



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: ENGENHARIA DE ALIMENTOS

MYLENA JUNQUEIRA PINTO BRITO

**IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE EM CARVÃO ATIVADO PRODUZIDO A
PARTIR DO CAROÇO DE CAJÁ**

ITAPETINGA – BAHIA
FEVEREIRO/ 2016

MYLENA JUNQUEIRA PINTO BRITO

**IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE EM CARVÃO ATIVADO PRODUZIDO A
PARTIR DO CAROÇO DE CAJÁ**

Orientadora: Dra. Cristiane Martins Veloso

Co-orientadores: Dra. Renata Cristina Ferreira Bonomo

Dr. Marcelo Franco

ITAPETINGA – BAHIA

FEVEREIRO / 2016

662.62

B876i

Brito, / Mylena Junqueira Pinto

Imobilização de lipase em carvão ativado produzido a partir do caroço de cajá. / Mylena Junqueira Pinto Brito. - Itapetinga: UESB, 2016.

69p.

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB, como parte integrante das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciências de Alimentos, área de concentração em Engenharia de Alimentos, para obtenção do título de mestre. Sob a orientação da Prof^ª. D.Sc. Cristiane Martins Veloso e co-orientação da Prof^ª. D.Sc. Renata Cristina Ferreira Bonomo e Prof. D.Sc. Marcelo Franco.

1. Adsorção. 2. Ativação química. 3. Biocatalisadores. I. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos. II. Veloso, Cristiane Martins. III. Bonomo, Renata Cristina Ferreira. IV. Franco, Marcelo. V. Título.

CDD(21): 662.62

Catálogo na fonte:

Adalice Gustavo da Silva – CRB/5-535

Biblioteca – UESB – Campus de Itapetinga-BA

Índice Sistemático para Desdobramento por Assunto:

1. Adsorção
2. Ativação química
3. Biocatalisadores



Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia
Programa de Pós-Graduação
Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos



Áreas de Concentração: Engenharia de Alimentos
Ciência de Alimentos

DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO

Título: IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE EM CARVÃO ATIVADO PRODUZIDO A PARTIR DO CAROÇO DE CAJÁ.

Autor (a): MYLENA JUNQUEIRA PINTO BRITO

Orientador (a): Prof.^a Dr.^a Cristiane Martins Veloso

Co-orientador (a): Prof.^a Dr.^a Renata Cristina Ferreira Bonomo
Prof.^o Dr. Marcelo Franco

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de **MESTRE EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: ENGENHARIA DE ALIMENTOS**, pela Banca Examinadora.

Prof.^a Dr.^a Cristiane Martins Veloso (UESB)

Prof.^o Dr. Rafael da Costa Ilhéu Fontan (UESB)

Prof.^a Dr.^a Andrea Lopes de Oliveira Ferreira (IFBA)

Itapetinga-BA, 24 de fevereiro de 2016.

*Ao meu pai Antônio e a minha
mãe Tiana, que sempre fizeram
tudo para que o meu sonho se
realizasse, dedico!*

AGRADECIMENTOS

À Deus pelo dom da vida e por se fazer presente em todos os momentos firmes ou incertos da minha vida, pois ao longo do caminho dessa jornada pude sentir a tua mão na minha, transmitindo-me a segurança necessária para chegar até aqui.

A minha mãe Tiana e ao meu pai Antônio, pelo amor incondicional, pelo exemplo maior de dignidade, perseverança, fé e por acreditarem e não medirem esforços para que eu pudesse concluir mais essa jornada. Agradeço por me ensinarem a importância da dedicação e respeito ao trabalho em que se está realizando. Vocês sempre foram os meus maiores incentivadores e são a razão dessa conquista!

A toda minha família, pelo carinho, atenção, e por sempre torcerem e vibrarem comigo em todas as conquistas.

Ao meu namorado Wesley por seu amor, apoio, compreensão e incentivo em todos os momentos. Obrigada por me acalmar sempre nos momentos mais difíceis e por tornar meus dias tão agradáveis. Te amo!

À minha orientadora, professora Dr^a. Cristiane Veloso, pela orientação, ensinamentos, dedicação, compreensão e pela paciência durante o desenvolvimento deste trabalho. Obrigada por todas as oportunidades e confiança depositada e por ser um exemplo de profissional e pessoa a qual admiro e me espelharei para sempre.

À todos os meus amigos que deixam os meus dias mais felizes e que mesmo à distância sempre se preocuparam e torceram por mim.

À Mari e Marília pela amizade e por estarem sempre ao meu lado durante essa jornada. Juntas formamos o trio inseparável das 3M's.

Aos colegas da república Dário e Bruna, pela amizade, pelos momentos de descontração e por dividirem comigo tantas alegrias e tristezas ao longo desses anos em Itapetinga.

Ao Professor DSc. Rafael Fontan pela atenção, prestatividade e pelos inúmeros conhecimentos passados durante todo o desenvolvimento do experimento.

Ao Professor DSc. Leandro Soares pelas as vezes que se disponibilizou a ajudar, sanar dúvidas e contribuir positivamente para o trabalho.

À professora DSc. Renata Bonomo e ao Professor DSc. Marcelo Franco, pela Co-orientação, e sugestões no desenvolvimento do projeto.

A todos os colegas do Laboratório de Engenharia de Processos (LEP) pela companhia, ajuda e momentos de descontração. Em especial a Olga, Gabriel, Carilan e Juliana pela amizade e troca de conhecimento.

À “Turma do carvão”: Keivisson, Matheus, Tâmara, Jéssica e Thainá. Agradeço especialmente a Keivisson pela amizade e por toda atenção e ajuda nessa reta final.

Às meninas do LABRA, Alexandra, Juliana e Dhiéssica pela ajuda na execução das atividades realizadas.

Aos integrantes da banca examinadora, por terem aceitado o convite em contribuir com esse trabalho.

À Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia e ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos pela oportunidade.

À Fundação de Amparo à Pesquisa (CAPES), pela bolsa concedida.

À todos os professores que contribuíram para o meu crescimento profissional.

E à todos aqueles que direta ou indiretamente fizeram parte desta conquista.

*O coração do homem planeja o seu caminho, mas o Senhor
lhe dirige os passos.(Provérbio 16)*

BRITO, M.J.P. **Imobilização de lipase em carvão ativado produzido a partir do caroço de cajá**. Itapetinga – BA: UESB, 2016. 69p. (Dissertação – Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos).

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo avaliar o processo de imobilização de lipase em carvão ativado obtido a partir do caroço do cajá (*Spondias mombin* L.). Os carvões foram preparados pelo método de ativação química utilizando o ácido fosfórico (H_3PO_4) ou hidróxido de potássio (KOH) como agentes de ativação. Foram avaliadas a influência do agente ativante, da razão de impregnação e da temperatura de carbonização nas propriedades físicas e químicas dos adsorventes. Para cada agente ativante empregado foi selecionado o adsorvente que apresentou as melhores características de área superficial e volume médio dos poros, para serem empregados como suporte para a imobilização de lipase por meio da adsorção física. A impregnação com KOH conduziu o desenvolvimento carvões com área superficial máxima de $222\text{ m}^2/\text{g}$, enquanto que com a impregnação com ácido foram obtidos carvão com área superficial de até $511\text{ m}^2/\text{g}$, mostrando que este agente ativante teve ação mais efetiva na modificação da estrutura dos adsorventes. Para determinar as melhores condições na imobilização da lipase nos suportes, foram avaliados o tempo de contato necessário para o sistema atingir o equilíbrio, a influência do pH do meio, a concentração inicial de enzima e a temperatura, na capacidade adsorptiva dos carvões, assim como na atividade hidrolítica dos derivados obtidos. As melhores condições de imobilização para suporte obtido a partir da impregnação ácida (CA4) foram: tempo 80 minutos, pH 3,5, concentração inicial de lipase 4000 mg.L^{-1} , apresentando atividade hidrolítica máxima de $278,4\text{ U/g}$ nas condições ideais. O suporte sintetizado por meio da ativação básica (CB4), apresentou uma atividade máxima de $270,0\text{ U/g}$ com o tempo de 120 minutos em pH 5, e atividade inicial 4000 mg.L^{-1} . Os testes realizados para a avaliação da estabilidade térmica da enzima imobilizada, demonstram que as enzimas imobilizadas no suporte CA4 conseguiram manter a maior atividade residual, durante um período de 24h.

Palavras chaves: adsorção; ativação química; biocatalisadores.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the lipase immobilization process on activated carbon obtained from the core of the caja (*Spondias mombin* L.). Carbons were prepared by chemical activation method using phosphoric acid (H_3PO_4) or potassium hydroxide (KOH) as activating agents. We evaluated the influence of the activating agent, the reason impregnation and the carbonization temperature on the physical and chemical properties of adsorbents. For each employee activating agent was selected which showed the best adsorbent characteristics of surface area and average pore volume to be applied as a support for the immobilization of lipase through physical adsorption. The impregnation with KOH led to the development coals with a maximum surface area of $222\text{ m}^2/\text{g}$, while in the acid impregnation were obtained carbon with a surface area of up to $511\text{ m}^2/\text{g}$, showing that this activating agent was more effective action in the modification of structure of the adsorbent. To determine the best conditions in lipase immobilization on the supports were evaluated contact time for the system to reach equilibrium, the influence of pH, the initial enzyme concentration and the temperature, the absorptive capacity of the coals, as well as the hydrolytic activity of the obtained derivatives. The best conditions for immobilization support obtained from the acid impregnation (CA4) were: Time: 80 minutes, pH 3.5, initial concentration of $4000\text{ lipase mg.L}^{-1}$, with maximum hydrolytic activity of 278.4 U / g in ideal conditions. The support synthesized by basic activation (CB4), showed maximum activity of 270.0 U/g at time 120 minutes at pH 5 and initial activity 4000 mg.L^{-1} . The tests performed to evaluate the thermal stability of the immobilized enzyme, demonstrate that enzymes immobilized on the support CA4 able to maintain the highest residual activity during a period of 24h.

Key words: adsorption; chemical activation; biocatalysts.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Reações catalisadas por lipases.....	18
Figura 2. Métodos de imobilização de enzimas	23
Figura 3. Ativação interfacial da lipase frente a um suporte hidrofóbico.	24
Figura 4. a) Fruto do Cajá (<i>Spondias mombin</i> L.) e b) Caroço do cajá	28
Figura 5. Valores de pH inicial e final no experimento de medida do ponto de carga os carvões ativados com ácido fosfórico.....	41
Figura 6. Valores de pH inicial e final no experimento de medida do ponto de carga dos carvões ativados com hidróxido de potássio.	42
Figura 7. Espectro de FTIR do material precursor.	43
Figura 8. Espectros de FTIR dos carvões ativados com ácido fosfórico (a) e hidróxido de potássio (b).	44
Figura 9. Espectros de FTIR dos carvões CA4 e CB4.	45
Figura 10. Isotermas de adsorção/dessorção de nitrogênio obtidas para os carvões ativados com ácido fosfórico.	46
Figura 11. Isotermas de adsorção/dessorção de nitrogênio obtidas para os carvões ativados com hidróxido de potássio.	47
Figura 12. Estabilidade térmica da enzima imobilizada no suporte CA4.	56
Figura 13. Estabilidade térmica da enzima imobilizada no suporte CB4.....	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Condições de preparação dos carvões ativados e codificação das amostras	33
Tabela 2. Caracterização química do material precursor.	39
Tabela 3. Rendimento e teor de cinzas dos carvões ativados	40
Tabela 4. Propriedades texturais dos carvões ativados.....	48
Tabela 5. Avaliação do efeito do tempo na adsorção da Lipase nos carvões CA4 e CB4. Condições: pH=3,5, concentração inicial de proteína de 4000 mg.L ⁻¹ e T = 30 °C.	49
Tabela 6. Avaliação do efeito do tempo na atividade hidrolítica da lipase imobilizada nos carvões CA4 e CB4. Condições: pH 3,5, concentração inicial de proteína de 4000 mg.L ⁻¹ e T = 30 °C.....	50
Tabela 7. Estudo do efeito do pH na adsorção da Lipase nos carvões ativados. Condições concentração inicial de proteína de 4000 mg.L ⁻¹ e T = 30 °C, tempo de contato 180 min.	51
Tabela 8. Avaliação do efeito do pH na atividade hidrolítica da lipase imobilizada nos carvões CA4 e CB4. Condições: pH 3,5, concentração inicial de proteína de 4000 mg.L ⁻¹ e T = 30 °C e tempo de contato 180 min.	51
Tabela 9. Estudo do efeito da temperatura na adsorção da Lipase nos carvões. Condições: concentração inicial de proteína de 4000 mg.L ⁻¹ , tempo de contato 180 min e pH 3,5 e 5,0 para os amostra CA4 e CB4 respectivamente.	53
Tabela 10. Avaliação do efeito temperatura na atividade hidrolítica da lipase imobilizada nos carvões CA4 e CB4. Condições: concentração inicial de proteína de 4000 mg.L ⁻¹ e pH 3,5 e 5,0 para os amostra CA4 e CB4 respectivamente.	53
Tabela 11. Estudo do efeito da concentração inicial de proteína na adsorção da Lipase nos carvões, na temperatura de 30 °C, tempo de 180 min e pH 3,5 e 5,0 para as amostra CA4 e CB4 respectivamente.....	54
Tabela 12. Avaliação do efeito da concentração inicial de proteína na atividade hidrolítica da lipase imobilizada nos carvões CA4 e CB4. Condições: temperatura de 30 °C, pH 3,5 e 5,0 para os amostra CA4 e CB4 respectivamente, tempo de 180 min.	54
Tabela 13. Estabilidade térmica da enzima imobilizada no suporte CA4. Concentração inicial de proteína de 4000 mg.L ⁻¹ e pH 3,5, temperatura 30 °C.	55
Tabela 14. Estabilidade térmica da enzima imobilizada no suporte CB4. Concentração inicial de proteína de 4000 mg.L ⁻¹ e pH 3,5.	56

