

UNIVERSIDADE TIRADENTES – UNIT

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE PROCESSOS - PEP

**TRATAMENTO DE BIOCHAR DE SEMENTE DE GOIABA
PARA IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE E APLICAÇÃO EM
REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO**

Autora: Lays Carvalho de Almeida.

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

Prof. Dr. Álvaro Silva Lima.

ARACAJU, SE - BRASIL

FEVEREIRO DE 2019

TRATAMENTO DE BIOCHAR DE SEMENTE DE GOIABA PARA IMOBILIZAÇÃO DE
LIPASE E APLICAÇÃO EM REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO

Lays Carvalho de Almeida

TESE APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA
DE PROCESSOS DA UNIVERSIDADE TIRADENTES COMO PARTE DOS
REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM
ENGENHARIA DE PROCESSOS.

Aprovada por:

Dr.^a Gisella Maria Zanin

Dr.^a Lisiane dos Santos Freitas

Dr.^a Nayára Bezerra Carvalho

Dr.^a Isadora Monteiro Andrade Barreto

Dr. Ranyere Lucena de Souza

Dr. Álvaro Silva Lima

Dr.^a Cleide Mara Faria Soares

ARACAJU, SE - BRASIL

FEVEREIRO DE 2019

FICHA CATALOGRÁFICA

Almeida, Lays Carvalho de

A447t

Tratamento de biochar de semente de goiaba para imobilização de lipase e aplicação em reação de transesterificação / Lays Carvalho de Almeida; orientação [de] Prof.^a Dr.^a Cleide Mara Faria Soares, Prof. Dr. Álvaro Silva Lima – Aracaju: UNIT, 2019.

106 f. il ; 30 cm

Tese (Doutorado em Engenharia de Processos) - Universidade Tiradentes, 2019

1. Biochar. 2. Imobilização. 3. Lipase. 4. Transesterificação I. Almeida, Lays Carvalho de. II. Soares, Cleide Mara Faria. (orient.). III. Lima, Álvaro Silva (orient.) IV. Universidade Tiradentes. V. Título.

CDU: 606: 62

“É preciso estudar muito para saber um pouco.”

(Montesquieu)

Agradecimentos

Primeiro de tudo, gostaria de agradecer a Deus por me guiar e iluminar sempre meus caminhos. Toda minha gratidão ao nosso bom Deus.

Aos meus orientadores que tenho grande admiração e serei eternamente grata. À professora Cleide por toda confiança, por todos os puxões de orelhas (sempre merecidos rsrs) e por acreditar em meu potencial. Ao professor Álvaro por toda compreensão e carinho. Transmitindo conhecimento e sempre disposto a ajudar.

A todos da família LPA/LEB que vivenciaram momentos de estudo, de comemorações e que contribuíram de forma direta e indiretamente para meu crescimento. Em especial aos irmãos da pesquisa, Anderson, Acácia, Danyelle, Isabela, Silvia, Regina e Juliana por todos os momentos de alegria, estresse, tristeza, emoção e viagens que passamos juntos. Aos alunos de iniciação científica Felipe e Victor pela dedicação e colaboração.

À Professora Lisiane, sou aquela aluna agregada “sem a obrigação formal”, por me ensinar tudo que sei hoje sobre cromatografia e pela paciência com a qual me recebeu durante esta jornada contribuindo para a minha formação. Além de todo o grupo do laboratório de análise de compostos orgânicos poluentes da UFS em especial à Roberta, Antônia, Sol e Diego que muito ajudaram durante as análises (GC, HPLC e MEV) e aos conhecimentos divididos.

Aos Professores Raquel Giordano e Paulo Tardioli, por me receberem tão bem durante dois meses na UFSCar e por toda a experiência adquirida. E a todos do grupo de pesquisa em especial a willian e Felipe por toda a dedicação e ajuda durante este período.

Aos meus amigos de infância: Ariadne, Rafaela, Cláudia, Hector, Harim, Matheus e Thiago pelo companheirismo e compreensão durante toda esta jornada.

À minha família, pelo constante apoio, amor, incentivo e pelo estímulo e encorajamento ocorridos durante o curso, pois sem isto jamais o teria concluído.

Aos órgãos de fomento CAPES, CNPq e Fapitec/SE pela concessão de bolsa de estudos, o apoio financeiro para o projeto de biodiesel e projeto de mobilidade acadêmica.

A todos os meus sinceros agradecimentos!

Resumo da tese apresentado ao Programa de Pós-graduação em Engenharia de Processos da Universidade Tiradentes como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Doutor em Engenharia de Processos.

TRATAMENTO DE BIOCHAR PARA IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE E APLICAÇÃO EM REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO

Lays Carvalho de Almeida

Este trabalho teve como objetivo realizar primeiramente o tratamento do biochar proveniente do processo de pirólise de semente de goiaba por diferentes processos de ativação, utilizando técnicas convencional (mufla) e não convencionais (assistidos por ultrassom e por micro-ondas) na presença de agentes de ativação (ácido fosfórico, hidróxido de potássio e diclorometano - DCM). Após a obtenção do biochar tratado, a segunda etapa foi utilizá-lo como suporte para a imobilização da lipase de *Burkholderia cepacia* (LBC) com diferentes protocolos de imobilização (adsorção física, imobilização hidrofóbica, ligação cruzada, ligação covalente unipontual e multipontual). Na etapa final aplicou-se o biocatalisador imobilizado nas reações de transesterificação de óleo de coco bruto em sistemas convencional (batelada) e não convencionais (ultrassom e micro-ondas) em diferentes condições de razões molares e temperatura, como também o uso de aditivos (peneira molecular, água e terc-butanol) na reação de transesterificação. O biochar tratado em ultrassom com DCM apresentou os melhores resultados para a imobilização da LBC por adsorção física e as reações de transesterificação realizadas em sistema convencional (batelada) apresentaram os melhores resultados de conversões de ésteres etílicos com cerca de 48 % em 96 h e a máxima formação de monoacilgliceróis de cerca de 60 % em 24 h para a razão molar óleo:etanol 1:7 a 40 °C. O uso de aditivos (peneira molecular, água, terc-butanol) nas reações de transesterificação em batelada não apresentou aumento na conversão de ésteres etílicos. Os sistemas não convencionais de transesterificação (ultrassom e micro-ondas) apresentaram uma redução na conversão de ésteres etílicos, a máxima conversão encontrada foi cerca de 25 % para ultrassom e 8 % para micro-ondas, resultado atribuído à baixa estabilidade do biocatalisador imobilizado nas condições reacionais.

Palavras-chave: Biochar, imobilização, lipase, transesterificação.

Abstract of these presented to the Process Engineering Graduate Program at the University Tiradentes as part of the requirements for the degree of Doctor in Process Engineering.

BIOCHAR TREATMENT FOR LIPASE IMMOBILIZATION AND APPLIED IN TRANSESTERIFICATION REACTION

Lays Carvalho de Almeida

Firstly, the objective of this work was to perform the treatment of biochar from the guava seed pyrolysis process by different activation processes using conventional (over) and unconventional techniques (assisted by ultrasound and microwave) in the presence of activating agents (phosphoric acid, potassium hydroxide and dichloromethane-DCM). And after obtaining the treated biochar, the second step was to use it biochar treated as support for the immobilization of *Burkholderia cepacia* lipase (BCL) with different immobilization protocols (physical adsorption, hydrophobic immobilization, crosslinking, unipontual and multipoint covalent binding). In the final step the immobilized biocatalyst was applied to the transesterification reactions of crude coconut oil in conventional (batch) and non-conventional (ultrasonic and microwave) systems under different conditions of molar ratios and temperature, as well as the use of additives (molecular sieve, water and tert-butanol) in the transesterification reaction. The ultrasonic biochar treated with DCM showed the best results for the immobilization of the BCL by physical adsorption and the transesterification reactions carried out in the conventional (batch) system showed the best results of conversion of ethyl esters with about 48 % in 96 h and the maximum formation of monoglycerides of about 60 % in 24 h for the oil: ethanol molar ratio 1:7 at 40 ° C. The use of additives in batch transesterification reactions showed no increase in conversion of ethyl esters. The non-conventional transesterification systems (ultrasonic and microwave) showed a reduction in the conversion of ethyl esters, the maximum conversion found were about 25 % for ultrasound and 8 % for microwave, a result attributed to the low stability of the immobilized biocatalyst under the reaction conditions

Keywords: Biochar, immobilization, lipase, transesterification.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS	4
2.1 OBJETIVO GERAL	4
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	4
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3.1 PROCESSOS ENZIMÁTICOS	5
3.1.2. <i>Lipase</i>	6
3.1.3 <i>Estabilização de enzimas</i>	8
3.1.3.1 Suportes	9
3.1.3.2 Técnicas de imobilização	15
3.2 REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO	18
3.2.1 <i>Processos convencionais</i>	22
3.2.2 <i>Processos não convencionais</i>	24
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
4.1 MATERIAIS	28
4.2 METODOLOGIA	28
4.2.1 <i>Produção do biochar</i>	30
4.2.2 <i>Tratamento do biochar para imobilização</i>	30
4.2.2.1 Tratamento convencional (mufla)	30
4.2.2.2 Tratamento não convencional.....	31
Assistido por ultrassom.....	31
Assistido por micro-ondas	31
4.2.3 <i>Imobilização da LBC em biochar</i>	31
4.2.3.1 Adsorção física (ADS).....	32
4.2.3.2 Imobilização hidrofóbica	32

4.2.3.3 Ligação covalente multipontual (LCM).....	33
Glicidol	33
Amino-glutaraldeído	33
4.2.3.4 Ligação cruzada e adsorção	34
4.2.4 Determinação da atividade hidrolítica.....	34
Rendimento de imobilização.....	35
4.2.5 Caracterização físico-química e morfológica dos biocatalisadores imobilizados	35
4.2.5.1 Caracterização morfológica do biochar e dos biocatalisadores imobilizados	35
Caracterização morfológica em B.E.T.	35
Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	35
4.2.5.2. Caracterização físico-química	36
Análise por espectroscopia no infravermelho por transformada de fourier (FTIR)	36
4.2.6 Reação convencional de transesterificação enzimática	36
4.2.7 Reações não convencionais de transesterificação enzimática.....	37
4.2.7.1 Ultrassom	37
4.2.7.2 Micro-ondas	37
4.2.8 Quantificação dos ésteres etílicos	37
4.2.9. Quantificação de mono, di e triacilgliceróis	38
4.2.10 Estabilidade operacional na reação de transesterificação	39
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
5.1 TRATAMENTO DO BIOCHAR PARA IMOBILIZAÇÃO	40
5.1.1 Caracterização morfológica e físico-química.....	40
Microscopia eletrônica de varredura (MEV) do biochar após o tratamento	40
Análise FTIR do biochar após o tratamento.....	44
5.1.2 Imobilização da LBC por adsorção física em biochar após tratamento.....	45
5.1.3 Caracterização morfológica e físico-química dos biocatalisadores imobilizados	47
Microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos biocatalisadores imobilizados	47
Análise FTIR dos biocatalisadores imobilizados	47

5. 2 IMOBILIZAÇÃO DA LBC EM BIOCHAR POR DIFERENTES PROTOCOLOS DE IMOBILIZAÇÃO	48
5.3 AVALIAÇÃO DA LIPASE IMOBILIZADA EM REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO.....	53
5.3.1 <i>Reação de transesterificação em reator batelada</i>	53
5.3.2- <i>Quantificação de mono, di e triacilgliceróis</i>	57
5.3.3 <i>Uso de Aditivos na reação de transesterificação</i>	60
5.3.4 <i>Uso da LBC em reações não convencionais de transesterificação enzimática</i>	62
Ultrassom.....	62
Micro-ondas.....	64
5.5.5. <i>Estabilidade operacional</i>	66
6. CONCLUSÕES.....	67
7. REFERÊNCIAS	68
ANEXOS	85
ANEXO I.....	85
ANEXO II	87
ANEXO III	88

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1 - Representação da estrutura tridimensional da lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> . A posição do íon Ca^{2+} está indicada por uma esfera na cor lilás	8
Figura 3.2 - Processo de pirólise de matérias lignocelulósicos (biomassa) e seus respectivos produtos.	11
Figura 3.3 - Diferentes métodos para imobilização de enzimas	15
Figura 3.4 - Etapas da reação de transesterificação catalisada por lipase	18
Figura 3.5 - Fatores que afetam a produção de biodiesel por transesterificação enzimática . .	21
Figura 3.6 - Processos para a produção de biodiesel por transesterificação enzimática	22
Figura 4.1 - Fluxograma das principais etapas realizadas neste trabalho.....	29
Figura 4.2 - Sistema utilizado para a pirólise composto: forno elétrico (1), Reator (2), condensador (3) e balão para coletar o bio-óleo (4).	30
Figura 4.3 - Fluxograma dos métodos de imobilização realizados neste trabalho e os respectivos locais de realização.....	32
Figura 5.1 - MEV do biochar sem tratamento (a), tratamento em mufla com KOH (b), H_3PO_4 (c), DCM (d), biochar com o tratamento em banho de ultrassom com KOH (e), H_3PO_4 (f), DCM (g), tratamento em micro-ondas com KOH (h), H_3PO_4 (i).	43
Figura 5.2 - Espectro de FTIR do biochar sem tratamento (—) e depois dos diferentes tratamentos: Mufla (a), Ultrassom (b) e Micro-ondas (c). Usando diferentes agentes químicos: DCM(—), KOH (—), H_3PO_4 (—).	44
Figura 5.3 - Microscopia eletrônica de varredura do biochar ativado com KOH em mufla (M-OH) (a), biocatalisador imobilizado por adsorção física (M-OH-LBC) (b).	47
Figura 5.4 - Espectro de FTIR para o biochar (M-OH) tratado em mufla com KOH (—) e biochar (M-OH-BC) tratado após a imobilização da LBC (—).	48
Figura 5.5 - Biochar antes do processo de silanização com ATPs (A) e após o processo de silanização com ATPs (B)	52
Figura 5.6 - Microscopia eletrônica de varredura do biochar sem silanização (a) e do biochar após silanização com ATPs (b).	52
Figura 5.7 - Conversão em ésteres etílicos utilizando o biocatalisador imobilizado por adsorção física em biochar tratado em ultrassom com diclorometano, em diferentes razões molares e tempo de reação nas diferentes temperaturas estudadas: (a) 40 °C; (b) 50 °C e (c) 60 °C.	56

Figura 5. 8 - Perfil de conversão mono (), di () e Triacilgliceróis () e de ésteres etílicos() na reação de transesterificação de óleo de coco bruto a 40 °C , 96 h e nas razões molares óleo:etanol 1:6,1:7,1:9,1:10,1:12.	59
Figura 5.9 - Perfil de conversão em ésteres etílicos na presença de 1; 2,5; 3,5; 5 e 10 % de água na reação de transesterificação de óleo de coco bruto na razão molar óleo:etanol 1:7, 40 °C e 96 h.....	61
Figura 5.10 - Perfil de conversão em ésteres etílicos na presença de 10 -60 % de terc-butanol na reação de transesterificação de óleo de coco bruto na razão molar óleo:etanol 1:7, 40 °C e 96 h.	61
Figura 5.11 - Perfil de conversão de ésteres etílicos na presença de 2,5; 5; 7,5 e 10 % de peneira molecular na reação de transesterificação de óleo de coco bruto na razão molar óleo:etanol 1:7, 40 °C e 96 h.....	62
Figura 5.12 - Cinética da reação de transesterificação enzimática assistida por ultrassom nas razões molares de óleo:etanol (1:5, 1:7, 1:9), temperatura de 40 °C e potência de 220 W.....	63
Figura 5. 13- Reutilização da LBC imobilizada em biochar por ADS em reação de transesterificação em batelada na razão molar 1:7 e 96 h de reação a 40 °C.	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 - Comparação do processo enzimático e químico (ácido e alcalino) para produção de biodiesel	Erro! Indicador não definido.
Tabela 3.2 - Resíduos agroindustriais para imobilização de enzimas	10
Tabela 3.3 - Os diferentes tipos de monoacilgliceróis e algumas de suas principais aplicações.....	19
Tabela 3.4 - Composição de ácidos graxos de óleos vegetais.	21
Tabela 3.5 - Micro-ondas aplicado para produção de biodiesel por via enzimática.	26
Tabela 3.6 - Ultrassom aplicado para produção de biodiesel por via enzimática.	27
Tabela 5.1 - Atividade hidrolítica da LBC imobilizada por adsorção física no biochar após os diferentes tratamentos.....	45
Tabela 5.2 - Avaliação dos métodos de imobilização da LBC em biochar a partir da determinação da atividade de hidrólise e rendimento de imobilização na reação de hidrólise do azeite de oliva.	49

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ADS: Adsorção Física;

BET: Método Brunauer-Emmett-Teller;

CG-MS: Cromatografia a Gás Acoplada à Espectrometria de Massas;

CLEA: Cross-Linked Enzyme Aggregates (Agregados Enzimáticos por Ligações Cruzada);

CSTR: Continuous Stirred-Tank Reactor (Reator Contínuo de Tanque Agitado);

D_p: Diâmetro de Poro;

DCM: Diclorometano

FFA: Free Fatty Acids (Ácidos Graxos Livres);

FTIR: Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier;

LBC: Lipase *Burkholderia cepacia*;

LCM: Ligação Covalente Mutipontual;

LCU: Ligação Covalente Unipontual;

M-DCM: Biochar com o Tratamento em Mufla com Diclorometano;

M-DCM-LBC: LBC Imobilizada por ADS em Biochar Tratado em Mufla com Diclorometano;

MEV: Microscopia Eletrônica de Varredura;

M-H: Biochar com o Tratamento em Mufla com Ácido Fosfórico;

M-H-LBC: LBC Imobilizada por ADS em Biochar Tratado em Mufla com Ácido Fosfórico;

MI-H: Biochar com o Tratamento em Micro-Ondas com Ácido Fosfórico;

MI-H-LBC: LBC Imobilizada por ADS em Biochar Tratado em Micro-ondas com Ácido Fosfórico;

MI-OH: Biochar com o Tratamento em Micro-ondas com Hidróxido de Potássio;

MI-OH-LBC: LBC Imobilizada por ADS em Biochar Tratado em Micro-ondas com Hidróxido de Potássio;

M-OH: Biochar com o Tratamento em Mufla com Hidróxido de Potássio;

M-OH-LBC: LBC Imobilizada por ADS em Biochar Tratado em Mufla com Hidróxido de Potássio;

PBR: Packed Bed Reactor (Reator de Leito Fixo);

PEG: Polietilenoglicol;

PFR: Plug Flow Reactor (Reator Tubular com Escoamento Uniforme);

PNPB: Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel;

U-DCM: Biochar com o Tratamento em Banho de Ultrassom com Diclorometano;

U-DCM-LBC: LBC Imobilizada por ADS em Biochar Tratado em Banho de Ultrassom com Diclorometano;

U-H: Biochar com o Tratamento em Banho de Ultrassom com Ácido Fosfórico;

U-H-LBC: LBC Imobilizada por ADS em Biochar Tratado em Banho de Ultrassom com Ácido Fosfórico;

U-OH: Biochar com o Tratamento em Banho de Ultrassom com Hidróxido de Potássio;

U-OH-LBC: LBC Imobilizada por ADS em Biochar Tratado em Banho de Ultrassom com Hidróxido de Potássio.

Capítulo 1

1. INTRODUÇÃO

A utilização de lipase imobilizada é uma alternativa promissora para o desenvolvimento de processos mais verdes. Uma vez que o uso desta enzima imobilizada como catalisadores apresentam vantagens quando comparado aos catalisadores químicos, pois as condições de reação são brandas e há redução na formação de subprodutos indesejáveis. Dentro deste contexto, há um crescente número de publicações científicas visando à utilização de biocatalisadores imobilizados em diferentes setores industriais, tais como na indústria de alimentos, cosméticos e biocombustíveis (ZHAO *et al.*, 2015; SIRISHA *et al.*, 2016)

Contudo para a substituição dos processos industriais tradicionais é necessário obter biocatalisadores imobilizados economicamente viáveis para a aplicação em escala industrial, tendo em vista o elevado custo das lipases e suportes utilizados no processo de imobilização. A partir deste cenário, há uma busca por suportes alternativos, ambientalmente amigáveis e de baixo custo como a utilização de resíduos agroindustriais tais como, sabugo de milho (RUZENDE *et al.*, 2014), talos de milho (LV *et al.*, 2013), fibra de coco (BRIGIDA *et al.*, 2008; CRISTOVÃO *et al.*, 2012).

Outra vertente que está em ascensão é o desenvolvimento de processos industriais com ciclo de vida de produtos ambientalmente sustentáveis. Os avanços tecnológicos tem permitido o aproveitamento de subprodutos de outros processos de obtenção de energias renováveis, tais como, biodiesel, bio-óleo, bioetanol e outros. Como, por exemplo, o aproveitamento da fração sólida (biochar) um subproduto originário do processo de pirólise para a produção de bio-óleo e biogás. O biochar pode ser aproveitado para adsorção de compostos orgânicos (ADEMILUYI *et al.*, 2009), fertilização dos solos (AHMAD *et al.*, 2012) e como catalisador (ZHAO *et al.*, 2018). E ainda, o biochar pode ser utilizado como suporte para imobilização de metais (REGMI *et al.*, 2012) e enzimas (GONZÁLEZ *et al.*, 2013).

Na literatura há relatos de modificações nas propriedades morfológicas e físico-química do biochar para ser utilizados como suporte e aplicado na preparação de catalisadores químicos (SHAN *et al.*, 2018; ZHAO *et al.*, 2018; WANG *et al.*, 2019). Dentre os tratamentos utilizados para a modificação do biochar pode citar-se: sulfonação (CHELLAPPAN *et al.*,

2018) e ativação química com KOH e NaOH (PILLAI *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2019). Em relação ao tratamento de biochar aplicado como suporte para preparação de biocatalisadores imobilizados ainda não foi encontrado. Entretanto há na literatura estudos que relatam o uso de suportes orgânicos tratados e/ou modificados para imobilização de enzimas, tais como, fibra de coco modificado com glutaraldeído (BRIGIDA *et al.*, 2007), fibra de coco modificado com glicidoxipropiltrimetoxisilano (CRISTOVÃO *et al.*, 2012) e fibra de algodão com polietilenoimina (ONDUL *et al.*, 2012).

Além do suporte outro fator chave para a obtenção de um biocatalisador imobilizado estável é a escolha adequada da técnica de imobilização. Existem diferentes técnicas de imobilização, tais como, adsorção física, ligação covalente, encapsulamento e ligação cruzada (CLEAs). A técnica de imobilização mais empregada é a adsorção física, pois apresenta baixo custo por não ser necessária ativação do suporte. Entretanto, não existe uma técnica universal para ser aplicada para todas as enzimas e suas várias aplicações (HOMAEI *et al.*, 2013; SIRISHA *et al.*, 2016).

Independentemente dos diversos estudos, ainda se faz necessário o estudo específico para os diferentes complexos formados entre a enzima e o suporte, bem como as condições reacionais para um melhor desempenho dos biocatalisadores imobilizados visando à obtenção máxima de produtos em um menor tempo e custo/benefício. Outro impasse para a substituição dos processos industriais tradicionais é o maior tempo de reação dos biocatalisadores imobilizados em comparação aos catalisadores químicos. Desta forma, esforços são realizados utilizando micro-ondas e ultrassom com o intuito de intensificar os processos enzimáticos, principalmente nas reações de transesterificação para a obtenção de ésteres etílicos com vista à produção de biodiesel (QUEIROZ *et al.*, 2015; MICHELIN *et al.*, 2015).

Tendo em vista a competição entre cadeia alimentícia e o elevado custo do óleo refinado, o presente estudo utilizou óleo de coco bruto para as reações de transesterificação enzimática em virtude do incentivo do governo brasileiro à pesquisa com o uso de óleo bruto. Além da elevada quantidade de ácido láurico presente no óleo de coco e a elevada produtividade de coco na região do nordeste, o qual Sergipe é considerado o terceiro maior produtor da região (JUNIOR *et al.*, 2013).

Com base nesse contexto, o foco deste trabalho foi o desenvolvimento de biocatalisadores imobilizados no biochar de semente de goiaba utilizando tratamentos

(convencionais e não convencionais) para ativação do biochar, a fim de melhorar as características físico-químicas e morfológicas para a imobilização de enzimas com diferentes protocolos. Os biocatalisadores produzidos foram testados em reações de hidrólise e transesterificação, com um enfoque na avaliação do desempenho destes na reação de transesterificação do óleo de coco bruto em etanol na obtenção de diferentes produtos (ésteres etílicos, monoacilgliceróis e diacilgliceróis).

Capítulo 2

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Imobilizar a lipase de *Burkholderia cepacia* (LBC) em biochar da semente de goiaba tratados por diferentes metodologias (convencional e não convencionais) e aplicar o biocatalisador em reação de transesterificação de óleo de coco bruto em meio contendo etanol.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito do tratamento no biochar por técnicas convencional (mufla) e não convencionais (ultrassom e micro-ondas) na presença de agentes ativadores;
- Realizar a caracterizar morfológica e físico-quimicamente o biochar ativado;
- Verificar o potencial de imobilização da lipase de *Burkholderia cepacia* (LBC) no biochar ativado por diferentes métodos de imobilização;
- Avaliar o potencial dos biocatalisadores imobilizados na reação de transesterificação de óleo de coco bruto e etanol para a síntese de ésteres etílicos por processo convencional (batelada) e não convencionais (ultrassom e micro-ondas);
- Quantificar a formação de mono, di e triacilgliceróis na reação de transesterificação de óleo de coco bruto e etanol em sistema batelada.
- Avaliar o uso de aditivos (peneira molecular, água e terc-butanol) na reação de transesterificação de óleo de coco bruto em etanol para a síntese de ésteres etílicos em sistema batelada.
- Realizar a estabilidade operacional no processo mais eficiente para a produção de ésteres etílicos.

Capítulo 3

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo será apresentada uma breve revisão bibliográfica referente aos seguintes tópicos: processos enzimáticos, lipase, tratamento de suporte, estabilização de enzimas em suportes e reação de transesterificação.

3.1 Processos enzimáticos

A demanda da sociedade por políticas públicas sustentáveis e processos industriais amigáveis ao meio ambiente, impulsiona o desenvolvimento dos processos enzimáticos (TANG e ZHAO, 2009). As enzimas são consideradas catalisadores mais eficientes, oferecendo processos muito mais competitivos em comparação com os catalisadores químicos, em virtude da redução do número de etapas de processo, quantidade de resíduos, alta especificidade e atuação em condições brandas de reação (temperatura 30 a 70 °C e pressão atmosférica) (CASTRO *et al.*, 2004; SHELDON e PELT, 2013; SINGH *et al.*, 2013; CHOI *et al.*, 2015).

Com os recentes avanços na engenharia de enzimas, engenharia metabólica e biologia sintética há um crescimento na aplicação da biocatálise em processos industriais em diferentes áreas, tais como alimentos, têxtil, farmacêutica, química fina e combustível (TRAN *et al.*, 2016). Nos últimos 10 anos houve um aumento no número de publicações científicas sobre a síntese de ésteres etílicos por via enzimática, devido às vantagens ambientais e econômicas deste processo em relação à transesterificação química (ZHAO *et al.*, 2015; TRAN *et al.*, 2016).

Baseando-se nas informações descritas, numerosos estudos abordam diferentes tipos de enzimas, em especial a lipase para a síntese de ésteres etílicos. Na Tabela 3.1 pode ser observado as Vantagens e desvantagens dos catalisadores químicos (homogêneos e heterogêneos) e o uso de enzimas imobilizadas como catalisadores (SHAN *et al.*, 2018; FONSECA *et al.*, 2019). Pode ser observado que o uso de enzimas imobilizadas apresenta vantagens quando comparado ao uso de catalisadores químicos na reação de transesterificação. Dentre as quais pode-se citar a fácil recuperação do subproduto (glicerol) e

baixo impacto ambiental. Já com o uso de catalisadores químicos heterogêneos apresenta alto impacto ambiental devido à necessidade de tratamento de água residual.

Tabela 3.1 - Vantagens e desvantagens dos diferentes catalisadores utilizados na reação de transesterificação de óleos vegetais e álcoois (Adaptado de FONSECA *et al.*, 2019).

Catalisador	Vantagens	Desvantagens
Homogêneo alcalino	Alto rendimento, baixo custo e rápida taxa de reação.	Neutralização de ácidos graxos livres (FFA), geração de águas residuais, difícil recuperação do catalisador e purificação dos produtos.
Homogêneo ácido	Alto rendimento (sob certas condições), conversão de FFA em biodiesel, baixo custo e taxa média de reação.	Corrosão de equipamentos, geração de águas residuais, catalisadores difícil recuperação e purificação dos produtos.
Heterogêneo alcalino	Alto rendimento, custo médio, taxa de reação rápida, possível reutilização e pode ser usado em processo contínuo.	Requerem alta energia, preparação tediosa de catalisador, lixiviação de catalisador e baixa área de superfície.
Heterogêneo ácido	Alto rendimento, custo médio, taxa de reação rápida, conversão de FFA em biodiesel, possível reutilização e pode ser usado em processo contínuo	Baixa concentração de locais ativos, alto custo da matéria-prima do catalisador, preparação tediosa de catalisadores e lixiviação de catalisadores.
Enzima imobilizada	Alta produtividade, conversão de FFA em biodiesel, baixa necessidade de energia, alta pureza do produto, capacidade de reutilização e pode ser usado em um processo contínuo.	Inibição por álcoois e alto custo.

3.1.2. Lipase

As lipases (EC. 3.1.1.3) pertencem ao grupo das hidrolases com capacidade de catalisar uma ampla gama de reações biocatalíticas (hidrólise de ésteres, esterificações, transesterificações, alcoólise), e atuam em uma vasta gama de meios reacionais (incluindo solventes orgânicos, líquidos iônicos ou fluidos supercríticos), bem como possuem

capacidade de reconhecerem substratos muito diferentes com elevada especificidade. (PALOMO *et al.*, 2005; TOMIC e RAMEK, 2006; MANOEL *et al.*, 2015; SÁNCHEZ *et al.*, 2017). Isso torna as lipases atraentes para diversas aplicações biotecnológicas, incluindo as indústrias de alimentos, detergentes, couro, têxtil, cosmético, papel, biocombustíveis e produtos farmacêuticos (BARBE *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2009; SÁNCHEZ *et al.*, 2017).

A lipase de *Burkholderia cepacia* (LBC) (anteriormente denominada *Pseudomonas cepacia*) é considerada como um dos biocatalisadores mais versáteis por realizar a catálise em ambos os meios aquosos e não aquosos e por apresentar uma alta especificidade a diferentes substratos, incluindo a resolução cinética de misturas racêmicas (TRODLER *et al.*, 2009; PAN *et al.*, 2010; ABDULLA e RAVINDRA, 2013; SÁNCHEZ *et al.*, 2017). A LBC é uma enzima globular com dimensão aproximada de $30 \times 40 \times 50$ Å, constituída por 320 resíduos de aminoácidos com uma massa molecular de 33 kDa (LI *et al.*, 2009).

A estrutura da LBC (Figura 3.1) é constituída por um padrão de dobramento α/β hidrolase, que consiste em β -fitas paralelas e por α -hélices e seu sitio ativo é formado pela tríade catalítica constituída por resíduos de serina, histidina e aspartato, o qual é recoberto 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 catálise, semelhante a todas as lipases (NARDINI e DIJKSTRA, 1999; PALOMO *et al.*, 2005; TRODLER *et al.*, 2009). A LBC 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 funcionar como uma alternativa para aceitação de prótons (KIM *et al.*, 1997; SCHRAG *et al.*, 1997).

