014; CABRERA-PADILLA *et al.*, 2012; WU *et al.*, 2011).

Tabela 5.2. Perda de massa observada para a lipase de BC e biocatalisadores imobilizados.

Ensaio	Região I (25 -200 °C)	Região II (200 – 600 °C)	Região III (600 - 1000 °C)
Lipase de BC livre	8,3	82,3	9,1
Biochar	7,2	11,4	47,7
ADS	6,7	8,8	30,8
LC	6,7	21,1	24,1

5.5.4. Espectroscopia no Infravermelho (FTIR)

Os espectros de FTIR obtidos para o Biochar e biocatalisadores imobilizados por ADS ou LC são mostrados na Figura 5.8. Em todos os espectros exibe banda na região 1590 cm^{-1} que está associada às vibrações da ligação $\text{C}=\text{O}$ de grupos aromáticos. Além disso, observa-se também a vibração característica de estiramento da ligação $\gamma\text{-CH}$ em torno de 876 cm^{-1} (ZHAO *et al.* 2013 e CHEN *et al.* 2011). Somente nos biocatalisadores imobilizados foram observadas as bandas na região de 1383 cm^{-1} , que estão associadas à amida terciária (COLLINS *et al.*, 2011). Apenas no biocatalisador imobilizado por ligação covalente é observado no espectro banda com baixa intensidade na região de 1110 cm^{-1} que está associada a vibrações de ligação C-O-C presentes no PEG 1500 (PAPADIMITRIOU *et al.* , 2012). Portanto pode-se verificar por meio da análise físico-química a presença da lipase de BC na superfície do biochar, confirmando a eficiência da técnica de imobilização da lipase de BC por adsorção física e ligação covalente.

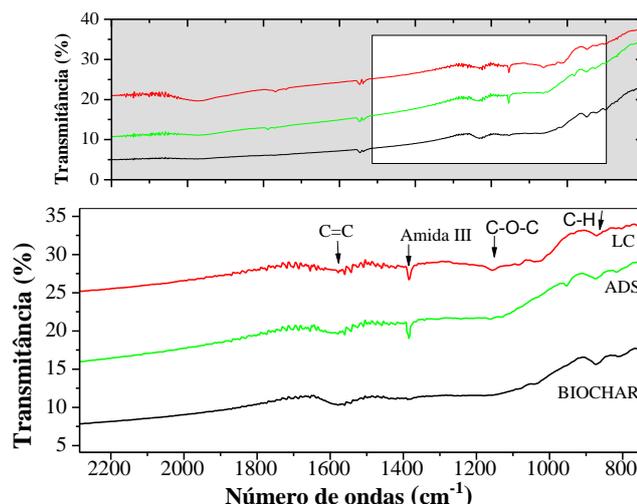


Figura 5.8. Espectro de FTIR para o biochar e biocatalisadores imobilizados ADS e LC.

5.6. PROPRIEDADES BIOQUÍMICAS DA LIPASE LIVRE BIOCATALISADORES IMOBILIZADOS

Foram avaliadas as propriedades bioquímicas dos biocatalisadores obtidos nas das diferentes metodologias de imobilização realizadas nesse trabalho, quanto a pH (4,0 - 10) e temperatura ótimos (25 - 80 °C), aos parâmetros cinéticos da LBC livre e imobilizada, estabilidade térmica (60 e 70 °C) e estabilidade operacional.

5.6.1. Efeito do pH e Temperatura

Segundo Abdulla e Ravindra (2013) a superfície da enzima contém grande número de grupos ácidos e básicos, a depender do pH do meio as cargas sobre estes grupos podem variar e alterar a atividade, a estabilidade estrutural e a solubilidade da enzima. O efeito do pH na atividade da lipase de BC livre e imobilizada é apresentado na Figura 5.9. Nota-se que tanto a lipase de BC livre e imobilizada por ligação covalente (LC) apresentaram pH ótimo de 7,0, indicando que este método de imobilização não alterou o pH ótimo da enzima. Entretanto na lipase de BC imobilizada por adsorção física (ADS) houve deslocamento para pH mais ácido (pH 4,0). A mudança do pH ótimo para a lipase imobilizada por adsorção física de acordo com Zucca e Sanjust (2014) está relacionada possivelmente a não especificidade das interações durante o processo de imobilização que resulta em alterações nos parâmetros bioquímicos, principalmente em enzimas fisicamente adsorvida em ambiente hidrofóbico. Na literatura são reportados deslocamento no pH ótimo para diferentes fontes de lipase e tipos

de suportes (SILVA *et al.*, 2011). Geralmente, as lipases imobilizadas em suportes policatiônicos tendem a deslocar o seu pH ótimo para valores mais ácidos (TALBERT e GODDARD *et al.*, 2012). Pereira *et al.* (2003) relataram para lipase de *Candida rugosa* imobilizada por adsorção física em quitosana o pH ótimo 6,0 ligeiramente inferior ao encontrado para o da lipase livre cujo o pH ótimo foi 7,0 este fato foi atribuído a um desequilíbrio no microambiente da enzima imobilizada devido às interações eletrostáticas com o suporte.

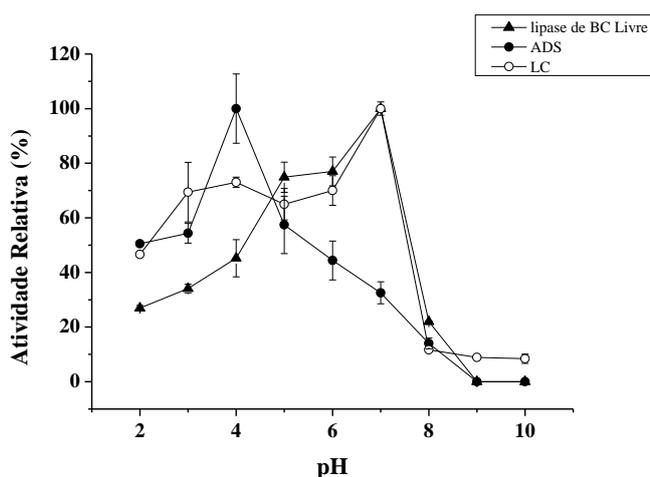


Figura 5.9. Efeito do pH na atividade da lipase de BC livre e imobilizada por adsorção física (ADS) e ligação covalente (LC).

A temperatura é um parâmetro muito importante para o aumento da velocidade de uma reação, pois com o seu aumento é produzida uma maior energia cinética nas moléculas dos reagentes, o que provoca um maior número de colisões por unidade de tempo. Porém em reações catalisadas por enzimas, para que as mesmas mantenham a atividade catalítica sua estrutura terciária e secundária precisam estar intacta, e o aumento da temperatura pode ocasionar a absorção de energia em excesso e com isso provoca o rompimento dessa estrutura e conseqüentemente a desnaturação da enzima. Desta forma é importante avaliar o efeito da temperatura no microambiente do biocatalisador imobilizado (GOMES *et al.*, 2006).