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVOS	17
2.1 Objetivo geral.....	17
2.2 Objetivos específicos.....	17
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
3.1 Lipases	18
3.2 Aplicações biotecnológicas das lipases.....	20
3.3 Imobilização de enzimas	21
3.3.1 Imobilização de lipases por adsorção	23
3.4 Carvão Ativado como suporte	25
3.5 Aplicação do carvão ativado na imobilização de enzimas	29
4. MATERIAIS E MÉTODOS	32
4.1 Materiais e reagentes.....	32
4.2 Síntese dos carvões ativados	32
4.2.1 Preparação do material precursor	32
4.2.3 Preparação dos carvões ativados.....	32
4.2.4 Determinação do rendimento e caracterização dos carvões obtidos	33
4.3 Ensaio de imobilização da lipase	35
4.3.1 Influência do tempo de contato sobre a imobilização da lipase	35
4.3.2 Influência do pH no processo de imobilização.....	36
4.3.3 Influência da temperatura no processo de imobilização.....	36
4.3.4 Influência da concentração inicial no processo de imobilização	37
4.4 Estabilidade térmica da enzima imobilizada	37
4.5 Determinação da atividade hidrolítica pelo método titulométrico	37
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
5.1 Caracterização do precursor de carbono	39
5.2 Rendimento e caracterização dos carvões ativados.....	39
5.3 Ponto de carga zero dos carvões ativados	41
5.4 Espectrofotometria de absorção no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	42
5.5 Medida de Porosidade e Área Superficial Específica.....	45
5.6 Imobilização da lipase por adsorção	49
5.6.1 Tempo necessário para atingir o equilíbrio de imobilização.....	49

5.6.2 Influência do pH inicial da solução no processo de imobilização.....	50
5.6.3 Influência temperatura no processo de imobilização.....	52
5.6.4 Influência concentração inicial da proteína no processo de imobilização.....	53
5.7 Estabilidade térmica da enzima imobilizada	55
6. CONCLUSÕES.....	58
7. REFERÊNCIAS	59

1. INTRODUÇÃO

As lipases (triacilglicerolacilhidrolases, E.C.3.1.1.3) são enzimas de grande potencial biotecnológico, pois são capazes de catalisar diversos tipos de reações. Elas compreendem um grupo de enzimas hidrolíticas que atuam geralmente na interface orgânico-aquosa, catalisando a hidrólise e a síntese de ésteres formados por glicerol e ácidos graxos de cadeia longa (PAQUES & MACEDO, 2006; SHAKERI & KAWAKAMI, 2009). Essas enzimas podem também catalisar reações de esterificação, transesterificação e interesterificação em solventes orgânicos (XI & XU, 2005; PAQUES & MACEDO, 2006).

A versatilidade das lipases permite que essas enzimas sejam selecionadas para aplicações potenciais em diversos setores, como a indústria de alimentos, oleoquímica, farmacêutica, tratamento de efluentes, na formulação de detergentes, síntese de biosurfactantes, entre outros (HASAN, SHAH & HAMEED, 2006; RAMANI et al. 2012; ITTRAT et al., 2014).

Apesar da alta eficiência catalítica da lipase, fatores ligados ao custo e a estabilidade limitam a utilização destes biocatalisadores. Uma alternativa para solucionar essas dificuldades é a utilização da enzima em sua forma imobilizada. A imobilização possibilita a reutilização do biocatalisador, permite a separação dos produtos do meio reacional de forma fácil e muitas vezes melhora a eficiência catalítica da enzima (MATEO et al., 2007; GHATTASA et al., 2014; ZANETTE, AWADALLAK & FILHO, 2014).

Lipases têm sido imobilizadas por diferentes métodos, tais como adsorção física, encapsulação, ligação covalente ou por reticulação (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO & SOLDI, 2004). O método de imobilização por adsorção é o mais comum, pois apresenta baixo custo, poucos efeitos deletérios para a atividade e seletividade da enzima (JEGANNATHAN et al., 2008; KHARRATA et al., 2011). Nesta técnica a enzima é imobilizada em um suporte sólido por interações de baixa energia, como interações de van der Waals ou hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e iônicas, entre outras. Vários materiais podem ser usados para este propósito e a escolha de um deles depende de suas propriedades, estabilidade física e química, caráter hidrofóbico/hidrofílico, capacidade de adsorção de enzima e custo (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO & SOLDI, 2004; CONTESINIA et al., 2010).

Nos últimos anos inúmeras pesquisas vêm sendo realizadas, visando o desenvolvimento de novos materiais para imobilização de enzimas como: celite, sílica mesoporosa hexagonal, carvão mesoporoso, carvão ativado, entre outros (ITTRAT et al., 2014; KANDASAMYA et al., 2010; MOTEEVALIZADEH et al., 2015). O carvão ativado se apresenta como um suporte com potencial para aplicação na imobilização enzimática, uma

vez que possui características que favorecem a imobilização, tais como uma área superficial elevada e porosidade altamente desenvolvida, elevada estabilidade química, e vários grupos funcionais sobre a superfície. Entretanto seu uso ainda é limitado devido ao seu elevado custo de produção (NARANJO et al., 2010; RAMANI et al., 2012).

Nesse sentido, existe um crescente interesse na busca de materiais alternativos de baixo custo que possam ser utilizados na sua produção. Os produtos empregados na síntese de carvão são substâncias com alto valor de carbono e baixo teor de inorgânicos, assim como resíduos sólidos da agricultura (cascas e sementes, madeiras e bagaços), com os quais se produz carvões ativados com sucesso comprovado (GIRALDO & MORENO-PIRAJÁN, 2012; PEREIRA et al., 2014). Com isso pesquisas que possam demonstrar a potencialidade desses resíduos na produção de carvão ativado são de suma importância.

O caroço do cajá apresenta-se como uma alternativa de matéria-prima com potencial para a produção de carvão ativado. Esta espécie tem sido amplamente estudada quanto ao valor nutricional da polpa, no entanto são escassos dados na literatura das formas de reaproveitamento dos resíduos do seu processamento. Dessa forma, a proposta de produzir carvão ativado, a partir do caroço do cajá através de ativação química, empregando diferentes condições de síntese, se torna relevante diante da busca por adsorventes que apresentem características que possibilitem imobilizar eficazmente a lipase (distribuição de poros, área superficial específica, atividade química da superfície) e que sejam de baixo custo. É interessante ressaltar que ainda existem poucos estudos relativos à imobilização de lipases, utilizando como suporte o carvão ativado, tornando o desenvolvimento desta pesquisa uma alternativa promissora. Sendo assim, o presente trabalho foi realizado com o objetivo de produzir carvões ativados a partir do caroço do cajá, caracterizá-los e aplicá-los como suporte para imobilização da lipase por meio do método de adsorção.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Sintetizar carvões ativados a partir do caroço do cajá, sob diferentes condições de síntese, e aplicá-los como suporte para imobilização da lipase por meio do método de adsorção.

2.2 Objetivos específicos

- Sintetizar carvões ativados a partir de um resíduo da agroindústria (caroço do cajá);
- Estudar o efeito do agente ativante, da razão de impregnação e da temperatura de carbonização sobre as propriedades do carvão ativado;
- Caracterizar os carvões ativados obtidos;
- Avaliar as condições ótimas para imobilização de lipase em carvão ativado;
- Estudar a influência do suporte sobre a atividade da enzima imobilizada.

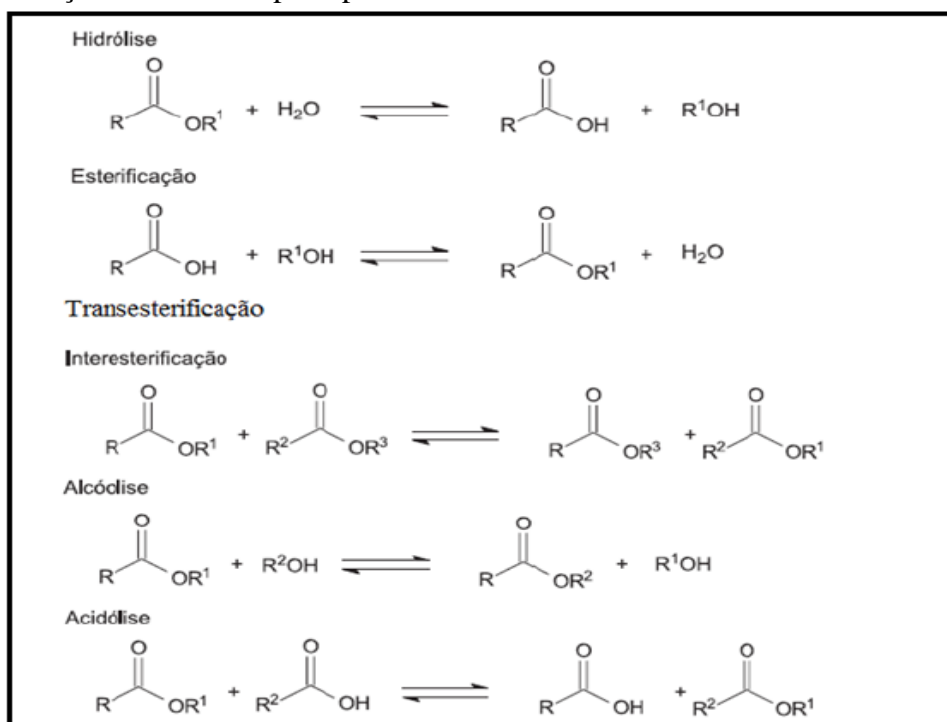
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Lipases

As lipases (triacilglicerolacilhidrolases E.C.3.1.1.3) constituem um importante grupo de enzimas com aplicações biotecnológicas (HASAN, SHAH & HAMEED, 2006; SHAKERI & KAWAKAMI, 2009). Estas enzimas encontram-se largamente distribuídas na natureza, podendo ser obtidas a partir de fontes animais, vegetais e microbianas (VILLENEUVE et al., 2000; YANG et al., 2005), tendo suas propriedades variadas de acordo com sua procedência. Dependendo da fonte, as lipases podem ter massa molar variando entre 20 kDa e 75 kDa com cerca de 150 a 650 resíduos de aminoácidos e atividade ótima em pH na faixa de 4 a 9 e em temperaturas variando desde a ambiente até 70 °C, sendo que, em sua maioria, apresentam atividade ótima próximo a 30 °C (CASTRO et al., 2004).

Possuem a capacidade de catalisar a hidrólise de triacilgliceróis de longa cadeia acila com a formação de diacilgliceróis, monoacilgliceróis, gliceróis e ácidos graxos, atuando na interface entre a fase orgânica e a fase aquosa. As lipases são também capazes de hidrolisar uma ampla variedade de ésteres (KAZLAUSKAS, 2005; ANGKAWIDJAJA & KANAYA, 2006) e, em condições adequadas, catalisam reações de esterificação e transesterificação (interesterificação, alcóólise e acidólise), levando à síntese de diferentes ésteres carboxílicos e amidas (KAZLAUSKAS, 2005; XI & XU, 2005; YADAV & JADHAV, 2005). Na Figura 1 são apresentadas algumas reações catalisadas por lipases.

Figura 1. Reações catalisadas por lipases



Adaptado de Paques e Macedo, 2006.

Apesar de lipases de fontes distintas serem capazes de catalisar a mesma reação, o desempenho de cada uma delas, sob as mesmas condições, pode ser bastante diferente. As lipases provenientes de microrganismos são as mais utilizadas industrialmente, porque além de apresentarem procedimentos mais simples de isolamento a partir do caldo fermentativo são, geralmente, mais estáveis que as lipases de outras fontes (HASAN, SHAH & HAMEED, 2006).

Todas as lipases, com exceção das lipases pancreáticas, possuem um único sítio ativo. Estas enzimas compartilham um padrão conformacional comum, denominado conformação alfa/beta hidrolase, cuja atividade enzimática resulta da tríade catalítica Serina-Histidina-Aspartato ou Glutamato (Ser-His-Asp/Glu) do seu sítio ativo (DALLA-VECCHIA, NASCIMENTO & SOLDI, 2004; GUPTA, BHATTACHARYA & MURTHY, 2013).

Os aspectos básicos sobre os mecanismos de catálise das lipases foram elucidados a partir do estudo das estruturas tridimensionais de várias destas enzimas, revelando duas diferentes conformações (SANDSTROM et al., 2012, ERICSSON et al., 2008). No qual o acesso ao sítio ativo da enzima está fechado através de um oligo-peptídeo hidrofóbico, chamado de tampa ou “lid”, que cobre a entrada do sítio ativo deixando-o completamente isolado do meio de reação (nesta conformação a lipase é considerada inativa) e a segunda conformação ocorre quando há ligação do substrato na superfície da enzima; esta tampa desloca-se, alterando a forma fechada da enzima para a forma aberta, deixando o sítio ativo acessível ao substrato. Ao mesmo tempo, a enzima expõe uma larga superfície de caráter hidrofóbico, o que facilita sua ligação à interface. Nesta conformação a lipase é considerada ativa. Este fenômeno é conhecido como “ativação interfacial” (PAIVA, BALCÃO & MALCATA, 2000; KHOABI et al., 2014). Logo, as lipases preferencialmente atuam em interfaces água-óleo, ou água-solvente orgânico, e a “ativação interfacial”, relaciona o aumento da atividade da lipase em função de substratos insolúveis, ou seja, as lipases atuam preferencialmente em substratos emulsionados (SHARMA et al., 2001).