Apesar das vantagens que as lipases apresentam um dos obstáculos para o desenvolvimento e aplicação de processos enzimáticos é o alto custo da enzima, baixa estabilidade operacional, difícil recuperação e reutilização da enzima. Entretanto estas desvantagens podem ser superadas com a imobilização das enzimas em suportes. Uma vez que a manipulação da enzima imobilizada em um sólido é mais conveniente do que sua forma solúvel, o que facilita a recuperação e re-uso eficiente da enzima, permitindo assim a sua

utilização, por exemplo, em operação contínua de leito fixo, bem como reduzindo os custos do processo (SHELDON e PELT, 2013; CHATTERJEE *et al.*, 2014; ZHAO *et al.*, 2015).

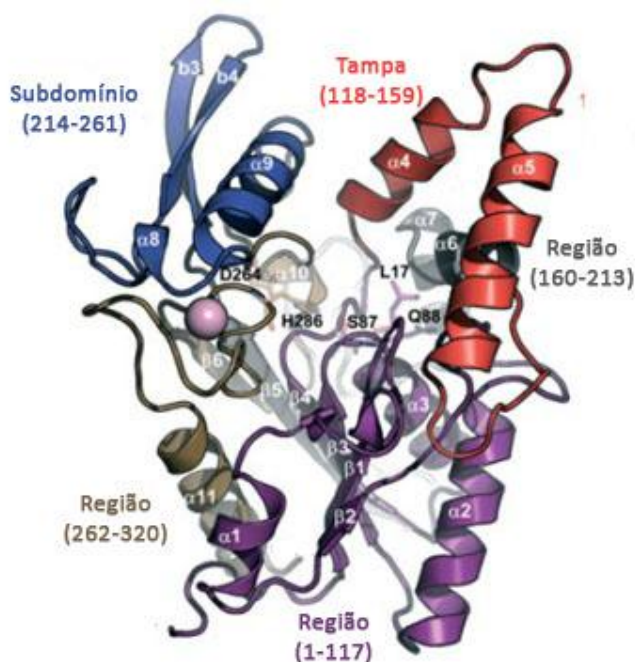


Figura 3.1 - Representação da estrutura tridimensional da lipase de *Burkholderia cepacia*. A posição do íon Ca^{2+} está indicada por uma esfera na cor lilás (Adaptado de BARBE *et al.*, 2009).

3.1.3 Estabilização de enzimas

A estabilização de enzimas surge como uma alternativa indispensável, a fim de alcançar a redução dos custos e uma maior eficiência global dos bioprocessos por meio da imobilização (ES *et al.*, 2015). De acordo com GUISÁN *et al.* (2006) a imobilização de enzimas refere-se às enzimas fisicamente confinadas ou localizadas em uma região definida do espaço com retenção de suas atividades catalíticas.

Primordialmente para se obter um biocatalisador imobilizado com propriedades favoráveis para a sua aplicação em escala industrial é a escolha do suporte, que apresente resistência mecânica e baixo custo, além da escolha adequada da técnica de imobilização que mantenha as propriedades catalíticas da enzima (ES *et al.*, 2015). As propriedades

bioquímicas, mecânicas e cinéticas do biocatalisador imobilizado resultam na interação entre a enzima e o suporte (HOMAEI *et al.*, 2013; SHELDON e PELT, 2013; CARVALHO *et al.*, 2014). A partir deste enfoque numerosos estudos abordam diferentes tipos de suportes e suas modificações físico-químicas para uma melhor interação entre a enzima e o suporte.

3.1.3.1 Suportes

As principais características a serem consideradas na seleção do suporte para a imobilização de enzimas são: resistência mecânica, química e microbiana, baixo custo de produção, ambientalmente amigável, inerte quimicamente a diferentes solventes e elevada área específica. Para a imobilização por ligação covalente a presença de grupos reativos na superfície do suporte é indispensável para realizar a funcionalização e ativação do suporte (GUISÁN *et al.*, 2006; ZUCCA e SANJUST, 2014).

Os suportes são geralmente divididos em duas classes principais: inorgânico, orgânico e recentemente suportes híbridos, os quais apresentam compostos orgânicos e inorgânicos na sua composição visando melhorar as características do suporte, como tamanho dos poros e grupos funcionais disponíveis para uma melhor interação da enzima e suporte (SILVA *et al.*, 2011). O primeiro grupo, amplamente utilizado para a imobilização de enzimas por englobar a maioria das características mencionadas, inclui alumina, sílica, argila, zeólitas e sílicas mesoporosas. Dentre estes, os suportes a base de sílica apresentam elevado potencial para a imobilização de lipases conforme relatado em diversos trabalhos na literatura, principalmente devido à possibilidade de modificação da superfície, estabilidade térmica, estabilidade mecânica e segurança toxicológica (CARVALHO *et al.*, 2013; CARVALHO *et al.*, 2014; BARBOSA *et al.*, 2014; ASHJARI *et al.*, 2015).

Os suportes orgânicos incluem principalmente polissacarídeos (como celulosas modificadas, dextrano, quitosana e agarose), os polímeros vinílicos e acrílicos (tal como de poli(álcool vinílico) e poliacrilamida) (ZUCCA e SANJUST, 2014). A busca por processos ambientalmente favoráveis e a redução dos custos no processo de imobilização de enzimas, torna o uso de resíduos agroindustriais como suporte uma alternativa promissora devido à sua grande disponibilidade e baixo custo. Na literatura é reportado o uso de resíduos agroindustriais como matriz de imobilização para amilase, invertase e lipase (Tabela 3.2). 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.

Tabela 3.1 - Resíduos agroindustriais para a imobilização de enzimas

Resíduos Agroindustriais	Enzima	Técnica de imobilização	Referência
Casca de arroz	<i>Invertase</i>	Adsorção física	D'SOUZA e GODBOLE, (2002)
Fibra de coco	Lipase de <i>Candida antarctica B</i>	Ligação covalente	BRIGIDA <i>et al.</i> (2007)
Fibra de coco	Lipase de <i>Candida antarctica B</i>	Adsorção física	BRIGIDA <i>et al.</i> (2008)
Fibra de coco	<i>Lacase</i>	Adsorção física	CRISTÓVÃO <i>et al.</i> (2011)
Fibra de coco	<i>Lacase</i>	Ligação covalente	CRISTÓVÃO <i>et al.</i> (2012)
Fibra de algodão	Lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i> e <i>Candida antarctica A</i>	Adsorção física	ONDUL <i>et al.</i> (2012)
Bagaço de cevada	<i>Lacase</i>	Adsorção física e Ligação covalente	SILVA <i>et al.</i> (2012)
Talos de milho	Lipase de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Adsorção física	LV <i>et al.</i> (2013)
Bagaço da cana-de-açúcar	Lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i>	Ligação covalente multipontual	MENDES <i>et al.</i> (2013)
Sabugo de milho	Lipase de <i>Burkholderia cepacia</i>	Adsorção física	RUZENE <i>et al.</i> (2014)
Fibra de coco	<i>Lacase</i>	Ligação covalente	BEZERRA <i>et al.</i> (2015)

Neste contexto o biochar é um subproduto rico em carbono produzido a partir da degradação térmica de matérias lignocelulósicos na ausência de oxigênio, processo denominado de pirólise, como pode ser visto na Figura 3.2 (KUPPUSAMY *et al.*, 2016). O biochar é reconhecido como um material multifuncional devido à sua variedade de aplicações, dentre as quais se destacam a remoção de poluentes orgânicos e inorgânicos de solução aquosa (RIBAS *et al.*, 2014), para melhorar a fertilidade e correção do pH do solo (ZWIETE *et al.*, 2010; LEHMANH *et al.*, 2011), como catalisadores em reação de transesterificação (WANG *et al.*, 2019; CHELLAPPAN *et al.*, 2018; ZHAO *et al.*, 2018) e imobilização de enzimas (GONZÁLEZ *et al.*, 2013).

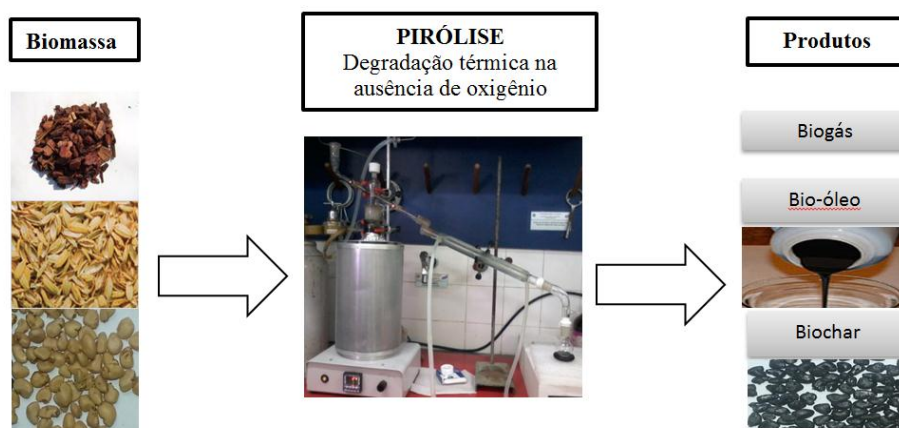


Figura 3.2 - Processo de pirólise de matérias lignocelulósicos (biomassa) e seus respectivos produtos.

Em relação à imobilização de enzimas o estudo de GONZÁLEZ *et al.* (2013) é o único encontrado na literatura. De acordo com este estudo o biochar de casca de aveia apresentou propriedades favoráveis para imobilização da lipase *Cândida rugosa*. Verificaram que na superfície do biochar há grupos hidroxilas e carboxílicos, os quais promovem a imobilização por meio da interação com o grupamento amino da enzima.

As propriedades físico-químicas do biochar dependem da matéria-prima e das condições da pirólise (taxa de aquecimento, temperatura, tempo de residência e granulometria) (ZHU *et al.*, 2015; STEFAGBNIUK e OLESZCZUK, 2015). O interesse da comunidade científica em pesquisar o biochar apresentou um crescimento exponencial, sendo a maior parte das pesquisas voltadas à aplicação do biochar, principalmente, na área de tratamento de água, alteração do solo, adsorção de metais e como base para a formação de catalisadores químicos para produção de biodiesel (ZHU *et al.*, 2015; TAN *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2019; ZHAO *et al.*, 2018).

Como destacado, uma gama de suportes estão em fase de desenvolvimento visando à obtenção de biocatalisadores estáveis e com elevada atividade catalítica, o que tem atraído o interesse da comunidade científica na busca por alternativas para a melhoria das propriedades morfológicas e físico-químicas dos suportes já existentes. Dentre estas alternativas destaca-se

o uso de aditivos durante ou após a preparação do suporte que proporciona alterações na área específica e porosidade, bem como a disponibilidade de grupamentos funcionais. Além disso, a obtenção de biocatalisadores estáveis está relacionada com a escolha das técnicas de imobilização enzimática que dependem das propriedades apresentadas na superfície dos suportes e da enzima, tais como grupos funcionais, carga iônica e grupos hidrofóbicos (CARVALHO *et al.*, 2014).

Tratamentos de suportes

Na literatura diferentes tipos de tratamento de suportes são utilizados visando à sua melhoria para a imobilização de enzimas, tais como: aditivos na etapa de modificação de suportes e uso de agentes de silanização. Alguns dos aditivos utilizados são polietilenoglicol - PEG, álcool polivinílico - PVA, caseína, gelatina, albumina de ovo ou bovina e líquidos iônicos. Os agentes silanizadores e bifuncionais utilizados são 3-aminopropiltrimetoxissilano, 3-aminopropiltriethoxissilano, 3-cloropropiltrimetoxissilano, epicloridrina, glutaraldeído, glioxal, formaldeído, glicidol e carbonildiimidazol. (CARVALHO *et al.*, 2014).

Diversos trabalhos relatam a modificação de suportes inorgânicos a base de sílica, por ser um suporte amplamente estudado e com grande capacidade de modificações em sua superfície por diferentes agentes, além da possibilidade de uso de aditivos em seu preparo. O estudo realizado por SOUZA *et al.* (2013) mostrou que o uso de diferentes líquidos iônicos como aditivos, durante o processo de encapsulamento da lipase de *Burkholderia cepacia* pela técnica sol gel apresentou maior área específica, diâmetro dos poros e rendimento de imobilização ao utilizar líquidos iônicos próticos. SOARES *et al.* (2003) compararam o uso do aditivo PEG e albumina na imobilização da lipase de *Candida rugosa* por ligação covalente em sílica silanizada e ativada com γ -aminopropiltriethóxi silano (γ -APTS) e ativada com glutaraldeído, o uso do aditivo PEG proporcionou um maior rendimento de imobilização cerca de 59 %.

Em relação às modificações em suportes orgânicos, existem poucos trabalhos na literatura. Os estudos realizados por BRÍGIDA *et al.* (2007) e CRISTOVÃO *et al.* (2012) utilizou-se glicidoxipropiltrimetoxissilano (GPTS) para o processo de silanização da fibra de coco para a imobilização, por ligação covalente, da lipase *Candida antarctica* e lacase, respectivamente, o que proporcionou a formação de ligação covalente multipontual ao utilizar

pH 10 em ambos os processos de imobilização obtendo biocatalisadores com maior estabilidade operacional mantendo 50 % da atividade inicial após 10 ciclos. ONDUL *et al.* (2012) realizaram um revestimento com polietilenoimina na fibra de algodão para posterior imobilização por adsorção seguida de ligação cruzada com glutaraldeído das lipases de *Cândida antarctica* A (CALA) e *Thermomyces lanuginosus* (TL).

A literatura não apresenta modificações na superfície do biochar visando à imobilização de enzimas, entretanto as propriedades do biochar (por exemplo, área de específica, tamanho de poro, massa molecular, hidrofobicidade, polaridade e grupos funcionais) podem ser modificadas por meio de tratamento de ativação química ou física (TAN *et al.*, 2016; SHIM *et al.*, 2015).

Diversos estudos relatam a utilização do biochar oriundo de diferentes materiais lignocelulósicos como semente de goiaba (RAHMAN e SAAD, 2003), semente de girassol (FOO e HAMEED, 2011a), bambu (ADEMILUYI *et al.*, 2009; FAN *et al.*, 2010), casca de amendoim (IDRIS *et al.*, 2012), cascas de nozes (KLASSON *et al.*, 2009), semente de azeitona (STAVROPOULOS e ZABANIOTOU, 2005), casca de arroz (FOO e HAMEED, 2011b), casca de coco (FOO e HAMEED, 2012a), casca de jaca (FOO e HAMEED, 2012b), casca de abacaxi (FOO e HAMEED, 2012c), serragem (FOO e HAMEED, 2012d) e palha de trigo (MAO *et al.*, 2015) como precursores para a produção de carvão ativado.

O tratamento de ativação do biochar para a produção de carvão ativado pode ser classificado como: ativação física ou ativação química. Na ativação física, o precursor (resíduos lignocelulósicos) é tratado termicamente numa atmosfera inerte e a ativação do produto sólido residual (biochar) é realizada em temperaturas elevadas (900 - 1000 °C), na presença de gases oxidantes como dióxido de carbono (PEREIRA *et al.*, 2014). O processo de ativação química pode ser realizado por métodos de ativação de uma ou duas etapas. No método de ativação química de uma etapa, o precursor é impregnado com agentes químicos, tais como hidróxido de potássio, hidróxido de sódio, carbonato de sódio, cloreto de magnésio, ácido fosfórico e cloreto de zinco e o material impregnado é tratado termicamente sob atmosfera inerte (TAN *et al.*, 2016; SHIM *et al.*, 2015).

A ativação em duas etapas envolve a carbonização do precursor seguido pela ativação do carvão resultante na presença de agentes químicos (hidróxido de potássio, hidróxido de

sódio, carbonato de sódio) (HADOUNA *et al.*, 2013). Além de apresentar algumas vantagens em relação à ativação física, como menor temperatura e tempo de tratamento e carvões ativados com elevada área específica (PEREIRA *et al.*, 2014).

Recentemente as pesquisas estão voltadas para buscar alternativas de aquecimento para a preparação de carvão ativado, com o intuito de reduzir o tempo de preparação e o consumo de energia (FOO e HAMEED 2011b). O aquecimento por micro-ondas vem sendo amplamente estudado, uma vez que o tempo necessário para a ativação é reduzido tornando-se mais eficiente em termos energéticos do que o método convencional de aquecimento por utilizar menos energia (MAO *et al.*, 2015). Embora o aquecimento por micro-ondas seja hoje uma técnica madura que encontra larga aplicação em ciência dos materiais, processamento de alimentos e química analítica, existem relativamente poucos estudos sobre o preparação de carvão ativado por aquecimento por micro-ondas (FOO e HAMEED 2011b).

Grande parte dos estudos realizados na preparação de carvão ativado está voltada para a remoção de poluentes (orgânicos e inorgânicos) de soluções aquosas e como suporte para preparação de catalisadores químicos aplicados na produção de biodiesel. ADEMILUYI *et al.* (2009) estudaram a remoção de poluentes orgânicos de efluentes industriais com carvão ativado em mufla proveniente da ativação com ácido clorídrico (0,1M) do biochar de bambu, no qual verificaram uma boa capacidade de adsorção de cerca de 62 % dos contaminantes orgânico. No estudo de STAVROPOULOS e ZABANIOTOU (2005) foi produzido carvão ativo a partir de semente de azeitona com ativação química utilizando KOH como agente de ativação, temperatura de ativação de 800 e 900 °C em diferentes tempos (1-4 h). Os resultados indicaram que o carvão ativado apresentou uma maior capacidade de adsorção do corante azul de metileno e área específica em relação ao carvão ativado comercial.

MARDHIAH *et al.* (2017) avaliaram o uso de biochar de pinhão-mansão (*Jaropha curcas*) como catalisador ácido tratado com ácido sulfúrico aplicado em reação de esterificação de óleo de pinhão-mansão (*Jaropha curcas*) e metanol. A conversão máxima foi de 99,13 % na razão molar de óleo:metanol de 1:12, 7,5 % em peso de catalisador, 60° e 60 min de tempo de reação. PILLAI *et al.* (2018) desenvolveram catalisadores básicos de KOH e NaOH utilizando biochar de poldas de *Albizia Lebbeck* ativado com ácido sulfúrico e bicarbonato de sódio para produção de biodiesel a partir de óleo de sementes de borracha.

Verificou-se que o rendimento máximo de 97,2 % foi obtido para a proporção de catalisador de 3:1,6:1,4 (KOH: NaOH: biochar ativado).

WANG et al. (2018) estudaram a produção de catalisador de oxido de cálcio utilizando o biochar ativado com KOH oriundo de turfa para ser aplicado em reação de transesterificação de óleo de dendê em metanol. O melhor desempenho foi para o catalisador preparado a 30 % (m/m) de oxido de cálcio e 700 °C de calcinação, o qual foi obtido 93 % de conversão de ésteres metílicos nas seguintes condições: 5 % (m/m) de catalisador, razão molar óleo/metanol de 1:8 e tempo de reação de 150 min. Concluindo que o biochar ativado de turfa apresenta propriedades favoráveis como suporte para a preparação de catalisadores químicos.

Com base nestes estudos verifica-se que há uma variedade de técnicas que podem ser utilizadas visando à melhoria das propriedades morfológica e físico-química dos diferentes suportes, o qual irá influenciar na escolha da técnica de imobilização de enzimas, uma vez que as interações entre os grupos funcionais presentes no suporte com os grupos reativos presentes na superfície da enzima determinará a melhor técnica para a imobilização e sua estabilidade.

3.1.3.2 Técnicas de imobilização

As técnicas de imobilização de enzimas podem ser divididas em três categorias: ligação a um suporte (adsorção física ou ligação covalente), encapsulamento e ligação cruzada (CLEAs) (Figura 3.3) (SHELDON e PELT, 2013; HOMAEI *et al.*, 2013).

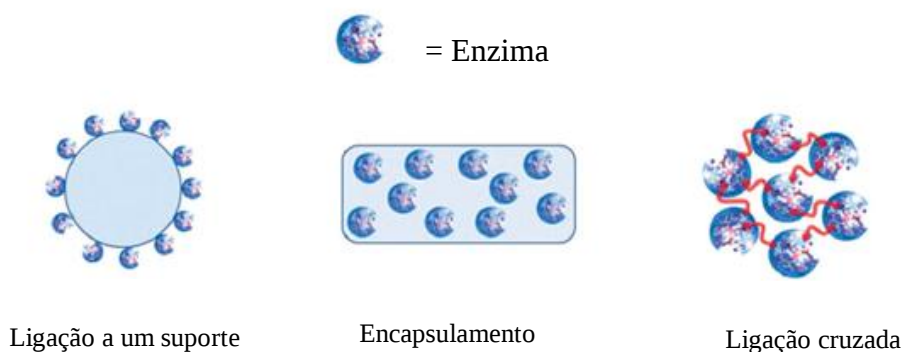


Figura 3.3 - Diferentes métodos para imobilização de enzimas (Adaptado de SHELDON e PELT, 2013).

A ligação da enzima ao suporte por adsorção física ocorre por interações hidrofóbicas, interações eletrostáticas, ligações de hidrogênio e de van der Waals, em geral é relativamente fraca e a não especificidade das interações podem levar à lixiviação da enzima resultante das alterações reacionais (pH, temperatura, e força iônica), que por sua vez resulta em perda de atividade com o tempo. Sugerindo assim, a aplicação de enzimas fisicamente adsorvida principalmente em ambientes hidrofóbicos (HOMAEI *et al.*, 2013; ZUCCA e SANJUST, 2014; ES *et al.*, 2015). Entretanto, adsorção física é a técnica mais utilizada devido à sua simplicidade e o baixo custo. Além de manter elevada atividade catalítica e permitir a reutilização do suporte uma vez que as interações são reversíveis, o que implica em vantagens econômicas para produções industriais (ES *et al.*, 2015).

A ligação covalente da enzima ao suporte é considerada mais forte, a qual minimiza a lixiviação da enzima da superfície do suporte em meio aquoso, que ocorre a formação de múltiplas ligações covalentes entre a enzima e o suporte, reduzindo a flexibilidade conformacional e evitando o desdobramento da enzima e a sua desnaturação (HANEFELD *et al.*, 2009). A ligação covalente se dá por meio da interação entre os resíduos das cadeias laterais dos aminoácidos da enzima como arginina, ácido aspártico, histidina e os grupos reativos do suporte como epóxi ou aldeído (DATTA *et al.*, 2013).

Uma das desvantagens apresentada pela ligação covalente é a necessidade da modificação química do suporte, com inserção de grupos reativos no suporte (NH₂, OH, COOH) capazes de reagir covalentemente com a enzima, por meio de agentes silanizadores e bifuncionais, tais como 3-aminopropiltrimetoxissilano, 3-aminopropiltriethoxissilano, 3-cloropropiltrimetoxissilano, epícloridrina, glutaraldeído, glioxal, formaldeído, glicidol, carbonildiimidazol, o que eleva o custo do processo de imobilização (CARVALHO *et al.*, 2014). Dentre os grupos reativos utilizados para a ativação do suporte está o aldeído que pode ser facilmente ligado com o grupo amina presente no resíduo de lisina da enzima. Onde a imina formada pode subsequentemente ser reduzida (NaBH₄), assegurando a imobilização irreversível (HANEFELD *et al.*, 2009; ZUCCA e SANJUST, 2014).

No geral, as enzimas imobilizadas covalentemente podem ser utilizadas em qualquer meio, enquanto as enzimas adsorvidas devem ser aplicadas em meios contendo solventes orgânicos ou em reagentes hidrofóbicos para evitar a lixiviação. Por outro lado, a ligação

covalente tem a desvantagem de ser irreversível, tanto a enzima e o suporte são inutilizados na maioria dos casos (HANEFELD *et al.*, 2009).

O encapsulamento não influencia negativamente na estrutura da enzima por reter a enzima no interior de uma matriz polimérica, tipicamente matrizes de polímeros orgânicos ou inorgânicos, tais como poliacrilamida e sílica sol-gel. A matriz é geralmente formada durante a própria imobilização, sendo a técnica sol-gel a mais utilizada, e consistindo em dois processos simultâneos: condensação dos precursores de sílica para formação da rede porosa de sílica e a encapsulação aleatória da enzima. Apesar da porosidade apresentada na matriz a difusão do substrato para a enzima pode ser restringida a depender do tamanho dos poros do suporte, do substrato e da conformação da enzima e seu sítio ativo durante a imobilização (HANEFELD *et al.*, 2009; SHELDON e PELT, 2013; CARVALHO *et al.*, 2014; NIGAM *et al.*, 2014).

A formação de agregados reticulados de enzima (CLEAs) é uma técnica que envolve uma única etapa simplificada do processo de imobilização. Os CLEAs são agregados de enzimas formados por precipitação física com sais inorgânicos ou solventes orgânicos. A enzima é precipitada com a ajuda de sais inorgânicos como sulfato de amônio, que comprimem a camada de solvatação e aumenta a interação enzima-enzima. Estes precipitados agregados são então reticulados com o auxílio de agentes, tais como glutaraldeído, que é um agente bifuncional reativo, capaz de reagir com os grupos amino da superfície da enzima (NIGAM *et al.*, 2014).

No entanto, não há nenhum método e suporte padrão para todas as enzimas e as suas várias aplicações, em razão das diferentes características químicas e composição das enzimas, as diferentes propriedades dos substratos e produtos. No entanto, todos os métodos podem apresentar um número de vantagens e desvantagens. A adsorção é simples, barata, e eficaz, mas frequentemente reversível; ligação covalente e CLEAs são eficazes e duráveis, mas são caros e facilmente afetam o desempenho da enzima e os problemas difusionais são inerentes ao encapsulamento (HOMAEI *et al.*, 2013).

Na literatura os diferentes biocatalisadores imobilizados a partir de várias técnicas de imobilização já foram utilizados em diversas aplicações, contudo o sistema lipase imobilizada em biochar ainda não foi testado em reação de transesterificação.

3.2 Reação de transesterificação

A reação de transesterificação é o método mais empregado para a produção de ésteres alquílicos de ácidos graxos (biodiesel) que ocorre na presença de óleo vegetal ou gordura animal e um álcool de cadeia curta (etanol ou metanol) na presença de um catalisador (enzimático ou químico) ou em condições supercríticas. Conforme apresentado na Figura 3.4., a reação de transesterificação enzimática ocorre em três etapas: os triacilgliceróis (óleo vegetal ou gordura animal) são convertidos em diacilgliceróis, em seguida, a monoacilgliceróis e finalmente em glicerol, cada etapa produz um mol de éster. A fim de favorecer a formação de ésteres é necessário o excesso de álcool, uma vez que a estequiometria da reação de transesterificação requer 3 mol de álcool para 1 mol de triacilgliceróis para a produção de 3 mol de ésteres e 1 mol de glicerol (GOG *et al.*, 2012; SANDOVAL *et al.*, 2017).

Portanto, após a reação de transesterificação o meio reacional pode apresentar os intermediários (monoacilgliceróis e diacilgliceróis) e os produtos (ésteres e glicerol). Os intermediários formados apresentam valor agregado para insumo industrial, uma vez que os monoacilgliceróis são surfactantes não iônicos amplamente utilizados nas indústrias farmacêuticas, de alimentos e de cosméticos. Na Tabela 3.3 são apresentados os diferentes tipos de monoacilgliceróis e algumas de suas principais aplicações (FREITAS *et al.*, 2008).

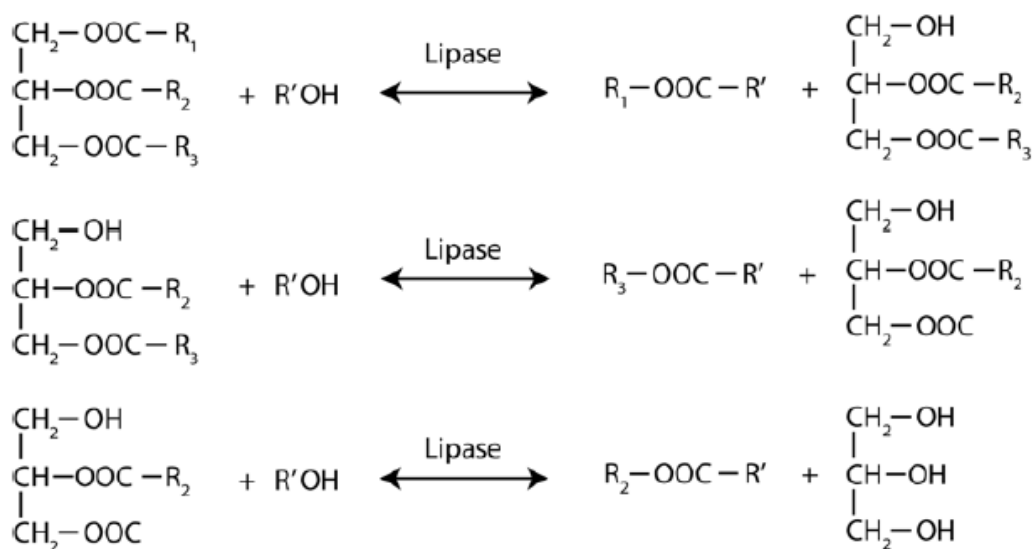


Figura 3.4 - Etapas da reação de transesterificação catalisada por lipase (Adaptado SANDOVAL *et al.*, 2017).

Tabela 3.2 - Os diferentes tipos de monoacilgliceróis e algumas de suas principais aplicações (FREITAS *et al.*, 2008).

MONOACILGLICERÓIS	APLICAÇÕES
<i>Monoacilgliceróis dos ácidos EPA e DHA</i>	Previnem efeitos danosos em pessoas que possuem desordens vasculares
<i>Monopentanoglicerol</i>	Tratamento de cabelos
<i>Monocaprina</i>	Possue propriedades antivirais, bacteriana e microbiana sendo utilizada em emulsões para mucosa bucal, reduzindo os prejuízos causados por bactérias como <i>Candida albicans</i> , que se aloja entre a gengiva e os dentes (principalmente nas dentaduras)
<i>Monolaurina</i>	Possui propriedades antivirais, bacteriana, protozoal e microbiana. Em medicamentos é usada para destruir a gordura revestida de viroses como, por exemplo, HIV e Herpes A monolaurina também é usada como um dos principais agentes penetrantes para aplicações em membranas mucosas, onde reduz o tempo necessário para o início da ação da droga, aumenta a quantidade da droga penetrante e causa menor ou nenhum efeito deletério à membrana mucosa
<i>Monooleína</i>	Utilizada como sistema de liberação de drogas, carregador farmacêutico e emulsificante
<i>Aracdonato de monoglicerila</i>	Ligante endógeno receptor de canabinóides nos tecidos cerebrais e intestinais
<i>Acetato de monoglicerila</i>	Pode melhorar a qualidade das gorduras, como, por exemplo, a margarina

Os diacilgliceróis (DAG) apresentam características emulsificantes semelhantes aos MAG e muitas vezes são usados juntamente com os monoacilgliceróis como emulsificante e estabilizante para as indústrias de alimentos, medicamentos e cosméticos (SONG *et al.*, 2012; BABICZ *et al.*, 2010). Além disso, os DAG têm atraído interesse devido às suas propriedades nutricionais benéficas, pois um óleo rico em DAG pode ser incorporado na dieta humana, uma vez que são facilmente utilizados pelo organismo como fonte de energia, quando comparado a óleos ricos em triacilgliceróis que, em excesso no organismo, são estocados em forma de gordura localizada, sendo assim o óleo rico em DAG é utilizado como óleo de cozinha funcional (GONÇALVES *et al.*, 2012; JIN *et al.*, 2011).