O efeito da temperatura na atividade catalítica para a lipase livre e os biocatalisadores imobilizados pelas duas técnicas (ADS e LC) pode ser observada na Figura 5.10. Pode-se observar que a atividade máxima da lipase de BC livre ocorreu a 50 °C, já para os biocatalisadores imobilizados ocorreu a 60 °C, possivelmente devido à mobilidade restringida

em decorrência da lipase estar ligada ao suporte e desta forma pode perder parte de sua acessibilidade ao substrato o que resulta novamente numa aparente redução da atividade, neste caso provocada por restrições difusionais, ou seja, limitações de acesso do substrato ao sítio ativo devido à presença da matriz sólida. Resultados similares foram observados em trabalhos utilizando suportes inorgânicos na imobilização de lipase de BC em suporte de sílica mesoporosa apresentou atividade máxima em 60 °C (HU *et al.*, 2012), como também em estudos envolvendo suportes orgânicos desenvolvidos por Cabrera-Padilla *et al.* (2012) que utilizou PHBV (biopolímero natural) na imobilização de lipase de *Candida rugosa* que apresentou temperatura ótima na faixa de 37- 45 °C e a enzima livre de 37 °C. As enzimas imobilizadas apresentam um aumento na atividade hidrolítica em temperatura de reação mais elevada comparada as enzimas livres, o que pode ser atribuída a conformação mais rígida da enzima imobilizada, como resultado de interações electrostáticas e ligação de hidrogênio entre a enzima e o suporte (CABRERA-PADILLA *et al.*, 2012).

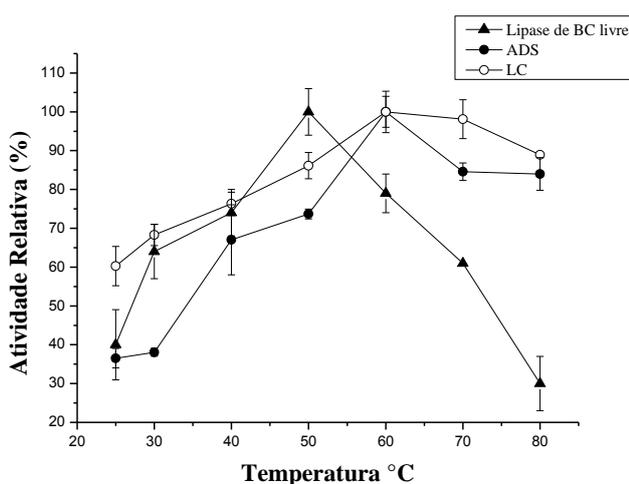


Figura 5.10. Efeito da temperatura na atividade da lipase de BC livre e imobilizada por adsorção física (ADS) e ligação covalente (LC).

5.5.2. Determinação dos parâmetros cinéticos

O efeito da concentração do substrato para a enzima livre e imobilizada foram estudados utilizando como substrato a emulsão de azeite, a reação foi conduzida no pH ótimo e temperatura ótima determinados anteriormente para a enzima livre e biocatalisadores imobilizados. Os valores de K_m (mM) e $V_{m\acute{a}x}$ ($\mu\text{mol/g}\cdot\text{min}$) para a enzima livre e

biocatalisadores imobilizados pelos métodos de adsorção física e ligação covalente estão apresentados na Tabela 5.3.

O valor de K_m (mM) é a medida de dissociação do complexo enzima-substrato de forma que quanto menor for este valor mais rápido é a taxa de dissociação do complexo (NAZARI *et al.*, 2009). $V_{m\acute{a}x}$ ($\mu\text{mol}/\text{mg}\cdot\text{min}$) indica a taxa máxima de reação, quando a enzima é totalmente saturada com o substrato (SOYSAL e SOYLEMEZ 2005). Os valores obtidos para enzima livre e imobilizada forneceram importantes informações sobre a interação da enzima e o substrato.

Na cinética da atividade hidrolítica, os valores de K_m (mM) e $V_{m\acute{a}x}$ ($\mu\text{mol}/\text{g}\cdot\text{min}$) foram calculados pela equação de Michaelis-Menten para a enzima livre e biocatalisadores imobilizados. O valor de $V_{m\acute{a}x}$ para lipase livre foi 3333 $\mu\text{mol}/\text{g}\cdot\text{min}$ e para os biocatalisadores imobilizados ADS e LC os valores $V_{m\acute{a}x}$ foram 2000 e 2500 $\mu\text{mol}/\text{g}\cdot\text{min}$, respectivamente. O valor de $V_{m\acute{a}x}$ da lipase de BC imobilizadas (ADS e LC) diminuiu cerca de 1,33 e 1,66 vezes respectivamente em comparação com a lipase de BC livre. Uma vez que o processo de imobilização não pode controlar a fixação da enzima sobre o suporte e esta fixação inadequada pode induzir uma conformação inativa à enzima e/ou a alteração nas propriedades dos sítios ativos que podem impedir a ligação de substrato ao sítio ativo, e desta forma reduzindo o valor de $V_{m\acute{a}x}$ para a enzima mediante a imobilização (BAYRAMOGLU e ARICA, 2014). Enquanto o valor de K_m para lipase livre foi 665 mM e para os biocatalisadores imobilizados ADS e LC os valores de K_m foram de 219 e 369 mM, respectivamente. A literatura descreve que a diminuição do K_m (mM) para a enzima imobilizada sugere um aumento da afinidade do sítio ativo da enzima ao substrato (GUNCHEVA e ZHIRYAKOVA 2011). Além disso, pode-se notar que ocorreu uma diferença nos valores do K_m para os biocatalisadores imobilizados pelos dois métodos, indicando diferentes afinidades da lipase imobilizada pelo substrato nos diferentes métodos de imobilização.

Tabela 5.3. Parâmetros cinéticos (V_{max} e K_m) do biocatalisador livre e imobilizado.

	K_m (mM)	V_{max} ($\mu\text{mol/g}\cdot\text{min}$)
Lipase de BC livre	665	3333
Adsorção Física (ADS)	219	2000
Ligação Covalente (LC)	369	2500

5.6.3. Estabilidade Térmica

A estabilidade térmica da lipase de BC e biocatalisadores imobilizados foi investigada e comparada por meio da determinação da atividade hidrolítica na reação de hidrólise em emulsão de azeite de oliva a 60 °C para diferentes tempos de reação. Na Figura 5.12 pode-se observar que o biocatalisador imobilizado por ligação covalente apresentou uma melhor estabilidade térmica quando comparado à enzima livre, já o biocatalisador imobilizado por adsorção física apresentou perfil cinético semelhante de inativação térmica da enzima livre.

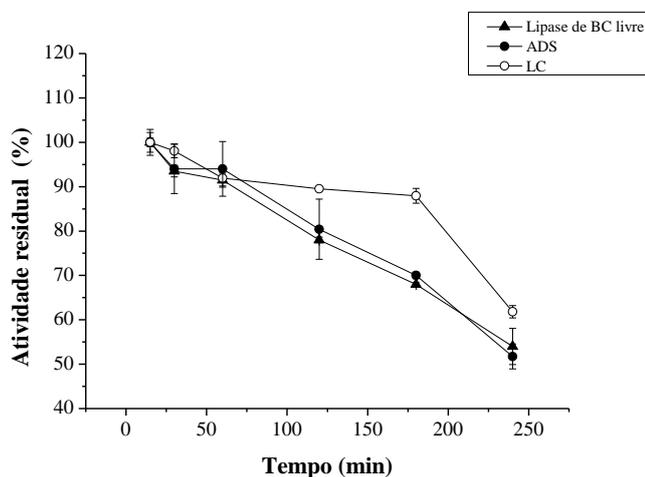


Figura 5.11. Estabilidade térmica do biocatalisador livre e imobilizado por adsorção física (ADS) e ligação covalente (LC) incubada a 60 °C.