As lipases são enzimas que exibem propriedades regioseletivas, quimiosseletivas e enantiosseletivas, cuja especificidade é controlada pelas propriedades da enzima, estrutura do substrato e por fatores que afetam a ligação da enzima ao substrato, sendo o triacilglicerol seu substrato padrão (PAQUES & MACEDO, 2006; GUPTA, GUPTA & RATHI, 2004; KAPOOR, GUPTA, 2012).

A especificidade das lipases em relação à estrutura do substrato é uma propriedade conhecida como regioseletividade, sendo as lipases subdivididas em lipases 1,3-específicas e lipases inespecíficas. As enzimas 1,3-específicas catalisam a liberação de ácidos graxos das posições 1 e 3 dos triacilgliceróis, já as inespecíficas atuam sobre todos os ácidos graxos,

independentemente da posição que ocupam na molécula de glicerol, promovendo a hidrólise e produzindo tanto ácidos graxos livres, glicerol, monoacilgliceróis e diacilgliceróis como intermediários (CASTRO et al., 2004).

Em relação à quimiosseletividade, as lipases atuam especificamente ou preferencialmente na hidrólise de ésteres de determinados ácidos graxos, em função do tamanho da cadeia carbônica ou da ou da insaturação (CASTRO et al., 2004).

A enantiosseletividade é uma propriedade que se refere à habilidade das enzimas distinguirem enantiômeros. A quiralidade intrínseca das enzimas permite que algumas reações biocatalisadas produzam compostos opticamente ativos. Esta propriedade muito é explorada na produção de fármacos (JAEGER & EGGERT, 2002; KAPOOR & GUPTA, 2012).

Como biocatalisadores, as lipases apresentam algumas vantagens importantes sobre os catalisadores clássicos industriais. Suas características de especificidade, regioseletividade e enantiosseletividade permitem a síntese de compostos de alta pureza, com um número reduzido de subprodutos e baixa geração de resíduos. Além disso, os processos enzimáticos requerem procedimentos mais simples e ainda evitam o uso de compostos químicos com alto potencial poluente (CASTRO-OCHOA et al., 2005; SILVA et al., 2005).

3.2 Aplicações biotecnológicas das lipases

O enorme potencial biocatalítico das lipases é de interesse para diversos setores industriais, como a indústria de alimentos, farmacêutica e química fina, tratamento de efluentes na formulação de detergentes, síntese de biosurfactantes, indústria de papel, entre outros (HASAN, SHAH & HAMEED, 2006; RODRIGUES & FERNANDO-LAFUENTE, 2010; CASTRO, et. al., 2004; CAMMAROTA & FREIRE, 2006).

Na indústria de alimentos, lipases podem ser utilizadas como biocatalisadores na modificação de óleos e gorduras para obtenção de alimentos com propriedades nutricionais alteradas, por exemplo, na modificação de ácidos graxos polinsaturados, resultando na produção de alimentos com baixa caloria (RODRIGUES & FERNANDO-LAFUENTE, 2010). Na indústria de laticínios, a lipase é empregada na produção de queijos modificados enzimaticamente, que têm seu aroma intensificado, ou na produção de ésteres aromatizantes de queijo para produtos salgados e petiscos (HASAN et al., 2006). Lipases também podem participar da aceleração do processo de maturação de queijos e na hidrólise da gordura do leite (HASAN et al., 2006).

Devido sua capacidade de hidrólise de óleos e gorduras, as lipases podem ser utilizadas no tratamento de efluentes com alto teor de lipídeos. O emprego de lipases, em geral, ocorre durante o pré-tratamento do efluente, visando à redução do teor de carga

orgânica (LEAL et al., 2006; RIGO et al., 2008). As lipases podem ser usadas na sua forma bruta (caldo fermentado) ou isoladas (HASAN et al., 2006; MENDES et al., 2005). A utilização de enzimas no tratamento de efluentes industriais tem sido desenvolvida como alternativa ao tratamento convencional e tem despertado grande interesse para a pesquisa, em função das vantagens apresentadas (SEITZ, 2007; JEGANATHAN et al., 2006; SONGA et al., 2011). Estudos como os de Rigo et al. (2008), Mita et al. (2010) e Kumar et al. (2012), têm avaliado o uso de lipases na degradação de resíduos lipídicos e relatam como vantagens, em relação aos métodos convencionais, a especificidade, o que permite a conversão a subprodutos não tóxicos; operação em uma ampla faixa de pH, temperatura e salinidade; possibilidade de uso em resíduos com alto ou baixo teor de poluentes; maior rendimento; operação em condições brandas e consequente diminuição de gastos com energia.

A produção de papel também utiliza lipases no seu processo de produção. Nestas indústrias, lipases são utilizadas para remoção do “pitch”, como são chamados os componentes hidrofóbicos da madeira, principalmente triglicerídeos e ceras, que causam problemas na fabricação do papel (VERMA; THAKUR; BHATT, 2012).

A produção de biodiesel é outro campo bastante explorado ultimamente. A partir de reações de transesterificação entre um óleo e um álcool catalisada por lipases é possível obter biodiesel tendo como principal vantagem, frente à catálise química, a separação catalisador/produto (MARCHETTI; MIGUEL; ERRAZU, 2007). Além de estudar fontes diversas de óleos, muitas pesquisas têm focado na fonte de lipase e nas etapas de reação, visando maior rendimento e alta taxa de produção (BAJAJ et al., 2010).

Contudo, as enzimas como biocatalizadores biológicos estão sujeitas a inativação por processos físicos, químicos ou biológicos, durante sua utilização ou estocagem (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004). Além das perdas ocorridas devido à inativação enzimática durante os bioprocessos, deve-se ressaltar também a existência de perdas da enzima livre durante o processo de separação do produto final. Nesse sentido, existe uma constante demanda pelo desenvolvimento de métodos que permitam a utilização de lipases de maneira efetiva e econômica (SALIHU et al., 2012). Muitos métodos têm sido propostos a fim de minimizar estes inconvenientes, sendo um deles a imobilização de enzimas sobre suportes sólidos.

3.3 Imobilização de enzimas

Embora as enzimas apresentem muitas vantagens em relação aos catalisadores inorgânicos, como elevada atividade catalítica, especificidade por determinado substrato e elevada atividade em condições brandas de reação, sua utilização em processos industriais

têm sido limitada. Isto se deve a baixa estabilidade operacional e à dificuldade de separação do produto final, que são consideradas como barreiras para o seu uso em processos contínuos e aplicações em larga escala. Contudo, uma das formas de aproveitar as vantagens da catálise enzimática e superar as deficiências deste processo, tem sido a utilização da enzima em sua forma imobilizada (HASAN, SHAH & HAMEED, 2006; YUCEL, 2012; GUPTA, BHATTACHARYA & MURTHY, 2013; GHATTASA et al., 2014).

Enzimas imobilizadas estão fisicamente confinadas ou localizadas em uma região definida do espaço, com manutenção de suas atividades catalíticas e podem ser utilizadas repetidas vezes ou continuamente (GIRELLI & MATTEI, 2005). O principal interesse em imobilizar uma enzima é obter um biocatalisador com atividade e estabilidade que não sejam afetadas durante o processo de uso, em comparação à sua forma solúvel (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO & SOLDI, 2004).

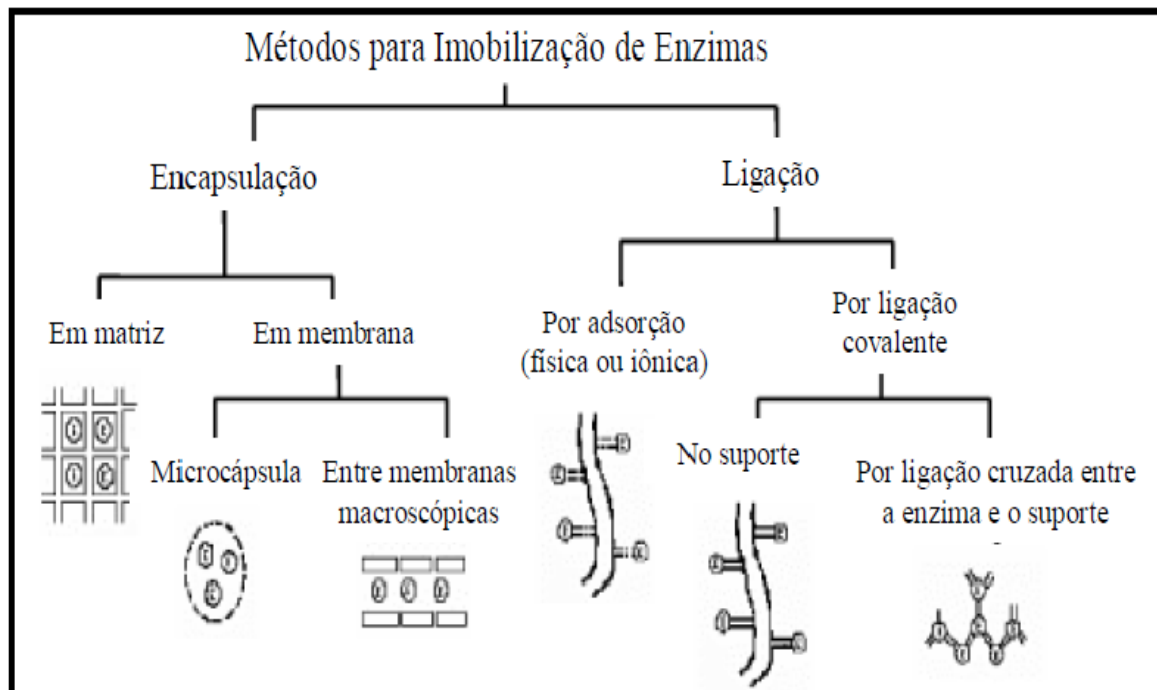
A imobilização pode conferir a enzima uma melhoria do seu desempenho catalítico e reduzir a sua inativação por distorção de sua estrutura nativa pela influência da temperatura, do pH e de solventes orgânicos (BRADY & JORDAAN, 2009; MENDES et al., 2011; MOTEVALIZADEH et al., 2015). Além disso, do ponto de vista econômico o uso de enzimas imobilizadas apresenta diversas vantagens sobre enzimas solúveis, tais como: uso em processos contínuos, possibilitando maior controle das variáveis do processo; facilidade de separação do produto de reação; aumento de estabilidade e a reutilização do biocatalisador, com aproveitamento prolongado de sua atividade catalítica (CHANG et al., 2007; BRADY & JORDAAN, 2009; GUPTA, BHATTACHARYA & MURTHY, 2013).

Entretanto, foram também relatadas algumas desvantagens com relação aos procedimentos de imobilização como: possível perda da atividade enzimática durante o processo de imobilização, os efeitos difusionais devido ao transporte do substrato e do produto ao sítio ativo da enzima imobilizada, além de muitas vezes, dependendo do tipo de imobilização, os métodos serem trabalhosos e demorados e acarretarem custos adicionais na produção de um biocatalisador (VILLENEUVE et al., 2000). Para que estas desvantagens sejam minimizadas é necessário conhecer a natureza da enzima, do material usado como suporte para a imobilização e a técnica de imobilização.

As enzimas podem ser imobilizadas por uma variedade de métodos, tais como encapsulamento (GUPTA, BHATTACHARYA & MURTHY, 2013; ZANETTE, AWADALLAK & FILHO, 2014) por ligação cruzada (KATO et al., 2011), interação covalente (KHOABI et al., 2014; GHATTASA et al., 2014) ou adsorção (KHARRATA et al., 2011; ITTRAT et al., 2014; MOTEVALIZADEH et al., 2015). Na Figura 2 são apresentados, esquematicamente, a classificação dos métodos utilizados para imobilização de enzimas.

A seleção do método de imobilização deve ser baseada em parâmetros como a eficácia da utilização da enzima, os custos do procedimento de imobilização, a toxicidade dos reagentes de imobilização e as propriedades finais desejadas do biocatalisador imobilizado (KARRA-CHAABOUNIA et al., 2008).

Figura 2. Métodos de imobilização de enzimas



Adaptado de Dalla-Vecchia, Nascimento & Soldi (2004).

3.3.1 Imobilização de lipases por adsorção

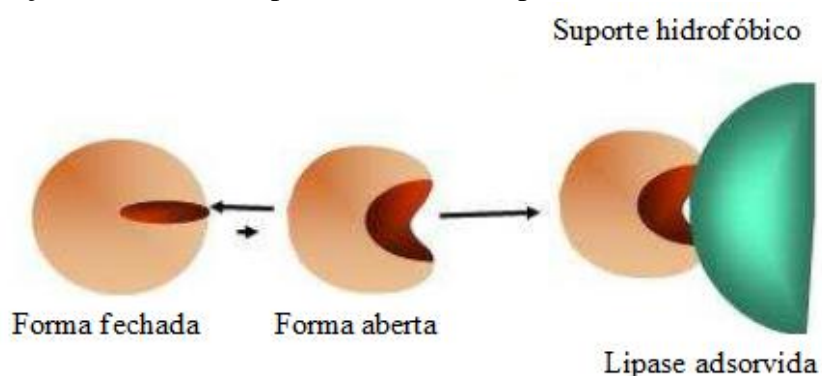
Um dos métodos mais empregados na imobilização de enzimas é o de adsorção. Esta técnica apresenta poucos efeitos deletérios para a atividade e seletividade da enzima, além de apresentar baixo custo e ser de fácil execução. Neste método ocorre a adesão da enzima na superfície do suporte insolúvel, que se encontra em meio aquoso, através de interações de Van der Waals, interações hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e interações específicas (CHANG et al., 2007; KARRA-CHAABOUNIA et al., 2008; KHARRATA et al., 2011).