Industrialmente, MAG e DAG são produzidos por meio da interesterificação de triacilgliceróis com glicerol (glicerólise), a altas temperaturas (>200 °C), na presença de

catalisadores inorgânicos (Ca(OH)_2 , NaOH) (FREGOLENTE *et al.*, 2009; GHATTAS *et al.*, 2014). Em virtude das temperaturas elevadas utilizadas no processo há formação de subprodutos indesejáveis acarretando cor escura e odor desagradável ao óleo. Esta reação produz uma mistura que contém cerca de 35-60 % de monoacilgliceróis, 35-50 % de diacilgliceróis, 1-20 % de triacilgliceróis, 1-10 % de ácidos graxos livres, e o sal de metal alcalino resultante (FREITAS *et al.*, 2008; FREGOLENTE *et al.*, 2009).

Tendo em vista a política e as exigências da sociedade para o desenvolvimento de processos industriais verdes, os processos enzimáticos tem atraído grande interesse da comunidade científica com um crescimento exponencial na última década, impulsionada pelos avanços nas áreas de engenharia enzimática, engenharia metabólica e biologia sintética (TANG e ZHAO, 2009; SHELDON e PELT, 2013).

Em relação à produção de ésteres alquílicos de ácidos graxos (biodiesel) via transesterificação enzimática, ANTCZAK *et al.* (2009) apresentam alguns fatores cruciais que afetam a produtividade, tais como: a escolha adequada da matéria-prima, o processo de imobilização da enzima para uma melhor estabilidade e eficiência catalítica, seguido dos chamados parâmetros secundários, tais como seleção do solvente orgânico, otimização da razão molar do solvente, temperatura, atividade da água, pH do microambiente da enzima e a concentração de glicerol admissível na reação, como pode ser visto no fluxograma (Figura 3.5).

Em relação à matéria-prima o óleo de coco bruto surge como uma alternativa promissora para a produção de biodiesel, uma vez que apresenta um elevado percentual de ácidos graxos saturados de cadeia curta, principalmente o ácido láurico que corresponde a cerca de 50 % da sua composição (NITBANI *et al.*, 2016). De acordo com MICHELIN *et al.* (2015) ácidos graxos de cadeia curta apresentam um melhor desempenho na produção de biodiesel por transesterificação enzimática por interagir de maneira mais eficiente com o receptor acilo e o biocatalisador. A Tabela 3.4 apresenta a composição de ácidos graxos presentes em diferentes óleos vegetais.

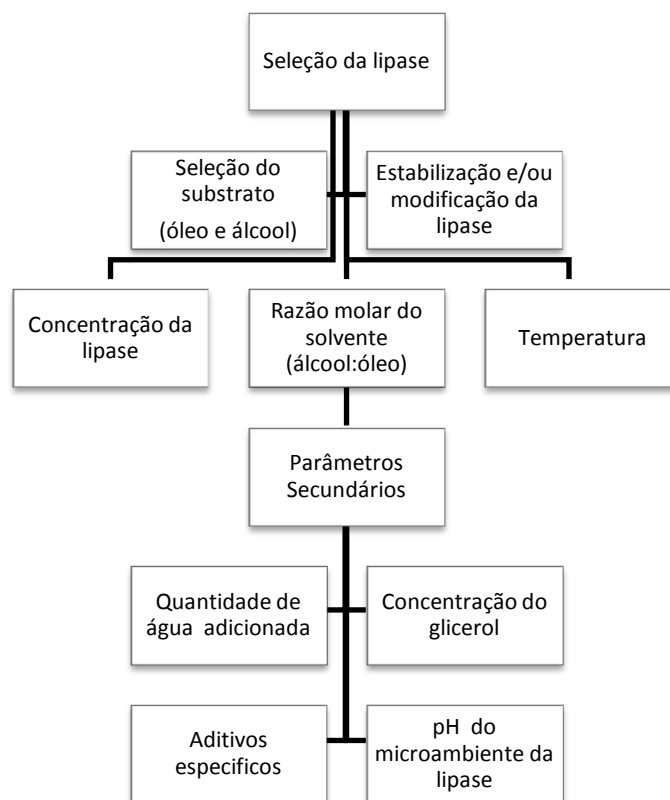


Figura 3.5 - Fatores que afetam a produção de biodiesel por transesterificação enzimática (Adaptado ANTCZAK *et al.*, 2009).

Tabela 3.3 - Composição de ácidos graxos de óleos vegetais (Adaptado KARMAKAR *et al.*, 2010).

Ácidos graxos (%)	Óleo de coco	Óleo de soja	Óleo de girassol	Óleo de <i>Jatropha</i>
Caprílico(C8:0)	5,0-9,0	-	-	-
Cáprico(C10:0)	6,0-10,0	-	-	-
Láurico(C12:0)	44,0-52,0	-	-	-
Mirístico(C14:0)	13,0-19,0	<0,5	<1,0	0,5-1,4
Palmítico(C16:0)	8,0-11,0	7-11	3,0-6,0	12,0-17,0
Esteárico(C18:0)	1,0-3,0	2,0-6,0	1,0-3,0	5,0-9,5
Oléico(C18:1)	5,0-8,0	19,0-34,0	14,0-35,0	37-63
Linoléico(C18:2)	0-1,0	43,0-56,0	44,0-75,0	19-41

O Brasil é o quarto maior produtor mundial de coco e a região nordeste tem uma elevada representatividade na produção nacional, em que o estado de Sergipe é considerado o terceiro maior produtor de coco, estando atrás apenas da Bahia e Ceará (JUNIOR *et al.*, 2013). Vale ressaltar que o óleo de coco pode ser produzido a partir do

resíduo da produção de coco ralado e leite de coco, desta forma não competiria com a produção de alimentos tornando-se uma matéria-prima promissora para a produção de biodiesel no Brasil. Além de promover o desenvolvimento socioeconômico da região produtora de coco devido à geração de emprego e renda (COSTA-SILVA *et al.*, 2017).

Com base nesse cenário o grupo de pesquisa o qual esse trabalho está inserido aprovou na seleção pública de Projetos de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação voltados para a cadeia produtiva do biodiesel no edital 40/2013 MCTI/CNPq, o projeto para produção enzimática de biodiesel a partir do óleo de coco bruto, sendo então selecionado para o presente estudo.

Concomitantemente aos estudos destes fatores está o desenvolvimento de tecnologia visando à viabilidade econômica para a produção de biodiesel por via enzimática para os mais diferentes óleos brutos e refinados, com o uso de diferentes configurações de reatores (batelada ou contínuo), técnicas não convencionais (micro-ondas e ultrassom) como pode ser visto no esquema mostrado na Figura 3.6.

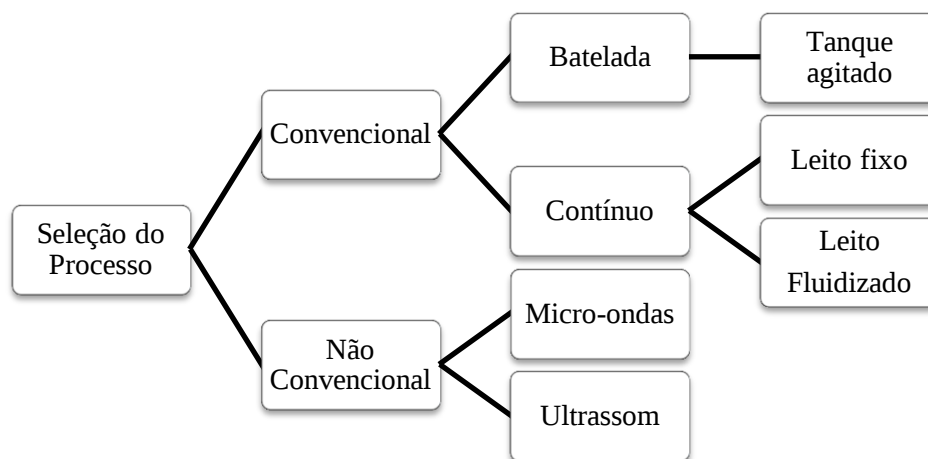


Figura 3.6 - Processos para a produção de biodiesel por transesterificação enzimática (Adaptado de MEUNIER *et al.*, 2015; MICHELIN *et al.*, 2015; CHEN *et al.*, 2016).

3.2.1 Processos convencionais

Diferentes configurações de reação e reatores são relatados na literatura com o intuito de reduzir os custos operacionais e melhorar a produção de biodiesel por transesterificação enzimática. Os reatores podem operar em batelada no qual não há entrada nem saída de reagentes ou produtos durante a reação, ou podem operar em fluxo contínuo em reator de

tanque agitado (*Continuous-Stirred Tank Reactor_CSTR*), reator tubular com escoamento uniforme (*Plug-Flow Reactor_PFR*) e reator de leito fixo (*Packed Bed Reactor _PBR*) (FOGLER, 2002). Os reatores mais estudados em reação de transesterificação enzimáticas são os de tanque agitado (CSTR) no qual a enzima (livre ou imobilizada) é dispersa na reação por agitação e de leito recheado (PBR) no qual a enzima imobilizada é empacotada em uma coluna (GOG *et al.*, 2012; CHRISTOPHER *et al.*, 2014).

O reator CSTR é o tipo mais simples, consiste de um reator e uma hélice, apresenta como vantagem a facilidade de construção, operação e manutenção, entretanto os biocatalisadores imobilizados podem sofrer danos mecânicos, o que pode reduzir a reutilização do catalisador e afetar a viabilidade econômica do processo (XU *et al.*, 2012; GOG *et al.*, 2012; MEUNIER *et al.*, 2015). O sistema contínuo do reator CSTR apresenta vantagem em relação ao reator de batelada, pois não é necessário esvaziar, limpar e recarregar o reator antes de uma nova reação, uma vez que biocatalisador é mantido no sistema com a utilização de um filtro na saída do reator (CHRISTOPHER *et al.*, 2014).

Já o reator PBR reduz o nível de tensão de cisalhamento das partículas do biocatalisador e permite a operação contínua. No entanto, os reatores PBR podem ser limitados por uma elevada queda de pressão através do leito ou da obstrução do biocatalisador pela acumulação do glicerol na parte inferior do reator, o que diminui a eficiência catalítica. Contudo vários trabalhos na literatura relataram aplicações promissoras utilizando reatores PBR em diferentes configurações com reatores em série, remoção intermediária de glicerol e com adição de solventes para reduzir a viscosidade da mistura reacional (XU *et al.*, 2012; GOG *et al.*, 2012; MEUNIER *et al.*, 2015).

No estudo realizado por MEUNIER *et al.* (2015) foi avaliado a transesterificação da trioleína num reator de leito recheado (PBR) com volume de 13,4 cm³ comparando dois biocatalisadores, Novozym 435 e a Lipase PS “Amano” SD imobilizada em Celite (CSG) visando à obtenção de ésteres de oleato de metila. Verificaram que a vazão do substrato influenciou significativamente na conversão do éster e o máximo de conversão obtida foi de 83 e 59 % para o biocatalisador (CSG) e Novozym 435, respectivamente, ao utilizar a maior vazão (20 mL/min). Esse resultado foi atribuído à remoção do glicerol na coluna ao utilizar uma maior vazão no sistema uma vez que a presença do glicerol limita o acesso da trioleína

com o sítio ativo da enzima. Este mesmo processo foi utilizado por MEUNIER *et al.* (2014) em reator batelada na temperatura de 40 °C e razão molar 5:1 (metanol:trioleína) e o máximo de conversão obtida foi de 62 e 8 % para o biocatalisador CSG e Novozym 435, respectivamente, ao utilizar o reator de leito fixo apresentou maior conversão em éster.

Outra vertente que tem despertado o interesse de muitos pesquisadores são os estudos relacionados à transesterificação enzimática com a utilização de tecnologias não convencionais, tais como aquecimento por micro-ondas e ultrassom. Com o intuito de redução do tempo de reação e aumento das taxas de conversão em éster.

3.2.2 Processos não convencionais

O uso de micro-ondas é estabelecido como uma fonte eficiente de aquecimento para uma variedade de reações químicas, em que elevados rendimentos e seletividade da reação podem ser alcançados em tempos reduzidos de reação (SHINDE e YADAV, 2014; CHEN *et al.*, 2016). De acordo com YADAV *et al.* (2015), a irradiação do micro-ondas em biosistemas não tem praticamente nenhum efeito sobre a energia de ativação ou tem apenas efeito moderado em poucos casos, reduz o tempo de reação em relação ao aquecimento convencional, e a absorção de energia faz com que os grupos funcionais envolvidos na reação apresentem uma maior reatividade em relação a incubação à mesma temperatura em aquecimento convencional.

Os dois importantes fatores que têm contribuição significativa no efeito do micro-ondas nos catalisadores enzimáticos são: (i) propriedades di-elétrica, e (ii) polaridade do meio de reação. O uso de micro-ondas para a produção de biodiesel por transesterificação enzimática não está totalmente estabelecido, mas estudos recentes demonstram que o uso de aquecimento por micro-ondas promove um aumento na conversão e redução no tempo de reação quando comparado com o aquecimento convencional (YADAV *et al.* 2015). Na Tabela 3.5 são apresentados os estudos que verificaram a influência do aquecimento não convencional por micro-ondas em reações de transesterificação enzimática.

O uso do ultrassom na reação de transesterificação enzimática poderá contribuir para uma mistura mais homogênea do substrato e facilitar assim a dispersão da enzima no substrato, reduzindo aglomeração de modo que a taxa de reação não diminua com o aumento da concentração da enzima. Além disso, como a síntese enzimática de biodiesel é muito mais

lenta do que a transesterificação química, a irradiação de ultrassom surge como uma alternativa viável para aumentar a velocidade da reação, a fim de tornar possível sua aplicação na produção de biodiesel por via enzimática em escala industrial (MICHELIN *et al.*, 2015). Na Tabela 3.6 estão alguns trabalhos encontrados na literatura utilizando o ultrassom para produção de biodiesel por via enzimática.

A partir da análise dos trabalhos disponíveis na literatura consultada, nota-se que, praticamente, não há relatos da aplicação de transesterificação de óleo de coco bruto assistido por micro-ondas ou ultrassom com enzimas imobilizadas em biochar de semente de goiaba. Este fato justifica o presente trabalho.

Tabela 3.4 - Micro-ondas aplicado para produção de biodiesel por via enzimática.

Potência	Matéria-prima	Biocatalisador/ Carregamento (%) (v/v)	Álcool	Razão molar (óleo:álcool)	Temperatura (°C)	Rendimento global (%) / tempo (h)	Referência
-	Óleo de macaúba	Novozym 435/ 2,5	Etanol	1:9	30	45/ 0,25	NOGUEIRA <i>et al.</i> (2010)
8 - 15 W	Sebo de bovino	Lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> imobilizada em sílica-PVA/ 20	Etanol	1:6	50	95/ 6	DA RÓ'S <i>et al.</i> (2012)
8 - 15 W	Óleo de dendê	Lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> imobilizada em sílica-PVA/ 20	Etanol	1:8	43	97/ 12	DA RÓ'S <i>et al.</i> (2013)
80 - 100 W	Óleo de babaçu	Lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> imobilizada em sílica-PVA/ 20	Etanol	1:12	50	100/ 10	DA RÓ'S <i>et al.</i> (2014)
50 W	Óleo de soja	Novozym 435/ 3,36	Etanol	1:3	60	99 / 3	QUEIROZ <i>et al.</i> (2015)

Tabela 3.5 - Ultrassom aplicado para a produção de biodiesel por via enzimática.

Frequência / potência	Matéria-prima	Biocatalisador/ Carregamento (%) (v/v)	Álcool	Razão molar (Óleo:Álcool)	Temperatura (°C)	Rendimento (%) / tempo (h)	Comentários	Referência
28 kHz/ 100 W	Óleo residual de fritura (elevada acidez)	Novozym 435/8	Propanol	1:3	45	95 / 1,6		WANG <i>et al.</i> (2007)
40 kHz/ 250 W + 50 rpm	Óleo de soja	Novozym 435/6	Metanol	1:6	40	96 / 4	Adição de álcool amílico terciário (1:1)	YU <i>et al.</i> (2010)
24 kHz/ 200 W	Óleo de pinhão- manso	Lipase A. <i>aerogenes</i> <i>imobilizada em</i> <i>sílica/-</i>	Metanol	1:4	-	84 / 0,5	Ultrassom de ponteira em ciclos de 0,7 s	KUMAR <i>et al.</i> (2011)
37 kHz/100 W	Óleo de soja	Lipozyme RMIM/13	Etanol	1:3	60	86 / 4		BATISTELLA <i>et al.</i> (2012)
25 kHz/ 200 W + 100 rpm	Óleo residual de fritura	Novozym 435/10	Carbonato de dimetilo	1:6	60	87 / 4		GHARAT e RATHOD, (2013)
40 kHz/ 132 W	Óleo de macaúba	Novozym 435/20	Etanol	1:9	75	70 / 0,5		MICHELIN <i>et al.</i> (2015)

Capítulo 4

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo serão apresentados os principais materiais e metodologias empregadas neste estudo para a ativação do biochar, imobilização de lipase em biochar e as reações de transesterificação, bem como os métodos analíticos empregados na caracterização dos biocatalisadores imobilizados e do biochar.

4.1 Materiais

A lipase microbiana de *Burkholderia cepacia* (LBC) foi adquirida da Sigma-Aldrich com atividade hidrolítica de 2500 U/g enzima (pH 7,0) determinada por reação de hidrólise (descrita no item 4.2.4). As sementes de goiaba foram cedidas pela indústria de polpa de frutas (POMAR), localizada na cidade de Aracaju/SE. Os outros reagentes utilizados foram: hexano P.A. 99 % (Synth, Brasil); polietilenoglicol (PEG 1500, Synth); epicloridrina (EPI) (Sigma-Aldrich); 3- aminopropiltrietoxissilano (ATPS) (Sigma-Aldrich); glicidol (Sigma-Aldrich) e glutaraldeído 50 % (Sigma-Aldrich); Hidróxido de potássio (Vetec, Brasil); ácido fosfórico (Vetec, Brasil); e diclorometano (Vetec, Brasil). O substrato utilizado para as reações de hidrólise foi o azeite de oliva comercial extra virgem com baixa acidez (Carbonell), goma arábica em pó pura (Synth, Brasil). O óleo de coco bruto foi adquirido em mercado local. Todos os outros reagentes utilizados foram de grau analítico.

4.2 Metodologia

As etapas realizadas neste estudo estão resumidamente apresentadas no fluxograma (Figura 4.1). Primeiramente foi determinado o melhor tratamento do biochar para a imobilização por adsorção física da LBC em relação à atividade hidrolítica, em seguida foram testados diferentes métodos de imobilização, em seguida com o biocatalisador imobilizado mais eficiente foi selecionado e aplicado em reações de transesterificação de óleo de coco bruto por métodos convencionais e não convencionais.

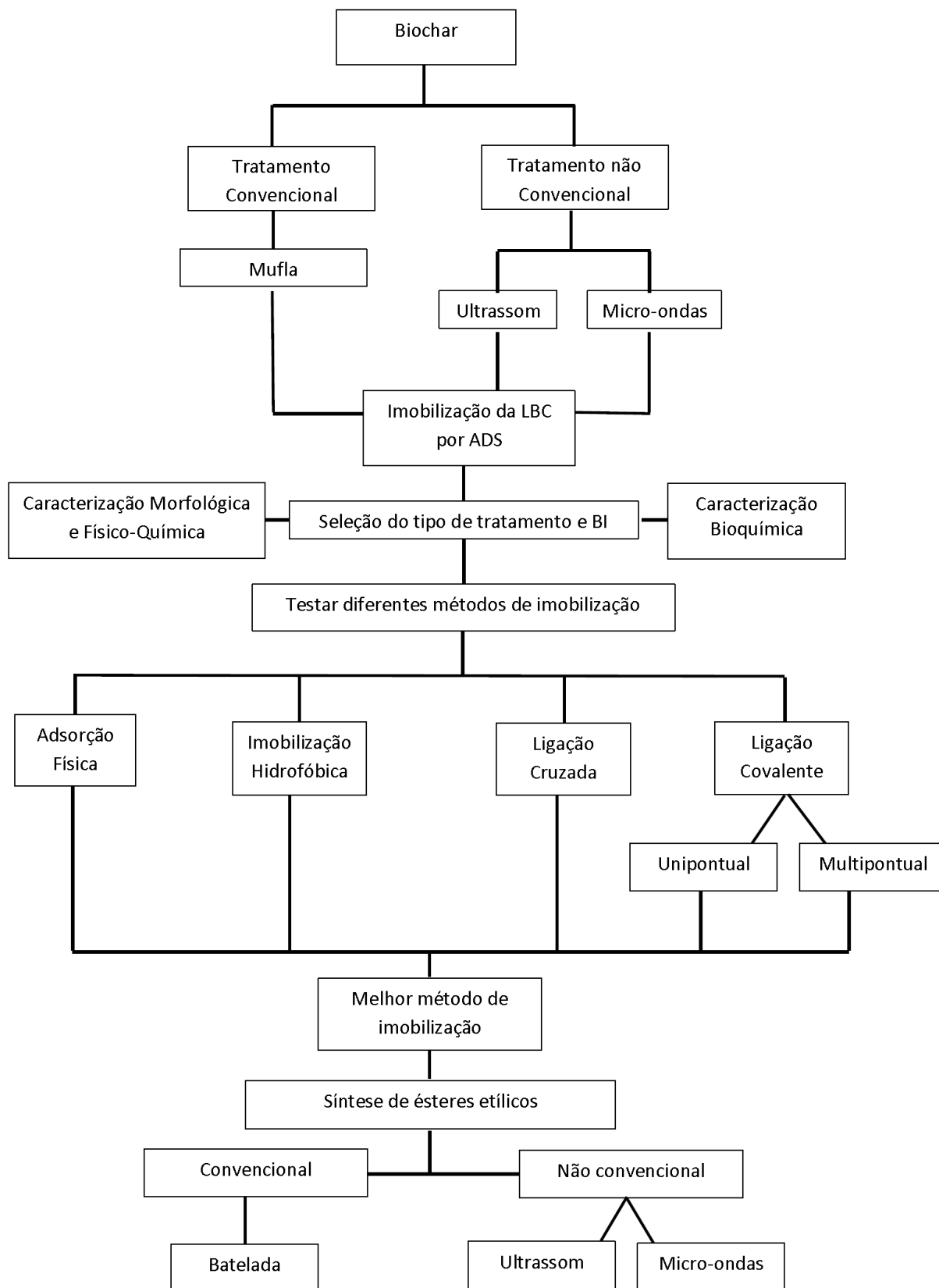


Figura 4.1- Fluxograma das principais etapas realizadas neste trabalho.

4.2.1 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 4.2. Antes de iniciar cada experimento, o reator foi purgado com gás nitrogênio para assegurar que o processo prosseguiria na ausência de oxigênio. As condições do processo de pirólise foram temperatura de 500 °C, massa de amostra 23 g, tempo de estabilização 5 min, fluxo de gás N₂ (1 mL/ min) e taxa de aquecimento do forno 30 °C/min foram adicionadas no reator de quartzo. Os vapores gerados na 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- 1,68 mm (SANTOS *et al.*, 2015).



Figura 4.2 - Sistema utilizado para a pirólise composto: forno elétrico (1), Reator (2), condensador (3) e balão para coletar o bio-óleo (4).

4.2.2 Tratamento do biochar para imobilização

4.2.2.1 Tratamento convencional (mufla)

O biochar de semente de goiaba foi incubado em três diferentes agentes químicos: diclorometano (M-DCM), solução de KOH (M-OH) ou H₃PO₄ (M-H) a 10 % (m/m) no

período de 24 h sob agitação em temperatura ambiente. Após esse período o biochar foi levado à mufla sob uma temperatura de 500 °C por 30 min, em seguida lavado exaustivamente com água a pH neutro e seco em estufa a 60 °C, conforme descrito por PEREIRA *et al* (2014) com algumas modificações.

4.2.2.2 Tratamento não convencional

Assistido por ultrassom

O biochar da semente de goiaba foi submerso em três diferentes agentes químicos: diclorometano (U-DCM), solução de KOH (U-OH) ou H₃PO₄ (U-H) a 10 % (m/m). Em seguida levado a banho de ultrassom (Ultroniqui) com uma frequência de funcionamento de 25 kHz e uma potência máxima de saída de 220 W por 30 min em temperatura ambiente (25 °C), em seguida lavado exaustivamente a pH neutro e seco em estufa a 60 °C, conforme descrito por GAI *et al.* (2014) com algumas modificações.

Assistido por micro-ondas

O tratamento foi realizado em reator de micro-ondas CEM (Discovery & Explorer SP) utilizando as soluções de KOH (MI-OH) e H₃PO₄ (MI-H) a 10 % (m/m). Neste tratamento não foi utilizado o diclorometano devido à sua baixa constante dielétrica. Foi utilizado cerca de 1 g de biochar com 5 mL da solução com uma potência máxima de 300 W em temperatura constante de 100 °C por 10 min. Em seguida lavado exaustivamente a pH neutro e seco em estufa a 60 °C.

4.2.3 Imobilização da LBC em biochar

Neste estudo foram avaliados diferentes métodos de imobilização da lipase em biochar (Figura 4.3). No Instituto de Tecnologia e Pesquisa (ITP) foram realizados os métodos de imobilização por adsorção física e ligação covalente unipontual. No departamento de engenharia química da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) foram realizados os métodos de imobilização ligação covalente multipontual, ligação cruzada e imobilização hidrofóbica.

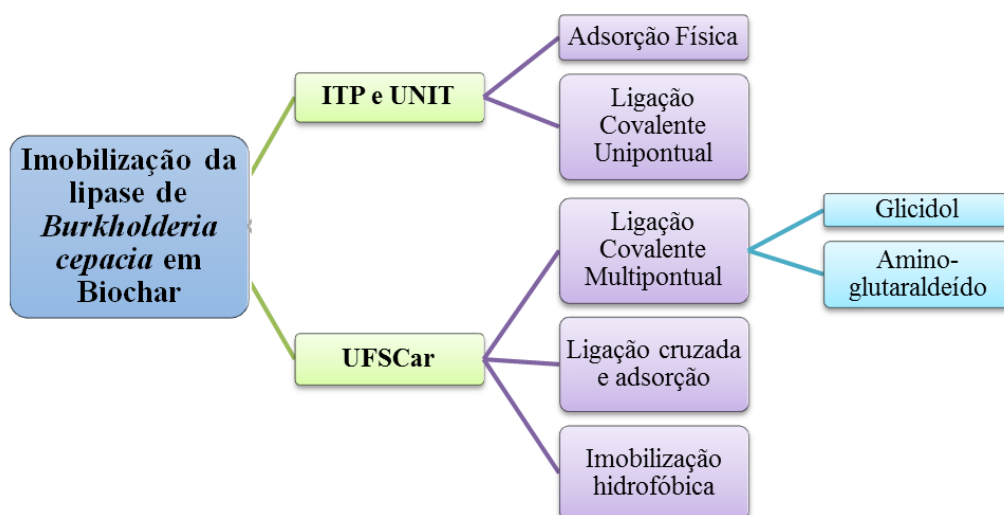


Figura 4.3 - Fluxograma dos métodos de imobilização realizados neste trabalho e os respectivos locais de realização.

4.2.3.1 Adsorção física (ADS)

O procedimento de imobilização da LBC 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 constante à temperatura ambiente (25 °C). Em seguida 10 mL de solução enzimática (0,15 g de enzima solubilizada em 10 mL de tampão de fosfato de sódio 0,1 M 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 24 h e estocado sob refrigeração.

4.2.3.2 Imobilização hidrofóbica

O procedimento de imobilização hidrofóbica da LBC consistiu no contato 1 g do biochar em 10 mL de solução enzimática (1,5 mg_{proteínas} solubilizada em tampão fosfato de potássio pH 7,0 (0,5 mM)), e mantido sob agitação por 24 horas em temperatura ambiente. Após esse tempo o biocatalisador imobilizado foi lavado com tampão fosfato de potássio pH 7,0 (0,5 mM) e estocado sob refrigeração, conforme descrito por LIMA *et al.* (2015) com algumas modificações.

4.2.3.3 Ligação covalente multipontual (LCM)

No processo de imobilização por ligação covalente multipontual foi necessário realizar a ativação do suporte, neste trabalho foram realizados diferentes protocolos de ativação com glicidol e amino-glutaraldeído.

Glicidol

Na ativação com glicidol foi utilizada a metodologia de GUISÁN (1988) com algumas modificações. A técnica consiste no contato 2 g de biochar em 40 mL de ácido nítrico a 10 % por 16 h em temperatura ambiente com agitação orbital e lavados exaustivamente com água destilada. Em seguida o biochar (2 g) ficou em contato com 15 g de NaOH diluídos em 30 mL de água e acrescentado posteriormente 6 mL de glicidol em agitação orbital por 16 h e lavados exaustivamente com água destilada e filtrados. O suporte ativado com o glicidol foi oxidado para a formação de cadeias mais curtas dos grupos glioxil. Para a oxidação 1 g do biochar ativado foi submerso em 7 mL de água e 3 mL de solução de periodato de sódio (0,1 M) mantido em agitação por 2 h e posteriormente lavado com água destilada.

Após o processo de ativação foi realizada a quantificação dos grupos glioxil presentes na superfície do suporte, pela quantidade de periodato de sódio consumido durante a oxidação. A quantificação do periodato de sódio foi realizada em meio contendo bicarbonato de sódio pela medida de absorbância em espectrofotômetro UV/Visível a 480 nm.

Amino-glutaraldeído

No processo de imobilização amino-glutaraldeído o biochar foi primeiramente modificado quimicamente com grupo amino, de acordo com a metodologia descrita por LIMA *et al.* (2015) com algumas modificações. Para a modificação foi utilizado 1 g do biochar (inteiro ou triturado) em 22,5 mL de tolueno e 2,5 mL de 3- aminopropil trietoxissilano (ATPS) deixado em refluxo por 5 h. Após o período de ativação, lavou-se o suporte com acetona e em seguida o suporte foi seco em estufa a 60 °C por um período máximo de 24 h. Em seguida o biochar foi ativado com solução de glutaraldeído 2,5 % (v/v) em tampão fosfato de potássio (0,1 M e pH 7,0), na proporção 1 g de suporte para 10 mL de solução de glutaraldeído 2,5 % (v/v). Após a homogeneização, a mistura foi mantida sob agitação por 16 h à temperatura ambiente e em seguida foi lavado exaustivamente com água destilada e filtrados para imediata imobilização. A imobilização da LBC foi realizada segundo

MENDES *et al.* (2013) com algumas modificações. Em 10 mL de tampão fosfato de potássio pH 7,0 (10 ou 100 mM), foi empregado o carregamento de lipase de 1,5 mg_{proteínas} /g_{suporte}. Posteriormente a solução enzimática foi adicionada ao meio na relação 1:10 (g de suporte: mL de solução enzimática). A suspensão foi mantida sob agitação orbital a 25 °C por um período de até 24 h. Em seguida, os derivados preparados foram lavados exaustivamente com tampão fosfato pH 7,0 (100 mM) e estocados sob refrigeração.

4.2.3.4 Ligação cruzada e adsorção

Para a ligação cruzada e adsorção foi utilizada uma solução enzimática com 0,5 g de proteína em 5 mL de tampão fosfato pH 7 (100 mM) e 1 g do biochar, o qual foi adicionado lentamente 1,5 mL de acetona gelada (agente de precipitação) e deixado sob leve agitação por 30 min em temperatura ambiente. Em seguida, foi adicionado 0,03 mL de glutaraldeído (50 %) e mantido sob leve agitação por 3 h, após esse período foi realizada a lavagem com tampão fosfato pH 7 (100 mM) e estocados sob refrigeração.