A Constante de inativação térmica e o tempo de meia vida para a lipase de BC livre e para os biocatalisadores imobilizados são mostrados na Tabela 5.4. Comparando a constante

de inativação da enzima livre com os valores obtidos para os biocatalisadores imobilizados ($k_{\text{imobilizado}}/k_{\text{livre}}$), verificou-se que a imobilização por adsorção física não altera significativamente a inativação térmica da enzima (valores de $k_{\text{imobilizado}}/k_{\text{livre}}$ próximo a 1), enquanto a imobilização por ligação covalente diminuiu (valores de $k_{\text{imobilizado}}/k_{\text{livre}}$ 0,64) sugerindo maior estabilidade térmica para enzima quando imobilizada por ligação covalente em biochar, proporcionando para o biocatalisador imobilizado um maior tempo de meia vida (7,2 h). Esses resultados corroboram com os dados da recuperação da atividade, para os quais o biocatalisador imobilizado por ligação covalente apresentou uma maior recuperação de atividade devido ao efeito estabilizante proporcionado pelo PEG 1500 o qual confere uma maior proteção para a lipase de BC em relação ao biocatalisador imobilizado por adsorção física.

Tabela 5.4 valores de constante de inativação térmica (K) e tempo de meia vida para o biocatalisador livre e imobilizado por ADS e LC

	K (h⁻¹)	K Imobilizado / K Livre	t_(1/2) (h)
Lipase de BC livre	0,0025		4,5
Adsorção Física (ADS)	0,0026	1,00	4,4
Ligação Covalente (LC)	0,0016	0,61	7,2

Os resultados encontrados são similares aos descritos por Brígida *et al.* (2007; 2008) na imobilização da lipase *Candida antarctica* B por adsorção física e ligação covalente em fibra de coco. Onde observaram que o processo de imobilização por ligação covalente proporcionou uma maior estabilidade térmica a lipase *Candida antarctica* B apresentando um tempo de meia vida de 1,4 vezes maior que o sistema imobilizado por adsorção física.

5.6.4. Estabilidade operacional

A estabilidade operacional é uma das características mais importantes relativas à aplicação do biocatalisador em escala industrial, uma vez que a capacidade de reutilização das enzimas imobilizadas minimizam os custos do processo. A estabilidade operacional da lipase de BC imobilizada em biochar foi testada na reação de hidrólise em emulsão de azeite de oliva por 10 min em 60 °C, conforme mostrado na Figura 5.12. Verificamos que a lipase de BC imobilizada por adsorção física pode ser reutilizada até 17 vezes, mantendo 50% da sua atividade inicial (2000 U/g). Contudo, a lipase de BC imobilizada por ligação covalente

apresentou baixa estabilidade operacional perdendo mais de 90 % da sua atividade inicial no primeiro reciclo (< 333 U/ g).

A partir dos resultados obtidos, pode-se sugerir a elevada estabilidade da lipase de BC imobilizada por adsorção física deve-se possivelmente a hidrofobicidade do bichar que tende a estabilizar a estrutura conformacional da lipase com a tampa aberta (GARCIA-GALAN *et al.*, 2011). A perda significativa da atividade na imobilização por ligação covalente está relacionada ao processo de lixiviação da enzima durante os ciclos, devido à formação de agregados da lipase de BC, que estão aderidos por ligações fracas na superfície do suporte conforme observado na Figura 5.6.c na análise de Microscopia Eletrônica de Varredura que corroboram para a perda superior a 90 % da sua atividade inicial no primeiro ciclo.

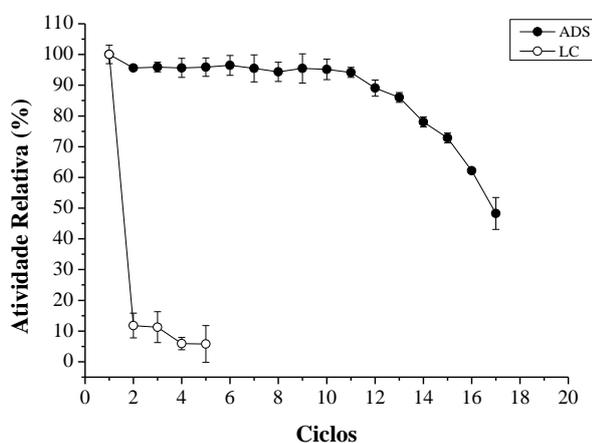


Figura 5.12. Estabilidade operacional da lipase imobilizada por adsorção física (ADS) e ligação covalente (LC) em biochar.

Resultados semelhantes foram relatados na literatura utilizando diferentes tipos de suporte e enzimas. No estudo de Cabrera-Padilla *et al.* (2012) avaliaram a estabilidade operacional da lipase *Cândida rugosa* imobilizada em PHBV observaram que o biocatalisador imobilizado pode ser reutilizado até 12 vezes retendo 50% da sua atividade inicial. Cristóvão *et al.* (2011) verificaram que para a *lacase* comercial imobilizado por adsorção física sobre fibra de coco em reação de oxidação de ABTS, pode ser reutilizada até 13 vezes retendo 55 % da sua atividade inicial. Apesar da imobilização por adsorção física ser conhecida por ter apenas ligações fracas envolvidas e provavelmente ter uma maior perda na atividade da enzima devido à lixiviação durante as lavagens. No entanto, a lipase *Candida rugosa* e a *lacase* comercial imobilizada por adsorção física apresentou boa estabilidade operacional.

No estudo realizado por Brígida *et al.* (2008) verificaram que a lipase *Candida antarctica* B immobilizada por adsorção física apresentou 50 % da sua atividade hidrolítica inicial após o terceiro ciclo de reação na hidrólise butirato de metilo (meio aquoso), já para a reação em meio orgânico mostrou boa estabilidade operacional, mantendo 80 % de sua atividade inicial após o sexto ciclo de reação. Brígida *et al.* (2007) avaliaram a estabilidade operacional da lipase *Candida antarctica* B immobilizada por ligação covalente em fibra de coco por meio de duas reações: a hidrólise de metil butirato (meio aquoso) e síntese butirato de butilo (meio orgânico). Obtiveram após cinco reuso para o biocatalisador preparado em pH 7,0 (CALB-7) uma atividade de cerca de 55 % em meio aquoso (hidrólise) e 75 % em meios orgânicos (síntese), respectivamente, e teve comportamento semelhante para o biocatalisador preparado em pH 10,0 (CALB-10) em meios aquoso, em torno de 55 % da atividade residual hidrolítica, mas apresentou um resultado inferior em meio orgânico, cerca de 45 % da atividade residual.