Considerando as forças envolvidas no processo de adsorção diferentes parâmetros vão influenciar na quantidade de enzima imobilizada e intensidade das interações, tais como: pH, força iônica do meio, natureza do solvente empregado, características do adsorvente, bem como a relação entre a concentração da enzima e do suporte (VILLENEUVE et al., 2000; DALLA-VECCHIA, NASCIMENTO & SOLDI, 2004). A quantidade de enzima adsorvida por quantidade do suporte aumenta com a concentração do biocatalisador até atingir um patamar de saturação, influenciando diretamente na eficiência da imobilização do suporte (ZHAO et al., 2013). Dependem do pH do meio o número e da natureza das cargas na

superfície do suporte, geralmente obtendo-se valores máximos de adsorção em valores próximos ao ponto isoelétrico da proteína. Isto ocorre devido ao fato de que, no valor de pH correspondente ao ponto isoelétrico da proteína, a repulsão eletrostática entre as moléculas de proteína é minimizada (VINU, MIYAHARA & ARIGA, 2005; SUN et al., 2010).

As lipases, especificamente, apresentam aumento de atividade quando adsorvidas em suportes hidrofóbicos, devido a mudanças conformacionais que tornam seu sítio ativo acessível aos substratos (MATEO et al., 2007; KANG et al., 2007). Na presença de uma superfície hidrofóbica, a lipase sofre uma ativação interfacial e o equilíbrio de suas formas é deslocado para a conformação aberta. Neste caso, a região do sítio ativo da enzima interage com o suporte por adsorção hidrofóbica, uma vez que o reconhece como similar aos seus substratos naturais. Assim, a lipase é imobilizada em sua conformação ativa (Figura 3) (MATEO et al. 2007; HANEFELD, GARDOSI & MAGNER, 2009).

Figura 3. Ativação interfacial da lipase frente a um suporte hidrofóbico.



Adaptado de Mateo et al. (2007).

O suporte empregado na técnica de adsorção exerce influência direta na eficiência do processo de imobilização. Nesse sentido vários materiais podem ser utilizados como suportes para a imobilização de enzimas e a escolha de um deles depende de suas propriedades tais como: estabilidade física e química, porosidade e tamanho dos poros, área superficial, caráter hidrofílico/hidrofóbico e o custo. Além disso, é necessário levar em consideração a natureza da enzima a ser imobilizada e do processo no qual o catalisador será aplicado (KANDASAMYA et al., 2010; CONTESINIA et al., 2010).

De acordo com sua composição os suportes podem ser classificados como orgânicos ou inorgânicos e de acordo com sua morfologia como porosos e não-porosos (DALLAVECCHIA, NASCIMENTO & SOLDI, 2004). Suportes inorgânicos fornecem resistências químicas superiores, mas têm algumas limitações em termos de flexibilidade e de transferência de massa. Já os suportes orgânicos apresentam menor resistência ao

escoamento, porém são mais baratos e proporcionam uma maior variedade de funcionalidades (GUPTA, BHATTACHARYA & MURTHY, 2013).

Os materiais porosos apresentam como principal vantagem sua elevada área superficial interna disponível para a imobilização de enzimas. Contudo, é importante atentar-se para o diâmetro dos poros do suporte, de modo que esses sejam suficientemente grandes para acomodar a enzima e permitir o acesso do substrato e difusão dos produtos (DALLAVECCHIA, NASCIMENTO & SOLDI, 2004). Em contraponto, a vantagem dos materiais não porosos, apesar da baixa área superficial, é a ausência da resistência à transferência de massa interna, que em alguns casos pode tornar a velocidade do processo lenta. No entanto, estudos relatam uma imobilização mais eficiente de enzimas ao se utilizar suportes porosos em comparação com os não porosos, devido ao seu tamanho e volume dos poros, da elevada área superficial e estruturas abertas características desses materiais (SHAKERI & KAWAKAMI, 2009; KANDASAMYA et al., 2010; ZHAO et al., 2013).

Nos últimos anos inúmeras pesquisas vêm sendo desenvolvida, visando o desenvolvimento de novos materiais para imobilização de lipases como: celite (XU et al., 2005), resíduos agrícolas (ITTRAT et al., 2014), sílica mesoporosa hexagonal (YADAV & JADHAV, 2005), carvão mesoporoso (KANDASAMYA et al., 2010) entre outros. Quando se estudam novos materiais, buscam-se principalmente suportes que aumentem a atividade específica após a imobilização, a faixa de pH ótimo para a atividade e a estabilidade térmica e que sejam de baixo custo (YE et al., 2006).

3.4 Carvão Ativado como suporte

O carvão ativado (CA) é um material carbonáceo, caracterizado por possuir uma área superficial interna e porosidade altamente desenvolvida, elevada estabilidade química e vários grupos funcionais sobre a superfície (SAHU, ACHARYA & MEIKAP, 2010). Devido a estas características o carvão ativado tem sido amplamente utilizado como adsorvente (PEREIRA et al., 2014; NOWICKI, KAZMIERCZAK & PIETRZAK, 2015), em catálise ou como suporte catalítico (GIRALDO & MORENO-PIRAJÁN, 2012) e em processos de purificação e separação (HU, LU & MEISNER, 2008; YANG, XIA & MOKAYA, 2007).

A capacidade de adsorção do carvão ativado é determinada pela sua porosidade interna, área superficial, distribuição de tamanho e volume de poro e pela presença de grupos funcionais em sua superfície, os quais são significativamente afetados pelas propriedades físicas e químicas do precursor, pelo método de preparação e as condições de ativação (DENG et al., 2010; HESASA et al., 2013).

A área superficial específica do carvão ativado se estende de $80 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ a $1200 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ e sabe-se que a área interna é variável e, segundo a União Internacional de Química Pura e Aplicada – IUPAC (1982), os poros podem ser classificados em função do diâmetro como microporos (menor que 2nm), mesoporos (entre 2 nm e 50 nm) e macroporos (maior que 50 nm). A estrutura dos poros limita as dimensões das moléculas que podem ser adsorvidas e a área superficial disponível limita a quantidade de material que pode ser adsorvido pela matriz. Os carvões ativados preparados convencionalmente são predominantemente microporosos, implicando na necessidade de tratamentos específicos de produção que favoreçam a formação de poros mais largos, acessíveis a moléculas maiores. Tais moléculas exigem não apenas elevada área superficial, mas também um maior volume de meso e macroporos na estrutura do carvão, visto que o diâmetro dos microporos permite o acesso exclusivo de adsorvatos pequenos, como o caso de moléculas gasosas (PEREIRA et al., 2014).

A química superficial dos materiais carbonáceos depende essencialmente, de seu conteúdo de heteroátomos, principalmente de seu conteúdo em complexos superficiais de oxigênio. A superfície do carvão apresenta características químicas ácidas e básicas; as ácidas associam-se às funcionalidades do oxigênio, como carboxilas, lactonas e fenóis. De outro lado, as funções como piranos, éter, hidroxilas e carbonilas são responsáveis pelas propriedades básicas na superfície do carvão. Esses grupos funcionais, podem afetar a capacidade de adsorção e podem ser modificados por tratamentos térmico e químico (JUNG et al., 2001).

3.4.1 Produção do carvão ativado

Os precursores utilizados na produção do CA são materiais que possuem alto teor de carbono e baixo teor de compostos inorgânicos, características essas presentes em vários resíduos agrícolas (PRAHAS et al., 2008). Os resíduos agrícolas são considerados insumos importantes para a preparação de carvões ativados, pois além de apresentarem em sua composição um elevado teor de matérias voláteis, característica essa que permite a obtenção de um adsorvente com uma estrutura altamente porosa, são matérias primas de baixo custo e renováveis (OKMAN et al., 2014; DJILANI et al., 2015).

Os materiais lignocelulósicos são constituídos por três principais frações poliméricas: celulose, lignina e hemicelulose, que são unidas entre si por ligações covalentes, formando uma rede complexa (JEFFRIES, 1990). Essas frações majoritárias são responsáveis por 97-99% de toda massa seca dos materiais. A composição do material lignocelulósico em relação ao conteúdo desses componentes, exerce influência direta no desenvolvimento da porosidade dos carvões produzidos (NABAISA et al., 2013). Neste sentido muitas pesquisas

tem sido realizadas visando avaliar o potencial desses materiais lignocelulósicos como precursores de carbono na produção de CA, incluindo cascas de coco (CAGNON et al., 2009; YANG et al., 2010), de cacau e caroço de caju (PEREIRA et al., 2014), resíduos de abacaxi (MAHAMAD, ZAINI & ZAKARIA, 2015), caroço de damasco (DJILANI et al., 2015), bambu (LIU et al., 2013), semente de uva (OKMAN et al., 2014), entre outros.

Uma vez determinada a fonte precursora de carbono, os carvões ativados são obtidos por processos que contam com a carbonização do material precursor e sua ativação (KETCHA et al., 2012). A carbonização consiste no tratamento térmico (pirólise) do material precursor em atmosfera inerte ou não, em temperaturas que variam entre 400 °C e 850 °C. Nesta etapa são removidos componentes voláteis e gases leves (CO, H₂, CO₂ e CH₄), produzindo uma massa de carbono fixo e uma estrutura porosa primária que favorece a ativação posterior. A pirólise da biomassa é um processo muito versátil e dependendo das condições da temperatura, taxa de aquecimento, tempo de residência, dentre outras, a produção de carvão requerido pode ser otimizada (DOMÍNGUEZ et al., 2007).

A temperatura de carbonização afeta diretamente as propriedades do carvão ativado, uma vez que a aplicação de calor acelera a degradação térmica e o processo de volatilização do material impregnado. Isto leva ao desenvolvimento de poros e aumento da área de superfície (IOANNIDOU & ZABANIOTOU, 2007; DAFFALLA; MUKHTAR & SHAHARUN, 2012).

A ativação consiste em submeter o material a reações secundárias, objetivando o aumento da área superficial. Esta é uma etapa de fundamental importância, pois nela será promovido o aumento da porosidade do carvão. Deseja-se no processo de ativação o controle das características básicas do material (distribuição de poros, área superficial específica, atividade química da superfície, resistência mecânica etc.) de acordo com a configuração requerida para uma dada aplicação específica (GUO et al., 2009; LI et al., 2008). A ativação pode ocorrer por processos físicos ou químicos.

A ativação física ocorre com a carbonização do material precursor e a subsequente ativação em altas temperaturas, entre 800 °C a 1.100 °C, sob fluxo de gases como vapor d'água, dióxido de carbono ou uma mistura desses gases. Esses gases oxidam o material carbonáceo do interior das partículas, promovendo a criação e desobstrução dos poros já existentes e concomitantemente ao desenvolvimento da estrutura porosa do material (HORIKAWA et al., 2010).

Já a ativação química consiste na impregnação do material lignocelulósico com agentes desidratantes, seguida de um tratamento térmico, com temperaturas entre 400 °C e 900 °C. Neste processo a carbonização e a ativação são realizadas simultaneamente. Em geral,

a ação promovida pela impregnação de um agente de ativação químico, pode ser descrita pela promoção simultânea da hidrólise e aumento da estrutura do carvão durante o tratamento térmico. Cloreto de zinco, ácido fosfórico, hidróxido de sódio, hidróxido de potássio são exemplos de agentes químicos que sem sendo bastante empregados no processo de ativação de carvões produzidos a partir de materiais lignocelulósicos (HORIKAWA et al., 2010; TAY, UCAR & KARAGOZ, 2009).

A ativação química tem vantagens e algumas desvantagens em relação à ativação física. Estas vantagens podem ser descritas sumariamente como: temperaturas mais baixas para pirólise, menor tempo de ativação, maior rendimento, permite obter materiais com maior área superficial, permite o controle e manutenção de uma melhor distribuição dos tamanhos dos poros e incorporação de grupos funcionais. A literatura também menciona algumas desvantagens da ativação química como o envolvimento de produtos altamente corrosivos e a necessidade de um passo extra de lavagem do produto final (YU & ZHONG, 2006; KALUDJEROVIC et al., 2014). Dessa forma, na maioria dos casos, ao se trabalhar com precursores de biomassa na produção do carvão ativado, opta-se pela ativação química (YORGUN, VURAL & DEMIRAL et al., 2009; ZYOUD et al., 2015).

3.4.2. Resíduo precursor para produção do carvão ativado – caroço do cajá (*Spondiasmombin L.*)

A cajazeira (*Spondiasmombin L.*) pertence à família *Anacardiaceae* e ao gênero *Spondias*, que possui entre 8 e 12 espécies distribuídas em regiões tropicais do mundo. No Brasil, é encontrada principalmente nos estados do Norte e Nordeste, onde seus frutos recebem diferentes denominações, tais como: cajá, cajá verdadeiro, cajá-mirim ou taperebá. Trata-se de uma espécie que sobrevive de forma silvestre e cuja exploração é feita de modo extrativista (PINTO et al., 2003; CARVALHO et al., 2011).

O cajá é constituído de polpa, casca e semente (Figura 4), porém apenas a polpa assume posição de destaque no tocante do aspecto comercial em função do aroma, sabor e palatabilidade que oferece ao ser degustado nas mais variadas formas. Os frutos são caracterizados como drupas de 3 a 6 cm de comprimento, ovóides ou oblongos, achatados na base, com cor variando do amarelo ao alaranjado. A casca é fina, lisa, com polpa pouco espessa também variando do amarelo ao alaranjado, suculenta e de sabor ácido – adocicado (BOSCO et al., 2000; SACRAMENTO & SOUZA 2000).

Figura 4. a) Fruto do Cajá (*Spondiasmombin L.*) e b) Caroço do cajá



(a)

(b)

A safra do cajá varia de região para região, sendo de maio a junho na Paraíba, de fevereiro a maio na região Sudeste da Bahia, de agosto a dezembro no Pará e janeiro a maio no Ceará. A comercialização dos frutos é feita em feiras livres, às margens de rodovias próximas às unidades de produção e nas indústrias de processamento de polpas (CAVALCANTE et al. 2009; SACRAMENTO & SOUZA, 2000).