4.2.4 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 % (m/v). A reação enzimática é formada por 5 mL de substrato, 2 mL de solução tampão fosfato de sódio pH 7,0 (0,1 M) 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 10 min 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 1 µmol de ácido graxo por minuto de reação, nas condições do ensaio. As atividades foram expressas em µmol/g.min (U/g).

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

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

Rendimento de imobilização

O rendimento de imobilização (RI %) foi calculado por meio da equação 4.2:

$$RI = \frac{U_s}{U_0} \times 100 \quad (4.2)$$

em que: 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).

4.2.5 Caracterização físico-química e morfológica dos biocatalisadores imobilizados

Nesta sessão serão apresentados os métodos utilizados para caracterizar o biochar e os biocatalisadores imobilizados.

4.2.5.1 Caracterização morfológica do biochar e dos biocatalisadores imobilizados

As caracterizações morfológicas do suporte e dos biocatalisadores imobilizados foram analisadas, com a determinação da área específica, diâmetro e volume de poro, além da microscopia eletrônica de varredura.

Caracterização morfológica em B.E.T.

As áreas específicas 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 específicas foram avaliadas de acordo com a adsorção de nitrogênio usando o equipamento NOVA 1200 (Quantachrome).

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 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.

4.2.5.2. Caracterização físico-química

Análise por espectroscopia no infravermelho por transformada de fourier (FTIR)

As amostras de lipase livre, biochar e biocatalisadores imobilizados foram analisadas 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.

4.2.6 Reação convencional 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 aditivos e uma proporção fixa de 20 % (m/m) do biocatalisador imobilizado em relação à massa total dos reagentes que participam da reação (FREITAS *et al.*, 2009). As reações foram conduzidas em frascos hermeticamente fechados imersos em banho termostatizado com agitação a 150 rpm empregando-se etanol como solvente e óleo de coco bruto como fonte de triacilgliceróis. A condição para transesterificação foram nas razões molares óleo:etanol (1:7; 1:9; 1:10; 1:12) e temperatura de 40, 50 e 60 °C em diferentes tempos de reação (24, 48, 72 e 96 h). Ao final da reação as amostras foram lavadas por 3 vezes com solução saturada de NaCl para remoção do glicerol formado. A quantificação dos ésteres foi realizada por cromatografia gasosa (CG).

Nas melhores condições encontradas nas reações de batelada realizadas foram utilizados aditivos. Analisou-se o efeito de concentração de água, terc-butanol e peneiras moleculares conforme descritos por BABAKI *et al.* (2015). Inicialmente, preparou-se âmbares com 0,3 g de biocatalisadores imobilizados e adicionou-se o óleo de coco e etanol na melhor razão molar 1:7. Em seguida foram variadas as concentrações de água (1; 2,5; 3,5; 5 e 10 %) (v/v), peneiras moleculares (2,5; 5; 7,5 e 10 %) e terc-butanol (10, 20, 30, 40, 50 e 60 %) (m/v). Em seguida as reações foram levadas ao banho térmico com agitação a 40 ° C

por 96 h. Em seguida as amostras foram retiradas e purificadas para quantificação dos ésteres etílicos.

4.2.7 Reações não convencionais de transesterificação enzimática

4.2.7.1 Ultrassom

As reações de transesterificação enzimática foram realizadas conforme descrito por BATISTELLA *et al.* (2012) com algumas modificações em banho de ultrassom (Ultroniqui) com uma frequência de funcionamento de 25 kHz e uma potência máxima de saída de 220 W. As reações foram realizadas nas seguintes condições experimentais: Razão molar de óleo:etanol (1:5; 1:7; 1:9), temperatura de 40 °C, concentração de enzima imobilizada [E] de 20 % (m/m) em relação à massa total dos reagentes que participam da reação e 100 % de potência de ultrassom por um período de 8 h.

4.2.7.2 Micro-ondas

As reações foram realizadas por irradiação num reator de micro-ondas (modelo Discover/ University-Wave, Cem Corporation), constituído por uma câmara interna cilíndrica de 75 mm de diâmetro e 100 mm de altura. A concepção cilíndrica garante a irradiação homogênea do volume de trabalho que, por exemplo, está ausente nos fornos de micro-ondas convencionais disponíveis no mercado e, frequentemente, utilizado em experiências sem modificações. A potência máxima de operação foi de cerca de 100 W. Um agitador magnético foi utilizado para realizar a mistura do meio reacional. O tempo de reação foi de 8 h. A temperatura foi controlada a 40 °C com o ar comprimido dentro da câmara monitorada por um sensor de infravermelho localizado na parte inferior da câmara. O volume oferecido no meio reacional para o reator de vidro foi 6 g de substrato que consiste em óleo de coco bruto e etanol anidro com diferentes razões molares (1:5, 1:7 e 1:9). A concentração de enzima imobilizada utilizada foi de 20 % em relação ao peso total dos reagentes envolvidos na reação. Além disso, o reator foi acoplado a um condensador de refluxo para evitar a perda de etanol como vapor.

4.2.8 Quantificação dos ésteres etílicos

As amostras foram quantificadas por cromatografia gasosa em equipamento Agilent Technologies (7820-A GC) acoplado ao detector de massas (MSD 5975), a coluna

Supelcowax10 (30 m X 0,25 mm ID X 0,25 µm de espessura). A temperatura do forno foi mantida a 130 °C durante 2 min, posteriormente aumentada para 220 °C a uma taxa de 20 °C/min, em seguida a temperatura foi elevada até 222 °C com uma taxa de 0,5 °C/min e por último para 250 °C a uma taxa de 20 °C/min e que permaneceu nesta temperatura por 3 min. O gás de arraste utilizado foi o hélio e fluxo de 1 mL/min. O injetor foi mantido em 250 °C no modo split (1:30), com volume de injeção de 1 µL. A temperatura da detector foi mantida 250 °C.

As amostras foram preparadas dissolvendo 0,01 g de produto final em 10 mL de hexano. 100 µL dessa solução e 100 µL do padrão interno (heptadecanoato de metila na concentração de 25 mg/L) foram transferidos para um balão de 1 mL e completado com hexano. 1 µL dessa amostra foi injetada no sistema GC-MS. Todas as injeções foram realizadas em duplicata.

O cálculo da porcentagem de ésteres da amostra foi realizado por padrão interno heptadecanoato de metila (C17:0), a partir da massa de biodiesel e das áreas correspondentes a cada composto e quantificação por meio da Equação 4.3,

$$Conversão (\%) = \frac{(AT-PI)}{PI} \times \frac{CPI \times 100}{CE} \quad (4.3)$$

onde: AT: área total dos picos; PI: área do padrão interno; CPI: concentração do padrão interno; CE: concentração enzimática.

4.2.9. Quantificação de mono, di e triacilgliceróis

A quantificação dos monoacilgliceróis, diacilgliceróis e triacilgliceróis foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com método de gradiente ternário, adaptado de JEGANNATHAN *et al.*, (2010) para as reações de transesterificação realizadas em batelada na temperatura de 40 °C. O equipamento utilizado foi o cromatógrafo Shimadzu LC-20AD, com coluna Allcrom 5uC18(2)100A (250 x 4,60mm) e detector UV-VIS a 205 nm. A vazão de fluxo do solvente ternário (água (solvente A), metanol (solvente B) e iso-Propanol / n-hexano, 5:4 (v/v) (solvente C)) de 1,2 mL/min. A condição inicial foi de 5 % de A + 95 % de B, 100 % de B em 10 min, 60 % de B + 40 % de C em 40 min. Nos últimos 7 min foi retomado o gradiente inicial para restabelecer as condições iniciais de operação da coluna. A temperatura da coluna foi mantida a 40 °C e injeção de 10µL. Os ácidos graxos foram

identificados pelo tempo de retenção dos padrões internos. O rendimento da reação de transesterificação foi calculado comparando a soma das áreas dos picos dos componentes do cromatograma.

4.2.10 Estabilidade operacional na reação de transesterificação

A estabilidade operacional do sistema imobilizado foi determinada na melhor condição determinada da reação de transesterificação (razão molar óleo: etanol 1:7; 40°C e 96 h) em regime de bateladas consecutivas com reutilização do sistema imobilizado. Neste estudo foi empregada, em todas as bateladas, a mesma massa de biocatalisador imobilizado (20 % (m/m em relação à massa total dos reagentes) lavado com hexano após cada ciclo de 96 h.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste tópico serão descritos os resultados quanto aos diferentes tratamentos do biochar de semente de goiaba para a imobilização da LBC a partir de estudos de protocolos de imobilização (adsorção física, imobilização hidrofóbica, ligação covalente unipontual e multipontual e ligação cruzada), caracterização morfológica e físico-química do suporte e dos biocatalisadores imobilizados. Além da aplicação do melhor biocatalisador imobilizado em reação de transesterificação do óleo de coco bruto em etanol.

5.1 Tratamento do biochar para imobilização

Nesta etapa serão descritos os resultados referentes ao tratamento do biochar de semente de goiaba por técnicas convencionais (mufla (M)) e não convencionais (ultrassom (U) e micro-ondas (MI)). Após o tratamento do biochar foi realizada a caracterização morfológica e físico-química e a imobilização por adsorção física, aplicada em reação de hidrólise.

5.1.1 Caracterização morfológica e físico-química

Microscopia eletrônica de varredura (MEV) do biochar após o tratamento

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi usada para caracterizar a morfologia do biochar de semente de goiaba após os tratamentos convencionais e não convencionais. As micrografias resultantes são mostradas na Figura 5.1. Pode-se observar que o biochar sem tratamento apresenta uma estrutura superficial porosa e com cavidades irregulares (Figura 5.1(a)).

O biochar com tratamento em banho ultrassom é mostrado na Figura 5.1(e-g) verifica-se um aumento dos poros presentes na superfície do biochar ao utilizar diclorometano (Figura 5.1(g)), possivelmente relacionados com a remoção dos resíduos de bio-óleo e cinzas presentes na superfície do biochar, desobstruindo os poros e tornando acessível para adsorção da LBC durante o processo de imobilização.

Nas amostras de biochar tratados com KOH (Figura 5.1(e)) nota-se na superfície aglomerados possivelmente relacionado aos resíduos do KOH que não foram totalmente removidos durante o processo de lavagem com água destilada a pH neutro, já ao utilizar a solução de H_3PO_4 (Figura 5.1(f)) a superfície do biochar não apresentou uma grande variação em relação ao biochar sem tratamento. O tratamento do biochar utilizando mufla é mostrado na Figura 5.1 (b-d), observa-se uma modificação na estrutura do biochar tornando-o frágil ao utilizar H_3PO_4 e diclorometano como mostra a Figura 5.1(c) e (d). Ao utilizar KOH (Figura (b)) verificou-se um maior número de poros na superfície do biochar, possivelmente relacionado à evaporação dos compostos impregnados de KOH, comportamento semelhante ao encontrado no estudo de FOO e HAMEED (2012a) para o biochar de casca de coco.

No tratamento utilizando micro-ondas (Figura 5.1(h-i)) nota-se que não ocorreu uma grande modificação na superfície do biochar quando comparado com o tratamento utilizando a mufla, possivelmente relacionado à baixa temperatura alcançada no micro-ondas cerca de 100 °C quando comparado com a temperatura de 500 °C da mufla. Verificou-se que ao utilizar a solução de KOH a superfície do biochar apresentou aglomerados (Figura 5.1(h)) semelhantes aos encontrados no tratamento de ultrassom com a solução de KOH (Figura 5.1(e)). Já ao utilizar a solução de H_3PO_4 nota-se uma superfície mais esbranquiçada provavelmente relacionada ao resíduo de H_3PO_4 não removido durante o processo de lavagem.

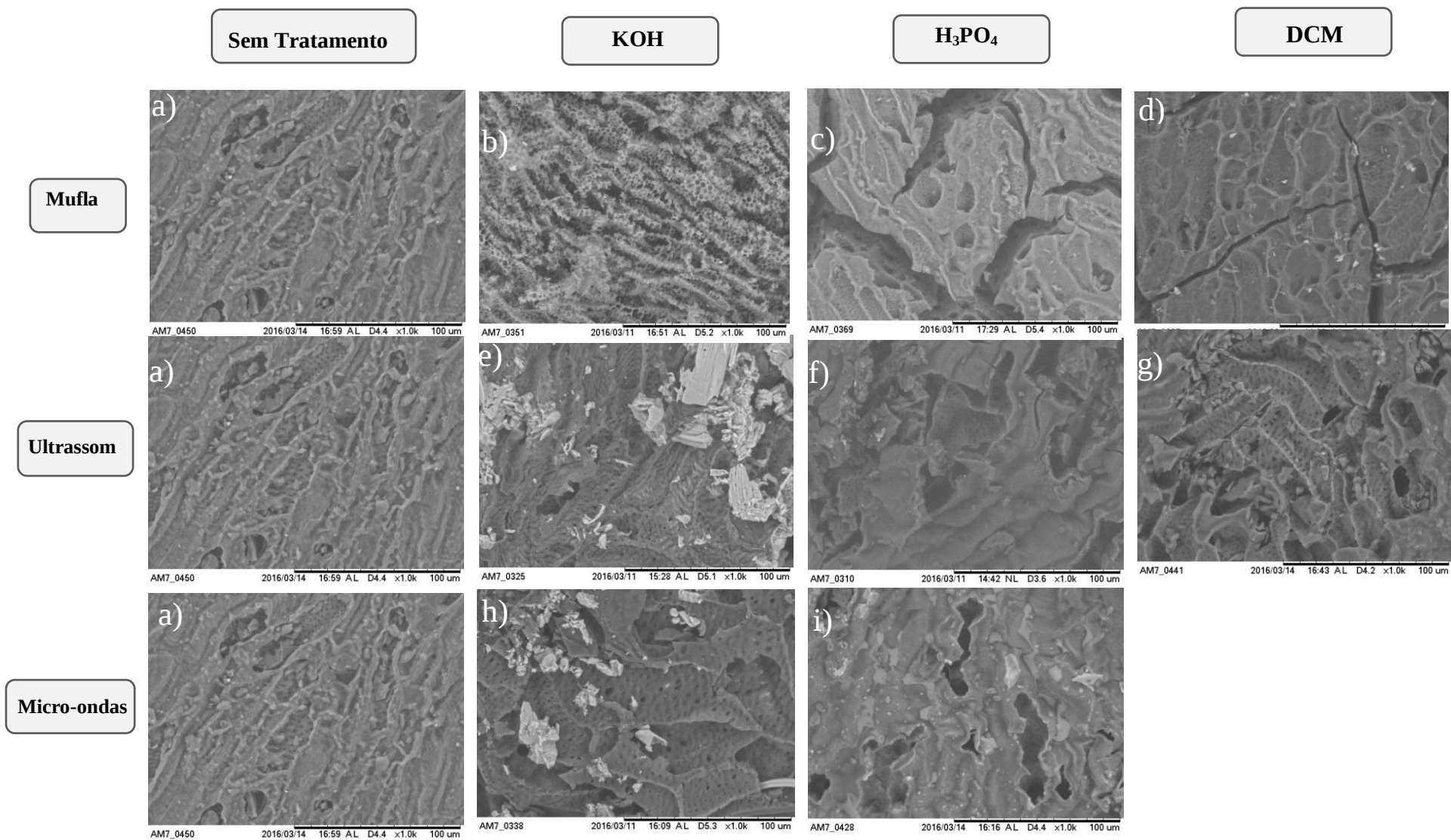


Figura 5.1 - MEV do biochar sem tratamento (a), tratamento em mufla com KOH (b), H_3PO_4 (c), DCM (d), biochar com o tratamento em banho de ultrassom com KOH (e), H_3PO_4 (f), DCM (g), tratamento em micro-ondas com KOH (h), H_3PO_4 (i).

Análise FTIR do biochar após o tratamento

Os espectros de FTIR obtidos para o biochar de semente de goiaba com os diferentes tratamentos são mostrados na Figura 5.2 (a-c). Todos os espectros exibem banda na região 1590 cm^{-1} que está associada às vibrações da ligação C=C de grupos aromáticos. Além disso, observa-se também a vibração característica de estiramento da ligação γ -CH em torno de 876 cm^{-1} (ZHAO *et al.*, 2013 e CHEN *et al.*, 2011).

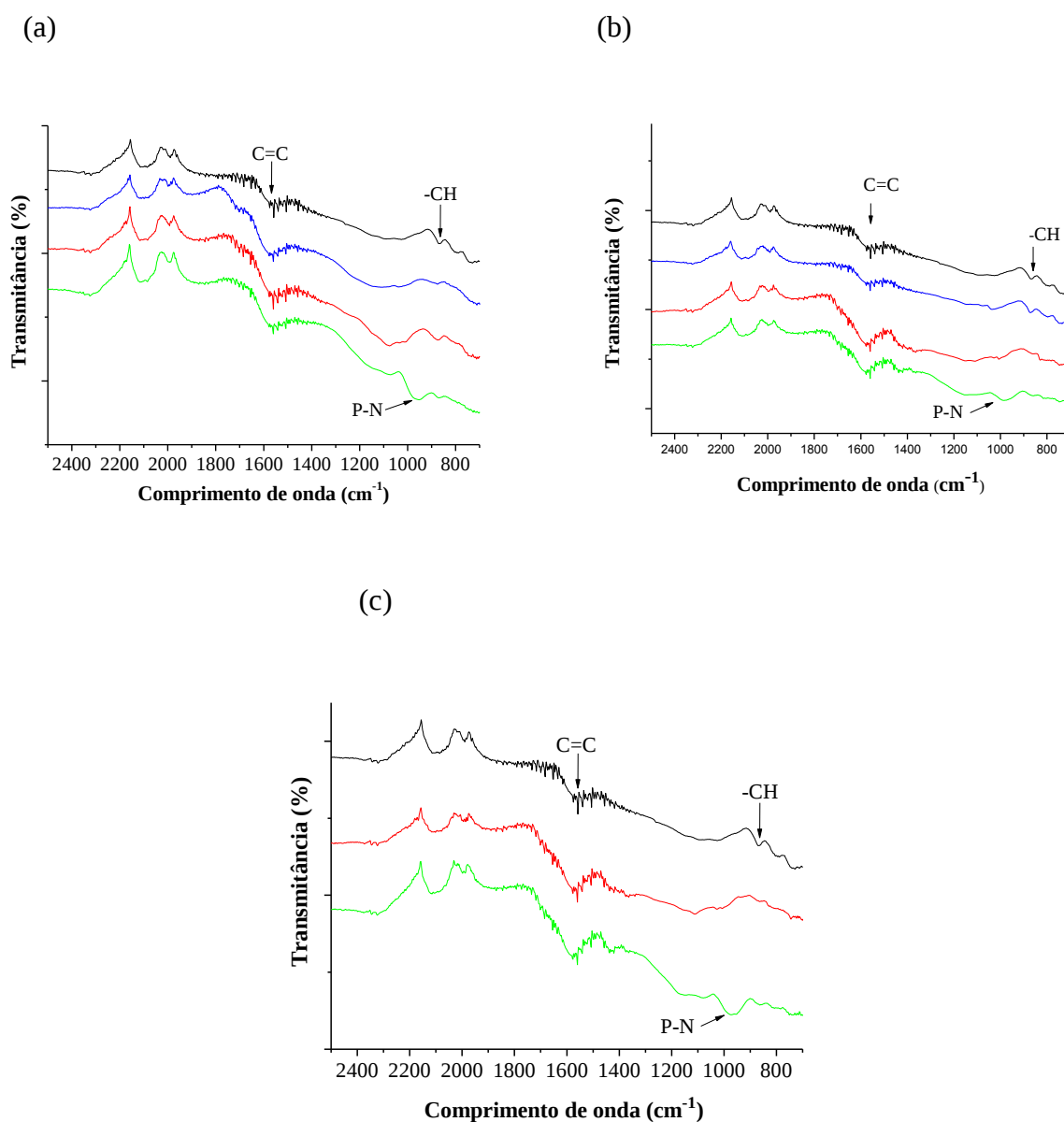


Figura 5.2 - Espectro de FTIR do biochar sem tratamento (—) e depois dos diferentes tratamentos: Mufla (a), Ultrassom (b) e Micro-ondas (c). Usando diferentes agentes químicos: DCM (—), KOH (—), H₃PO₄ (—).

Os espectros do biochar com os diferentes tratamentos apresentaram uma variação mínima nas propriedades químicas da superfície em relação ao biochar sem tratamento. Observa-se um aumento na intensidade da banda em torno de 1570 cm⁻¹ característica de grupo aromático C=C, atribuído à condensação dos anéis aromáticos, possivelmente relacionado à reação com os solventes e com o aquecimento (KLASSON et al., 2009). Os espectros do biochar tratado com H₃PO₄ exibem uma maior intensidade na banda na região de 995 cm⁻¹ que está associada à vibração da ligação P-N (PAVIA et al., 2010).

5.1.2 Imobilização da LBC por adsorção física em biochar após tratamento

Após os tratamentos do biochar, foi realizada a imobilização da LBC por adsorção física, a fim de verificar a influência dos diferentes tratamentos no processo de imobilização. A Tabela 5.2 apresenta a atividade hidrolítica determinada na reação padrão de hidrólise do azeite de oliva do biocatalisador imobilizado por adsorção física nos diferentes biochar obtidos com os diversos tratamentos.

Tabela 5.1 - Atividade hidrolítica da LBC imobilizada por adsorção física no biochar após os diferentes tratamentos.

Tipos de tratamento	Agente químico	Siglas dos suportes	Atividade hidrolítica (U/g)
Mufla	KOH	M-OH	317 ± 1,2
	H ₃ PO ₄	M-H	154 ± 1,0
	Diclorometano	M-DCM	240 ± 0,8
Micro-ondas	KOH	MI-OH	210 ± 1,5
	H ₃ PO ₄	MI-H	75 ± 1,0
Ultrassom	KOH	U-OH	154 ± 1,6
	H ₃ PO ₄	U-H	146 ± 2,0
	Diclorometano	U-DCM	258 ± 0,9
Sem tratamento			190 ± 1,4

No aquecimento convencional (mufla) verifica-se que o agente químico KOH apresentou uma melhor atividade hidrolítica, quando comparado com o uso do H_3PO_4 e diclorometano (DCM) como agente químico, representando um aumento de 52 % na atividade hidrolítica em relação ao biocatalisador imobilizado no biochar tratado com H_3PO_4 (M-H) e 32 % em relação ao biocatalisador imobilizado no biochar tratado com diclorometano em micro-ondas (M-DCM). A maior atividade hidrolítica apresentada para este biocatalisador imobilizado está, possivelmente, relacionada à modificação em sua superfície com uma maior quantidade de poros disponíveis para a adsorção física da LBC, conforme observado na micrografia descrita na Figura 5.1(f), entretanto observou-se que estes biocatalisadores apresentaram baixa estabilidade mecânica durante o protocolo de imobilização da LBC por adsorção física.

No tratamento com micro-ondas do biochar o comportamento foi semelhante ao apresentado no tratamento convencional, onde a utilização do KOH como agente químico apresentou um aumento de 64 % na atividade hidrolítica em relação ao tratamento com H_3PO_4 . Como mencionado em diversos estudos, a utilização do KOH como agente químico no aquecimento convencional e não convencional mostra uma melhor capacidade de adsorção de compostos orgânicos, uma vez que apresenta uma maior área específica em relação ao tratamento utilizando ácido como agente químico (FOO e HAMEED, 2012 a-c; FOO e HAMEED, 2011b; MAO *et al.*, 2015).

Este fato sugere uma maior capacidade de modificação morfológica do biochar na presença de KOH o que possivelmente influenciou na capacidade de adsorção da LBC no biochar após os tratamentos. Em relação ao tratamento em ultrassom a atividade hidrolítica máxima de 258 U/g foi ao utilizar o diclorometano como agente químico, o que representa um aumento de 40 e 43 % em relação ao uso do KOH e H_3PO_4 , respectivamente. Este resultado deve-se possivelmente à capacidade de remoção dos resíduos do bio-óleo da superfície do biochar pelo diclorometano em relação ao KOH e H_3PO_4 como indicado na micrografia (Figura 5.1(b-d)).

Com base nestes resultados verificou-se que o melhor tratamento do biochar para a imobilização da LBC foi o tratamento por aquecimento convencional (mufla) utilizando como agente químico KOH (M-OH), que foi caracterizado morfológica e físico-quimicamente.

5.1.3 Caracterização morfológica e físico-química dos biocatalisadores imobilizados

Microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos biocatalisadores imobilizados

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi usada para caracterizar a morfologia do biochar após o processo de imobilização. Verificou-se que o biocatalisador imobilizado com maior atividade hidrolítica (Tabela 5.2) foi utilizando o biochar ativado por aquecimento convencional com KOH (M-OH), as micrografias resultantes são mostradas na Figura 5.3

Nota-se que o biochar (M-OH) apresentou uma boa resistência mecânica ao processo de imobilização, o qual manteve a sua estrutura morfológica. Também é possível observar que após o processo de imobilização da LBC os poros do biochar (M-OH) estão parcialmente preenchidos.

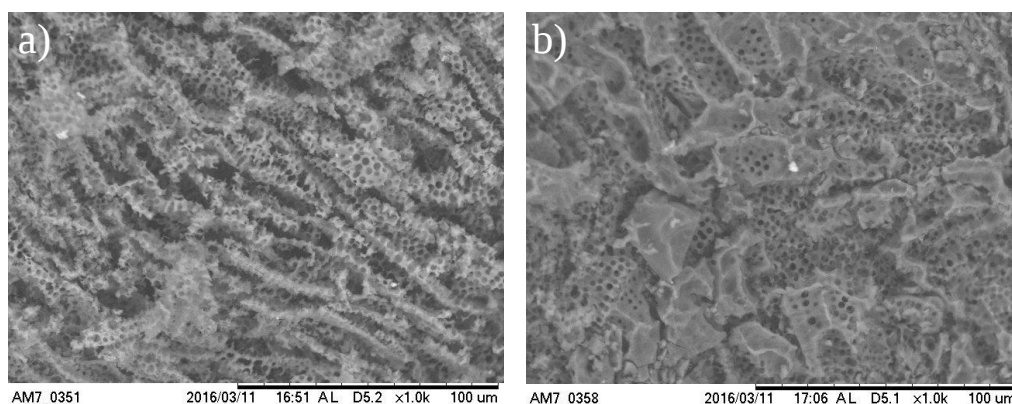


Figura 5.3 - Microscopia eletrônica de varredura do biochar ativado com KOH em mufla (M-OH) (a), biocatalisador imobilizado por adsorção física (M-OH-LBC) (b).

Análise FTIR dos biocatalisadores imobilizados

Os espectros de FTIR obtidos para o biocatalisador imobilizado com maior atividade hidrolítica são mostrados na Figura 5.4. Em comparação ao biochar ativado (M-OH) e ao imobilizado nota-se uma pequena variação nas propriedades químicas da superfície. O espectro do biocatalisador imobilizado exibe banda na região 1000 cm^{-1} que está associada às vibrações da ligação C-N característico do grupo amina que está presente na LBC.

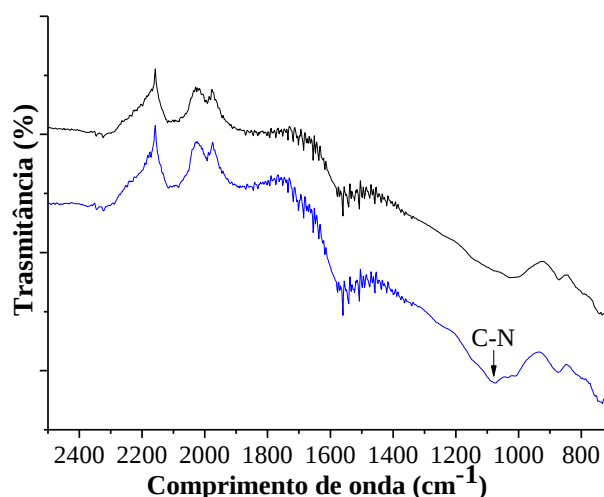


Figura 5.4 - Espectro de FTIR para o biochar (M-OH) tratado em mufla com KOH (—) e biochar (M-OH-BC) tratado após a imobilização da LBC (—).

De acordo com KUMAR *et al.* (2009) não é possível verificar grandes modificações nas propriedades químicas da superfície do suporte após o processo de imobilização, uma vez que a interação entre enzima e o suporte são complexas.

5. 2 Imobilização da LBC em biochar por diferentes protocolos de imobilização

Neste tópico serão descritos os resultados referentes aos diferentes protocolos de imobilização utilizados para a imobilização da LBC no biochar tratado em ultrassom com diclorometano, tendo em vista que este tratamento manteve a estabilidade mecânica do biochar em relação ao tratamento convencional com KOH que apresentou uma melhor atividade hidrolítica como mostrado no tópico anterior (5.1.2).

Na Tabela 5.3 são apresentados os valores das atividades dos diferentes biocatalisadores e do rendimento de imobilização. A maior atividade encontrada foi para o biocatalisador imobilizado por ligação covalente unipontual possivelmente relacionado a uma maior estabilização da LBC, devido à presença do PEG-1500 durante o processo de imobilização. Comportamento semelhante foi observado em diversos trabalhos na literatura, que ao utilizar o PEG-1500 na imobilização proporcionou um aumento na atividade catalítica da enzima para outros suportes, tais como: sílica, nanoesferas (Fe_3O_4) e fosfato de zircônio (WU *et al.*, 2001; SOARES *et al.*, 2003; MENDES *et al.*, 2006; DEVI *et al.*, 2009; SHELDON e PELT 2013; SULAIMAN *et al.*, 2014).

No estudo realizado por BLANCO e ROLDÁN (2017) foi avaliado o efeito do PEG com diferentes massas molares (1500, 3000 e 10000 g/mol) na imobilização da lipase de *Candida antarctica* B em sílica- octil. Os biocatalisadores imobilizados foram incubados em tolueno a 70 °C para verificar a estabilidade térmica, ao utilizar o PEG-1500 de menor massa molar foi alcançada a maior estabilidade térmica mantendo-se estável por 14 dias e com o controle e os PEG (3000 e 10000) os biocatalisadores imobilizados perderam 50 % da sua atividade inicial após 3 dias.

De acordo com BLANCO e ROLDÁN (2017) este comportamento foi atribuído à redução da mobilidade da lipase que está relacionado com o não desdobramento da estrutura terciária da lipase. Uma vez que as moléculas do PEG cercam a superfície da enzima que não está em contato com a sílica-octil e com isso impede o desdobramento da lipase. O PEG de menor massa molar por apresentar uma menor molécula tem uma maior facilidade e eficiência para o total recobrimento da superfície da lipase e assim reduzir flexibilidade da lipase. Entretanto, a rigidez excessiva da enzima pode reduzir a atividade catalítica devido ao impedimento de alterações conformacionais necessárias para facilitar o contato do substrato com o sitio ativo da enzima.

Tabela 5.2 - Avaliação dos métodos de imobilização da LBC em biochar a partir da determinação da atividade de hidrólise e rendimento de imobilização na reação de hidrólise do azeite de oliva.

Método de Imobilização	Atividade (U/g)	Rendimento de imobilização (%)*	Referência
Adsorção Física	258	54	Este trabalho
Imobilização Hidrofóbica	118	11	Este trabalho
Ligação Cruzada + Adsorção	25,5	3,6	Este trabalho
Ligação Covalente Unipontual	833	89	ALMEIDA <i>et al.</i> , 2015
Ligação Covalente Multipontual (ATPS + GLU) pH 7 (100mM)	156	12	Este trabalho
Ligação Covalente Multipontual (Glicidol)	-	-	Este trabalho

* O rendimento de imobilização foi calculado pela eq. 4.2.