5.7. POTENCIAL DE PRODUÇÃO DE ÉSTERES ETÍLICOS

Neste estudo verificou-se o potencial da aplicação do biocatalisador immobilizado por adsorção física na conversão de óleo de coco bruto em ésteres etílicos. Na Figura 5.13 foi analisada a influência do tempo de reação na conversão de ésteres etílicos. O biocatalisador immobilizado apresentou uma conversão máxima de 32,68 % com o tempo de reação de 48 h a 40 °C. A temperatura de 40 °C foi selecionada neste estudo, uma vez que trabalhos descritos na literatura apresentaram bom rendimento na produção de ésteres etílicos e metílicos devido à baixa viscosidade do meio reacional facilitando assim o aumento da taxa de transferência de massa (GULDHE *et al.*, 2015; SIM *et al.*, 2010).

A produção enzimática de ésteres etílicos a partir de óleos vegetais possuem alguns fatores que afetam a eficiência no processo. Uma vez que os óleos vegetais em sua forma bruta são obtidos por meio de extração de solvente ou prensagem mecânica contendo uma grande quantidade de impurezas, tais como: antioxidantes, fosfolipídios, ácidos graxos livres, esteróis e água. Essas impurezas presentes nos óleos vegetais apresenta efeito significativo na reação de transesterificação e também podem interferir na separação dos ésteres e glicerol (MICHELIN *et al.*, 2015; LAM *et al.*, 2010).

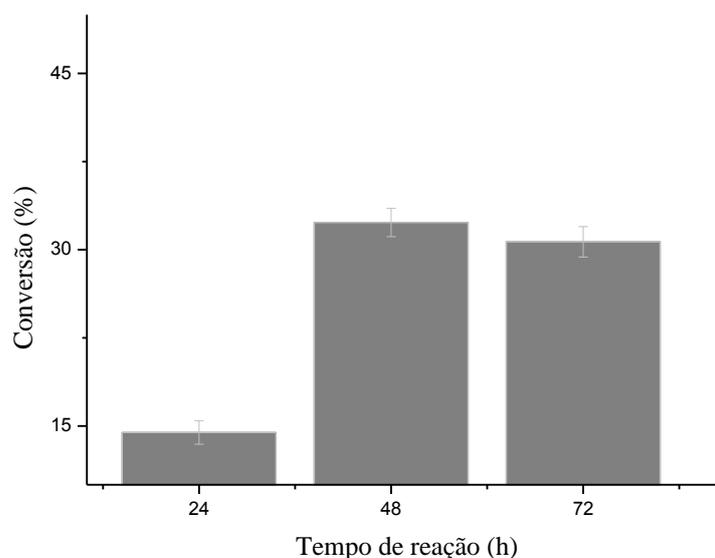


Figura 5.13. Influência do tempo de reação na conversão de ésteres etílicos.

A composição de ácidos graxos presentes no óleo de coco utilizado neste estudo consistiu em 86,85 % de ácidos graxos saturados, sendo a sua predominância de ácido láurico (> 40 %), e 13,15 % de ácidos insaturados similares ao óleo de coco utilizado por Jiang e canela (2012), como mostrado na Tabela 5.5. Entretanto, na produção de biodiesel a predominância de ácidos graxos saturados apresenta uma tendência a cristalizar em temperaturas baixas, o que pode limitar o uso desses biocombustíveis (TUPUFIA *et al.*, 2013).

De acordo com trabalhos reportados na literatura, a transesterificação de óleos vegetais é extremamente sensível às condições reacionais (temperatura, razão molar álcool: óleo, umidade, entre outros) (RIBEIRO *et al.*, 2014; OLIVEIRA *et al.*, 2014). Abigor *et al.* (2000) estudaram o uso da lipase *Burkholderia cepacia* livre como catalisador na transesterificação de óleo de coco utilizando 10 % de concentração de enzima e diferentes tipos de álcoois (etanol, metanol, 1- butanol, 1- propanol, isobutanol, isopropanol) com razão molar de óleo: álcool (1:4) e tempo de reação de 8 h. Obtendo conversão de 35 % de ésteres etílicos, 2 % de ésteres metílicos, 40 % de ésteres 1- butílicos, 16 % ésteres propílicos, 40 % de ésteres isobutílicos e 15 % isopropílico.

Tabela 5.5. Composição de ácidos graxos do óleo de coco.

Ácidos Graxos	Composição %	* Composição %
Caproico (C 6:0)	± 0,25	-
Caprílico (C8:0)	± 5,4	± 7,7
Cáprico (C10:0)	± 4,5	± 6,4
Laúrico (C12:0)	± 45,8	± 48,5
Mirístico(C14:0)	± 19	± 17,2
Palmítico(16:0)	± 9,0	± 8,9
Esteárico(C18:0)	± 2,8	± 2,2
Oléico(C18:1)	± 6,7	± 6,9
Linoleico (C18: 2)	± 2,0	± 1,6

* Jiang e Tan (2012)

Ribeiro *et al.* (2012) avaliaram as condições do processo (temperatura, razão molar óleo: álcool, concentração de enzima e tipo de álcool), a fim de verificar a sua influência na transesterificação de óleo de coco catalisada pela lipase comercial Novozym 435 para a produção de biodiesel. O melhor resultado de conversão foi de 80,5 % obtido utilizando etanol com uma temperatura mais elevada (60 °C), razão molar de óleo: álcool (1:10) e concentração de enzima (7 %).

Com base nos resultados encontrados neste estudo verificamos o potencial da lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizada por adsorção física em biochar para a produção de ésteres etílicos, havendo a necessidade de trabalhos futuros para estudar as condições reacionais visando uma maior conversão.

6. CONCLUSÃO

A partir dos resultados apresentados ao longo do trabalho, pode-se concluir que os objetivos inicialmente propostos foram alcançados, ou seja, a imobilização da lipase de *Burkholderia cepacia* em biochar por adsorção física e ligação covalente, bem como a caracterização dos biocatalisadores nos aspectos físico-químicos e bioquímicos. Verificou-se rendimento de imobilização de 54 e 89 % para os biocatalisadores imobilizados por adsorção física e ligação covalente, respectivamente.

Na caracterização bioquímica observa-se que o biocatalisador imobilizado por adsorção física apresentou pH ótimo igual a 4,0 e por ligação covalente o pH ótimo manteve-se igual ao da enzima livre (pH 7,0). A temperatura ótima para os biocatalisadores imobilizados foi 60 °C, 10 °C acima da temperatura ótima da enzima livre. A lipase de BC imobilizada por ADS apresentou melhor estabilidade operacional quando comparada com lipase de BC imobilizada por ligação covalente, o reuso máximo foi de 17 vezes considerando a manutenção de 50 % da sua atividade inicial (2000 U/g).

Na caracterização físico-química e morfológica dos biocatalisadores imobilizados observou-se na análise de MEV a formação de agregados de lipase de BC na superfície do biochar no sistema imobilizado por ligação covalente, o que corroborar para a baixa estabilidade operacional apresentanda. Desta forma verificou-se o potencial da aplicação do biocatalisador imobilizado por adsorção física na conversão de óleo de coco bruto em ésteres etílicos apresentando uma conversão máxima de 32,68 %, havendo a necessidade de trabalhos futuros para estudar as condições reacionais visando uma maior conversão.