A crescente exploração comercial do cajá está relacionada principalmente às características adequadas para a industrialização, aliadas ao aroma e sabor agradáveis (OLIVEIRA; COSTA & AFONSO, 2014). No Brasil, notadamente no Norte e Nordeste, a espécie tem participação crescente no agronegócio, principalmente pela comercialização para o consumo *in natura* e para o processamento de polpa, apresentando grande aceitação no mercado pelo seu sabor exótico, excelente qualidade e valor comercial como matéria-prima no preparo de sucos, picolés, sorvetes, néctares e geleias (CARVALHO et al., 2011; SOARES, 2006). Esta espécie também, vêm sendo amplamente estudada quanto ao seu valor nutricional (MOURA et al., 2015; TIBURSKI et al., 2011; CARVALHO et al., 2011). Convém ressaltar que apesar do crescimento considerável na produção de cajá nos últimos anos, são escassos dados na literatura a respeito da quantidade de fruto que são produzidos a nível nacional e regional.

Os caroços de cajá, ainda não apresentam aplicabilidade, em especial na área de alimentos. Estes resíduos lignocelulósicos podem caracterizar-se como mais uma alternativa de matéria-prima de grande potencial para a produção de carvão ativado, pois o setor agroindustrial tem crescido nos últimos anos, gerando grandes quantidades de resíduos.

3.5 Aplicação do carvão ativado na imobilização de enzimas

Nos últimos anos, os carvões ativados produzidos a partir de material lignocelulósicos vêm sendo utilizados de forma eficiente como suporte para imobilização de enzimas.

Ganeshet al. (2009), sintetizaram carvão ativado utilizando como material precursor a casca de arroz e aplicaram o adsorvente produzido como suporte para imobilização de protease. Nesse estudo, o precursor de carbono foi submetido a uma pré-carbonização a 400 °C sob fluxo de CO₂, durante 4 h e em seguida foi ativado com ácido fosfórico na razão de impregnação 1:3,4 durante 1 h a 800 °C. O carvão produzido apresentou predominantemente característica microporosa, com área superficial de 291,15 m² g⁻¹. O estudo de imobilização demonstrou que em pH 6 foi obtido uma maior porcentagem de imobilização e que após incubação a 50 °C, a enzima imobilizada manteve 50% da sua atividade inicial, enquanto que a enzima livre, que foi completamente inativada. Tal resultado mostra que o uso do carvão ativado para a imobilização de protease foi satisfatório, devido ao aumento da estabilidade e da alta atividade de enzima imobilizada.

Naranjo et al. (2010) sintetizaram carvão utilizando o endocarpo do coco como material precursor de carbono. O precursor foi ativado com cloreto de zinco em uma atmosfera de nitrogênio (N₂) por 5 h, a partir da temperatura ambiente até atingir 800 °C. Depois de atingida a temperatura máxima, a atmosfera passou a ser ativante, empregando-se o CO₂ durante 1 h. O material obtido foi utilizado como suporte para a imobilização de lipase, sendo o biocatalisador aplicado na síntese de biodiesel. Os resultados mostraram uma capacidade de imobilização de 95% da lipase sob o suporte. A utilização da lipase imobilizada em carvão ativado resultou em um maior geração de biodiesel, a partir da transesterificação do óleo de palma, quando comparada com a enzima em sua forma solúvel.

Ramaniet al. (2010) produziram carvão ativado a partir da casca de arroz em um processo de duas fases: pré-carbonização seguida pela ativação química. A pré-carbonização do material precursor foi realizada a 400 °C sob fluxo de ar comprimido, seguido pela ativação química utilizando ácido fosfórico a 800 °C. O carvão foi então utilizado como suporte para a imobilização da lipase e o biocatalisador foi aplicado na hidrólise do azeite de oliva. Os estudos demonstraram uma atividade máxima de imobilização da lipase no carvão de 3570 U/g sob condições ótimas de imobilização (tempo de contato de 180 min, pH 5,0 e temperatura de 30 °C) e que a lipase imobilizada apresentou uma melhor estabilidade térmica e reutilização do que a lipase em sua forma solúvel. Os autores concluíram que carvão ativado produzido a partir da casca de arroz pode ser considerado um suporte eficiente para imobilização da lipase, uma vez que o biocatalisador obtido apresentou um grande potencial para a hidrólise do azeite.

Em estudos posteriores Ramaniet al. (2012) também sintetizaram carvão ativado a partir da casca de arroz, seguindo a mesma metodologia descrita anteriormente, e utilizaram o material como suporte para imobilização da lipase, porém empregando o biocatalisador na

hidrólise de resíduos lipídicos presentes em efluente de matadouro. O derivado obtido mostrou-se bastante estável operacionalmente, tendo-se observado que após 21 ciclos reacionais este não perdeu sua atividade.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais e reagentes

Neste trabalho foi utilizada lipase comercial de pâncreas de porco (Lipase from porcine pâncreas type II da Sigma), que possui 40% de proteína e atividade específica de 100-500 U/mg. Todos os outros reagentes utilizados na síntese dos carvões, imobilização de lipase e determinação da atividade hidrolítica foram de grau analítico.

Na síntese dos carvões ativados foi utilizado como material precursor de carbono os caroços de cajá. Os mesmos foram doados por uma indústria de polpa de frutas situada na cidade de Coarací - Ba.

4.2 Síntese dos carvões ativados

4.2.1 Preparação do material precursor

Os caroços do cajá foram lavados em água corrente e em seguida expostos ao sol durante uma semana. Posteriormente os mesmos foram triturados em moinho de facas para obtenção do material particulado e peneirados em uma peneira de 40 mesh. O farelo obtido foi utilizado na síntese dos carvões.

4.2.2 Caracterização do material precursor

O material precursor utilizado na síntese dos carvões foi caracterizado em relação ao teor de lignina, fibras e celulose segundo a metodologia descrita por Silva e Queiroz (2002). Foi determinado também o teor de cinzas de acordo com as normas do Instituto Adolfo Lutz (2004).

4.2.3 Preparação dos carvões ativados

Na síntese dos carvões ativados duas metodologias foram empregadas, com modificação do agente de ativação, razão de impregnação e temperatura de carbonização dos materiais.

4.2.3.1 Ativação química com ácido fosfórico - H_3PO_4

O resíduo foi impregnado com ácido fosfórico (85%) nas razões mássicas de impregnação de 1:1 e 1,5:1 (massa de ativante/ massa do precursor) e seco em estufa a 105 °C por 24 h. Em seguida o material foi carbonizado em forno mufla, sob fluxo de nitrogênio (50 mL.min⁻¹) com taxa de aquecimento de 5°C min⁻¹, até a temperatura final de 450 °C ou 500 °C, mantida constante por 60 minutos. Os carvões obtidos foram lavados com água à

temperatura aproximada de 60 °C até que o pH7,0 fosse alcançado. Em seguida, foram secos em estufa a 105 °C por 24 h e peneirados em uma peneira de 40 mesh.

4.2.3.2 Ativação química com hidróxido de potássio - KOH

O resíduo foi impregnado com hidróxido de potássio nas razões de impregnação 0,25:1 (50 g de ativante / 200 g de precursor) e 0,5:1 (100 g de ativante/ 200 g de precursor), em ambos os casos adicionou também 100 mL de água destilada, sem seguida o material foi seco em estufa a 105 °C por 48 h. A carbonização dos materiais foi realizada em forno mufla, sob fluxo de nitrogênio (50 mL.min⁻¹) com taxa de aquecimento de 5 °C min⁻¹, até a temperatura final de 450 °C ou 500 °C, mantida constante por 60 minutos. As amostras obtidas foram imersas em uma solução de ácido clorídrico 0,2 mol.L⁻¹ e levado à ebulição por um período de 30 min sob refluxo. Posteriormente, foram lavadas com água à temperatura aproximada de 60 °C até pH 7,0 e secas em estufa a 105 °C durante 24 h. Os carvões foram peneirados em uma peneira de 40 mesh.

De acordo com as condições de síntese, os materiais obtidos foram codificados conforme descrito na Tabela 1.

Tabela 1. Condições de preparação dos carvões ativados e codificação das amostras

Amostra	Agente ativante	Razão de impregnação	Temperatura de carbonização
CA1	H ₃ PO ₄	1:1	450 °C
CA2	H ₃ PO ₄	1:1	500 °C
CA3	H ₃ PO ₄	1,5:1	450 °C
CA4	H ₃ PO ₄	1,5:1	500 °C
CB1	KOH	0,25:1	450 °C
CB2	KOH	0,25:1	500 °C
CB3	KOH	0,5:1	450 °C
CB4	KOH	0,5:1	500 °C

4.2.4 Determinação do rendimento e caracterização dos carvões obtidos

4.2.4.1 Rendimento no processo de síntese dos carvões

O rendimento no processo de síntese dos carvões, a partir do farelo do caroço do cajá, foi calculado através da Equação 1.

$$R_c (\%) = \left(\frac{m_c}{m_p} \right) \times 100 \quad (1)$$

Em que: R_c é o rendimento de carvão (%), m_c é a massa do carvão obtido (g) e m_p é a massa do farelo do precursor (g).

4.2.4.2 Teor de cinzas dos carvões ativados

O teor de cinzas foi determinado segundo a metodologia proposta pela AOAC (1995).

4.2.4.3 Ponto de carga zero dos carvões ativados

O pH do ponto de carga zero (pH_{pcz}) é definido como o pH em que a superfície do carvão possui carga neutra. A metodologia empregada para sua determinação é denominada “experimento dos 11 pontos” (REGALBUTO & ROBLES, 2004). O procedimento consistiu em colocar 50 mg da amostra de cada carvão, em contato com 50,0 mL de soluções de cloreto de sódio $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ em diferentes valores de pH (1-11) e deixá-los sobre agitação constante durante 24 h. O pH de cada solução foi ajustado com solução de ácido clorídrico $0,50 \text{ mol L}^{-1}$ ou hidróxido de sódio $0,50 \text{ mol L}^{-1}$. Ao final de 24 h, o pH foi medido e construído o gráfico, do pH final versus o pH inicial. O pH_{PCZ} corresponde à faixa onde o pH final se mantém constante independentemente do pH inicial, ou seja a superfície comporta-se como um tampão.

4.2.4.4 Espectrofotometria de absorção no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Os grupos funcionais dos carvões ativados produzidos foram avaliados por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier. As amostras avaliadas foram lidas diretamente utilizando-se a técnica de reflectância total atenuada (ATR) na região infravermelha de $4000\text{-}500 \text{ cm}^{-1}$ em um espectrofotômetro FTIR Bruker, modelo Vertex 70 no CETENE.

4.2.4.5 Medida de Porosidade e Área Superficial Específica

As isotermas de adsorção e dessorção dos carvões ativados foram obtidas em um equipamento Micromeritics modelo ASAP 2420, utilizando aproximadamente 0,20 g de amostra. Antes das medidas, as amostras foram submetidas a uma etapa de pré-tratamento, que consistiu no aquecimento a $120 \text{ }^\circ\text{C}$. Em seguida, as amostras foram submetidas a uma evacuação a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ por 30 min, seguida de um aquecimento, com taxa de aquecimento de $10 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$, até $200 \text{ }^\circ\text{C}$, permanecendo nesta temperatura por 300 min. Posteriormente foram obtidas isotermas de adsorção e dessorção de nitrogênio a 77 K . A área superficial específica

foi determinada pela equação de BET (BRUNAUER, 1938). A distribuição de poros foi obtida a partir da isoterma de dessorção utilizando o método BJH (BARRET, 1951), enquanto que o volume dos microporos foi determinado pela análise *t-plot* a partir da isoterma de adsorção (LIPPENS, 1964).

4.3 Ensaios de imobilização da lipase

Foi avaliado o método de adsorção para a imobilização da lipase de pâncreas nos carvões ativados, utilizando como suporte um carvão ácido e um básico, selecionados de acordo com as características físicas dos mesmos. Com o intuito de determinar os melhores parâmetros para a imobilização da enzima, foi avaliado o efeito do tempo de contato, do pH do meio reacional, da temperatura de trabalho e da concentração inicial de enzima a ser imobilizada. O experimento foi realizado em triplicata.

4.3.1 Influência do tempo de contato sobre a imobilização da lipase

Para se avaliar a tempo de contato necessário para se atingir o equilíbrio de adsorção no processo de imobilização de lipase em carvão ativado, foram realizados ensaios partindo-se de uma solução com concentração inicial de proteína de 4000 mg L^{-1} , em tampão acetato de sódio ($0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 3,5). Alíquotas de 5mL da solução de lipase foram adicionados em tubos contendo 0,1 g de cada suporte. Os tubos foram mantidos sob agitação constante (20 rpm), em um agitador orbital à temperatura de 30°C . Para o controle de temperatura, utilizou-se uma estufa BOD (LogenScientific LG340FT220-RBC). A cada tempo pré-determinado (20, 60, 80, 100, 120 e 180 minutos), os tubos foram retirados e em seguida centrifugados sendo o sobrenadante filtrado, em filtro-seringa de PTFE hidrofílico, poro $0,45 \mu\text{m}$, e diâmetro de 25 mm (Analítica). A quantificação das proteínas foi realizada pelo método de Bradford (1976). O equilíbrio do processo foi atingido quando os valores da concentração da solução se mantiveram constantes com o tempo. A enzima imobilizada nos suportes em estudo, foram submetidas à secagem a vácuo a 50°C durante 48 h.