A segunda maior atividade (258 U/g) foi para o método de adsorção física com cerca de 54 % de rendimento de imobilização. Em estudos realizados anteriormente pelo grupo verificou-se uma elevada estabilidade operacional deste biocatalisador imobilizado, o qual manteve 50 % da atividade inicial após 16 ciclos em reações de hidrólise de azeite de oliva, atribuída ao caráter hidrofóbico do suporte que contribuiu no processo de interação entre a enzima e o suporte (ALMEIDA *et al.*, 2015).

O processo de imobilização por adsorção física de lipase em suportes hidrofóbicos está relacionado ao mecanismo de ação chamado de ativação interfacial característico na maioria das lipases, uma vez que as lipases apresentam seu sítio ativo coberto por uma “tampa” formada por uma cadeia polipeptídica, que pode isolá-lo do meio de reação (forma fechada) e na presença de uma interface, como uma mistura de água e óleo, a tampa é aberta permitindo acesso ao sítio ativo da enzima. Desta forma a imobilização de lipase em suportes hidrofóbicos tende a imobilizar em sua conformação aberta com o seu sítio ativo acessível ao substrato possibilitando uma melhor catálise (MANOEL *et al.*, 2015; LIMA *et al.*, 2015).

No estudo realizado por KOPP *et al.* (2015) foi observada uma superativação da lipase de *Pseudomonas fluorescens* imobilizada em micropartículas magnéticas de sílica-octil. Atribuído ao fenômeno conhecido como hiperativação interfacial, pois em superfícies hidrofóbicas a imobilização de lipases pode favorecer a abertura da “tampa” de natureza hidrofóbica aumentando a atividade enzimática.

Na literatura diversos estudos utilizam a imobilização por adsorção física com o uso de suportes orgânicos. BRÍGIDA *et al.* (2008) avaliaram a imobilização por adsorção física da lipase *tipo B* de *Candida antarctica* imobilizada em fibra de coco verde que mostrou-se 92 vezes mais estável do que a enzima livre. No estudo realizado por CRISTÓVÃO *et al.* (2011) foi avaliada 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.

Em relação à imobilização hidrofóbica a baixa atividade encontrada pode ser atribuída a pequenas mudanças conformacionais na estrutura terciária da lipase, devido às interações hidrofóbicas entre a enzima e o suporte, favorecida pela baixa força iônica utilizada durante o processo de imobilização, uma vez que o biochar apresenta uma elevada hidrofobicidade este efeito proporcionou uma maior alteração na estrutura da lipase em relação ao processo de

imobilização por adsorção física, o que possivelmente proporcionou a baixa atividade do biocatalisador imobilizado.

Comportamento semelhante foi relatado por LIMA *et al.* (2015) no estudo realizado com a lipase de *Pseudomonas fluorescens* imobilizada com baixa força iônica em suportes hidrofóbicos comerciais (Poliestireno e Amberlite), o qual apresentou baixa atividade nos biocatalisadores imobilizados com cerca de 15 e 26 % de atividade para o Poliestireno e Amberlite, respectivamente.

No processo de imobilização multipontual, observou-se que a ativação com glicidol não foi realizada de maneira efetiva. Após ativação verificou-se cerca de 20 $\mu\text{mol/g}_{\text{suporte}}$ de grupos aldeído presentes na superfície do suporte, pela quantidade de periodato de sódio consumido durante a oxidação. A baixa formação de grupos glioxil no suporte inviabiliza o processo de imobilização da LBC por ligação covalente multipontual. Já que o número de ligações covalentes entre o suporte e a enzima depende do grau de ativação do suporte (concentração de grupos aldeídos na superfície do suporte) e na concentração de grupos amina na molécula de enzima (RODRIGUES *et al.*, 2008).

No estudo realizado por RODRIGUES *et al.* (2008) na imobilização multipontual da lipase de *Candida antarctica* utilizando como suportes agarose e quitosana obtiveram na ativação com glicidol cerca de 1327 e 1835 $\mu\text{mol/g}_{\text{suporte}}$. Portanto, não foi realizado neste estudo o processo de imobilização multipontual ativado com glicidol da LBC no biochar visto que apresentou baixo grau de ativação.

Entretanto, no processo de imobilização multipontual amino-glutaraldeído, na etapa de silanização com ATPs verificou-se que o biochar apresentou um recobrimento de cor esbranquiçada após o processo de silanização como mostra a Figura 5.5, o qual indica que houve uma modificação na superfície do biochar após o processo de silanização. Além disso, foi realizada a microscopia eletrônica de varredura no biochar após o processo de silanização com ATPs, conforme pode ser observado na Figura 5.6 (a-b) a superfície do biochar apresentou um total recobrimento com o ATPs. Contudo, no processo de imobilização da LBC apresentou baixa atividade, o que pode estar relacionado à alta reatividade dos grupos aldeídos inseridos após o processo de ativação com glutaraldeído (BARBOSA *et al.*, 2013).

Apesar da LBC ter como característica a facilidade de formar agregados entre si, devido aos seus bolsões hidrofóbicos, foi possível verificar que o processo de agregação e

adsorção no biochar não apresentou resultado promissor, possivelmente relacionado à baixa reatividade dos grupos presentes na superfície do biochar e também atribuído à utilização do glutaraldeído como agente reticulante, uma vez que a LBC apresenta elevada sensibilidade como relatado anteriormente. Com base nestes resultados o melhor biocatalisador imobilizado foi obtido pelo método de adsorção física no biochar tratado em ultrassom com diclorometano, sendo este biocatalisador selecionado para a aplicação em reações de transesterificação enzimática do óleo de coco bruto.



Figura 5.5 - Biochar antes do processo de silanização com ATPs (A) e após o processo de silanização com ATPs (B)

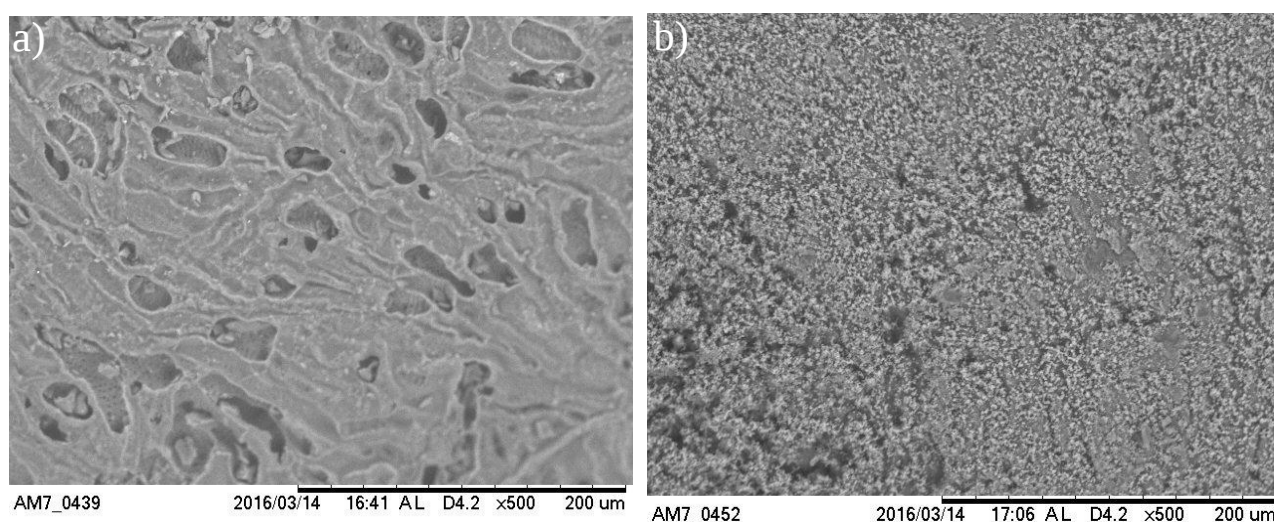


Figura 5.6 - Microscopia eletrônica de varredura do biochar sem silanização (a) e do biochar após silanização com ATPs (b).

5.3 Avaliação da lipase imobilizada em reação de transesterificação

Após a seleção do melhor método de imobilização verificou-se o potencial da LBC imobilizada em biochar tratado em ultrassom com diclorometano na reação de transesterificação de óleo de coco bruto em etanol em reator batelada (método convencional).

5.3.1 Reação de transesterificação em meio convencional

As reações em batelada foram inicialmente realizadas para o biocatalisador imobilizado por adsorção física. A figura 5.7 (a-c) apresenta as conversões das reações de transesterificação do óleo de coco bruto, obtidas nas temperaturas de 40, 50 e 60 °C, nas razões molares de (1:6, 1:7, 1:9, 1:10 e 1:12) e nos tempos de reação de (24, 48, 72 e 96 h). Verificou-se que o máximo rendimento global da reação, utilizando a enzima, imobilizada foi de 48 % na razão molar 1:7, 40 °C e com o tempo de reação de 96 h (Cromatograma em anexo I). Observa-se que a maior conversão em ésteres etílicos foi alcançado com um maior tempo reacional para todas as temperaturas estudadas (Figura 5.7 a-c), possivelmente devido ao efeito de resistência à transferência de massa oferecida pelo suporte para a difusão do substrato no interior da matriz, isto é, a maior dificuldade de acessibilidade do substrato e da saída do produto do interior do sistema imobilizado conforme descrito por JEGANNATHAN *et al.* (2010) para a reação de transesterificação de óleo de palma e metanol utilizando a LBC imobilizada em k-carrageenan com máxima conversão em ésteres metílicos em 78 h.

Em relação à temperatura, nas reações de transesterificação foi possível observar que a variação de temperatura não apresentou influência significativa e os valores máximos de conversão em ésteres etílicos são de 48, 30 e 35 % para as temperaturas de 40, 50 e 60 °C, respectivamente (Figura 5.7 a-c). Comportamento semelhante ao que é encontrado na literatura referente à variação da temperatura, em que alguns estudos de transesterificação enzimática não demonstraram influência significativa na conversão em ésteres etílicos utilizando lipases na temperatura entre 30 e 60 °C (FREITAS *et al.*, 2009; GOG *et al.*, 2012; AMINI *et al.*, 2017; LI *et al.*, 2017). No estudo realizado por AMINI *et al.* (2017) avaliaram a reação de transesterificação de óleo de semente de manjerição e metanol utilizando a lipase comercial Novozym 435, observaram um aumento de 30 % na conversão em ésteres metílicos com o aumento da temperatura de 30 para 40 °C e no intervalo de 40 a 60 °C, a temperatura

não influenciou na conversão em ésteres metílicos apresentando conversões similares de cerca de 88 %.

LI *et al.* (2017) obtiveram comportamento semelhante ao estudarem a transesterificação de óleo de soja em metanol utilizando a LBC imobilizada em nanopartículas magnéticas. Verificaram que a temperatura ótima de reação foi de 45 °C com uma conversão em ésteres metílicos de 86 % e ao avaliarem o efeito da temperatura na reação observaram um aumento na conversão em ésteres metílicos quando a temperatura reacional foi gradualmente aumentada de 35 para 45 °C e no intervalo de 45 a 60 °C a temperatura não influenciou na conversão de ésteres metílicos. Portanto, o perfil de reação de transesterificação em reator batelada utilizando óleo de coco bruto e etanol catalisado pela LBC imobilizada por ADS no biochar tratado foi similar aos descritos na literatura considerando a variação de temperatura.

Já em relação à variação da razão molar foi possível observar que o aumento da razão molar óleo:álcool a partir de 1:7 não apresentou aumento significativo na conversão em ésteres etílicos. Perfil semelhante foi relatado por FREITAS *et al.* (2009) no estudo da reação de transesterificação de óleo de babaçu e etanol utilizando a LBC imobilizada covalentemente em sílica-PVA. Observaram que o excesso de etanol apresentou efeito negativo (inibição da atividade) para a LBC imobilizada e a máxima conversão em ésteres etílicos (98 %) foi obtida na razão molar de 1:7 a 39 °C por 72 h. OLIVEIRA *et al.* (2014) ao estudarem a LBC imobilizada em sílica modificada com líquido iônico prótico (pentanoato de N-metilmonoetanolamina) obtiveram uma conversão máxima em ésteres etílicos de 51,90 %, na reação de transesterificação do óleo de babaçu em etanol na razão molar (óleo: álcool) de 1:7 a 40 °C por 48 h. De acordo com a literatura o excesso de álcool em reações de transesterificação com enzimas imobilizadas reduz a conversão em ésteres etílicos devido ao efeito de inativação do sistema imobilizado (ISO *et al.*, 2001; HSU *et al.*, 2003).

Há estudos utilizando óleo de coco que contém elevada composição de ácido láurico em reações de transesterificação enzimática e química. No estudo de RIBEIRO *et al.* (2014) alcançaram êxito na reação de transesterificação do óleo de coco catalisada pela lipase comercial (Novozyme 435), com rendimento em ésteres etílicos em 80 % utilizando 7 % de enzima, razão molar óleo:etanol (1:10) e temperatura de 60 °C. Já o estudo de NAKPONG *et al.* (2010) analisou a transesterificação química de óleo de coco em metanol com o uso de um catalisador alcalino obtendo um rendimento de 98,4 % em ésteres metílicos.

A produção enzimática de ésteres etílicos a partir de óleos vegetais brutos possuem alguns fatores que afetam a eficiência do processo. Tendo em vista que os óleos vegetais, em sua forma bruta, são obtidos por meio de extração por 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 apresentam efeito significativo na reação de transesterificação e também podem interferir na separação dos ésteres e glicerol (MICHELIN *et al.*, 2015; LAM *et al.*, 2010). Neste sentido as conversões obtidas neste trabalho podem ser atribuídas às impurezas presentes no óleo vegetal, visto que o óleo de coco utilizado neste estudo foi na sua forma bruta.

Entretanto, é importante salientar que neste estudo foi utilizado baixa carga enzimática (150 mg de lipase/ 1 g de suporte) no processo de imobilização conforme estabelecido no estudo de carregamento enzimático do biochar de semente de goiaba realizados em estudos anteriores (ALMEIDA *et al.*, 2015). Consequentemente obteve-se baixa conversão em ésteres etílicos, quando comparado à literatura para a mesma lipase imobilizada em diferentes suportes conforme relatado anteriormente (FREITAS *et al.*, 2009; LI *et al.*, 2017), uma vez que o carregamento enzimático influencia na conversão em ésteres etílicos.

Conforme foi observado por MEHRASBI *et al.* (2017) ao estudarem a reação de transesterificação de óleo de cozinha usando em metanol utilizando a lipase de *Candida antarctica* (CALB) imobilizada covalentemente em nanopartículas magnéticas, verificaram uma influência na conversão em ésteres metílicos ao variar a concentração de enzima imobilizada (10 a 100 mg) no sistema reacional e a máxima conversão de 48 % em ésteres metílicos foi obtida ao utilizar 100 mg (55 mg CALB/1 g de suporte) a 50 °C por 96 h.

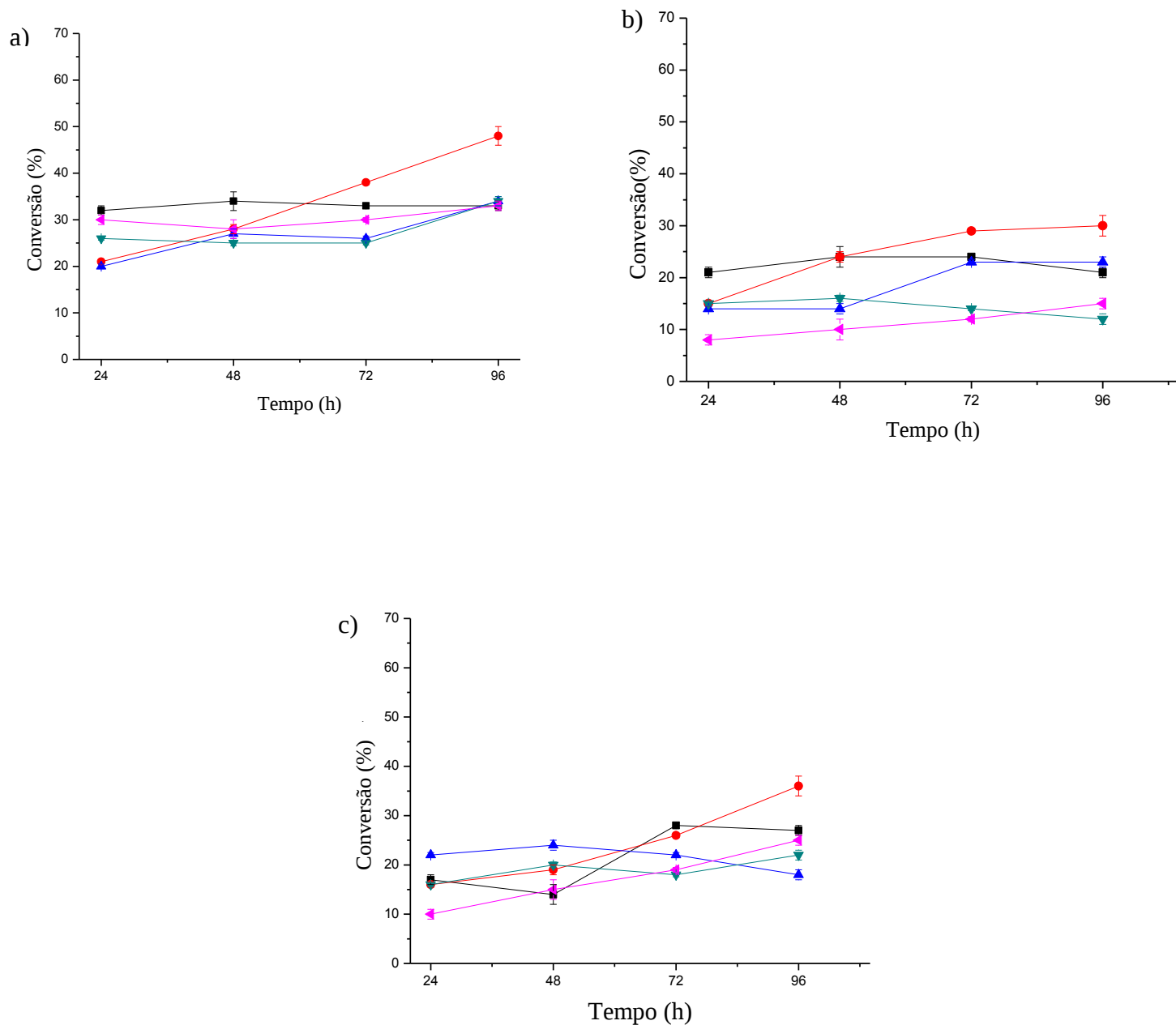


Figura 5.7 - Conversão em ésteres etílicos utilizando o biocatalisador imobilizado por adsorção física em biochar tratado em ultrassom com diclorometano, em diferentes razões molaes e tempo de reação nas diferentes temperaturas estudadas: (a) 40 °C; (b) 50 °C e (c) 60 °C.

5.3.2- Quantificação de mono, di e triacilgliceróis

A quantificação de mono, di e triacilgliceróis foi realizada apenas na reação de transesterificação em batelada com o biocatalisador imobilizado por adsorção física na melhor temperatura (40 °C) e em todos os tempos de reação (24, 48, 72 e 96 h) e nas razões molares (1:6, 1:7, 1:9, 1:10 e 1:12). Conforme relatado por LOPRESTO *et al.* (2015) a reação de transesterificação catalisada por lipases ocorre em três etapas reversíveis com formação de intermediários mono e diacilgliceróis.

Os resultados apresentados na Figura 5.8 mostram que a conversão total dos triacilgliceróis em monoacilgliceróis, diacilgliceróis e ésteres etílicos ocorreram no tempo de reação de 48 h para as razões molares 1:6 e 1:7, enquanto com o aumento da razão molar (1:9, 1:10 e 1:12) o tempo reacional para a conversão total dos triacilgliceróis foi de 72 h. De acordo com TRUBIANO *et al.* (2007) o excesso de álcool na reação de transesterificação enzimática reduz a velocidade inicial da reação e apresenta um efeito negativo na lipase. Comportamento que pode ser explicado devido ao efeito de inibição do álcool, uma vez que o contato da enzima com a fase orgânica polar imiscível formada, como consequência de uma falta de solubilidade completa do álcool, bem como do produto glicerol, na fase oleosa (FREITAS *et al.*, 2009).

Na Figura 5.8 é também possível verificar o mesmo comportamento em relação à formação de monoacilgliceróis com o excesso de álcool na reação de transesterificação, em que é possível observar que nas razões molares 1:9, 1:10 e 1:12 a formação de monoacilgliceróis ocorreu de maneira mais lenta atingindo a máxima conversão com um maior tempo reacional de 96 h com cerca de 57, 50 e 50 %, respectivamente. E já com a menor razão molar (1:6) a máxima formação de monoacilgliceróis foi obtida com 48 h de reação com cerca de 46 %. Conforme relatado anteriormente a razão molar ótima foi de 1:7 (Anexo II, Figura A3) apresentando uma máxima formação de monoacilgliceróis no menor tempo de reação (24 h) com cerca de 62 %. Em relação aos ésteres etílicos foi possível observar que na razão molar de 1:7 (Anexo II, Figura A3) obteve-se a máxima conversão com cerca de 40 % em 96 h. E nas razões molares óleo:álcool de 1:6, 1:9, 1:10 e 1:12 observa-se que as conversões são similares com máxima formação de cerca de 30 %. Verifica-se que o excesso de etanol não influenciou na conversão dos ésteres etílicos.

No estudo realizado por JEGANNATHAN *et al.* (2010), em que avaliaram o uso da lipase LBC encapsulada com k-carrageenan na reação de transesterificação de óleo de palma e metanol também observaram que a razão molar ótima óleo:metanol foi de 1:7. Em relação à formação de monoacilgliceróis foi observado o mesmo perfil em que a formação de monoacilgliceróis nas primeiras 6 horas de reação foi maior com cerca de 45 % e que ao final de 72 h a formação de monoacilgliceróis foi de 10 % e a conversão em ésteres metílicos foi de cerca de 85 %. Concluindo que a primeira e segunda etapa da reação de transesterificação com a lipase LBC ocorre em uma maior velocidade em relação à terceira etapa da reação, ou seja, à conversão de monoglicérides para ésteres metílicos.

No entanto, DANTAS *et al.* (2013), ao estudarem a influência de etanol na reação de transesterificação de óleo de canola utilizando a LBC livre verificaram que a concentração de monoglicérides foi menor que a de diglicérides, indicando que a etapa lenta da reação foi a transesterificação de diglicérides para ésteres e monoglicérides. A máxima conversão obtida para ésteres etílicos foi de 67 % na razão molar 1:9 a 37 °C. LOPRESTO *et al.* (2015), ao estudarem a reação de transesterificação de óleo de girassol e etanol utilizando a LBC imobilizada covalentemente em resina acrílica observaram o mesmo comportamento em relação à formação de mono e diglicérides em que há uma máxima formação de diglicérides nas primeiras 3 h de reação mantendo estável até o tempo final, e a formação máxima de monoglicérides foi obtida após 8 h de reação. A máxima conversão obtida para ésteres etílicos foi de 46 % a 37 °C em 9 h de reação, indicando que a etapa lenta da reação foi a transesterificação de diglicérides para ésteres e monoglicérides.

Portanto, é possível observar que a LBC imobilizada por adsorção física em biochar de semente de goiaba apresentou o perfil de formação do monoglicérides similar ao estudo de JEGANNATHAN *et al.* (2010) com máxima formação nas primeiras horas de reação. E já nos estudos realizados por DANTAS *et al.* (2013) e LOPRESTO *et al.* (2015) o comportamento da LBC na reação de transesterificação apresentou perfil contrário. Este comportamento da LBC pode ser explicado devido aos diferentes processos de imobilização utilizados, uma vez que a interação entre a enzima e o suporte pode influenciar no acesso do substrato ao sítio ativo da enzima em virtude de restrições estéricas ou mudanças conformacionais derivadas do tipo de ligação entre a enzima e o suporte (LOPRESTO *et al.*, 2015).

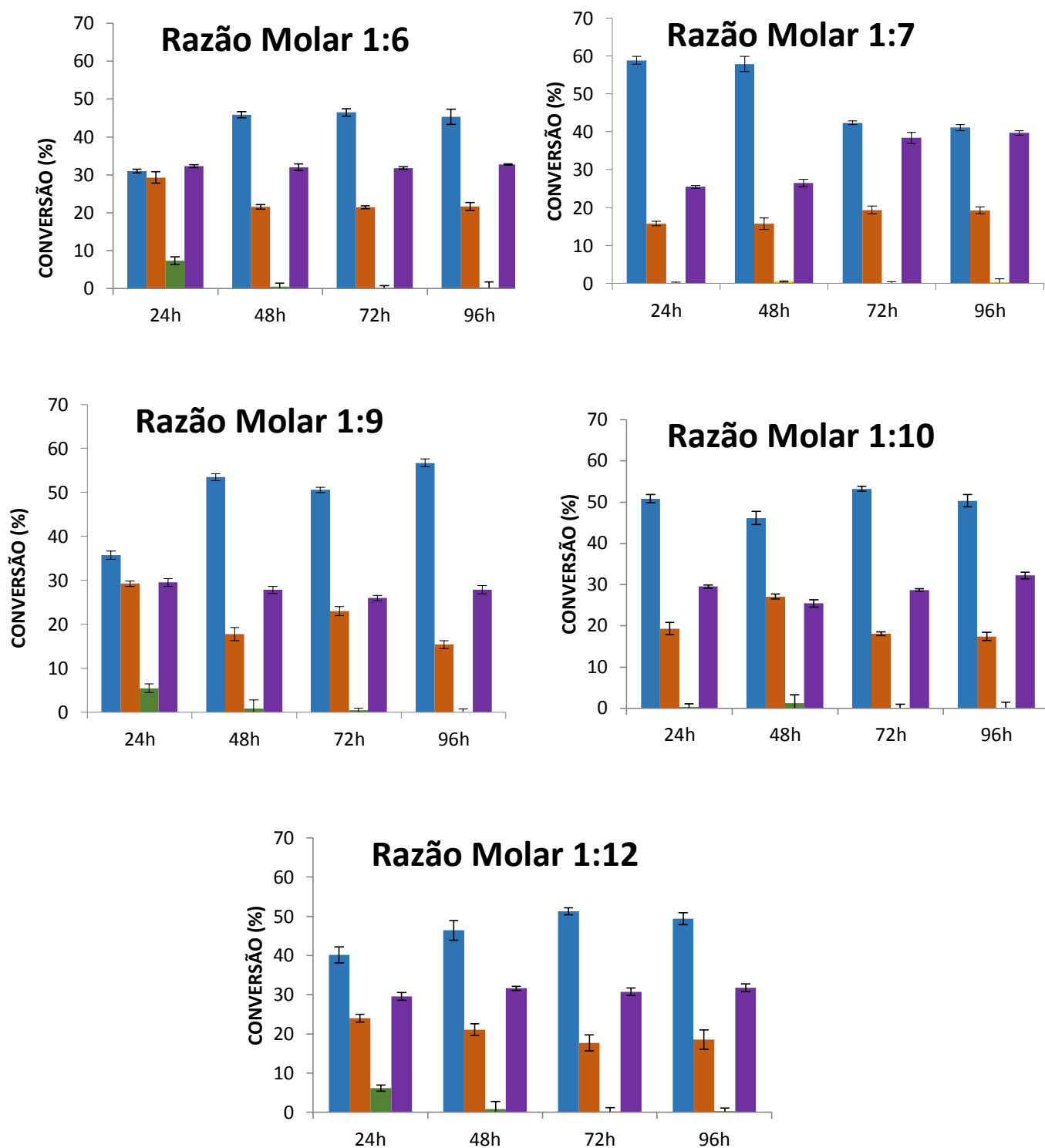


Figura 5. 8 - Perfil de conversão mono (■), di (■) e Triacilgliceróis (■) e de ésteres etílico (■) na reação de transesterificação de óleo de coco bruto a 40 °C , 96 h e nas razões molares óleo:etanol 1:6,1:7,1:9,1:10,1:12.

5.3.3 Uso de Aditivos na reação de transesterificação

Com intuito de aumentar a conversão em ésteres etílicos no sistema batelada foram utilizados aditivos, tais como: água, terc-butanol e peneiras moleculares em diferentes concentrações na melhor condição de reação determinada anteriormente, ou seja, na razão molar 1:7, 40 °C e 96 h. De acordo com GOG *et al.* (2012) a presença de água em reações de transesterificação desempenha forte influência sobre a atividade catalítica e estabilidade da lipase, uma vez que as lipases apresentam uma “tampa” hidrofóbica em seu sítio ativo que ao interagir com a interface óleo:água apresenta mudança conformacional expondo o sítio ativo.

Diversos estudos relatam que pequenas alíquotas de água aumentam a conversão de ésteres e que na presença de água em excesso as lipases tendem a realizar reação de hidrólise reduzindo a conversão em ésteres (KAIEDA *et al.*, 2001; SHAH e GUPTA, 2007; GOG *et al.*, 2012; BABAKI *et al.*, 2015). Na Figura 5.9 observa-se o perfil de conversão em ésteres etílicos. Com o aumento da concentração de água há redução da conversão em ésteres, e que até mesmo em pequenas alíquotas de água a conversão não é melhorada.

De acordo com BABAKI *et al.* (2015) a adição de álcoois terciários, tais como terc-butanol e terc-amil em reações de transesterificação enzimática apresenta efeito positivo, tendo em vista que estes álcoois melhoram a solubilidade do subproduto glicerol e metanol no meio reacional reduzindo a inativação das lipases, o que resulta em um aumento no rendimento de transesterificação. Na Figura 5.10 mostrou-se o perfil de conversão em ésteres etílicos na presença de diferentes concentrações de terc-butanol adicionado na reação. Nota-se que a reação manteve-se de forma quase idêntica sem ou com a presença de 10-30 % de terc-butanol, possivelmente este comportamento está relacionado com o uso do etanol que não apresenta um efeito deletério para a lipase quando comparado ao metanol. Acima de 30 % de terc-butanol apresenta uma redução na conversão em ésteres etílicos, comportamento semelhante ao relatado por BABAKI *et al.*, (2015) na reação de transesterificação de óleo de canola com a lipase *Thermomyces lanuginosus* imobilizada em sílica.

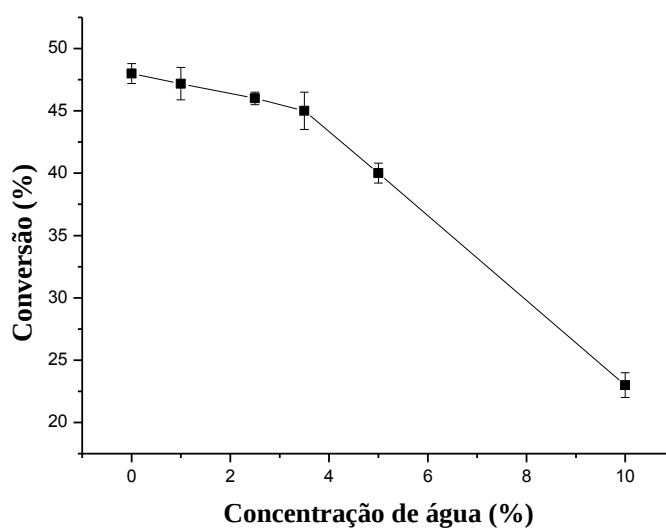


Figura 5.9 - Perfil de conversão em ésteres etílicos na presença de 1; 2,5; 3,5; 5 e 10 % de água na reação de transesterificação de óleo de coco bruto na razão molar óleo:etanol 1:7, 40 °C e 96 h.