A contribuição deste trabalho foi o desenvolvimento de um biocatalisador imobilizado que, poderá possivelmente substituir, os processos químicos convencionais em aplicações industriais após a otimização do método de imobilização da enzima imobilizada em biochar e das condições de reacionais de diferentes processos, como por exemplo a produção de biodiesel.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Deste modo a partir dos resultados promissores obtidos neste estudo sugere-se a realização das seguintes etapas para a área de biocatálise com o objetivo da aplicação industrial:

- O uso de aditivos durante o processo de imobilização.
- Estudar os efeitos das variáveis tempo e concentração dos biocatalisadores ADS e LC na transesterificação do óleo de coco.
- Uso de meios convencionais e não convencionais para produção de ésteres etílicos.
- Estudar a viabilidade econômica da metodologia desenvolvida em questão.

8. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- ABDULLA, R.; RAVINDRA, P. Characterization of cross linked Burkholderia cepacia lipase in alginate and k-carrageenan hybrid matrix. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 44, p. 545–551, 2013.
- ABIGOR, R. D.; UADIA, P. O.; FOGLIA, T. A.; HAAS, M. J.; JONES, K. C.; OKPEF, E. ; OBIBUZOR, J. U.; BAFOR, M. E. Lipase-catalysed production of biodiesel fuel from some Nigerian lauric oils. *Biochemical Society Transactions*, 28, p.979 – 981, 2000.
- AHMAD, M.; LEE, S. S.; DOU, X.; MOHAN, D.; SUNG, J. K.; YANG, J. E.; OK, Y. S. Effects of pyrolysis temperature on soybean stover- and peanut shell-derived biochar properties and TCE adsorption in water. *Bioresource Technology* , 118, p.536–544, 2012.
- AMEN-CHEN, C.; PAKDEL, H.; ROY, C. Production of monomeric phenols by thermochemical conversion of biomass: a review, *bioresour.technol.* 79, p. 277-299, 2001
- AMUTIO, M.; LOPEZ, G.; AGUADO, R.; ARTETXE, M.; BILBAO, J.; OLAZAR, M. Kinetic study of lignocellulosic biomass oxidative pyrolysis. *Fuel*, 95, p. 305–311, 2012.
- BARBOSA, A. S.; SILVA, M. A. O.; CARVALHO, N. B.; MATTEDI, S.; IGLESIAS, M. A.; FRICKS, A. T.; LIMA, A. S.; FRANCESCHI, E.; SOARES, C. M. F. Imobilização de Lipase por Encapsulação em Sílica Aerogel *Quim. Nova*, 37, p. 969-976, 2014
- BAYRAMOGLU, G.; ARICA, M.Y. Immobilization of Mucor miehei esterase on core-shell magnetic beads via adsorption and covalent binding: Application in esters synthesis. *Fibers and Polymers*, 15, p. 2051-2060, 2014.
- BOURKE, J.; MANLEY-HARRIS, M.; FUSHIMI, C.; DOWAKI, K.; NUNOURA, T.; ANTAL, M. J.; Do All Carbonized Charcoals Have the Same Chemical Structure? 2. A Model of the Chemical Structure of Carbonized Charcoal. *Ind. Eng. Chem. Res*, 46, p. 5954-5967, 2007.
- BRADY, D. AND JORDAAN, J. Advances in enzyme immobilization – Review. *Biotechnol Lett*, 31, p. 1639–1650, 2009.
- BRIDGWATER, A. V. Review of fast pyrolysis of biomass and product upgrading. *Biomass and bioenergy*, 38, p. 68 -94, 2012.
- BRÍGIDA, A. I. S.; PINHEIRO, A. D. T.; FERREIRA, A. L. O.; GONÇALVES, L. R. B. Immobilization of Candida antarctica Lipase B by Adsorption to Green Coconut Fiber. *Appl Biochem Biotechnol*, 146, p.173–187, 2008.
- BRÍGIDA, A. I. S.; PINHEIRO, A. D. T.; FERREIRA, A. L. O.; PINTO, G. A. S.; GONÇALVES, L. R. B. Immobilization of Candida Antarctica Lipase B by Covalent Attachment to Green Coconut Fiber. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 7, p. 136–140, 2007.

- CABRERA-PADILLA, R. Y. ; LISBOA, M. C. ; FRICKS, A. T. ; FRANCESCHINI, E. ; LIMA, A. S. ; SILVA, D. P. ; SOARES, C. M .F. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on poly(3-hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate): a new eco-friendly support. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, v. 39, p. 289-298, 2012.
- CAGNON, B.; Py, X.; GUILLOT, A.; STOECKLI, F.; CHAMBAT,G. Contributions of hemicellulose, cellulose and lignin to the mass and the porous properties of chars and steam activated carbons from various lignocellulosic precursors. *Bioresource Technology*, 100, p. 292–298, 2009.
- CARVALHO, N. B.; LIMA, A. S.; SOARES, C. M. F. Uso de Sílicas Modificadas para Imobilização de Lipases. *Química Nova*, 2014.
- CARVALHO, N. B.; SOARES, C. M. F.; BARBOSA, J. M. P.; OLIVEIRA, M. V. S.; FRICKS, A. T.; LIMA, A. S. Biochemical properties of *Bacillus* sp. ITP-001 lipase immobilized with a sol gel process. *Química Nova*, 36, p. 52 - 58, 2013.
- CARVALHO, A. K. F; DA RÓS, P. C. M.; TEIXEIRA, L. F.; ANDRAD, G. S. S.; ZANIN, G. M.; CASTRO, H. F. Assessing the potential of non-edible oils and residual fat to be used as a feedstock source in the enzymatic ethanolysis reaction. *Industrial Crops and Products*, 50, p.485 – 493, 2013.
- CABANA, H.; JONES, J. P.; AGATHOS, S. N. Preparation and characterization of cross-linked laccase aggregates and their application to the elimination of endocrine disrupting chemicals. *Journal of Biotechnology*, 132, p. 23–31, 2007.
- COLLINS, S. E.; LASSALLE, V., FERREIRA, M. L. FTIR-ATR characterization of free *Rhizomucor meihei* lipase (RML), Lipozyme RMIM and chitosan-immobilized RML. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* , 72, p. 220 – 228, 2011.
- CRISTÓVÃO, A. R. O; TAVARESA, A. P. M.; BRÍGIDAB, A. I. S.; LOUREIROA, J. M.; BOAVENTURA, A. R.; MACEDO, E. A.; COELHO, M. A. A. Immobilization of commercial laccase onto green coconut fiber by adsorption and its application for reactive textile dyes degradation. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 72, p. 6 – 12, 2011.
- D'SOUZA, S. F.; GODBOLE, S. S. Immobilization of invertase on rice husk using polyethylenimine. *J. Biochem. Biophys Methods*, 52, p. 59 – 62, 2002.
- DALLA, R. V; NASCIMENTO, M. G. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. *Química Nova*, 27, 623-630, 2004.
- DEVI, B. L. A.; GUO, Z.; XU, X. Characterization of Cross-Linked Lipase Aggregates. *J Am Oil Chem Soc*, 86, p.637–642, 2009.
- DICOSIMO, R.; MCAULIFFE, J.; POULOSEB, A. J.; BOHLMANNB,G. Review Industrial use of immobilized enzymes, *Chemical Society Reviews*, 42, p. 6437-6474, 2013.
- FAO. Food and Agriculture Organization. Disponível em <<http://faostat.fao.org>> Acesso em Agosto/2013.
- FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, M.; SANROMÁN, M. A; MOLDES, D. Recent developments and applications of immobilized laccase, *Biotechnol Adv*, 2012.