A partir da diferença entre a quantidade inicial e final de proteínas, determinou-se a capacidade adsortiva de cada um dos carvões, utilizando-se a Equação 2.

$$q = \frac{VC_{in} - VC}{m_{ads}}(2)$$

Em que: q é a capacidade adsorptiva (mg.g^{-1}), V é o volume de solução (mL), C_{in} concentração inicial da solução (mg.L^{-1}), C é a concentração da solução (mg.L^{-1}) no equilíbrio e m_{ads} é a massa do adsorvente (g).

Para avaliar o processo de imobilização, quantificou-se ainda a atividade hidrolítica da solução inicial da enzima solúvel, do sobrenadante (ao final do processo de imobilização) e da enzima imobilizada nos carvões ativados, utilizando-se o método de hidrólise da emulsão de azeite de oliva, conforme metodologia descrita no item 4.5.

4.3.2 Influência do pH no processo de imobilização

Com o intuito de avaliar a influência do pH do meio reacional no processo de imobilização de lipase nos carvões ativados, realizou-se a imobilização partindo-se de uma solução com 4000 mg L^{-1} . Os valores de pH da solução inicial de lipase avaliados foram: 3,0, 3,5, 4,0, 5,0, 6,0, 7,0 e 8,0. Foi utilizado solução tampão acetato de sódio ($0,1 \text{ mol.L}^{-1}$) para valores de pH 3,0 a 5,0 e fosfato de sódio ($0,1 \text{ mol.L}^{-1}$) para os valores de pH 6,0 a 8,0. Alíquotas de 5mL da solução de lipase, em cada pH avaliado, foram adicionados em tubos contendo aproximadamente 0,1 g de cada suporte. Os tubos foram mantidos sob agitação constante (20rpm), em um agitador orbital à temperatura de 30°C . Uma vez atingido o tempo de contato determinado na etapa anterior, os tubos foram retirados e em seguida centrifugados, sendo o sobrenadante filtrado. A quantificação das proteínas no sobrenadante e a atividade hidrolítica da solução da enzima solúvel, do sobrenadante ao final do processo de imobilização, e da enzima imobilizada seguiram a mesma metodologia descrita anteriormente.

4.3.3 Influência da temperatura no processo de imobilização

Visando avaliar o efeito da temperatura no processo de imobilização da lipase, foram realizados estudos em diferentes temperaturas (10°C , 30°C e 50°C). Partindo-se de uma solução inicial de enzima com concentração de 4000 mg L^{-1} , no pH ótimo, alíquotas de 5 mL da solução, foram adicionados em tubos contendo 0,1 g de cada suporte. Os tubos foram mantidos sob agitação constante (20 rpm), em um agitador orbital, em estufa BOD nas temperatura de estudo. Atingido o tempo de contato estabelecido, os tubos foram retirados e em seguida centrifugados, sendo o sobrenadante filtrado. A quantificação das proteínas no sobrenadante e a atividade hidrolítica da solução de enzima solúvel, do sobrenadante ao final do processo de imobilização, e da enzima imobilizada seguiram a mesma metodologia descrita anteriormente.

4.3.4 Influência da concentração inicial no processo de imobilização

Para avaliar o efeito da concentração inicial de proteína no processo de imobilização da lipase nos suportes em estudo, foram adicionados em tubos contendo 0,1 g de cada carvão, 5mL da solução de enzima com diferentes concentrações no pH ideal. As concentrações iniciais da enzima estudada foram: 2000 mg L⁻¹, 3000 mg L⁻¹, 4000 mg L⁻¹, 5000 mg L⁻¹ e 6000 mg L⁻¹. Os tubos foram mantidos sob agitação constante (20 rpm), em agitador orbital na temperatura determinada no teste anterior. Atingido o tempo de contato estabelecido, os tubos foram retirados e em seguida centrifugados, sendo o sobrenadante filtrado. A quantificação das proteínas no sobrenadante e a atividade hidrolítica da solução de enzimasolúvel, do sobrenadante ao final do processo de imobilização e da enzima imobilizada seguiram a mesma metodologia descrita anteriormente.

4.4 Estabilidade térmica da enzima imobilizada

A estabilidade térmica foi avaliada incubando-se a lipase solúvel ou imobilizada nas melhores condições determinadas (tempo, pH, temperatura e concentração) em tampão acetato de sódio 0,1 mol.L⁻¹ em pH 3,5, variando a temperatura de 10 a 50 °C durante 24 h. Para isso, 5 mL do tampão foram adicionados em tubos contendo 0,1 g da lipase solúvel ou imobilizada e mantidos sob agitação constante (20 rpm), em um agitador orbital nas temperatura de estudo durante 24 h. Decorrido o tempo de contato, os tubos foram retirados e em seguida centrifugados, sendo o sobrenadante filtrado. A quantificação das proteínas no sobrenadante foi determinada pelo método de Bradford (1976). A atividade hidrolítica da solução de sobrenadante ao final do processo de imobilização e da enzima imobilizada a mesma metodologia descrita anteriormente.

4.5 Determinação da atividade hidrolítica pelo método titulométrico

A atividade hidrolítica das enzimas solúveis e imobilizadas foi determinada pelo método de hidrólise da emulsão de azeite de oliva conforme metodologia adaptada de Soares et al. (1999). O substrato foi preparado pela emulsão de 25 g de azeite de oliva e 75 g de solução de goma arábica a 3% (m/m). Em frascos Erlenmeyer de 125 mL foram adicionados: 5mL de substrato, 5 mL de solução tampão fosfato de sódio (0,1mol.L⁻¹, pH 8,0) e adicionados 1 mL de derivado ou 0,1 mg de enzima na forma imobilizada, respectivamente. Os frascos foram incubados a 37 °C por 10 min em incubadorarotativa com agitação de 150 rpm. Após o período de incubação a reação foi paralisada pela adição de 10 mL de uma solução de etanol a 92,5% (v/v). Os ácidos graxos liberados foram titulados com solução de NaOH 30 mmol.L⁻¹, utilizando fenolftaleína como indicador, ao se trabalhar com a enzima em

sua forma solúvel, e através da titulação com NaOH 30 mmol.L⁻¹ até pH 11 ao se avaliar a enzima em sua forma imobilizada. O cálculo da atividade hidrolítica foi realizado de acordo com a Equação 3. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima que libera 1µmol de ácido graxo por minuto de reação, nas condições do ensaio (37 °C, pH 8,0 e 150 rpm). Em paralelo, foi realizado um controle empregando azeite de oliva, sem a adição de enzimas. A atividade foi expressa em µmoles.min⁻¹ (U) ou µmoles.g⁻¹min⁻¹ (U/g) para a enzima imobilizada(Equação 4) .

$$U(\mu\text{mol}/\text{min}) = \frac{(V_a - V_b) \cdot M \cdot 10^3}{t} \quad (3)$$

$$U\left(\frac{\mu\text{mol}}{\text{min}} \cdot \text{g}\right) = \frac{(V_a - V_b) \cdot M \cdot 10^3}{t \cdot m} \quad (4)$$

Em que: M é a concentração molar da solução de NaOH; m é a massa de enzima imobilizada (grama de derivado); t é o tempo de reação (min); V_a é o volume de NaOH gasto na titulação da amostra (mL) e V_b é o volume do NaOH gasto na titulação do controle (mL).

5.RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização do precursor de carbono

Os resultados da caracterização química do caroço de cajá são apresentados na Tabela 2. Como pode ser observado, o material precursor apresenta um baixo teor de cinzas, considerado como uma vantagem para a produção do carvão ativado, uma vez que esse baixo teor pode levar a um aumento da área superficial dos carvões produzidos (LI & WANG, 2008). Em relação ao conteúdo de lignina, celulose e hemicelulose, observa-se que o caroço do cajá apresenta em sua composição um maior teor de celulose. A composição do material lignocelulósico exerce influência direta no desenvolvimento da porosidade dos carvões produzidos (IOANNIDOU & ZABANIOTOU, 2007; NABAISA et al., 2013). Além disso, os percentuais desses compostos lignocelulósicos também apresentam importância relativa no que diz respeito à perda de massa do material durante o processo de carbonização, influenciando no rendimento do carvão ativado.

Tabela 2. Caracterização química do material precursor.

Material	Cinzas (%)	Lignina (%)	Celulose (%)	Hemicelulose (%)
Caroço do cajá	1,96 ± 0,01	9,47 ± 0,92	14,87 ± 2,82	8,23 ± 1,74

5.2 Rendimento e caracterização dos carvões ativados

O rendimento do carvão é uma medida importante da viabilidade da elaboração de carvão ativado a partir de um dado precursor. O efeito da temperatura de carbonização, do agente ativante e da razão de impregnação no rendimento dos carvões produzidos está apresentado na Tabela 3. Observa-se que exceto para amostras CB1 e CB2 o aumento da temperatura de ativação promoveu uma pequena redução no rendimento do adsorvente, este comportamento pode ser atribuída a grande quantidade de produtos voláteis que podem ser facilmente liberados com o aumento da temperatura, promovendo então uma maior perda de peso do precursor de carbono e conseqüentemente uma redução do produto final (OKMAN et al., 2014).

Observa-se também na Tabela 3, que a ativação com H₃PO₄ proporcionou um maior rendimento na produção dos carvões ativados, quando comparados aos ativados com KOH. A tendência observada está de acordo com resultados reportados na literatura para carvões preparados a partir de outros precursores, através da ativação com agentes ácidos e básicos, e têm sido atribuídas aos diferentes mecanismos de ação dos agentes químicos utilizados na impregnação (PRAHAS et al., 2008; NUNELL et al., 2012; LIM, SRINIVASAKANNAN

&SHOAIBI, 2015). Os agentes ácidos interferem nas fases iniciais da carbonização do precursor, que iniciam-se em temperaturas mais baixas, enquanto que os agentes básicos apenas começam a reagir depois que o precursor já tenha sido pelo menos parcialmente carbonizado a temperaturas mais elevadas (CARROTT, RIBEIRO & MOURÃO, 2006; KALDERIS et al., 2008). A ativação com H₃PO₄, especificamente, promove a formação de ligações de éster de fosfato entre cadeias dos biopolímeros lignocelulósicos, formando uma camada protetora na estrutura interna dos poros superficiais pela presença de fosfato e ésteres de polifosfato. Isto leva a formação de uma matriz rígida que impede a queima excessiva do precursor e limita a perda de matérias voláteis durante o aquecimento, resultando, assim, em um maior rendimento (BLANCO et al., 2000; FIERRO et al., 2010; LIM et al., 2010). Por outro lado, com agentes básicos, ocorre uma volatilização significativa dos compostos orgânicos formados, devido a baixa temperatura de decomposição térmica do precursor, aparentemente antes das reações químicas envolvendo o agente de ativação se tornarem termodinamicamente viável a temperaturas mais elevadas, promovendo conseqüentemente menores rendimentos (LILLO-RÓDENAS et al., 2004).

Tabela 3. Rendimento e teor de cinzas dos carvões ativados

Amostra	Rendimento (%)	Cinzas (%)
CA1	19,19	5,72 ± 0,01
CA2	17,93	7,17 ± 0,01
CA3	24,02	6,39 ± 0,01
CA4	23,72	7,14 ± 0,01
CB1	12,10	1,44 ± 0,01
CB2	12,28	1,72 ± 0,01
CB3	13,61	3,20 ± 0,01
CB4	12,51	1,79 ± 0,01

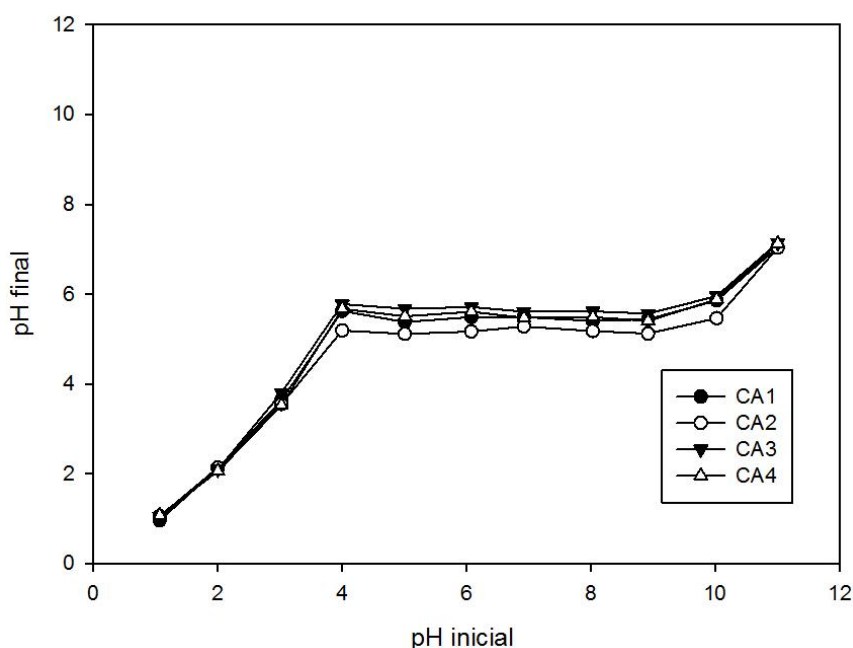
Em termos qualitativos o baixo teor de cinzas é normalmente recomendado para carvões ativados, uma vez que grandes quantidades de cinzas tendem a reduzir a adsorção por bloquear os poros da matriz carbônica e adsorver preferencialmente água, devido ao seu caráter hidrofílico (SAYGILI, GUZEL & ONAL, 2015). Os carvões ativados com ácido fosfórico apresentaram maior teor de cinzas que os adsorventes ativados com o hidróxido de potássio. Este fato pode ser atribuído à presença de fosfatos originados da reação entre o ácido fosfórico e o material precursor durante o processo de carbonização e que não foram removidos efetivamente no processo de lavagem (LIM, SRINIVASAKANNAN & SHOAIBI, 2015). É possível observar ainda que o aumento da temperatura de carbonização proveu um aumento no teor de cinzas dos carvões, exceto para as amostras CB3 e CB4. De acordo com

Ioannidou e Zabaniotou (2007), as temperaturas mais elevadas de carbonização tendem a aumentar a porcentagens de cinzas e o teor de carbono fixo, devido à diminuição da matéria volátil. Os valores de cinzas obtidos para os carvões sintetizados neste presente trabalho estão de acordo com os encontrados para carvões produzidos a partir de outros precursores (OKMAN et al., 2014; PEREIRA et al., 2014 MAHAMAD, ZAINI & ZAKARIA, 2015; DJILANI et al., 2015).