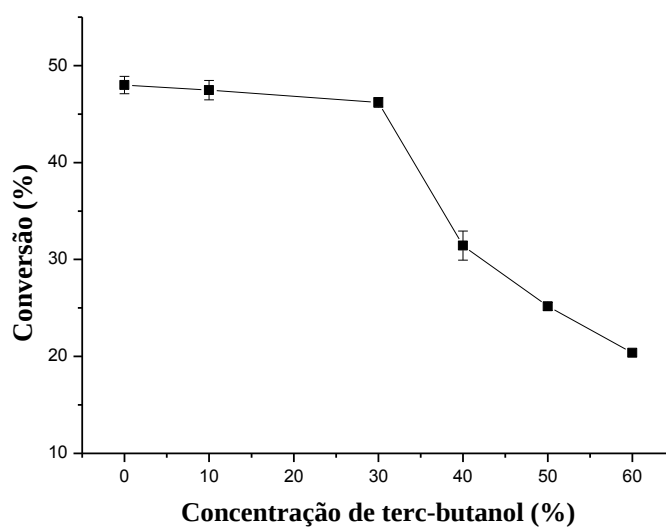


Figura 5.10 - Perfil de conversão em ésteres etílicos na presença de 10 -60 % de terc-butanol na reação de transesterificação de óleo de coco bruto na razão molar óleo:etanol 1:7, 40 °C e 96 h.

Na Figura 5.11 apresenta-se o efeito da presença de peneira molecular em diferentes concentrações na reação de transesterificação de óleo de coco bruto. Nota-se uma redução de cerca de 10 % na conversão em ésteres etílicos com cerca de 5 % de peneira molecular, comportamento semelhante ao encontrado por BABAKI *et al.* (2015). De acordo com esses

autores o uso de adsorventes pode efetivamente controlar a concentração de água durante a transesterificação, como também reduzir a quantidade álcool no meio reacional, e assim reduzir a conversão em ésteres.

Portanto, o uso de aditivos na reação de transesterificação utilizando óleo bruto, etanol e o biocatalisador selecionado não apresentou efeito significativo na conversão em ésteres etílicos.

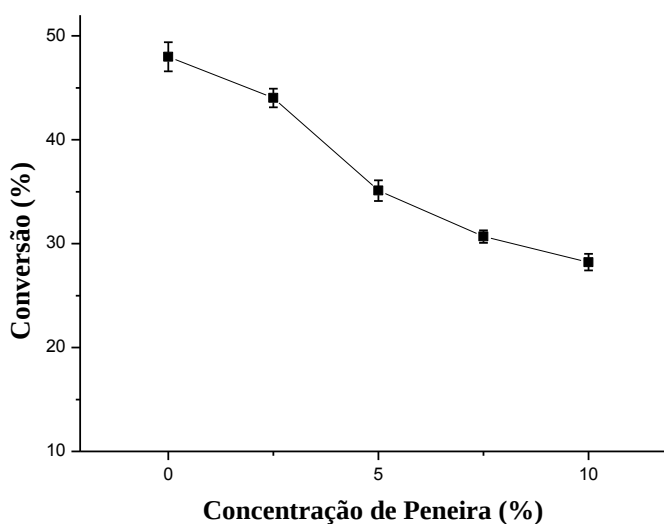


Figura 5.11 - Perfil de conversão de ésteres etílicos na presença de 2,5; 5; 7,5 e 10 % de peneira molecular na reação de transesterificação de óleo de coco bruto na razão molar óleo:etanol 1:7, 40 °C e 96 h.

5.3.4 Uso da LBC em reações não convencionais de transesterificação enzimática

Neste tópico verificou-se a substituição do processo convencional (batelada) para os processos não convencionais (ultrassom e micro-ondas) com o objetivo de intensificar o processo enzimático.

Ultrassom

As reações em ultrassom foram inicialmente realizadas com intuito de verificar a cinética da reação com as seguintes condições experimentais: 100 % amplitude de irradiação, 40 °C e com baixa carga enzimática de 10 % em massa do biocatalisador imobilizado por adsorção física. De acordo com Figura 5.12 a máxima conversão (6 %) foi alcançada com o

tempo de 8 h, verifica-se que a conversão apresentada foi menor ao encontrado nas reações em batelada (58 %).

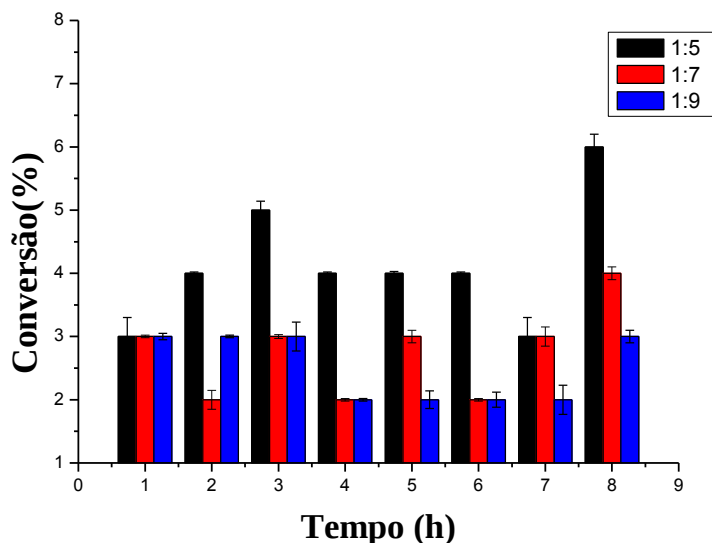


Figura 5.12 - Cinética da reação de transesterificação enzimática assistida por ultrassom nas razões molares de óleo:etanol (1:5, 1:7, 1:9), temperatura de 40 °C e potência de 220 W.

Com base nesses testes iniciais, foram realizadas reações com 20 % (m/m) do biocatalisador imobilizado e nas melhores condições experimentais anteriores. Os resultados apresentaram um aumento na conversão para cerca de 25 %, conforme apresentado na Tabela 5.4. Desta forma, observou-se que o uso do ultrassom em reações de transesterificação utilizando a LBC não apresentou aumento na taxa de conversão em ésteres etílicos em comparação com as reações realizadas em batelada.

Tabela 5.4 - Rendimento de conversão em ésteres etílicos na reação de transesterificação assistida por ultrassom com 100 % de amplitude de irradiação, 20 % (m/m) de biocatalisador imobilizado, 40 °C e 8 h.

Razão Molar (óleo:etanol)	Conversão (%)
1:5	21,92 ± 0,05
1:7	20,07 ± 0,02
1:9	24,96 ± 0,23

Os efeitos da irradiação do ultrassom na atividade enzimática não estão apresentados na literatura de maneira consolidada. Em alguns casos, o uso do ultrassom resulta na perda de atividade enzimática, em outros leva ao aumento da taxa de reação. O ultrassom pode interferir nas características da enzima, causar distúrbios nas interações fracas e induzir mudanças conformacionais nas proteínas o que altera sua estrutura devido à perturbação dinâmica causada pela irradiação do ultrassom (SHAH e GUPTA, 2008; TRENTIN *et al.*, 2015; ZENEVICZ *et al.*, 2016). Neste estudo foi possível observar que a irradiação do ultrassom não apresentou aumento na taxa de reação da transesterificação do óleo de coco bruto utilizando a LBC imobilizada por adsorção física.

No entanto, até o momento, o potencial do ultrassom não está bem conhecido, devido à falta de conhecimento dos efeitos moleculares exatos do ultrassom em enzimas e células vivas (SHAH e GUPTA, 2008; YU *et al.*, 2010). Estudos com catálise enzimática demonstram que a irradiação do ultrassom oferece uma taxa de reação mais rápida para a produção de biodiesel, o aumento da taxa de reação é atribuído à superação das limitações de transferência de massa quando aplicado a um sistema de reação com duas fases (YU *et al.*, 2010).

BATISTELLA *et al.* (2012) avaliaram a influência da irradiação do banho de ultrassom na transesterificação enzimática do óleo de soja com etanol utilizando as enzimas comerciais Lipozyme RM IM e Novozym 435. A máxima conversão obtida foi de 86 % e 57 % para a Lipozyme RM IM (13 % em massa de enzima, 100 % de amplitude de irradiação e 57 °C) e Novozym 435 (27 % em massa de enzima, 40 % de amplitude de irradiação e 63 °C), respectivamente, com tempo de reação de 4 h e razão molar 1:3. No estudo realizado por MICHELIN *et al.* (2015) avaliaram a influência da irradiação do banho de ultrassom na reação de transesterificação do óleo não comestível de coco de macaúba e etanol com a lipase comercial Novozym 435. A máxima conversão obtida foi de 70 % com uma de irradiação de 132 W, 65 °C e tempo de reação de 30 min.

Micro-ondas

As reações em micro-ondas foram realizadas com potência de 100 W, 20 % (m/m) de biocatalisador imobilizado por adsorção física, 40 °C e tempo de reação de 8 h. Os resultados apresentados mostram que a irradiação por micro-ondas não aumentou a taxa de reação da LBC apresentando baixas conversões em ésteres etílicos, cerca de 8 % em comparação com as reações em batelada como mostra a Tabela 5.5.

O uso do micro-ondas como fonte de energia, para aquecimento, é amplamente utilizado em química orgânica, o qual proporciona redução no tempo de reação e melhoria nas conversões. No estudo realizado por DA RÓS *et al.* (2012) verificaram a influência da irradiação por micro-ondas na reação de transesterificação de óleo de babaçu e etanol com a Lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizada em sílica-PVA. Observou-se um aumento de aproximadamente 6 vezes na taxa de reação ao utilizar a irradiação de micro-ondas obtendo uma conversão de 100 % com um tempo de reação de 10 h e com o aquecimento convencional o mesmo resultado foi alcançado com 48 h de reação.

Tabela 5.5 - Rendimento de conversão em ésteres etílicos em reações de transesterificação assistidas por micro-ondas com potência de 100 W, 20 % (m/m) de biocatalisador imobilizado, 40 °C e 8 h.

Razão Molar (óleo:etanol)	Conversão (%)
1:5	6,11 ± 0,05
1:7	7,91 ± 0,15
1:9	5,93 ± 0,10

Entretanto, neste trabalho os resultados demonstraram que o uso do micro-ondas não apresentou aumento na conversão em ésteres etílicos, possivelmente está relacionado com o efeito da irradiação no complexo enzima-suporte formado na imobilização por adsorção física da LBC no biochar de semente de goiaba. Tendo em vista que os trabalhos na literatura utilizaram LBC imobilizada por ligação covalente ou lipase comercial imobilizada (Novozym 435), ou seja, o complexo formado entre enzima-suporte apresenta uma maior estabilidade quando comparado com o método de adsorção física que ocorre por meio de interações hidrofóbicas, iônicas e forças de Van Der Waals (NOGUEIRA *et al.*, 2010; DA RÓS *et al.*, 2013).

As reações enzimáticas são bastante complexas e os estudos com o uso da irradiação de micro-ondas em síntese enzimática permanecem ainda limitados (NOGUEIRA *et al.*, 2010; DA RÓS *et al.*, 2013). De acordo com REJASSE *et al.* (2007) a irradiação por micro-ondas pode influenciar nas propriedades estruturais e funcionais das enzimas, uma vez que a absorção direta da energia de micro-ondas no domínio polar da proteína poderia induzir modificação na flexibilidade da enzima, e conseqüentemente alterar as propriedades

enzimáticas. Portanto, o comportamento enzimático sob irradiação de micro-ondas ainda necessita ser mais explorada, pois os efeitos dependem do biocatalisador, da polaridade da reação e temperatura para o sistema proposto neste estudo.

5.5.5. Estabilidade operacional

A partir da seleção do tratamento do biochar de semente de goiaba, do método de imobilização e da escolha do processo convencional para a reação de transesterificação de óleo de coco bruto e etanol foi realizado o estudo de estabilidade operacional. A estabilidade operacional da LBC imobilizada por adsorção física em biochar tratado com DCM foi determinada na melhor condição da reação de transesterificação em batelada na razão molar óleo:etanol 1:7, 40 °C e em ciclos de 96h. Conforme apresentado na Figura 5.13 é possível observar que o sistema imobilizado apresenta baixa estabilidade operacional reduzindo cerca de 70 % da conversão em ésteres etílicos inicial no terceiro ciclo. A redução da conversão em ésteres etílicos, após a reutilização pode ser atribuído à dessorção da LBC do biochar uma vez que a imobilização de enzimas por ADS ocorre por meio de interações fracas (van der Waals, hidrofóbica e ligações de hidrogênio) (YADAV *et al.*, 2005). Outro fator que influencia negativamente na conversão em ésteres etílicos está relacionado ao bloqueio dos poros do suporte pelo glicerol formado durante a transesterificação (WATANABE *et al.*, 2000).

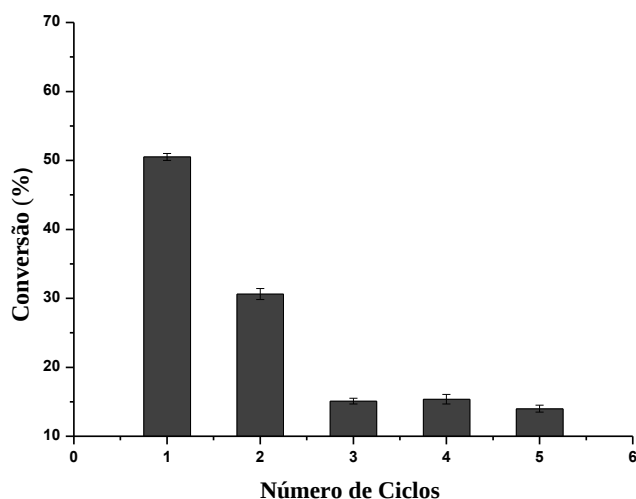


Figura 5. 13- Reutilização da LBC imobilizada em biochar por ADS em reação de transesterificação em batelada na razão molar 1:7 e 96 h de reação a 40 °C.

6. CONCLUSÕES

Com os diferentes tratamentos utilizados para a ativação do biochar foi possível observar que ocorreu mudanças morfológicas e físico-químicas e mostrou-se que o melhor tratamento para a imobilização da LBC foi o tratamento convencional com KOH que apresentou uma considerável alteração em sua estrutura em relação aos outros métodos utilizados. Entretanto no que se refere à estabilidade mecânica o tratamento em mufla apresentou baixa estabilidade quando comparado com o tratamento realizado em ultrassom, haja vista a necessidade da produção de biocatalisador mecanicamente estável foi utilizado para o desenvolvimento do trabalho o biochar tratado em ultrassom com diclorometano.

Na avaliação dos diferentes métodos de imobilização da LBC no biochar, verificou-se que o biochar não apresenta grupos reativos suficientes para a realização de imobilização covalente multipontual, apesar da inserção de grupos funcionais no biochar, os sistemas imobilizados por ligação covalente multipontual e ligação cruzada não apresentaram resultados viáveis, apenas o sistema imobilizado por adsorção física apresentou resultado promissor. O biocatalisador imobilizado (LBC imobilizada por adsorção física em biochar tratado em ultrassom com diclorometano) foi utilizado nas reações de transesterificação do óleo de coco bruto em diferentes condições reacionais. Verificou-se que a máxima conversão em ésteres etílicos foi de 48 % em batelada, nas seguintes condições: razão molar 1:7, 40 °C por 96 h e a máxima formação de monoacilgliceróis foi de 60 % na razão molar 1:7, 40 °C por 24 h.

Em relação ao uso de aditivos na reação de transesterificação foi observado que a adição de água, peneira molecular e terc-butanol não apresentou aumento na conversão em ésteres etílicos. Como também não apresentou aumento na conversão em ésteres etílicos as reações de transesterificação assistidas por micro-ondas e ultrassom apresentando baixas conversões com cerca de 8 e 25 %, respectivamente, quando comparada com as reações em batelada. A partir dos resultados apresentados, pode-se concluir que a utilização do biochar como suporte para imobilização de enzima é uma alternativa promissora, bem como a utilização destes biocatalisadores imobilizados em reações de transesterificação de óleo de coco bruto com elevada formação de monoacilgliceróis.

7. REFERÊNCIAS

- 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.
- ADEMILUYI, F. T.; AMADI, S. A.; AMAKAMA, JACOB, N. Adsorption and treatment of organic contaminants using activated carbon from waste nigerian bamboo, *Journal of Applied Sciences and Environmental Management*, 13, p. 39-47, 2009.
- 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.
- ALMEIDA, L. C.; JESUS, F. A.; SANTOS, F. M. S.; FRICKS, A.; FREITAS, L. S.; LIMA, A. S.; SOARES, C. M. F. Imobilização de lipase de *Burkholderia cepacia* por ligação covalente em biochar derivado de semente de goiaba (*Psidium guajava* L). In: XX Simpósio Nacional de Bioprocessos, XI Simpósio de Hidrólise Enzimática de Biomassa, Fortaleza, 2015.
- AMINI, Z.; ONG, H. C.; HARRISON, M. D.; KUSUMO, F.; MAZAHARI, H.; ILHAM, Z. Biodiesel production by lipase-catalyzed transesterification of *Ocimum basilicum* L. (sweet basil) seed oil, *Energy Conversion and Management*, 132, p. 82-90, 2017.
- ANTCZAK, M. S.; KUBIAK, A.; ANTCZAK, T.; BIELECKI, S. Enzymatic biodiesel synthesis – key factors affecting efficiency of the process, *Renewable Energy*, 34, p. 1185-1194, 2009.
- ASADA, T.; OHKUBO, T.; KAWATA, K.; OIKAWA, K. Ammonia adsorption on bamboo charcoal with acid treatment, *Journal of Health Science*, 52, p. 585-589, 2006.
- ASHJARI, K.; MOHAMMADIC, M.; BADRI, R. Chemical amination of *Rhizopus oryzae* lipase for multipoint covalent immobilization on epoxy-functionalized supports: Modulation of stability and selectivity, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 115, p. 128-134, 2015.

- BABAKI, M.; YOUSEFI, M.; HABIBI, Z.; BRASK, J.; MOHAMADDI, M. Preparation of highly reusable biocatalysts by immobilization of lipases on epoxy-functionalized silica for production of biodiesel from canola oil, *Biochemical Engineering Journal*, 101, p. 23-31, 2015.
- BABICZ, I.; LEITE, S. G. F.; SOUZA, R. O. M. A.; ANTUNES, O. A. C. Lipase-catalyzed diacylglycerol production under sonochemical irradiation, *Ultrasonics Sonochemistry*, 17, p. 4-6, 2010.
- BARBE, S.; LAFAQUIE`RE, V.; GUIEYSSE, D.; MONSAN, P.; REMAUD-SIME`ON, M.; ANDRE, I. Insights into lid movements of *Burkholderia cepacia* lipase inferred from molecular dynamics simulations, *Proteins*, 77, p. 509-523, 2009.
- BARBOSA, O.; ORTIZ, C.; BERENGUER-MURCIA, A.; TORRESA, R.; RODRIGUES, R. C.; FERNANDEZ-LAFUENTEE, R. Glutaraldehyde in bio-catalysts design: a useful crosslinker and a versatile tool in enzyme immobilization, *RSC Advances*, 4, p. 1583-1600, 2013.
- 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, *Química Nova*, 37, p. 969-976, 2014.
- BATISTELLA, L.; LERIN, L. A.; BRUGNEROTTO, P.; DANIELLI, A.J; TRENTIN, C. M.; POPIOLSKI, A.; TREICHEL, H.; OLIVEIRA, J. V.; OLIVEIRA, D. Ultrasound-assisted lipase-catalyzed transesterification of soybean oil in organic solvent system, *Ultrasonics Sonochemistry*, 19, p. 452-458, 2012.
- BEZERRA, T. M. S; BASSAN, J. C.; SANTOS, V. T. O.; FERRAZ, A.; MONTI, R. Covalent immobilization of laccase in green coconut fiber and use in clarification of apple juice, *Process Biochemistry*, 50, p. 417-423, 2015.
- BLANCO, R. M.; ROLDAN, I. Two additives to improve stability of immobilized lipase, *Biocatalysis and Biotransformation*, 36, p. 224-232, 2017.
- 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.

- 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, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 146, p. 173-187, 2008.
- 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, N. B.; LIMA, A. S.; SOARES, C. M. F. Uso de sílicas modificadas para imobilização de lipases, *Química Nova*, 38, p. 399-409, 2014.
- CASTRO, H. F.; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação, *Química Nova*, 27, p. 146-156, 2004.
- CHATTERJEE, S.; YADAV, D.; BARBORA, L.; MAHANTA, P.; GOSWAMI, P. Silk-Cocoon matrix immobilized lipase catalyzed transesterification of sunflower oil for production of biodiesel, *Journal of Catalysts*, ID 868535, p. 1-7, 2014.
- CHELLAPPAN, S.; NAIR, V.; SAJITH, S.; APARNA, K. Experimental validation of biochar based green Bronsted acid catalysts for simultaneous esterification and transesterification in biodiesel production. *Bioresource Technology Reports*, 2, p. 38-44, 2018.
- CHEN, B.; CHEN, Z.; LV, S. A novel magnetic biochar efficiently sorbs organic pollutants and phosphate, *Bioresource Technology*, 102, p. 716-723, 2011.
- CHEN, CHIA-CHEN; MURALIDHAR, R. P.; SHOBHA, D. C.; CHANG, PO-CHI; HO, YEN-PENG. Study of microwave effects on the Lipase-Catalyzed hydrolysis, *Enzyme and Microbial Technology*, 82, p. 164-172, 2016.
- CHELLAPPAN, S.; NAIR, V.; SAJITH, V.; APARNA, K. Synthesis, optimization and characterization of biochar based catalyst from sawdust for simultaneous esterification and transesterification, *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 26, p. 2654-2663, 2018.
- CHOI, JUNG-MIN; HAN, SANG-SOO; KIM, HAK-SUNG. Industrial applications of enzyme biocatalysis: Current status and future aspects, *Biotechnology Advances*, 33, p. 1443-1454, 2015.

- CHRISTOPHER, L. P.; KUMAR, H.; ZAMBARE, V. P. Enzymatic biodiesel: challenges and opportunities, *Applied Energy*, 119, p. 497-520, 2014.
- COSTA-SILVA, T. A.; CARVALHO, A. K. F. SOUZA, C. R. F.; DE CASTRO, H. F.; SAID, S.; OLIVEIRA, W. P. Enzymatic transesterification of coconut oil using chitosan-immobilized lipase produced by fluidized-bed system, *Energy Fuels*, 31(11), p. 12209-12216, 2017.
- CRISTOVÃO, R. O; TAVARES, A. P. M.; BRÍGIDA, A. I. S.; LOUREIRO, J. M; BOAVENTURA, R. 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.
- CRISTOVÃO, R. O.; SILVÉRIO, S. C.; TAVARES, A. P. M.; BRÍGIDA, A. I. S.; LOUREIRO, J. M.; BOAVENTURA, R. A. R.; MACEDO, E. A.; COELHO, M. A. Z. Green coconut fiber: a novel carrier for the immobilization of commercial *laccase* by covalent attachment for textile dyes decolourization, *World Journal Microbiol Biotechnol*, 28, p. 2827-2838, 2012.
- D'SOUZA, S. F.; GODBOLE, S. S. Immobilization of invertase on rice husk using polyethylenimine, *Journal of Biochemical and Biophysical Method*, 52, p. 59-62, 2002.
- DA RÓ'S, P. C. M.; DE CASTRO, H. F.; CARVALHO, A. K. F.; SOARES, C. M. F.; DE MORAES, F. F.; ZANIN, G. M. Microwave-assisted enzymatic synthesis of beef tallow biodiesel, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 39, p. 529-536, 2012.
- DA RÓ'S, P. C. M.; FREITAS, L.; PEREZ, V. H.; DE CASTRO, H. F. Enzymatic synthesis of biodiesel from palm oil assisted by microwave irradiation, *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 36, p. 443-451, 2013.
- DA RÓ'S, P. C. M.; SILVA, W. C.; GRABAUSKAS, D.; PEREZ, V. H.; DE CASTRO, H. F. Biodiesel from babassu oil: characterization of the product obtained by enzymatic route accelerated by microwave irradiation, *Industrial Crops and Products*, 52, p. 313-320, 2014.
- DEHKHODA, A. M.; ELLIS, N. Biochar-based catalyst for simultaneous reactions of esterification and transesterification, *Catalysis Today*, 207, p. 86-92, 2013.

- DATTA, S.; CHRISTENA, L. R.; RAJARAM, Y. R. S. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials, *Biotechnology*, 3, p. 1-9, 2013.
- DANTAS, J. H.; PARIS, L. D.; BARÃO, C. E.; ARROYO, P. A.; SOARES, C. M. F.; VISENTAIRNER, J. V.; FARIA, F.; ZANIN, G. M. Influence of alcohol: oil molar ratio on the production of ethyl esters by enzymatic transesterification of canola oil. *African Journal of Biotechnology*, 12, p. 6968-6979, 2013.
- DEVI, B. L. A.; GUO, Z.; XU, X. Characterization of cross-linked lipase aggregates, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 86, p. 637-642, 2009.
- ES, I.; VIEIRA, J. D. G.; AMARAL, A. C. Principles, techniques, and applications of biocatalyst immobilization for industrial application, *Applied Microbiology Biotechnology*, 99, p. 2065-2082, 2015.
- FAN, Y.; WANG, B.; YUAN, S.; WUA, X.; CHEN, J. WANGA, L. Adsorptive removal of chloramphenicol from wastewater by NaOH modified bamboo charcoal, *Bioresource Technology*, 101, p. 7661-7664, 2010.
- FOGLER, H. S. **Distribuições de Tempos de Residência para Reatores Químicos**. 3 ed. Rio de Janeiro: LTC, 2002.
- FOO, K. Y.; HAMEED, B. H. Preparation and characterization of activated carbon from sunflower seed oil residue via microwave assisted K_2CO_3 activation, *Bioresource Technology*, 102, p. 9794-9799, 2011a.
- FOO, K. Y.; HAMEED, B. H. Utilization of rice husks as a feedstock for preparation of activated carbon by microwave induced KOH and K_2CO_3 activation, *Bioresource Technology*, 102, p. 9814-9817, 2011b.
- FOO, K. Y.; HAMEED, B. H. Coconut husk derived activated carbon via microwave induced activation: Effects of activation agents, preparation parameters and adsorption performance, *Chemical Engineering Journal*, 184, p. 57-65, 2012a.
- FOO, K. Y.; HAMEED, B. H. Potential of jackfruit peel as precursor for activated carbon prepared by microwave induced NaOH activation, *Bioresource Technology*, 112, p. 143-150, 2012b.
- FOO, K. Y.; HAMEED, B. H. Porous structure and adsorptive properties of pineapple peel based activated carbons prepared via microwave assisted KOH and K_2CO_3 activation, *Microporous and Mesoporous Materials*, 148, p. 191-195, 2012c.

- FOO, K. Y.; HAMEED, B. H. Mesoporous activated carbon from wood sawdust by K_2CO_3 activation using microwave heating, *Bioresource Technology*, 111, p. 425-432, 2012d.
- FREITAS, L.; BUENO, T.; PEREZ, V. H.; CASTRO, H.F. Monoacilgliceróis: produção por via enzimática e algumas aplicações, *Química Nova*, 31, p. 1514-1521, 2008.
- 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.
- FREGOLENTE, P. B. L.; PINTO, G. M. F.; WOLF-MACIEL, M. R.; FILHO, R. M.; BATISTELLA, C. B. Produção de monoacilgliceróis e diacilgliceróis via glicerólise enzimática e destilação molecular, *Química Nova*, 32, p. 1539-1543, 2009.
- GHATTAS, N.; ABIDI, F.; GALAI, S.; MARZOUKI, N.; SALAH, A. B. Monoolein production by triglycerides hydrolysis using immobilized *Rhizopus oryzae* lipase, *International Journal of Biological Macromolecules*, 68, p. 1-6, 2014.
- GAI, X.; WANG, H.; LIU, J.; ZHAI, L.; LIU, S.; REN, T.; LIU, H. Effects of feedstock and pyrolysis temperature on biochar adsorption of ammonium and nitrate, *PLoS ONE*, 9, p. 1-19, 2014.
- GHARAT, N.; RATHOD, V. K. Ultrasound assisted enzyme catalyzed transesterification of waste cooking oil with dimethyl carbonate, *Ultrasonics Sonochemistry*, 20, p. 900-905, 2013.
- GOG, A.; ROMAN, M.; TOS, M.; PAIZS, C.; IRIMIE, F. D. Biodiesel production using enzymatic transesterification-current state and perspectives, *Renewable Energy*, 39, p. 10-16, 2012.
- GONÇALVES, K. M.; SUTILI, F. K.; LEITE, S. G. F.; SOUZA, R. O. M. A.; LEAL, I. C. R. Palm oil hydrolysis catalyzed by lipases under ultrasound irradiation – the use of experimental design as a tool for variables evaluation, *Ultrasonics Sonochemistry*, 19, p. 232-236, 2012.
- 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, *Journal of Biobased Materials and Bioenergy*, 7, p. 724-732, 2013.

- GUISÁN, J. M.; Agarose-Aldehyde gels as supports for immobilization-stabilization of enzymes, *Enzyme and Microbial Technology*, 10, p. 375, 1988.
- GUISÁN, J. M.; In: **Immobilization of enzymes for use in organic media. In: Immobilization of enzymes and cells.** Totowa: Humana Press. p. 1-13, 2006.
- HADOUNA, H.; SADAOUIB, Z.; SOUAMIA, N.; SAHELA, D.; TOUMERTA, I. Characterization of mesoporous carbon prepared from date stems by H₃PO₄ chemical activation, *Applied Surface Science*, 280, p. 1-7, 2013.
- HANEFELD, U.; GARDOSI, L.; MAGNER, E. Understanding enzyme immobilization, *Chemical Society Review*, 38, p. 453-468, 2009.
- HOMAEI, A. A.; SARIRI, R.; VIANELLO, F.; STEVANATO, R. Enzyme immobilization: an update, *Journal of Chemical Biology*, 6, p. 185-205, 2013.
- HSU, A. F.; JONES, K. C.; FOGLIA, T. A.; MARMER, W. N. Optimization of alkyl ester production from grease using a phyllosilicate sol-gel immobilized lipase, *Biotechnology Letters*, 25, p. 1713-1716, 2003.
- IDRIS, S.; IYAKA, Y. A.; DAUDA, B. E. N.; DAMITSO, M. M. N.; UMAR, M. T. Kinetic study of utilizing groundnut shell as an adsorbent in removing chromium and nickel from dye effluent, *American Chemical Science Journal*, 2, p. 12-24, 2012.
- ISO, M.; CHEN, B. X.; EGUCHI, M.; KUDO, T.; SHRESTHA, S. Production of biodiesel fuel from triglycerides and alcohol using immobilized lipase, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 16, p. 53-58, 2001.
- JEGANNATHAN, K. R.; JUN-YEE, L.; CHAN, E.-S.; RAVINDRA, P. Production of biodiesel from palm oil using liquid core lipase encapsulated in κ -carrageenan, *Fuel*, 89, p. 2272-2277, 2010.
- JIN, J.; LI, D.; ZHU, X. M.; ADHIKARI, P.; LEE, K.-T.; LEE, J. H. Production of diacylglycerols from glycerol monooleate and ethyl oleate through free and immobilized lipase-catalyzed consecutive reactions, *New Biotechnology*, 28, p. 190-195, 2011.
- JUNIOR, L. A. J.; TOMMASI, A. C.; OLIVEIRA JUNIOR, A. M.; RUSSO, S. L. Análise da produção de coco no estado de Sergipe frente ao crescimento da cultura no Nordeste e no Brasil, *GEINTEC*, 5, p. 400 - 408, 2013.