- FREITAS, L.; DA RÓS, P. C. M.; SANTOS, J. C.; DE CASTRO, H. F. An integrated approach to produce biodiesel and monoglycerides by enzymatic interesterification of babassu oil (*Orbinya* sp). *Process Biochemistry*, 44, p.1068 - 1074, 2009.
- GHALY, A. E.; DAVE, D.; BROOKS, M. S.; BUDGE, S. Production of Biodiesel by Enzymatic Transesterification: Review. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 6, p. 54-76, 2010.
- GOMES, F. M. PAULA, A. V; SILVA, G. S.; CASTRO, H. F.; Determinação Das Propriedades Catalíticas Em Meio Aquoso E Orgânico Da Lipase De *Candida Rugosa* Imobilizada Em Celulignina Quimicamente Modificada Por Carbonildiimidazol. *Quimica Nova*, 29, 4, 710-718, 2006.
- GONZÁLEZ, M. E.; CEA, M.; SANGALETTI, N.; GONZÁLEZ, A.; TORO, C.; DIEZ, M. C.; MORENO, N.; QUEROL, X.; NAVIA, R. Biochar Derived from Agricultural and Forestry Residual Biomass: Characterization and Potential Application for Enzymes Immobilization. *J. Biobased Mater. Bioenergy*, 7, p.724-732, 2013.
- GONZÁLEZ, M. P. E. AND MONTOYA, V. H. Guava seed as an adsorbent and as a precursor of carbon for the adsorption of acid dyes. *Bioresource Technology*, 100, p. 2111–2117, 2009.
- GUISAN, J. M.; In: **Immobilization of enzymes for use in organic media. In: Immobilization of enzymes and cells.** Totowa: Humana Press. p. 1-13. 2006.
- GULDHE, A.; SINGH, B.; MUTANDA, T.; PERMAUL, K.; BUX, F. Advances in synthesis of biodiesel via enzyme catalysis: Novel and sustainable approaches. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 41, p.1447–1464, 2015.
- GUNCHEVA, M. E.; ZHIRYAKOVA, D. Catalytic properties and potential applications of *Bacillus* lipases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 68, p.1-21, 2011.
- HAN, Y.; BOATENG, A. A; QI, P. X.; LIMA, I. M.; CHANG, J. Heavy metal and phenol adsorptive properties of biochars from pyrolyzed switch grass and woody biomass in correlation with surface properties. *Journal of Environmental Management*, 118, p.196 -204, 2013.
- HANEFELD, U., Immobilisation of hydroxynitrile lyases. *Chemical Society Reviews*, 42, p. 6308-6321, 2013.
- HILTEN, R. N. BIBENS, B. P. KASTNER, J. R. DAS, K. C. In-Line Esterification of Pyrolysis Vapor with Ethanol Improves Bio-oil Quality, *Energy Fuels*, 24, p. 673–682, 2009.
- Hu, Y.; TANG, S.; JIANG, L.; ZOU, S.; YANG, Y.; HUANG, H. Immobilization of *Burkholderia cepacia* lipase on functionalized ionic liquids modified mesoporous silica SBA-15, *Process Biochemistry*, 47, p 2291–2299, 2012.
- HUBER, G. W.; IBORRA, S.; CORMA, A. Synthesis of transportation fuels from biomass: Chemistry, catalysts, and engineering. *Chemical Reviews*, 106, p. 4044-4098, 2006.
- IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Pesquisa Agrícola Municipal 2011. Disponível em <<http://www.sidra.ibge.gov.br>>. Acesso em Julho/2013.

- IBRAF – INSTITUTO BRASILEIRO DE FRUTAS. Frutas brasileiras em ascensão. Disponível em: <http://www.ibraf.org.br/imprensa/0901_FrutasBrasileirasAscensao.asp>. Acesso em: maio/2014.
- IHAA, O. K.; ALVES, F. C. V. C.; SUAREZ, A. P. Z.; SILVA, C. R. P.; MENEGHETTI, M. R.; MENEGHETTI, S. M. P. Potential application of *Terminalia catappa* L. and *Carapa guianensis* oils for biofuel production: Physical-chemical properties of neat vegetable oils, their methyl-esters and bio-oils (hydrocarbons). *Industrial Crops and Products*, 52, p. 95–98, 2014.
- JIMENEZ-CORDERO, D.; HERAS, F.; ALONSO-MORALES, N.; GILARRANZ, M. A.; RODRIGUEZ, J. J. Porous structure and morphology of granular chars from flash and conventional pyrolysis of grape seeds, *Biomass and bioenergy*, 54, p.123-132, 2013.
- JIANG, J.; TAN, C. Biodiesel production from coconut oil in supercritical methanol in the presence of cosolvent. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 43, p. 102 – 107, 2012.
- KAPOOR, M.; GUPTA, M. N. Review Lipase promiscuity and its biochemical applications. *Process Biochemistry*, 47, p. 555–569, 2012.
- KARTAL, F.; JANSSEN, M. H. A.; HOLLMANN, F.; SHELDON, R. A.; KILINC, A. Improved esterification activity of *Candida rugosa* lipase in organic solvent by immobilization as Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs). *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 71, p.85–89, 2011.
- KIM, J.; GRATE, J. W.; WANG, P. Nanostructures for enzyme stabilization. *Chemical Engineering Science*, 61, p. 1017–1026, 2006.
- KOBLITZ, M. G. B; PASTORE, G. M. Purificação parcial, por dois diferentes métodos cromatográficos, da lipase produzida por *Rhizopus sp1*. *Ciênc. Tecnol. Aliment*, 24(2): 287-292, 2004.
- KOBORI, C. N. AND JORGE, N. Caracterização dos Óleos de Algumas Sementes de Frutas como Aproveitamento de Resíduos Industriais. *Ciência e Agrotecnologia*, 29, p. 1008-1014, 2005.
- LAM, M. K.; LEE, K. T.; MOHAMED, A. R. Homogeneous, heterogeneous and enzymatic catalysis for transesterification of high free fatty acid oil (waste cooking oil) to biodiesel: A review. *Biotechnology Advances*, 28, p. 500 – 518, 2010.
- LAUFENBERG, G. Transformation of vegetable waste into added products: (A) the upgrading concept; (B) practical implementations. *Bioresource Technology*, 87, p.167-198, 2003.
- LAVOINE, N.; DESLOGES, I.; DUFRESNE, A.; BRAS, J. Microfibrillated cellulose – Its barrier properties and applications in cellulosic materials: A review. *Carbohydrate Polymers*, 90, p 735 - 764, 2012.
- LEE, Y.; PARK, J.; RYU, C.; GANG, K. Y.; YANG, W.; PARK, Y. K.; JUNG, J. D.; HYUN, S. Comparison of biochar properties from biomass residues produced by slow pyrolysis at 500 °C *Bioresource Technology*, 148, p. 196 - 201, 2013.
- LEHMANN, J.; RILLIG, M. C.; THIES, J.; MASIELLO, C. A.; HOCKADAY, W. C.; CROWLEY, D. Biochar effects on soil biota _A review, *Soil Biology & Biochemistry*, 43, p.1812-1836, 2011.