5.3 Ponto de carga zero dos carvões ativados

A determinação do pH de ponto de carga zero (pH_{pcz}) foi realizada com o objetivo de investigar a carga superficial do adsorvente. Os resultados obtidos nos ensaios do pH_{pcz} para cada carvão foram calculados fazendo-se uma média aritmética entre os pontos que se apresentaram constantes para o pH final, e estão apresentados nas Figuras 5 e 6, para os carvões ativados com H_3PO_4 e KOH respectivamente.

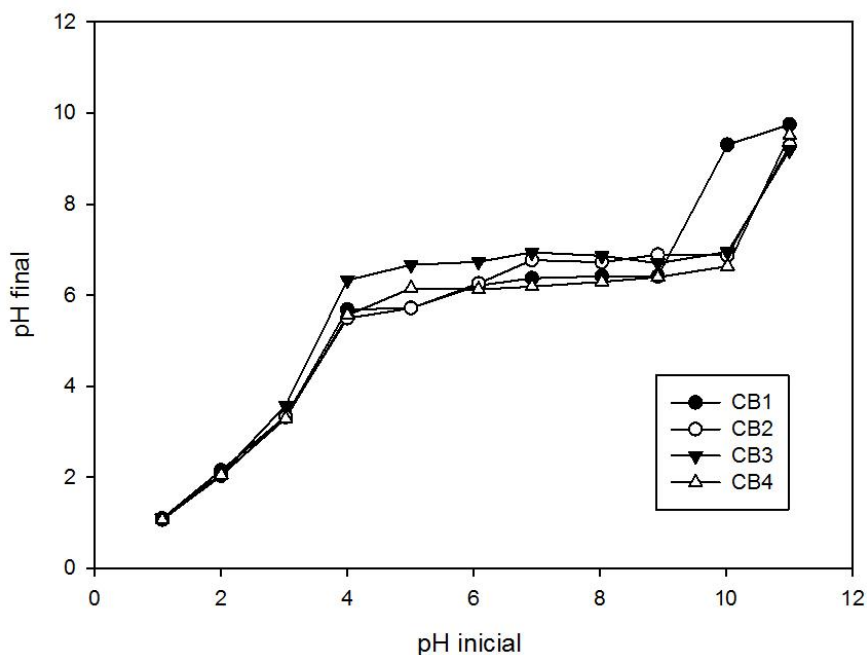
Figura 5. Valores de pH inicial e final no experimento de medida do ponto de carga os carvões ativados com ácido fosfórico.



Todos os carvões produzidos com ácido fosfórico apresentaram pH_{pcz} ácido com valores entre 5,2 e 5,7. Isto pode ser explicado pela formação de grupos ácidos na superfície de carvão como resultado do agente de ativação. Por outro lado, os carvões ativados com o hidróxido de potássio, apresentam um caráter próximo da neutralidade em sua superfície com valores de pH_{pcz} entre 6,3 e 6,7. A determinação do pH de ponto de carga zero é importante visto que o pH do sistema afeta o processo de adsorção pela dissociação de grupos funcionais sobre os sítios ativos na superfície do adsorvente. No pH_{pcz} considera-se que o material atua

como uma solução tampão. Em soluções com pH abaixo do ponto de carga zero a superfície do carvão ativado é protonada, favorecendo a adsorção de compostos com carga negativa, e conseqüentemente é desprotonada em pH acima, favorecendo o comportamento oposto (VIEIRA et al., 2010).

Figura 6. Valores de pH inicial e final no experimento de medida do ponto de carga dos carvões ativados com hidróxido de potássio.



É interessante ressaltar que as diferenças nos valores de pH_{pcz} são uma consequência das diferentes condições de preparação, confirmando que, escolhendo-se cuidadosamente as condições de síntese, é possível obter carvões ativados com diferentes níveis de acidez, a partir de um dado precursor (YUSO, RUBIO & IZQUIERDO, 2014).

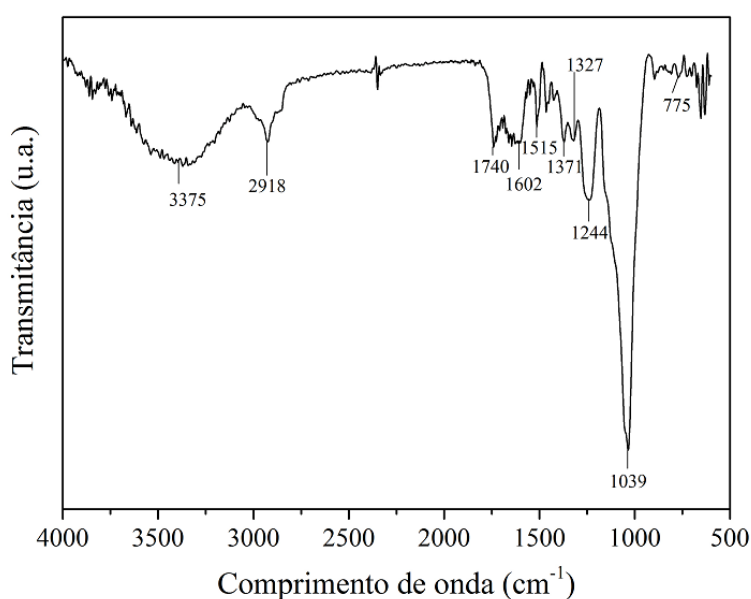
5.4 Espectrofotometria de absorção no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A análise de FTIR permite observações espectrométricas da superfície do adsorvente na faixa de $500\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$ e serve como um meio direto para a identificação de grupos funcionais orgânicos contidos na superfície. Uma análise do carvão antes e após o processo de ativação possibilita a obtenção de informações com relação à participação desses grupos funcionais no processo de ativação do material precursor (NAMASIVAYAM & KAVITHA, 2006; YAKOUT & SHARAF 2012).

Como é possível observar no espectro obtido para o material precursor (Figura 7) a banda mais intensa que aparece em 3375 cm^{-1} , pode ser atribuída como um estiramento de grupos hidroxilas em interação do tipo ligação de hidrogênio, pertencente à estrutura da

celulose, que se constitui no principal componente do nosso material lignocelulósico (Tabela 2) (SHARMA et al., 2000; ROCHA, 2005). Além desta, vale destacar a banda na região de 1039 cm^{-1} atribuída a estiramentos de ligações glicosídicas (C-O-C) presente em celulose e hemicelulose. Segundo Moretti et al. (2014) algumas bandas podem ser observadas para identificar a presença de grupos característicos dos compostos presentes em materiais lignocelulósicos, os quais são representados por bandas na região de 2918 cm^{-1} resultantes da deformação axial de ligações C-H que é característico de celulose, lignina e hemicelulose e uma banda na região de 1602 cm^{-1} , que representam estiramentos típicos de compostos aromáticos.

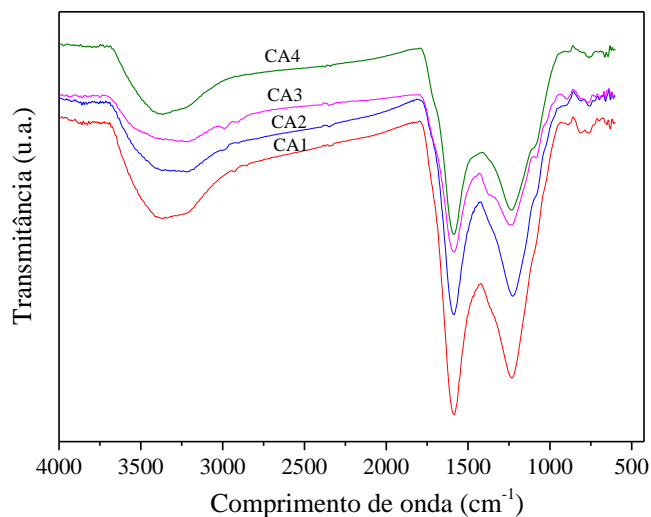
Figura 7. Espectro de FTIR do material precursor.



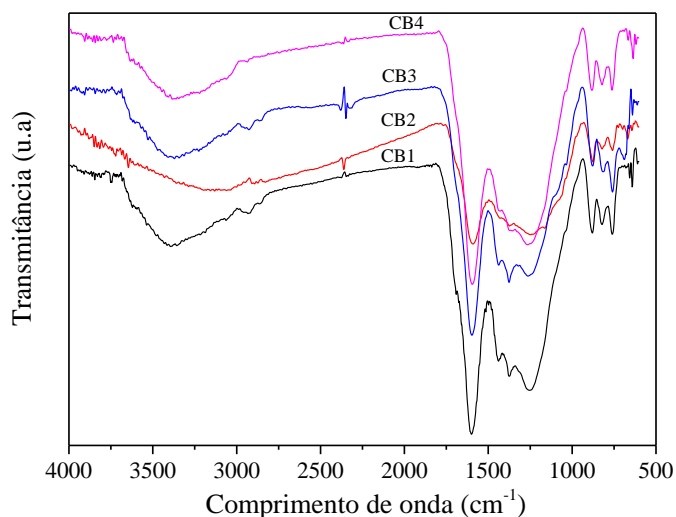
Os espectros de FTIR para as amostras de carvões ativados obtidos a partir do caroço do cajá e submetidos à ativação química com o ácido fosfórico e hidróxido de potássio, estão apresentados na Figura 8. Os espectros revelam alterações de grupos funcionais presentes no material precursor em relação aos carvões obtidos. Nota-se que algumas bandas originalmente presentes no mesmo desapareceram nos carvões ativados. É possível verificar que a presença dos grupos funcionais foram afetadas pela natureza do agente químico utilizado na impregnação. Porém, para os materiais obtidos a partir do mesmo agente de ativação, a temperatura de carbonização e razão do agente ativante não provocaram alterações significativas na química superficial dos materiais. Desta forma, escolheu-se uma amostra ativada com H_3PO_4 (CA4) e outra com KOH (CB4) para fazer a identificação das bandas observadas nos espectros (Figura 9).

A banda de absorção longa entre $3670\text{-}3200\text{ cm}^{-1}$, com o máximo em aproximadamente 3357 cm^{-1} , observada nos espectros das amostras CA4 e CB4, é característica de vibrações de estiramento do grupo OH de ácidos carboxílico e água absorvida (XU et al., 2014). Nota-se uma menor intensidade das bandas na amostra impregnada com KOH (CB4). A banda pronunciada em 1594 cm^{-1} para a amostra CA4, e com menor intensidade em 1583 cm^{-1} para a amostra CB4, pode ser atribuída a vibração de estiramento da ligação C=C na estrutura dos carvões ativados. As bandas em 1439 cm^{-1} e 1373 cm^{-1} de baixa intensidade e observada somente no carvão CB4 podem ser atribuídas a deformação angular de O-H ou estiramento (C-H) para $-\text{CH}_3$, mostrando que esse material sofreu menor modificação em relação a estrutura do precursor. As bandas em 1244 cm^{-1} (CA4) e 1230 cm^{-1} (CB4) são atribuídas a ligação C-O em fenóis, éteres aromáticos e ácidos carboxílicos e comprova o caráter mais ácido para o carvão impregnado com ácido fosfórico, pois a mesma aparece com maior intensidade na amostra CA4. As bandas em 877 cm^{-1} , 812 cm^{-1} e 758 cm^{-1} são atribuídas a estiramento C-H de compostos aromáticos (BARBOSA, 2008).

Figura 8. Espectros de FTIR dos carvões ativados com ácido fosfórico (a) e hidróxido de potássio (b).



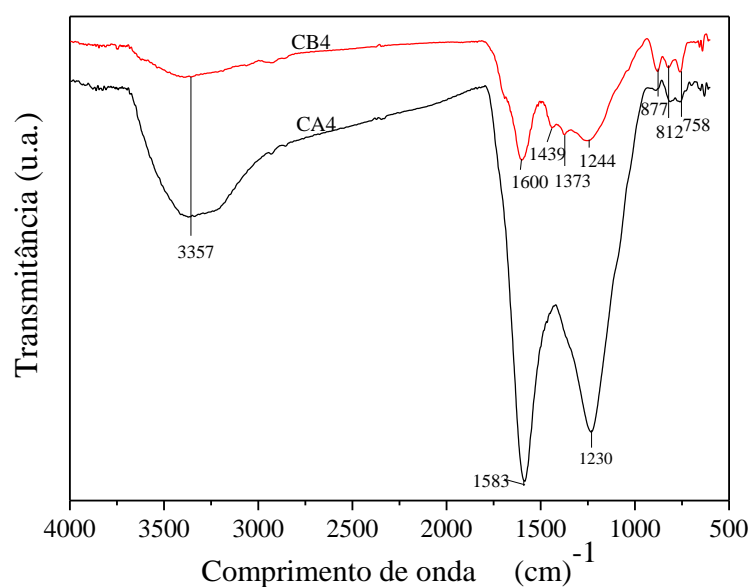
(a)



(b)

Observa-se que a impregnação com ácido fosfórico promoveu uma alteração de forma mais pronunciada na estrutura do material precursor, indicando que esse agente de ativação tem ação mais efetiva na modificação da estrutura do precursor e também na geração de grupamentos funcionais de caráter ácido.