- KAIEDA, M.; SAMUKAWA, T.; KONDO, A.; FUKUDA, H. Effect of methanol and water contents on production of biodiesel fuel from plant oil catalyzed by various lipases in a solvent-free system, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 91, p. 2-5, 2001.
- KARMAKAR, A.; KARMAKAR, S.; MUKHERJEE, S. Properties of various plants and animals feedstocks for biodiesel production, *Bioresource Technology*, 101, p. 7201-7210, 2010.
- KIM, K. K.; SONG, H. K.; SHIN, D. H.; HWANG, K. Y.; SUH, S. W. The crystal structure of a triacylglycerol lipase from *Pseudomonas cepacia* reveals a highly open conformation in the absence of a bound inhibitor, *Structure*, 5, p. 173-185, 1997.
- KOPP, W.; SILVA, F. A.; LIMA, L. N.; MASUNAGA, S. H.; TARDIOLI, P. W.; GIORDANO, R. C.; ARAÚJO-MOREIRA, F. M.; GIORDANO, R. L. C. Synthesis and characterization of robust magnetic carriers for bioprocess applications, *Materials Science and Engineering B*, 193, p. 217-228, 2015.
- KLASSON, K. T.; WARTELLE, L. H.; RODGERS, J. E.; LIMA, I. M. Copper (II) adsorption by activated carbons from pecan shells: Effect of oxygen level during activation, *Industrial Crops and Products*, 30, p. 72-77, 2009.
- KUMAR, A. G.; SWARNALATHA, S.; KAMATCHI, P.; SEKARANB, G. Immobilization of high catalytic acid protease on functionalized mesoporous activated carbon particles, *Biochemical Engineering Journal*, 43, p.185-190, 2009.
- KUMAR, G.; KUMAR, D.; POONAM, R.; JOHARI, C. P. S. Enzymatic transesterification of *Jatropha curcas* oil assisted by ultrasonication, *Ultrason. Sonochem*, 18, p. 923-927, 2011.
- KUPPUSAMY, S.; THAVAMANI, P.; MEGHARAJ, M.; VENKATESWARLU, K.; NAIDU, R. Agronomic and remedial benefits and risks of applying biochar to soil: Current knowledge and future research directions, *Environment International*, 87, p.1-12, 2016.
- 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 Advance*, 28, p. 500-518, 2010.

- LEHMANH, 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, N.; ZENG, QUAN-MING; ZONG, MIN-HUA. Substrate specificity of lipase from *Burkholderia cepacia* in the synthesis of 3-arylaliphatic acid esters of floxuridine, *Journal of Biotechnology*, 142, p. 267-270, 2009.
- LI, K.; FAN, Y.; HE, Y.; ZENG, L.; HAN, X.; YAN, Y. *Burkholderia cepacia* lipase immobilized on heterofunctional magnetic nanoparticles and its application in biodiesel synthesis, *Scientific Reports*, 7, p. 64-73, 2017.
- LOPRESTO, G. G.; NACCARATO, S.; ALBO, L.; PAOLA, M. G.; CHAKRABORTY, S.; CURCIO, S.; CALABRÒ, V. Enzymatic transesterification of waste vegetable oil to produce biodiesel, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 121, p. 229-235, 2015.
- LIMA, L. N.; OLIVEIRA, G. C.; ROJAS, M. J.; CASTRO, H. F.; DA RÓS, P. C. M.; MENDES, A. A.; GIORDANO, R. L. C.; TARDIOLI, P. W. Immobilization of *Pseudomonas fluorescens* lipase on hydrophobic supports and application in biodiesel synthesis by transesterification of vegetable oils in solvent-free systems, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 42, p. 523-535, 2015.
- LV, J. S.; LIUA, X.Y.; XUA, J. X.; DENG, Y. F.; WUA, Z.; WANG, Y. M.; FAN, 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.
- MARDHIAH, H. H.; ONG, H. C.; MASJUKI, H. H.; LIM, S.; PANG, Y. L. Investigation of carbon-based solid acid catalyst from *Jatropha curcas* biomass in biodiesel production. *Energy Conversion and Management*, 144, p. 10–17, 2017.
- MANOEL, E. A.; JOSÉ, C. S.; FREIRE, D. M. G.; RUEDA, N.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Immobilization of lipases on hydrophobic supports involves the open form of the enzyme, *Enzyme and Microbial Technology*, 71, p. 53-57, 2015.
- MAO, H.; ZHOU, D.; HASHISH, Z.; WANG, S.; CHEN, H.; WANG, H. Preparation of pinewood- and wheat straw-based activated carbon via a microwave-assisted potassium hydroxide treatment and an analysis of the effects of the microwave activation conditions, *BioResources*, 10, p. 809-821, 2015.

- MENDES, A. A.; DE CASTRO, H. F.; GIORDANO, R. L. C. Triagem de suportes orgânicos e protocolos de ativação na imobilização e estabilização de lipase de *Thermonyces lanuginosus*, *Química Nova*, 36, p. 245-251, 2013.
- MENDES, A. A.; SILVA, M. L. C. P.; BARBOSA, B. C. M.; SOARES, C. M. F.; CASTRO, H. F. Atividade e estabilidade operacional de lipase imobilizada em fosfato de zircônio na ausência e presença de polietilenoglicol, *Acta Scientiarum Technology Maringá*, 28, p. 133-140, 2006.
- MEUNIER, S. M.; RAJABZADEH, A. R.; LEGGE, R. L. Kinetic modelling of the production of methyl oleate by Celite supported lipase sol-gels, *Biochemical Engineering Journal*, 85, p. 63-70, 2014.
- MEUNIER, S. M.; RAJABZADEH, A. R.; WILLIAMS, T. G.; LEGGE, R. L. Methyl oleate production in a supported sol-gel immobilized lipase packed bed reactor, *Energy Fuels*, 29, p. 3168-3175, 2015.
- MEHRASBI, M. R.; MOHAMMADI, J.; PEYDA, M.; MOHAMMADI, M. Covalent immobilization of *Candida antarctica* lipase on core-shell magnetic nanoparticles for production of biodiesel from waste cooking oil, *Renewable Energy*, 101, p. 593-602, 2017.
- 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.
- NAKPONG, P.; WOOTTHIKANOKKHAN, S. High free fatty acid coconut oil as a potential feedstock for biodiesel production in Thailand, *Renew Energy*, 35, p.1682-1687, 2010.
- NARDINI, M.; DIJKSTRA, B. W. α/β Hydrolase fold enzymes: the family keeps growing, *Current Opinion in Structural Biology*, 9, p.732-737, 1999.
- NITBANI, F. O.; SISWANTAA, D.; JUMINA, SOLIKHAH, E. N. Isolation and antibacterial activity test of lauric acid from crude coconut oil (*Cocos nucifera* L.), *Procedia Chemistry*, 18, p. 132 -140, 2016.
- NIGAM, S.; MEHROTRA, S.; VANI, B.; MEHROTRA, R., Lipase immobilization techniques for biodiesel production: an overview, *International Journal of Renewable Energy & Biofuels*, p. 1-16, 2014.

- NOGUEIRA, B. M.; CARRETONI, C.; CRUZ, R.; FREITAS, S.; MELO, J. R. P. A.; FÉLIX, R. C.; PINTO, J. C.; NELE, M. Microwave activation of enzymatic catalysts for biodiesel production, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 67, p. 117-121, 2010.
- 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.
- PALOMO, J. M.; ORTIZ, C.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; FUENTES, M.; GUISÁN, J. M.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Lipase–lipase interactions as a new tool to immobilize and modulate the lipase properties, *Enzyme and Microbial Technology*, 36, p. 447- 454, 2005.
- PAN, S.; LIU, X.; XIE, Y.; YI, Y.; LI, C.; YAN, Y.; LIU, Y. Esterification activity and conformation studies of *Burkholderia cepacia* lipase in conventional organic solvents, ionic liquids and their co-solvent mixture media, *Bioresource Technology*, 101, p. 9822 - 9824, 2010.
- PAVIA, D.; LOMPMON, G.; KRIZ, G.S.; VYVYAN, J. R. **Introdução à espectroscopia**, 4 ed., São Paulo: Cengage, 2010.
- PEREIRA, R. G.; VELOSO, C. M.; SILVA, N. M.; SOUSA, L. F.; BONOMO, R. C. F.; SOUZA, A. O.; SOUZA, M. O. G.; FONTAN, R. C. I. Preparation of activated carbons from cocoa shells and siriguela seeds using H_3PO_4 and $ZnCl_2$ as activating agents for BSA and α -lactalbumin adsorption, *Fuel Processing Technology*, 126, p. 476-486, 2014.
- PILLAI, S. N.; KANNAN, P. S.; VETTIVEL, S. C.; SURESH, S. Optimization of transesterification of biodiesel using green catalyst derived from Albizia Lebbeck Pods by mixture design. *Renewable Energy*, 104, p. 185-196, 2017.
- QUEIROZ, M. B.; BOAVENTURA, R. F.; HEREDIA, M. F.; ALVAREZ, H. M.; LIMA, A. S.; DARIVA, C.; SOARES, C. M. F.; FRICKS, A. Microwave activation of

- immobilized lipase for transesterification of vegetable oils, *Química Nova*, 38, p. 303-308, 2015.
- RAHMAN, I. A.; SAAD, B. Utilization of guava seeds as a source of activated carbon for removal of methylene blue from aqueous solution, *Malaysian Journal of Chemistry*, 5, p. 008 - 014, 2003.
- REJASSE, B.; LAMARE, S.; LEGOY, M. D.; BESSON, T. Influence of microwave irradiation on enzymatic properties: applications in enzyme chemistry, *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 22, p. 519-527, 2007.
- 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.
- RIBAS, M. C.; ADEBAYO, M. A.; PROLA, L. D. T.; LIMA, E. C.; CATALUÑA, R.; FERIS, L. A.; PUCHANA-ROSETO, M. J.; MACHADO, F. M.; PAVAN, F. A.; CALVETE, T. Comparison of a homemade cocoa shell activated carbon with commercial activated carbon for the removal of reactive violet 5 dye from aqueous solutions, *Chemical Engineering Journal*, 248, p. 315-326, 2014.
- 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.
- RODRIGUES, D. S.; MENDES, A. A.; ADRIANO, W. S.; GONÇALVES, L. R. B.; GIORDANO, R. L.C. Multipoint covalent immobilization of microbial lipase on chitosan and agarose activated by different methods, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 51, p. 100-109, 2008.
- RUZENE, D. S.; SILVA, D. P.; SOARES, C. M. F.; LIMA, A. S.; COSTA, D. M.; CABRERA-PADILLA, R. Y.; CASTRO, R. S. S.; SOUZA, E. R.; TEIXEIRA, J. A. C.; QUEISSADA, D. D. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR1020140013156, data de depósito: 20/01/2014, título: "UTILIZAÇÃO DE SABUGO DE MILHO COMO SUPORTE PARA O PROCESSO DE IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES", Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial, Brasil, 2014.

- SANTOS, R. M., SANTOS, A. O. SUSSUCHI, E. M., NASCIMENTO, J. S., LIMA, A. S., FREITAS L. S. Pyrolysis of mangaba seed: Production and characterization of bio-oil, *Bioresource Technology*, 196, p. 43-48, 2015.
- SÁNCHEZ, D. A.; TONETTO, G. M.; FERREIRA, M. L. *Burkholderia cepacia* lipase: A versatile catalyst in synthesis reactions, *Biotechnology and Bioengineering*, p. 1-19, 2017.
- SANDOVAL, G.; CASAS-GODOY, L.; BONET-RAGEL, K.; RODRIGUES, J.; FERREIRA-DIAS, S.; VALERO, F. Enzyme-catalyzed production of biodiesel as alternative to chemical catalyzed processes: advantages and constraints, *Current Biochemical Engineering*, 4, p. 109 -141, 2017.
- SAUCIER, C.; ADEBAYO, M. A.; LIMA, E. C.; CATALUNA, R.; THUE, P. S.; PROLA, L. D. T.; PUCHANA-ROSETO, M. J.; MACHADO, F. M.; PAVAN, F. A.; DOTTO, G. L. Microwave-assisted activated carbon from cocoa shell as adsorbent for removal of sodium diclofenac and nimesulide from aqueous effluents, *Journal of Hazardous Materials*, 289, p.18-27.
- SIRISHA, V. L.; JAIN, A.; JAIN, A. Enzyme immobilization. *Advances in Food and Nutrition Research*, p.179-211, 2016.
- SONG, Z.; LIU, Y.; JIN, Q.; LI, L.; WANG, X.; HUANG, J.; LIU, R. Lipase-catalyzed preparation of diacylglycerol-enriched oil from high-acid rice bran oil in solvent-free system, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 168, p. 364-374, 2012.
- SUBRAMONIA, P. N.; KANNAN, P.S.; VETTIVEL, S.C.; SURESH, S. Optimization of transesterification of biodiesel using green catalyst derived from *Albizia Lebbeck* Pods by mixture design. *Renew Energy*, 104, p. 185–96, 2017.
- 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.
- SHAN, R.; LU, L.; SHI, Y.; YUAN, H.; SHI, J. Catalysts from renewable resources for biodiesel production. *Energy Conversion and Management*, 178, p. 277-289, 2018.
- SHAH, S.; GUPTA, M. N. Lipase catalyzed preparation of biodiesel from *Jatropha* oil in a solvent free system, *Process Biochemistry*, 42, p. 9-14, 2007.

- SHAH, S.; GUPTA, M, N. The effect of ultrasonic pre-treatment on the catalytic activity of lipases in aqueous and non-aqueous media, *Chemistry Central Journal*, 2:1, p. 1-9, 2008.
- SHELDON, R. A.; PELT, S. V. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how, *Chemical Society Reviews*, 42, p. 6223-6235, 2013
- SHIM, T.; YOO, J.; RYU, C.; PARK, YONG-KWON; JUNG, J. Effect of steam activation of biochar produced from a giant miscanthus on copper sorption and toxicity, *Bioresource Technology*, 197, p. 85-90, 2015.
- SHINDE, S. D.; YADAV, G. D. Microwave irradiated immobilized lipase catalyzed synthesis of alkyl benzoate esters by transesterification: mechanism and kinetic modeling, *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 53, p. 8706-871, 2014.
- SILVA, G. S.; OLIVEIRA, P. C.; GIORDANI, D. S.; CASTRO, H. F. Chitosan/siloxane hybrid polymer: synthesis, characterization and performance as a support for immobilizing enzyme, *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 22, p. 1407-1417, 2011.
- SILVA, A. M.; TAVARES, A. P. M.; ROCHA, C. M. R.; CRISTOVÃO, R. O.; TEIXEIRA, J. A.; MACEDO, E. A. Immobilization of commercial laccase on spent grain, *Process Biochemistry*, 47, p. 1095-1101, 2012.
- SIMÕES, A. S.; MORI, M. Y.; FARIA, R.; CASTRO, H. F. Desempenho da Matriz Híbrida SiO₂-Quitosana na Imobilização da Lipase Microbiana de *Candida rugosa*, *Química Nova*, 34, p. 33-38, 2011.
- SINGH, R. K.; TIWARI, M. K.; SINGH, R.; LEE, J. K. From Protein Engineering to Immobilization: Promising Strategies for the Upgrade of Industrial Enzymes, International, *Journal of Molecular Sciences*, 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*, 79, p. 745-757, 1999.
- SOARES, C. M. F.; SANTANA, M. H. A.; ZANIN, G. M.; CASTRO, H. F. Efeito do polietilenoglicol e da albumina na imobilização de lipase microbiana e na catálise em meio orgânico, *Química Nova*, 26, p. 832, 2003.

- SOARES, C. M. F.; SANTOS, O. A. 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.
- SOUZA, R. L.; FARIA, E. L. P.; FIGUEIREDO, R. T.; FREITAS, L. S.; IGLESIAS, M.; MATTEDI, S.; ZANIN, G. M.; SANTOS, O. A. A.; COUTINHO, J. A. P.; LIMA, A. S.; SOARES, C. M. F. Protic ionic liquid as additive on lipase immobilization using silica sol gel, *Enzyme and Microbial Technology*, 52, p. 141-150, 2013.
- STAVROPOULOS, G. G.; ZABANIOTOU, A. A. Production and characterization of activated carbons from olive-seed waste residue, *Microporous and Mesoporous Materials*, 82, p. 79-85, 2005.
- STEFAGBNIUK, M.; OLESZCZUK, P. Characterization of biochars produced from residues from biogas production, *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 115, p. 157-165, 2015.
- 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.
- TAN, X.; LIU, Y.; ZENG, G. ; WANG, X. ;HUA, X.; GU, Y.;YANG, Z. Application of biochar for the removal of pollutants from aqueous solutions, *Chemosphere*, 125, p. 70-85, 2015.
- TAN, G.; XU, N.; XU, Y.; WANG, H.; SUN, W. Sorption of mercury (II) and atrazine by biochar, modified biochars and biochar based activated carbon in aqueous solution, *Bioresource Technology*, 2011, p.727-735, 2016.
- TANG, W. L.; ZHAO. H. Review industrial biotechnology: Tools and applications, *Journal Biotechnology*, 4, p. 1725-1739, 2009.
- TOMIC, S.; RAMEK, M. Quantum mechanical study of *Burkholderia cepacia* lipase enantioselectivity, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 38 p. 139–147, 2006.
- TRAN, D. T.; CHEN, C. L.; CHANG, JO-SHU. Continuous biodiesel conversion via enzymatic transesterification catalyzed by immobilized *Burkholderia cepacia* lipase in a packed-bed bioreactor, *Applied Energy*, 168, p. 340-350, 2016.
- TRENTIN, C. M.; POPIOLKI, A. S.; BATISTELLA, L.; ROSA, C. D.;TREICHEL, H.; OLIVEIRA, D.; OLIVEIRA, J. V. Enzyme-catalyzed production of biodiesel by

- ultrasound-assisted ethanolysis of soybean oil in solvent-free system, *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 38, p.437-48, 2015.
- TRODLER, P.; SCHMID, R. D.; PLEISS, J. Modeling of solvent-dependent conformational transitions in *Burkholderia cepacia* lipase, *BMC Structural Biology*, 9, p. 1-13, 2009.
- TRUBIANO, G.; BORIO,D.; ERRAZU,A. Influence of the operating conditions and the external mass transfer limitation on the sythesis of fatty acid esters using a *Candida antarctica* Lipase, *Enzyme and Microbial Technology*, 40, p. 716-722, 2007.
- WANG, J. X.; HUANG, Q. D.; HUANG, F. H.; WANG, J. W.; HUANG, Q. J. Lipase-catalyzed production of biodiesel from high acid value waste oil using ultrasonic assistant, *Chinese Journal of Biotechnology*, 23, p. 121-128, 2007.
- WANG, X.; YU, X.; XU, Y. Homologous expression, purification and characterization of a novel high-alkaline and thermal stable lipase from *Burkholderia cepacia* ATCC 25416, *Enzyme and Microbial Technology*, 45, p. 94-102, 2009.
- WANG, S.; SHAN, R.; WANG, Y.; LU, L.; YUAN, H. Synthesis of calcium materials in biochar matrix as a highly stable catalyst for biodiesel production, *Renewable Energy*, 2, p.1-42, 2018.
- WATANABE, Y.; SHIMADA, Y.; SUGIHARA, A.; NODA, H.; FUKUDA, H.; TOMINAGA, Y. Continuous production of biodiesel fuel from vegetable oil using immobilized *Candida antarctica* lipase, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 77, p.355-60, 2000.
- WU, J. C.; Zhang, G. F.; He, Z. M. Enhanced activity of *Candida rugosa* lipase modified by polyethylene glycol derivatives, *Biotechnology Letters*, 23, p. 211, 2001.
- XU, Y.; NORDBLAD, M.; WOODLEY, J. M. A two-stage enzymatic ethanol-based biodiesel production in a packed bed reactor, *Journal of Biotechnology*, 162, p. 407-414, 2012.
- YADAV, G. D.; JADHAV, S.R. Synthesis of reusable lipases by immobilization on hexagonal mesoporous silica and encapsulation in calcium alginate: transesterification in non-aqueous medium, *Microporous Mesoporous Mater*, 86, p.215-220, 2005.
- YADAV, G. D.; HUDE, M. P.; TALPADE, A. D. Microwave assisted process intensification of lipase catalyzed transesterification of 1,2 propanediol with dimethyl carbonate for the

- green synthesis of propylene carbonate: Novelty of kinetics and mechanism of consecutive reactions, *Chemical Engineering Journal*, 281, p.199-208, 2015.
- YU, D.; TIAN, L.; WU, H.; WANG, S.; WANG, Y. ; MA, D. ; FANG X. Ultrasonic irradiation with vibration for biodiesel production from soybean oil by Novozym 435, *Process Biochemistry*, 45, p. 519-525, 2010.
- ZENEVICZ, M. C. P.; JACQUES, A.; FURIGO, A. F.; OLIVEIRA, J. V.; OLIVEIRA, D. Enzymatic hydrolysis of soybean and waste cooking oils under ultrasound system, *Ind. Crops Prod*, 80, p. 235-241, 2016.
- ZIVKOVIC, L. T. I.; ZIVKOVIC, L. S.; BABIC, B. M.; KOKUNESOSKI, M. J.; JOKIC, B. M.; KARADZIC, I. M. Immobilization of *Candida rugosa* lipase by adsorption onto biosafe meso/macroporous silica and zirconia, *Biochemical Engineering Journal*, 93, p. 73-83, 2015.
- ZHAO, X.; OUYANG, W.; HAO, F.; LIN, C.; WANG, F.; HAN, S.; GENG, X. Properties comparison of biochars from corn straw with different pretreatment and sorption behaviour of atrazine, *Bioresource Technology*, 147, p. 338-344, 2013.
- ZHAO, X.; QI, F.; YUAN, C.; DU, W.; LIU, D. Lipase-catalyzed process for biodiesel production: Enzyme immobilization, process simulation and optimization, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 44, p. 182-197, 2015.
- ZHAO, C.; YANG, L.; XING, S.; LUO, W.; WANG, Z.; LV, P. Biodiesel production by a highly effective renewable catalyst from pyrolytic rice husk, *Journal of Cleaner Production*, 32, p. 1-33, 2018.
- ZHU, L.; LEI, H.; WANG, L.; YADAVALLI, G.; ZHANG, X.; WEI, Y.; LIU, Y.; YAN, D.; CHEN, S.; AHRING, B. Biochar of Corn Stover: Microwave-assisted pyrolysis condition induced changes in surface functional groups and characteristics, *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 115, p. 149-156, 2015.
- ZUCCA, P.; SANJUST, E. Inorganic materials as supports for covalent enzyme immobilization: methods and mechanisms, *Molecules*, 19, p. 14139-14194, 2014.
- ZWIETEN, L. V.; KIMBER, S.; MORRIS, S.; CHAN, K. Y.; DOWNIE, A.; RUST, J.; JOSEPH, S.; COWIE, A. Effects of biochar from slow pyrolysis of papermill waste on agronomic performance and soil fertility, *Plant Soil*, 327, p. 235-246, 2010.

ANEXO I

Nesta sessão de anexos serão apresentados a tabela da lista de ésteres etílicos encontrados no óleo de coco bruto com o tempo de retenção (t_R) (Tabela A1) e os cromatogramas referentes ao óleo de coco bruto (Figura A1) e da reação de transesterificação catalisada por lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizada em biochar (tratado em ultrassom com diclorometano) por adsorção física (ADS) na melhor condição (razão molar de óleo e etanol de 1:7, 40 °C e tempo de 96 h) (Figura A2).

Tabela A1 - Ésteres etílicos presentes no óleo de coco bruto utilizado para as reações de transesterificação.

Pico	t_R (min)	Éster
1	3.0	Caprilato de etila
2	4.3	Caproato de etila
3	5.6	Laurato de etila
4	6.8	Miristato de etila
5	8.1	Palmitato de etila
6	8.6	Heptadecanoato de Metila (PI*)
7	9.9	Linoleato de etila
8	10.1	Oleato de etila
9	10.6	Estearato de etila

*PI = padrão interno

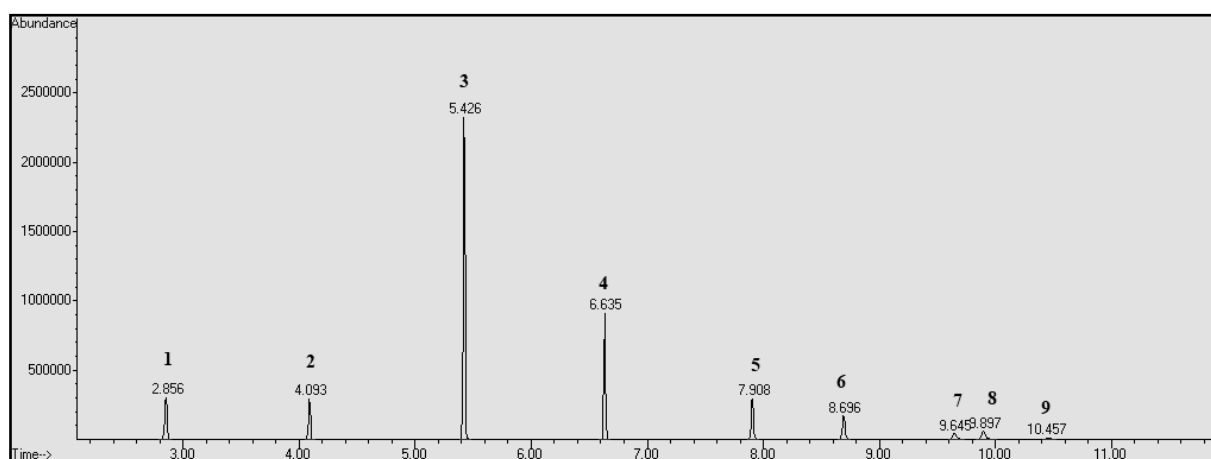


Figura A1 – Cromatograma da quantificação dos ésteres etílicos para óleo de coco bruto.

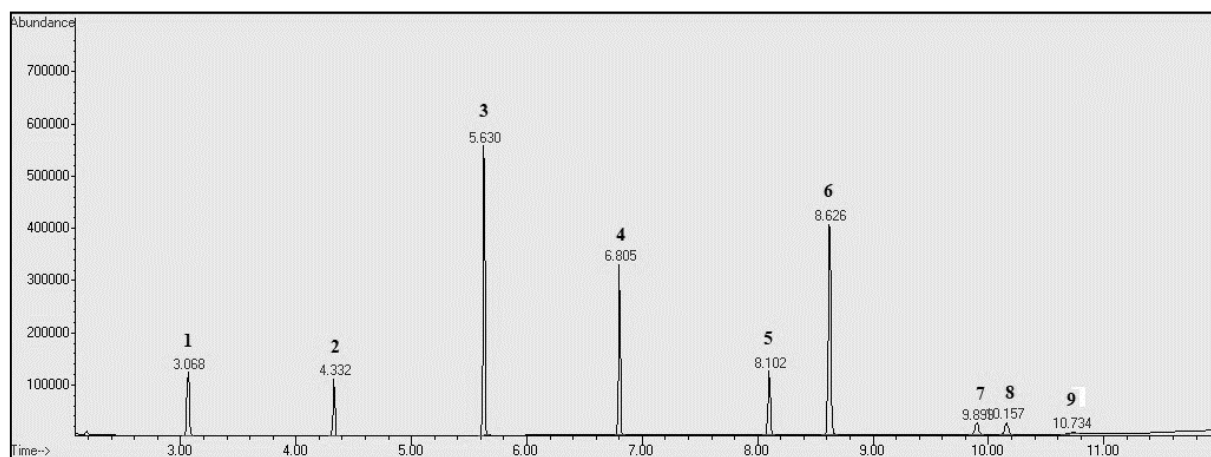


Figura A2 - Cromatograma da quantificação dos ésteres etílicos para reação de transesterificação utilizando a lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizada por ADS em biochar realizada na razão molar (óleo:etanol) 1:7 a 40 °C em 96 h.

ANEXO II

Nesta sessão de anexos serão apresentados os cromatogramas referentes ao óleo de coco bruto e da reação de transesterificação catalisada por lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizada em biochar (tratado em ultrassom com diclorometano) por adsorção física na razão molar de óleo:etanol de 1:7, 40 °C e nos tempos de reação 24, 48, 72 e 96 h (Figura A3).

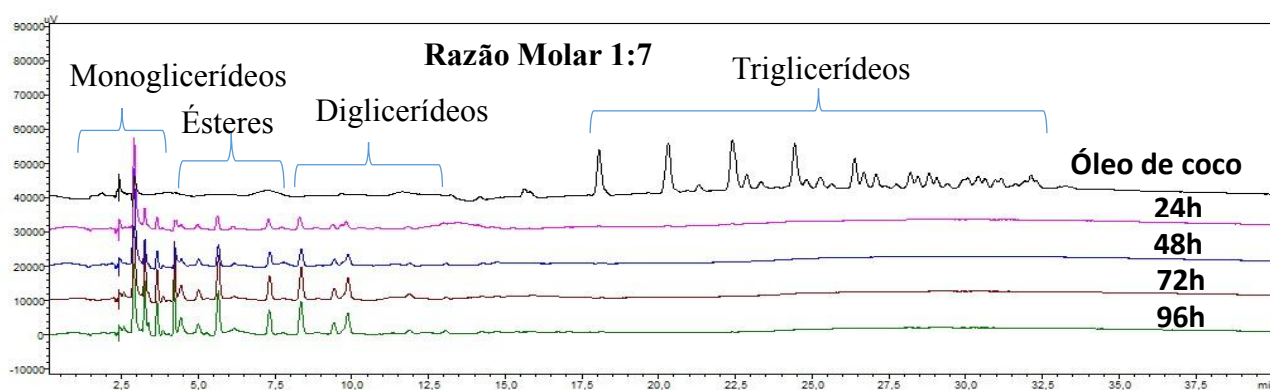


Figura A3- Cromatograma de quantificação do Mono, di e Triacilgliceróis e ésteres etílicos para o óleo de coco bruto e na reação realizada à 40 °C, com razão molar 1:7 (óleo:álcool) utilizando a lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizada em biochar nos tempo de reação de 24 a 96h. .

ANEXO III

Lista de divulgação dos resultados

Dois trabalhos foram apresentados em congresso nacional e um artigo foi publicado em revista Qualis A1.

➤ CONGRESSOS

❖ Ano 2016

Trabalho completo intitulado: APLICAÇÃO DA LIPASE DE *Burkholderia cepacia* IMOBILIZADA EM BIOCHAR NA TRANSESTERIFICAÇÃO DE ÓLEO DE COCO BRUTO. Apresentado no XXI Congresso Brasileiro de Engenharia Química, Fortaleza em setembro de 2016.

❖ Ano 2017

Trabalho completo intitulado: USE OF ADDITIVES IN THE TRANSESTERIFICATION OF CRUDE COCONUT OIL USING LIPASE OF *Burkholderia cepacia* IMMOBILIZATION ONTO BIOCHAR. Apresentado no XXI Simpósio Nacional de Bioprocessos XII Simpósio de Hidrólise Enzimática de Biomassa, Aracaju em setembro de 2017.