- LI, S.; HU, J.; LIU, B. Use of chemically modified PMMA microspheres for enzyme immobilization. *BioSystems*, 77, p. 25–32, 2004.
- LV, J. S.; LIUA, X.Y.; XUA, J. X.; DENG, Y. F.; WUA, Z.; WANG, Y. M.; FANA, M. F.; JIANGSU, H. Preparation and properties of adsorption material from corn stalkscore when used for enzyme immobilization and the subsequent activities of the adsorbed enzymes, *Industrial Crops and Products*, 50, p. 787– 796, 2013.
- MENDES, A. A.; CASTRO, H. F.; GIORDANO, R. L. C. Triagem de Suportes Orgânicos e Protocolos de Ativação na Imobilização e Estabilização de Lipase de *Thermomyces lanuginosus*. *Quim. Nova*, 36, p. 245-251, 2013.
- MENDES, A. A.; OLIVEIRA, P. C.; CASTRO, H. F.; GIORDANO, R. L. C. Aplicação De Quitosana Como Suporte Para A Imobilização De Enzimas De Interesse Industrial. *Química. Nova*, 34(5), p. 831 - 840, 2011.
- MENEZES, J. D. S.; DRUZIAN, J. I.; PADILHA, F. F.; SOUZA, R. S. Produção biotecnológica de goma xantana em alguns resíduos agroindustriais, caracterização e aplicações. *Rev. Elet. em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental*, 8, p. 1761-1776, 2012.
- MICHELIN, S.; PENHA, F. M.; SYCHOSKI, M. M.; SCHERER, R. P.; TREICHEL, H.; VALERIO, A.; LUCCIO, M. D.; OLIVEIRA, D.; OLIVEIRA, J. V. Kinetics of ultrasound-assisted enzymatic biodiesel production from Macauba coconut oil. *Renewable Energy*, 76, p. 388 – 393, 2015.
- MILETIC, N.; NASTASOVIC, A.; LOOS, K. Immobilization of biocatalysts for enzymatic polymerizations: Possibilities, advantages, applications, *Bioresource Technology*, 115, p. 126-135, 2012.
- MIRANDA, R.; BUSTOS-MARTINEZ, D.; BLANCO, S. C.; VILLARREAL, G. M. H.; CANTU, R. M. E. Pyrolysis of sweet orange (*Citrus sinensis*) dry peel; *J. Anal. Appl. Pyrolysis*, 86, p. 245–251, 2009.
- MOHAN, D.; PITTMAN, C. U.; STEELE, P. H. Pyrolysis of Wood/Biomass for Bio-oil: A Critical Review. *Energy & Fuels*, 20, p. 848-889, 2006.
- MUKHERJEE I.; MYLONAKIS A.; GUO Y.; SAMUEL S.P.; LI S.; WEI R.Y.; KOJTARI A.; WEI Y. Effect of nonsurfactant template content on the particle size and surface area of monodisperse mesoporous silica nanospheres. *Microporous and Mesoporous Materials*. 22, p. 168-174, 2009.
- NASCIMENTO, R. J.; ARAÚJO, C. R.; MELO, E. A. Atividade Antioxidante De Extratos De Resíduo Agroindustrial De Goiaba (*Psidium Guajava* L.). *Alim. Nutr*, 21, p. 209-216, 2010.
- NICOLINE, K. P.; CASAGRANDE, M.; JESUS, A. C. Pirolise De Biomassa Em Baixa Temperaturas. Campinas, SP; Editora Atomo, 2013.
- OLIVEIRA, M. V. S.; MOLGERO, P. C.; DA RÓS, S. M.; CASTRO, H. F.; SOARES, C. M. F.; LIMA, A. S. Transesterification of babassu oil catalyzed by *Burkholderia cepacia* encapsulated in sol-gel matrix employing protic ionic liquid as an additive. *Acta Scientiarum. Technology Maringá*, 36, p. 445-451, 2014.

- ONDUL, E.; DIZGE, N.; ALBAYRAK, N. Immobilization of *Candida antarctica* A and *Thermomyces lanuginosus* lipases on cotton terry cloth fibrils using polyethyleneimine, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 95, p.109 - 114, 2012.
- PAPADIMITRIOU, S. A.; ACHILIAS, D. S.; BIKIARIS, D. N. Chitosan-g-PEG nanoparticles ionically crosslinked with poly(glutamic acid) and tripolyphosphate as protein delivery systems. *International Journal of Pharmaceutics*, 430, p. 318– 327, 2012.
- PANDEY, M. P.; KIM, C. S. Lignin Depolymerization and Conversion: A Review of Thermochemical Methods. *Chem. Eng. Technol.* 34, p. 29 - 41, 2011.
- PEREIRA, E. B.; ZANIN, G. M.; CASTRO, H.F. Immobilization and Catalytic Properties of Lipase on Chitosan for Hydrolysis and Esterification Reactions, *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 20, p. 343 - 355, 2003.
- RAHMAN, I. A. and SAAD, B. Utilization of Guava Seeds as a Source of Activated Carbon for Removal of Methylene Blue from Aqueous Solution. *journal of chemistry*, 5, p 8-14, 2003.
- REGMI, P. ; MOSCOSO, J. L.; KUMAR, S.; CAO, X.; MAOB, J.; SCHAFFRAN, G. Removal of copper and cadmium from aqueous solution using switchgrass biochar produced via hydrothermal carbonization process, *Journal of Environmental Management*, 109, p.61- 69, 2012.
- RIBEIRO, L. M. O.; SILVA, A. E.; SILVA, M. C. S; ALMEIDA, R. M. R. G. A Study on Ethanolysis and Methanolysis of Coconut Oil for Enzymatically Catalyzed Production of Biodiesel. *Journal of Sustainable Bioenergy Systems*, 4, p. 215 - 224, 2014.
- RIBEIRO, L. M. O.; SANTOS, B. C. S.; ALMEIDA, R. M. R. Studies on reaction parameters influence on ethanolic production of coconut oil biodiesel using immobilized lipase as a catalyst. *biomass and bioenergy*, 47,p. 498 - 503, 2012.
- RIBEIRO, B. D.; CASTRO, A. M.; COELHO, M. A. Z.; FREIRE, D. M. G. Review Article Production and Use of Lipases in Bioenergy: A Review from the Feedstocks to Biodiesel Production. *Enzyme Research*, 16, p.1-16, 2011.
- RÓS, P. M.; SILVA ,G. A. M.; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C.; CASTRO, H. F. Evaluation of the catalytic properties of *Burkholderia cepacia* lipase immobilized on non-commercial matrices to be used in biodiesel synthesis from different feedstocks, *Bioresource Technology*, 101, p 5508–5516, 2010.
- SCHRAG, J. D.; LI, Y. G.; CYGLER, M.; LANG, D. M.; BURGDORF, T.; HECHT, H. J.; SCHMID, R.; SCHOMBURG, D.; RYDEL, T. J.; OLIVER, J. D.; STRICKLAND, L. C.; DUNAWAY, C. M.; LARSON, S. B.; DAY, J.; MCPHERSON, A. The open conformation of a *Pseudomonas* lipase. *Structure*, 5, p 187-202, 1997.
- SANTOS, C. E.; KIST, B. B.;CARVALHO, C.; REETZ,E.R.; DRUM, M., **Anuário brasileiro da fruticultura**, Santa Cruz do Sul, 12, p.9-15, 2014.
- SHAHID, E. M.; JAMAL, Y. Production of biodiesel: A technical review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 15, p. 4732 - 4745, 2011.
- SHELDON, R. A.; PELT, S. V. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. *Chem. Soc. Rev.*, 42, 6223-6235, 2013.