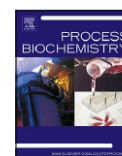
➤ ARTIGO

O artigo intitulado: USE OF CONVENTIONAL OR NON-CONVENTIONAL TREATMENTS OF BIOCHAR FOR LIPASE IMMOBILIZATION, foi publicado em 2017 na Process Biochemistry v. 61, pg 124–129 (Qualis A1) sobre os tratamentos realizados no biochar para imobilização da lipase de *Burkholderia cepacia*.



Contents lists available at ScienceDirect

Process Biochemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/procbio

Short communication

Use of conventional or non-conventional treatments of biochar for lipase immobilization



Lays C. Almeida^a, Anderson S. Barbosa^a, Alini T. Fricks^a, Lisiane S. Freitas^b, Álvaro S. Lima^a, Cleide M.F. Soares^{a,*}

^a Institute of Technology and Research, Tiradentes University, Av. Murilo Dantas 300, 49032-490, Aracaju, Sergipe, Brazil

^b Department of Chemistry, Federal University of Sergipe, Av. Marechal Rondon, s/n, Jd. Rosa Elze, 49100-000, São Cristóvão, Sergipe, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Biochar
Conventional treatment (muffle) and non-conventional (ultrasound, microwave)
Immobilization
Lipase

ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate the influence of dichloromethane (CH_2Cl_2), potassium hydroxide (KOH) and phosphoric acid (H_3PO_4) in the treatment of biochar from guava seeds on conventional and non-conventional techniques (ultrasound and microwave) for the immobilization of *Burkholderia cepacia* lipase (BCL) by physical adsorption. The effects of the different treatments on the physical and chemical properties of the biochar were evaluated by scanning electron microscopy (SEM) and Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR). The immobilization of the BCL on the biochar was evaluated in hydrolysis reactions of olive oil. The conventional treatment of the biochar with KOH showed increased modification on the surface of the biochar, which presented a highly porous surface, and a greater activity for the immobilized biocatalyst compared with the other treatments. The results revealed the potential of biochar as a support novelty for the immobilization of enzymes and for their application in biocatalysis.

1. Introduction

Biochar is a byproduct of the pyrolysis reaction (thermal degradation in the absence of oxygen) of lignocellulosic material, and has a high carbon content [1]. Recently biochar has been recognized as a multifunctional material due to its wide variety of applications, such as: the removal of organic and inorganic pollutants from aqueous solution [2]; the fertilization and pH correction of soils for agriculture [3,4]; and the immobilization of enzymes [5]. This has attracted the interest of the scientific community and prompted research into alternative methods to improve the morphological and physicochemical properties of biochar.

Several studies have reported the use of biochar from different lignocellulosic materials such as guava seed [6], sunflower seed [7], olive seed [8], bamboo [9,10], groundnut shell [11], pecan shells [12], rice [13], coconut [14], jackfruit [15], pineapple [16], sawdust [17] and wheat straw [18] as precursors for the production of activated carbon. Different activating agents (HCl, ZnCl_2 , H_2SO_4 , H_3PO_4 , NaOH, K_2CO_3 , CO_2 and KOH), as well as conventional (muffle) and non-conventional (microwave) heating techniques have been used. Most of the studies carried out in the preparation of activated carbon are aimed at the removal of organic and inorganic pollutants from aqueous solutions.

Multiple articles using activated carbon from lignocellulosic materials to immobilize enzymes are still scarce in the literature. Recently

Brito et al. [19] evaluated the use of activated charcoal from yellow mombin fruit stones as a support for the immobilization of lipase from porcine pancreas type II produced by Sigma. Activated charcoal was prepared by chemical activation (impregnation of the activation agent in the material followed by carbonization) using conventional heating (muffle), which verified the influence of phosphoric acid and potassium hydroxide as an activation agent. The carbonization temperature and the physical and chemical properties of the activated carbon were evaluated. The results showed that both carbons produced good lipase adsorption capacity, which makes activated charcoal a promising alternative as a support for the immobilization of enzymes. However, the use of non-conventional treatments of biochar have not yet been reported.

Due to the search for green and sustainable industrial processes, enzymatic processes appear as a promising alternative to replace traditional chemical processes, because the enzymes are selective and act under mild reaction conditions (room temperature, atmospheric pressure and physiological pH). For commercial viability there is a need to immobilize the enzymes to improve their stability and increase the possibility of reuse of the biocatalyst in comparison with the free enzyme [20,21]. Among the methods used for immobilization, physical adsorption is considered the simplest and cheapest method when compared with covalent binding and encapsulation methods [22].

The objective of this work was to verify the influence on the

* Corresponding author.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2017.06.020>

Received 14 February 2017; Received in revised form 22 May 2017; Accepted 20 June 2017

Available online 21 June 2017

1359-5113/© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

morphological and physico-chemical properties of guava seed biochar of conventional (muffle) and non-conventional (microwave and ultrasound) treatment with dichloromethane (CH_2Cl_2), potassium hydroxide (KOH) and phosphoric acid (H_3PO_4) for the purpose of immobilization of *Burkholderia cepacia* lipase by physical adsorption.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Burkholderia cepacia lipase (BCL) was purchased from Sigma-Aldrich. (St. Louis, MO, USA), with an activity of 2500 U/g. The guava seeds were kindly provided by the fruit pulp industry (POMAR, Aracaju-Sergipe, Brazil), hexane P.A., potassium hydroxide (KOH), phosphoric acid (H_3PO_4), and dichloromethane (CH_2Cl_2) were obtained from Vetec (Rio de Janeiro, Brazil). The substrate used for the hydrolysis reactions consisted of commercial extra virgin olive oil with low acidity (Carbonell), and Arabic gum (Synth, Brazil). All other reagents used were of analytical grade.

2.2. Biochar production

Biochar production was carried out at the laboratory scale using the pyrolysis equipment described in detail by Santos et al. [23]. The pyrolysis conditions of the guava seed were previously optimized for bio-oil production and the following conditions used: Temperature = 500 °C, heating rate = 30 °C min⁻¹, final time = 5 min and flow rate of N_2 = 1 mL min⁻¹. A quantity of guava seeds was (12 g) introduced into the quartz reactor in the pyrolysis furnace and the apparatus refluxed with a stream of nitrogen at 1 mL min⁻¹ for 5 min. The sample was heated from 25 °C to 500 °C, at 30 °C min⁻¹ and held at 500 °C for 60 min.

2.3. Biochar treatment

2.3.1. Conventional treatment (Muffle)

The guava seed biochar was incubated in three different chemical agents: CH_2Cl_2 , KOH and H_3PO_4 in solution 10% (m/m), for a 24 h period with stirring at room temperature (25 °C). Biochar was muffled at a temperature of 500 °C for 30 min, then thoroughly washed at neutral pH and oven dried at 60 °C.

2.3.2. Non-conventional treatment (Microwave and ultrasound)

The microwave treatment was carried out in a Discovery CEM microwave reactor (Discovery & Explorer SP) using KOH and H_3PO_4 solutions at a concentration at 10% (m/m). 1 g of biochar was used with 5 mL of the solution, with a maximum power of 300 W and a constant temperature of 100 °C for 10 min. The biochar was then thoroughly washed to neutral pH and dried in an oven at 60 °C. Dichloromethane was not used in the Non-conventional treatment (microwave) because its properties render it invisible to the specific radiation used.

The ultrasound treatment, the guava seed biochar was submerged in three different chemical agents: CH_2Cl_2 , KOH and H_3PO_4 in solution 10% (m/m). The mixture was maintained in an ultrasonic bath for 30 min at room temperature (25 °C), then thoroughly washed at neutral pH and oven dried at 60 °C.

2.4. Immobilization of lipase onto biochar

The immobilization procedure of *Burkholderia cepacia* lipase onto the biochar (support) by physical adsorption was performed as described by Soares et al. [24] with some modifications. The technique consists in contacting 1 g of the biochar in 10 mL of hexane for 15 min with vigorous stirring at room temperature (25 °C). Afterwards, 10 mL of enzymatic solution (0.15 g of BCL solubilized in 10 mL of 0.1 M sodium phosphate buffer pH 7.0) was added and kept under stirring for

3 h. The enzyme-support solution was maintained at 4 °C for 24 h. After this period, the immobilized biocatalyst was washed with hexane and dried in a desiccator at room temperature for 24 h.

2.5. Enzymatic activity assay

Enzymatic activities of both free and immobilized lipase samples were assayed by the olive oil hydrolysis method according to a modification used by Soares et al. [24]. The substrate was prepared by mixing 50 mL olive oil with 50 mL gum Arabic solution (7% w/v). the reaction was prepared with 5 mL of the emulsion, 2 mL 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.0), and either free (100 mg) or immobilized (100 mg) enzyme was incubated for 5 min for free and 10 min for immobilized at 37 °C under stirring at 80 rpm. The reaction was stopped by addition of 2 mL acetone-ethanol-water solution (1:1:1). Liberated fatty acids were titrated with 0.01 M potassium hydroxide solution in the presence of phenolphthalein as an indicator. One unit (U) of enzyme activity was defined as the amount of enzyme that liberated 1 μmol of free fatty acid per min ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$). Analyses of the hydrolytic activities of immobilized biocatalysts were used to determine the yield $\eta(\%)$ according to Eq. (1).

$$\eta(\%) = \frac{U_s}{U_o} \times 100 \quad (1)$$

In which U_s corresponds to the total enzymatic activity recovered on the support, and U_o represents the enzyme units offered for immobilization.

2.6. Sample characterization

The morphology of guava seed biochar and the immobilized biocatalysts with the best results for hydrolytic activity was determined by scanning electron microscopy (SEM) (Hitachi S-3000N, operated at maximum accelerating voltages of 500 V at 30 kV and resolution of the 15A). The samples were also subjected to FTIR analysis (Agilent Technology CARY 630 FTIR spectrophotometer). Spectra were obtained in the wavelength range from 400 to 4000 cm^{-1} .

3. Results and discussion

Different treatments of biochar have been published for the removal of organic and inorganic pollutants and for other applications. However, for the use of biochar as a support for the immobilization of enzymes such as BCL by physical adsorption, other studies are necessary to improve the efficiency. This work first performed conventional and non-conventional treatment of guava seed biochar and then characterized the support and the immobilized biocatalyst.

3.1. Sample characterization

3.1.1. Scanning electron microscopy (SEM)

Scanning electron microscopy (SEM) was used to characterize the biochar morphology after conventional and non-conventional treatments. The resulting micrographs are shown in Fig. 1. They verified that untreated biochar has a porous surface structure with irregular cavities (Fig. 1a). Biochar after ultrasonic bath treatment is shown in Fig. 1b-d. There is an increase in the pores present on the surface of the biochar treated with dichloromethane (Fig. 1b), possibly related to the removal of bio-oil residues and ash present in the surface of the biochar; thus, unclogging the pores and making it accessible for adsorption of *Burkholderia cepacia* lipase (BCL) during the immobilization process. When KOH solution was used (Fig. 1c), it was possible to observe agglomerates on the surface possibly related to the KOH residues that were not totally removed during the washing process with distilled water at neutral pH. After treatment with H_3PO_4 (Fig. 1d), the surface of the biochar showed no obvious variations compared to the biochar

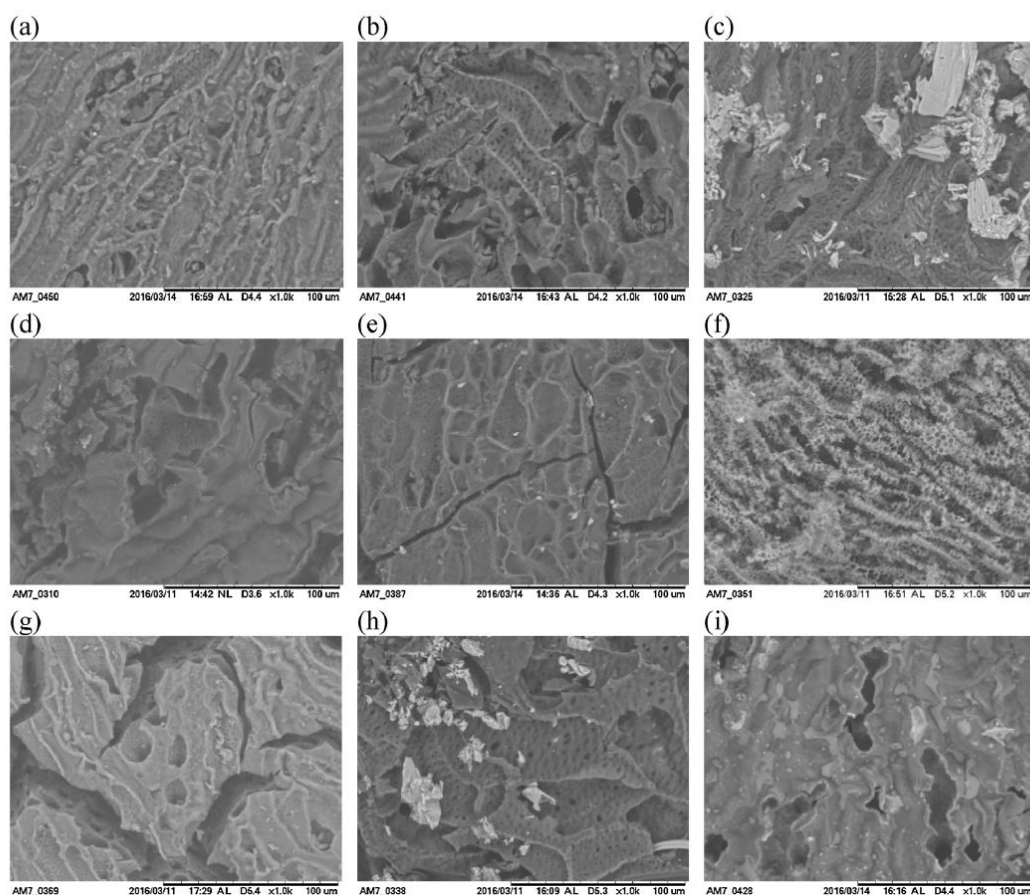


Fig. 1. Scanning electron microscopy of biochar without treatment (a), biochar with the treatment in ultrasound bath with CH_2Cl_2 (b), KOH (c), H_3PO_4 (d), biochar in muffle treatment with CH_2Cl_2 (e), KOH (f), H_3PO_4 (g), biochar with microwave treatment with KOH (h), H_3PO_4 (i).

without treatment.

The treatment of biochar using muffle (Fig. 1e–g) showed a modification in the structure of the biochar, producing a brittle appearance using CH_2Cl_2 and H_3PO_4 as shown in Fig. 1(e) and (g), respectively. With KOH, a larger number of pores were observed on the surface of the biochar, possibly related to the evaporation of the impregnated KOH compound, similar to the observations of Foo and Hameed [14]. In the microwave treatment there was not a great deal of modification to the surface of the biochar when compared with the muffle treatment. This behavior is possibly related to the low temperature reached in the Discovery microwave of 100 °C, compared with the temperature of 500 °C in the muffle treatment. When KOH solution was used, the surface of the biochar presented agglomerates (Fig. 1h) similar to those found in the ultrasound treatment with the KOH solution (Fig. 1c). With H_3PO_4 solution, the whitish surface is probably related to residual H_3PO_4 not removed during the washing process.

3.1.2. FTIR analysis

The FTIR spectra obtained for the biochar after the different treatments are shown in Fig. 2a–c. All spectra exhibited a band in the 1590 cm^{-1} region associated with the vibrations of the $\text{C}=\text{O}$ bond of aromatic groups. The characteristic stretching vibration of $\gamma\text{-CH}$ binding around 876 cm^{-1} [25,26] was also observed. The spectra of the

biochar after the different treatments presented small variations in the surface chemical properties in relation to the untreated biochar — an increase in the intensity of the band around 1570 cm^{-1} characteristic of aromatic group $\text{C}=\text{C}$ bonds, attributed to the condensation of aromatic rings, possibly related to reaction with solvents and heating [12]. For the biochar treated with H_3PO_4 , the spectra exhibited a higher band intensity in the 995 cm^{-1} region associated with P–N bond vibrations [27].

3.2. Screening immobilization

The immobilization of the BCL by physical adsorption was performed on the treated biochar to verify the influence of the different treatments on the lipase immobilization process. Table 1 shows the hydrolytic activity of the biocatalyst immobilized onto biochar after the different treatments. In the conventional heating (muffle), it was verified that the chemical agent KOH presented the maximum hydrolytic activity of $317\text{ }\mu\text{mol g}^{-1}\text{ min}^{-1}$. The biocatalyst immobilized onto biochar treated by conventional heating (muffle) with KOH showed hydrolytic activity ($317\text{ }\mu\text{mol g}^{-1}\text{ min}^{-1}$) representing an increase of 51.4% when compared to the biocatalyst immobilized in the biochar treated with H_3PO_4 ($154\text{ }\mu\text{mol g}^{-1}\text{ min}^{-1}$) and an increase of 24.2% for the biochar treated with CH_2Cl_2 ($240\text{ }\mu\text{mol g}^{-1}\text{ min}^{-1}$). The highest

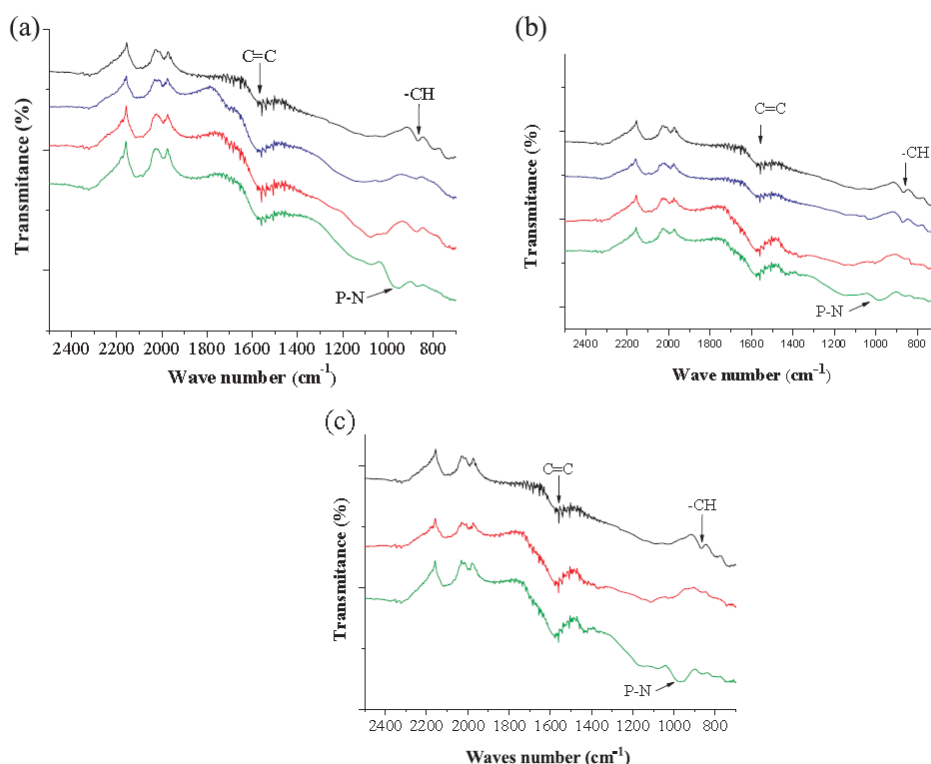


Fig. 2. FTIR spectrum of biochar without treatment (—) and after the different treatments: (a) conventional treatment muffle and non-conventional treatments (b) ultrasound and (c) microwave. Using different chemical agents: CH_2Cl_2 (—), KOH (—), H_3PO_4 (—).

Table 1
Hydrolytic activity of BCL immobilized by physical adsorption onto biochar with different treatment. The assay reaction conditions (37 °C, pH 7.0, 80 rpm) with 100 mg enzyme immobilized.

Types of treatment	Chemical agent	Hydrolytic activity ($\mu\text{mol g}^{-1} \text{min}^{-1}$)
Without treatment	—	190
Ultrasound	KOH	154
	H_3PO_4	146
	CH_2Cl_2	258
Muffle	KOH	317
	H_3PO_4	154
	CH_2Cl_2	240
Microwave	KOH	210
	H_3PO_4	75

activity presented for the immobilized biocatalyst after KOH treatment was possibly due to greater modification of the surface with increasing of pores as shown in the micrograph (Fig. 1f). The increase of the pores allowed a greater surface area for the immobilization a larger amount of BCL by physical adsorption onto the support.

The non-conventional treatment (microwave) of the biochar using KOH showed an increase in hydrolytic activity of 64.2% ($210 \mu\text{mol g}^{-1} \text{min}^{-1}$) compared with H_3PO_4 ($75 \mu\text{mol g}^{-1} \text{min}^{-1}$). As mentioned in several treatment studies, the use of KOH in conventional and non-conventional heating treatments produced a better adsorption capacity for organic compounds, due to the higher surface area produced compared with acid treatments [13–16,18]. In the ultrasonic treatment, the maximum hydrolytic activity of $258 \mu\text{mol g}^{-1} \text{min}^{-1}$

was obtained using CH_2Cl_2 as the chemical agent, which represents an increase of 40.3 and 43.4% in relation to KOH ($154 \mu\text{mol g}^{-1} \text{min}^{-1}$) and H_3PO_4 ($146 \mu\text{mol g}^{-1} \text{min}^{-1}$), respectively. This result is possibly due to the increased ability of dichloromethane to remove bio-oil residues on the biochar surface relative to KOH and H_3PO_4 as shown in the micrographs (Fig. 1b–d).

3.3. Sample characterization of the immobilized biocatalyst

3.3.1. Scanning electron microscopy (SEM)

Scanning Electron Microscopy (SEM) was used to characterize the biochar morphology after the immobilization process. It was found that the best immobilized biocatalyst was on biochar treated by conventional heating with KOH, and the resulting micrographs are shown in Fig. 3. The micrograph of the biocatalyst immobilized onto biochar treated with KOH observed smoothness of the pores after of the modification and lipase immobilization onto support surface. In this case, we can suggest one deposition irregular of enzyme affected depth of the pores (Fig. 3b), if to compare with support (Fig. 3a).

3.3.2. FTIR analysis

The FTIR spectrum obtained for the best immobilized biocatalyst (biochar treated with KOH) is shown in Fig. 4. Compared to treated biochar and immobilized biocatalyst there is a small variation in the chemical properties of the surface. The spectrum of the immobilized biocatalyst shows a band in the region 1100 cm^{-1} associated with vibrations of the C–N bond characteristic of the amine group present in BCL. According to Kumar et al. [27] it is not possible to verify large modifications in the chemical properties of the surface of the support

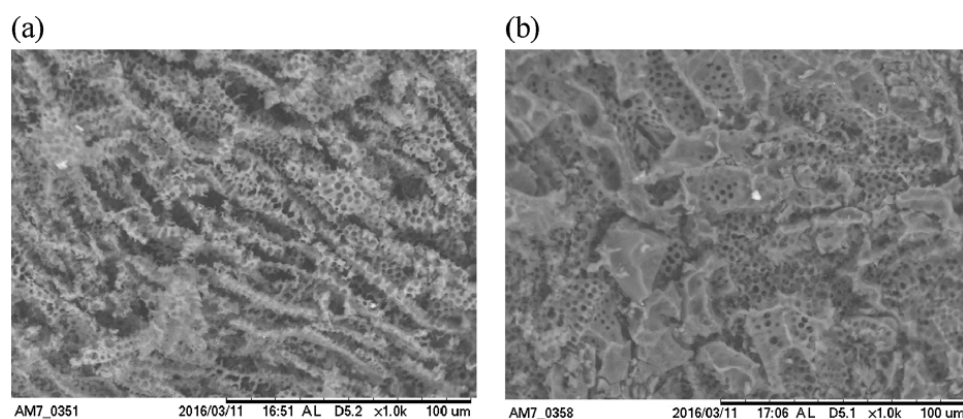


Fig. 3. Scanning electron micrographs of biochar with conventional treatment (muffle) with KOH (a) and biochar treated after immobilization of the BCL (b).

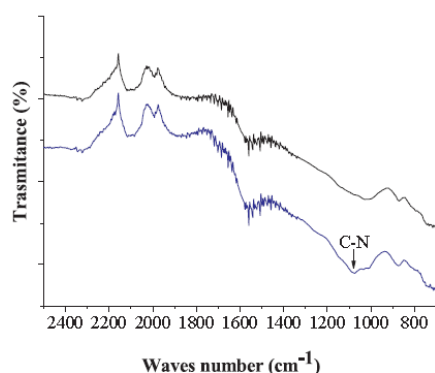


Fig. 4. FTIR spectra for the biochar treated with conventional treatment (muffle) with KOH (—) and biochar treated after immobilization of the BCL (---).

after the immobilization process, due to the complex interaction between the enzyme and the support.

4. Conclusion

The results showed that the treatments performed on the biochar produced modifications in its morphological structure, and the best treatment for the immobilization of BCL was conventional heating (muffle) with the chemical agent KOH. In view of the obtained results, we can conclude that biochar is a promising support for the preparation of immobilized biocatalysts because it presents a low cost compared with traditional supports, making it a good alternative for applications on the industrial scale.

Acknowledgments

The authors acknowledge financial assistance from the Brazilian research funding agencies CAPES, CNPq, and FAPITEC/SE.

References

- [1] S. Kuppasamy, P. Thavamani, M. Megharaj, K. Venkateswarlu, R. Naidu, Agronomic and remedial benefits and risks of applying biochar to soil: current knowledge and future research directions, *Env. Int.* 87 (2016) 1–12.
- [2] M.C. Ribas, M.A. Adebayo, L.D.T. Prola, E.C. Lima, R. Cataluña, L.A. Feris, M.J. Puchana-Rosero, F.M. Machado, F.A. Pavan, T. Calvete, Comparison of a homemade cocoa shell activated carbon with commercial activated carbon for the removal of reactive violet 5 dye from aqueous solutions, *Chem. Eng. J.* 248 (2014) 315–326.
- [3] L.V. Zwieten, S. Kimber, S. Morris, K.Y. Chan, A. Downierust, J.S. Joseph, A. Cowie, Effects of biochar from slow pyrolysis of papermill waste on agronomic performance and soil fertility, *Plant Soil* 327 (2010) 235–246.
- [4] J. Lehmann, M.C. Follig, J. Thies, C.A. Mastello, W.C. Hockaday, D. Crowley Biochar, Effects on soil biota: a review, *Soil Biol. Biochem.* 43 (2011) 1812–1836.
- [5] M.E. González, M. Cea, N. Sangaletti, A. González, C. Toro, M.C. Díez, N. Moreno, X. Querol, R. Navia, Biochar derived from agricultural and forestry residual biomass: characterization and potential application for enzymes immobilization, *J. Biobased Mater. Bioenergy* 7 (2013) 724–732.
- [6] I.A. Rahman, B. Saad, Utilization of guava seeds as a source of activated carbon for removal of methylene blue from aqueous solution, *Malay. J. Chem* 5 (2003) 8–14.
- [7] K.Y. Foo, B.H. Hameed, Preparation and characterization of activated carbon from sunflower seed oil residue via microwave assisted K_2CO_3 activation, *Bioresour. Technol.* 102 (2011) 9794–9799.
- [8] G.G. Stavropoulos, A.A. Zabanitotu, Production and characterization of activated carbons from olive-seed waste residue, *Microporous Mesoporous Mater.* 82 (2005) 79–85.
- [9] F.T. Ademiluyi, S.A. Amadi, J.N. Amakama, Adsorption and treatment of organic contaminants using activated carbon from waste nigerian bamboo, *J. Appl. Sci.* 13 (2009) 39–47.
- [10] Y. Fan, B. Wang, S. Yuan, X. Wu, J. Chen, L. Wanga, Adsorptive removal of chloramphenicol from wastewater by NaOH modified bamboo charcoal, *Bioresour. Technol.* 101 (2010) 7661–7664.
- [11] S. Idris, Y.A. Iyaka, B.E.N. Dauda, M.M.N. Damitso, M.T. Umar, Kinetic study of utilizing groundnut shell as an adsorbent in removing chromium and nickel from dye effluent, *Ame. Chem. Sci. J.* 2 (2012) 12–24.
- [12] K.T. Klasson, L.H. Wartelle, J.E. Rodgers, I.M. Lima, Copper(II) adsorption by activated carbons from pecan shells: effect of oxygen level during activation, *Ind. Crops Products* 30 (2009) 72–77.
- [13] K.Y. Foo, B.H. Hameed, Utilization of rice husks as a feedstock for preparation of activated carbon by microwave induced KOH and K_2CO_3 activation, *Bioresour. Technol.* 102 (2011) 9814–9817.
- [14] K.Y. Foo, B.H. Hameed, Coconut husk derived activated carbon via microwave induced activation: effects of activation agents, preparation parameters and adsorption performance, *Chem. Eng. J.* 184 (2012) 57–65.
- [15] K.Y. Foo, B.H. Hameed, Potential of jackfruit peel as precursor for activated carbon prepared by microwave induced NaOH activation, *Bioresour. Technol.* 112 (2012) 143–150.
- [16] K.Y. Foo, B.H. Hameed, Porous structure and adsorptive properties of pineapple peel based activated carbons prepared via microwave assisted KOH and K_2CO_3 activation, *Microporous Mesoporous Mat.* 148 (2012) 191–195.
- [17] K.Y. Foo, B.H. Hameed, Mesoporous activated carbon from wood sawdust by K_2CO_3 activation using microwave heating, *Bioresour. Technol.* 111 (2012) 425–432.
- [18] H. Mao, D. Zhou, Z. Hashish, S. Wang, H. Chen, H. Wang, Preparation of pinewood and wheat straw-based activated carbon via a microwave-assisted potassium hydroxide treatment and an analysis of the effects of the microwave activation conditions, *Bioresour. J.* 10 (2015) 809–821.
- [19] M.J.P. Brito, C.M. Veloso, R.C.F. Bonomo, R.C.I. Fontan, L.S. Santos, K.A. Monteiro, Activated carbons preparation from yellow mombin fruit stones for lipase immobilization, *Fuel Process. Technol.* 156 (2017) 421–428.
- [20] J.-M. Choi, S.-S. Han, H.-S. Kim, Industrial applications of enzyme biocatalysis: current status and future aspects, *Biotechnol. Adv.* 33 (2015) 1443–1454.
- [21] R.A. Sheldon, S.V. Felt, Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how, *Chem. Soc. Rev.* 42 (2013) 6223.
- [22] A.A. Homaei, R. Sariri, F. Vianello, R. Stevanato, Enzyme immobilization: an update, *J. Chem. Biol.* 6 (2013) 185–205.
- [23] R.M. Santos, A.O. Santos, E.M. Sussuchi, J.S. Nascimento, A.S. Lima, L.S. Freitas, Pyrolysis of mangaba seed: production and characterization of bio-oil, *Bioresour.*

- Technol. 196 (2015) 43–48.
- [24] C.M.F. Soares, O.A. Santos, H.F. Castro, F.F. Moraes, G.M. Zanin, Studies on lipase immobilization in hydrophobic sol-gel matrix, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 113 (2004) 307–319.
- [25] X. Zhao, W. Ouyang, F. Hao, C. Lin, F. Wang, S. Han, X. Geng, Properties comparison of biochars from corn straw with different pretreatment and sorption behaviour of atrazine, *Bioresour. Technol.* 147 (2013) 338–344.
- [26] D. Pavia, G. Lompmmon, G.S. Kriz, J.R. Vyvyan, *Introdução à Espectroscopia*, Four ed., Cengage São Paulo, 2010.
- [27] A.G. Kumar, S. Swamalatha, P. Kamatchi, G. Sekaran, Immobilization of high catalytic acid protease on functionalized mesoporous activated carbon particles, *Biochem. Eng. J.* 43 (2009) 185–190.