- SILVA, E. D.; ARABUTAN, D. T.; SILVA, T. RABELLO, C. B.; LIMA, R. B. LIMA, M. B.; LUDKE, J. V. Composição físico-química e valores energéticos dos resíduos de goiaba e tomate para frangos de corte de crescimento lento. *R. Bras. Zootec.*, 38, p.1051-1058, 2009.
- SILVA, G. S.; OLIVEIRA, P. C.; GIORDANI, S.; CASTRO, H. F. de. Chitosan/siloxane hybrid polymer: synthesis, characterization and performance as a support for immobilizing enzyme. *J. Braz. Chem. Soc.[online]*, 22 (8), p. 1407-1417, 2011.
- SILVA, L. M. R.; FIGUEIREDO, E. A.T.; RICARDO, N. M. P. S.; VIEIRA, I. G. P.; FIGUEIREDO, R. W. BRASIL, I. M.; Gomes, C. L. Quantification of bioactive compounds in pulps and by-products of tropical fruits from Brazil, *Food Chemistry*, 143, p. 398 - 404, 2014.
- SILVA, W. C.; TEIXEIRA, L. F.; CARVALHO, A. K. F.; MENDES, A. A.; CASTRO, H. F. Influence of feedstock source on the biocatalyst stability and reactor performance in continuous biodiesel production. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 20, p. 881- 886, 2014.
- SIM, J. H.; KAMARUDDIN, A. H.; BHATIA, S. Biodiesel (FAME) productivity, catalytic efficiency and thermal stability of lipozyme TL IM for crude palm oil transesterification with methanol. *J Am Oil Chem Soc*, 87, p.102 - 734, 2010.
- SIMÕES, A. S.; MORI, R. Y.; FARIA, R.; CASTRO, H. F. Desempenho da Matriz Híbrida SiO₂-Quitosana na Imobilização da Lipase Microbiana de *Candida rugosa*. *Quimica. Nova*, 34, p. 33 - 38, 2011.
- SINGH, R. K.; TIWARI, M. K.; SINGH, R.; LEE, J.K., Review From Protein Engineering to Immobilization: Promising Strategies for the Upgrade of Industrial Enzymes, *Int. J. Mol. Sci.*, 14, p. 1232 - 1277, 2013.
- SOARES, C. M. F.; CASTRO, H. F.; MORAES, F. F.; ZANIN, G. M. Characterization and utilization of *Candida rugosa* lipase immobilized on controlled pore silica. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 77, p. 745 - 747, 1999.
- SOARES, C. M. F.; SANTOS O.A., CASTRO, H. F.; MORAES, F. F., ZANIN, G. M. Studies on lipase immobilization in hydrophobic sol-gel matrix. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 113, p. 307-319, 2004 (b).
- SOARES, C. M. F.; SANTOS O.A.; OLIVO J.E.; CASTRO, H. F.; MORAES, F.F.; ZANIN, G.M. Influence of the alkyl-substituted silane precursor on sol-gel encapsulated lipase activity, *Journal of Molecular Catalysis B - Enzymatic*, 29, p. 69 - 79, 2004(a).
- SOUZA, H. A.; NATALE, W.; MODESTO, V. C; ROZANE, D. E Mineralização do nitrogênio proveniente da aplicação do resíduo da indústria processadora de goiabas em Argissolo. *Bragantia, Campinas*, 70 (4), p. 882-887, 2011.
- SULAIMAN, N. J.; RAHMAN, R. A.; NGADI, N. Precipitation of Cellulase and Xylanase for Cross-Linked Enzyme Aggregates. *Jurnal Teknologi (Sciences & Engineering)*, 68, p.17–20, 2014.
- TALBERT, J. N.; GODDARD, J. M. Review Enzymes on material surfaces. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 93, p. 8– 19, 2012.

- TAN, C.; YAXIN, Z.; HONGTAO, W.; WENJING, L.; ZEYU, Z.; YUANCHENG, Z.; LULU, R.; T. Influence of pyrolysis temperature on characteristics and heavy metal adsorptive performance of biochar derived from municipal sewage sludge *Bioresource Technology*, 164, p.47–54, 2014.
- TANG, J.; ZHU, W.; KOOKANA, R.; KATAYAMA, A., Characteristics of biochar and its application in remediation of contaminated soil, *Journal of Bioscience and Bioengineering*. p. 1- 7, 2013.
- TUPUFIA, S. C.; JEON, Y. J.; MARQUIS, C.; ADESINA, A. A.; ROGERS, P. L. Enzymatic conversion of coconut oil for biodiesel production. *Fuel Processing Technology*, 106, p. 721–726, 2013.
- UCHÔA-THOMAZ, A. M. A.; SOUSA, E. C.; CARIOCA, J. O. B.; MORAIS, S. M.; LIMA, A.; MARTINS, C. G.; ALEXANDRINO, C. D.; FERREIRA, P. A.T.; RODRIGUES, A. L. M.; RODRIGUES, S. P.; THOMAZ, J. C. A.; SILVA, J. N.; RODRIGUES, L. L. Chemical Composition, Fatty Acid Profile and Bioactive Compounds of Guava Seeds (*Psidium guajava* L.). *Food Science and Technology*, 34, p. 485 - 492, 2014.
- WU, H.; ZHAO, Y.; LONG, Y.; ZHU, Y.; WANG, H.; LU, W. Evaluation of the biological stability of waste during landfill stabilization by thermogravimetric analysis and Fourier transform infrared spectroscopy *Bioresource Technology* 102, p. 9403–9408, 2011.
- YUSOF, S. Guavas, Universiti Putra Malaysia, Selangor, Malaysia Copyright Elsevier Science Ltd. All Rights Reserved, 2003.
- ZANIN, G. M.; MORAES, F. F. Thermal stability and energy of deactivation of free and immobilized amyloglucosidase in the saccharification of cassava starch. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 70-72: p. 383-394, 1998.
- ZHAO, L.; CAO, X.; MA`SEKB, O.; ZIMMERMAN, A. Heterogeneity of biochar properties as a function of feedstock sources and production temperatures. *Journal of Hazardous Materials*, 256, p.1 – 9, 2013.