Figura 9. Espectros de FTIR dos carvões CA4 e CB4.



5.5 Medida de Porosidade e Área Superficial Específica

A adsorção do nitrogênio a temperatura de 77 K é um procedimento padrão frequentemente utilizado para análise da área superficial e caracterização das propriedades texturais de materiais adsorventes. As isotermas de adsorção obtidas fornecem informações

qualitativas preliminares sobre o mecanismo de adsorção de nitrogênio e da estrutura porosa do carvão (SING, 1985).

Nessa análise pode-se observar, com base nas isotermas obtidas para os carvões ativados com diferentes agentes de impregnação (Figuras 10 e 11), que esses materiais apresentam diferenças em sua morfologia em função das condições de preparação a que foram submetidas. Entretanto, de acordo com a forma, e em conformidade com a classificação IUPAC (1982), todas as isotermas de adsorção/dessorção neste estudo podem ser identificadas como tipo IV. Esse tipo de isoterma reflete o fenômeno da condensação capilar, característicos de materiais mesoporosos, em que observa-se a formação de monocamada seguida a adsorção de multicamadas até inflexão e saturação da isoterma. A primeira inclinação (sob baixos valores de p/p_0) corresponde à cobertura de uma monocamada. A segunda inclinação mostra a adsorção devido à condensação capilar. Através dessa análise é possível inferir ainda que as isotermas que apresentam um ciclo de histerese mais larga a altas pressões relativas indicam que o adsorvente tem uma estrutura mista, constituída de microporos e mesoporos (LIM; SRINIVASAKANNAN & BALASUBRAMANIAN, 2010; JAIN & TRIPATHI, 2014). A confirmação de que a estrutura dos adsorventes sintetizados são constituídos na maior parte por mesoporos, assim como a diferenças texturais provenientes do efeito da temperatura de ativação, do agente químico ativante e da sua razão de impregnação, sob as características físicas dos adsorventes sintetizados são apresentadas detalhadamente na Tabela 4.

Figura 10. Isotermas de adsorção/dessorção de nitrogênio obtidas para os carvões ativados com ácido fosfórico.

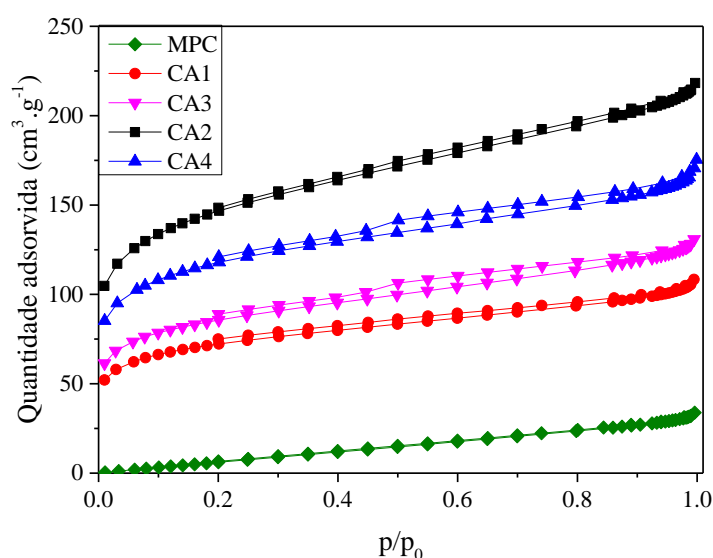
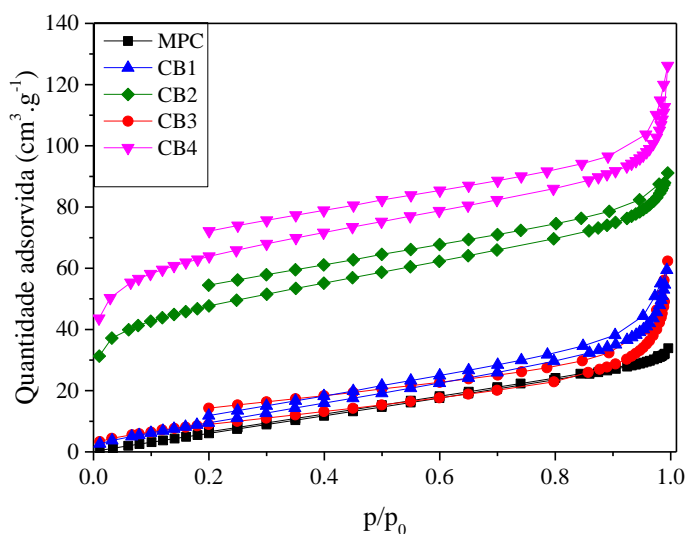


Figura 11. Isotermas de adsorção/dessorção de nitrogênio obtidas para os carvões ativados com hidróxido de potássio.



A análise dos dados apresentados mostram diferenças significativas em relação aos parâmetros texturais das amostras. Sendo que, tanto o agente químico utilizado na impregnação como a temperatura de ativação, levaram a mudanças nas mesmas. A ativação química com o ácido fosfórico levou a síntese de adsorventes com maior área superficial quando comparado aos submetidos à ativação com agente de caráter básico (KOH). As razões para as diferenças no desenvolvimento dos poros e áreas superficiais nos carvões ativados com H_3PO_4 e KOH vêm sendo analisadas por alguns autores (NUNELL et al., 2012; LACERDA et al., 2015). Tem sido proposto que o mecanismo de ativação com ácido fosfórico promove a formação de ligações de éster de fosfato entre cadeias de celulose e é considerada a principal contribuinte para o aumento do volume da estrutura de carbono, uma vez que esses vínculos são baseados na inserção de moléculas de ácido fosfórico entre as cadeias de celulose, separando-os ainda mais. Essa expansão pode ser reforçada pela formação e inserção posterior de polifosfatos na estrutura através de ligações éster, com cadeias de celulose, que por sua vez é considerado um dos principais contribuintes para o desenvolvimento de mesoporos. Resultados semelhantes aos encontrados nesse estudos foram descritos por Fiuza et al. (2015) ao utilizar o caroço do cajá como material precursor de carbono e como agentes ativantes o ácido fosfórico e o hidróxido de potássio. Esses obtiveram carvões com uma área superficial de $246 \text{ m}^2/\text{g}$ e $510 \text{ m}^2/\text{g}$ para os carvões ativados com KOH e H_3PO_4 respectivamente, ou seja aumento de cerca de 100 % da área ao se utilizar o ácido como agente ativante.

Observa-se que independente do agente químico utilizado na impregnação, o aumento da temperatura de carbonização proporcionou um aumento na área superficial dos

adsorventes. Este comportamento pode ser atribuído à aceleração da degradação térmica e consequentemente aumento na liberação dos compostos voláteis, levando o desenvolvimento dos poros e aumento a área de superfície do carvão (YAKOUT & SHARAF 2012). É possível observar também que as amostras CB1 e CB3, ambas carbonizadas a 450 apresentam área superficial semelhantes ao do material precursor, evidenciando que ao utilizar o KOH como agente ativante é indicado que a carbonização seja realizada a temperaturas superiores a essas, uma vez que vem sendo relatado que reações químicas envolvendo esse agente de ativação ocorre de forma mais acentuada em temperaturas mais elevadas (PRAHAS et al., 2008; CARROTT et al., 2006).

O diâmetro médio dos poros dos adsorventes variaram entre 3,92 nm e 4,17 nm, para os ativados com ácido fosfórico, e 4,82 nm e 7,47 nm, para os ativados com hidróxido potássio, esses valores permitem classificar todos adsorventes sintetizados como mesoporosos de acordo com IUPAC. Observa-se também que exceto as amostras CB1 e CB3, os demais carvões são caracterizados por apresentarem uma estrutura mista, constituída por microporos e mesoporos. De modo geral, os poros são os responsáveis diretos pelo aumento da área superficial de um adsorvente, e, quanto à capacidade de adsorção de determinadas substâncias, o tamanho dos poros é de fundamental importância.

Tabela 4. Propriedades texturais dos carvões ativados.

Amostra	$S_g(m^2/g)$	$D_p(nm)^a$	$V_{meso}(cm^3/g)$	$V_{Micro}(cm^3/g)$
MPC	48	5,05	0,046	-
CA1	251	4,15	0,084	0,055
CA2	511	3,92	0,180	0,104
CA3	298	4,16	0,107	0,066
CA4	409	4,17	0,133	0,094
CB1	44	6,65	0,083	-
CB2	167	4,82	0,090	0,027
CB3	37	7,47	0,078	-
CB4	222	5,28	0,108	0,045

^a Máximo da distribuição de tamanho de poro.

Esses resultados demonstram que é possível obter carvões ativados com diferentes características de área superficial e porosidade, partido do mesmo material precursor, variando-se os parâmetros de síntese. As características texturais do adsorvente são de extrema importância em um processo de adsorção, uma vez a estrutura dos poros limita as dimensões das moléculas que podem ser adsorvidas e a área superficial disponível limita a

quantidade de material que pode ser adsorvido pela matriz. Em virtude do exposto, como os adsorventes foram sintetizados com o objetivo de serem aplicados no processo de imobilização da lipase, por meio da técnica de adsorção, e essas por sua apresenta dimensão em torno de 4nm (SERRA et al., 2004), as amostras CA4 e CB4, foram selecionados como suporte para a imobilização da enzima.

5.6 Imobilização da lipase por adsorção

5.6.1 Tempo necessário para atingir o equilíbrio de imobilização

Para que o processo de imobilização fosse realizado de forma eficiente, era de fundamental importância a determinação do tempo necessário para que o sistema atinja o equilíbrio. A capacidade adsorvidos carvões ativadas está apresentada na Tabela 5. Observa-se já nos estágios iniciais uma alta capacidade adsorvida enzima para ambos os carvões, isso ocorre devido à rápida saturação dos sítios ativos (poros) do adsorvente, indicando que o equilíbrio de interação enzima suporte foi rapidamente alcançado.

Tabela 5. Avaliação do efeito do tempo na adsorção da Lipase nos carvões CA4 e CB4. Condições: pH=3,5, concentração inicial de proteína de 4000 mg.L⁻¹ e T = 30 °C.

Tempo (min)	q (mg.g ⁻¹) CA4	q (mg.g ⁻¹) CB4
20	172,44± 0,93	170,48± 1,03
60	182,79± 0,34	171,71± 0,66
80	180,06± 1,87	170,03± 0,48
100	183,89± 1,12	176,98± 1,02
120	183,39± 2,24	174,45± 1,16
180	180,55± 1,20	179,07± 0,46

A atividade hidrolítica das enzimas imobilizadas em relação ao tempo de contato com suporte está apresentada na Tabela 6. Para o carvão CA4 após 80 minutos de contato não se observou variação significativa na atividade hidrolítica da enzima imobilizada, assim como teor de proteína adsorvida. Já a enzima imobilizada no carvão CB4, após 100 minutos de contato houve aumento significativo de 191,0 U/g para 249,0 U/g com 120 minutos, não apresentado alteração significativa após esse tempo. Os diferentes comportamentos observados para os suportes podem ser atribuídos a maior área superficial e volume dos poros do suporte CA4, que favorecem a imobilização da enzima. Resultados semelhantes aos obtidos nesse estudo, também foram encontrados por Ramani et al. (2012) ao imobilizaram lipase em carvão ativado. Os autores relataram que a máxima atividade hidrolítica da enzima imobilizada foi alcançada em 90 min de contato e a mesma atividade foi mantida até 180 min.

Tabela 6. Avaliação do efeito do tempo na atividade hidrolítica da lipase imobilizada nos carvões CA4 e CB4. Condições: pH 3,5, concentração inicial de proteína de 4000 mg.L⁻¹ e T = 30 °C.

Tempo (min)	Atividade inicial da solução (U)	Atividade da enzima imobilizada no carvão CA4 (U/g)	Atividade da enzima imobilizada no carvão CB4 (U/g)
20	25,2	275,6	199,0
60	25,2	300,0	219,0
80	25,2	283,2	201,0
100	25,2	278,1	191,0
120	25,2	278,0	249,0
180	25,2	279,0	247,2

Os resultados indicam que o suporte CA4 foi mais eficiente para conduzir o processo de imobilização nas condições avaliadas, uma vez que as enzimas imobilizadas apresentaram maior atividade hidrolítica e que o equilíbrio foi alcançado em um menor tempo de contato. É interessante ressaltar que embora o equilíbrio em termos de atividade hidrolítica das enzimas imobilizadas tenha se dado em 80 min e 120 min para o amostra CA4 e CB4, respectivamente, optou-se nos estudos que se seguiram trabalhar com um tempo de contato de 180min, a fim de garantir que mesmo com mudanças no meio (pH de imobilização e temperatura) em condições de equilíbrio da interação carvão – enzima fossem mantidos.

5.6.2 Influência do pH inicial da solução no processo de imobilização

O pH determina a carga líquida da proteína. Estudando o efeito deste parâmetro sobre o processo da adsorção pode-se determinar a contribuição das interações eletrostáticas sobre a interação enzima/carvão ativado. Assim, estudou-se o processo de imobilização da lipase por adsorção em diferentes valores de pH. Observa-se na Tabela 7 que para ambos os suportes a maior atividade adquirida para valores de pH inferiores a 6,0 (meio ácido), sendo que para o carvão CA4 observa-se maior capacidade adsorptiva em pH 3,5 e em pH 4,0 para o suporte CB4. Esses resultados mostram ainda que, o carvão ativado CB4 apresentou uma maior capacidade adsorptiva que o CA4, apesar de possuir uma menor área superficial e volume dos poros, evidenciando que interações enzima-carvão foram governadas por interações eletrostáticas e hidrofóbicas. A lipase ácida possui ponto isoelétrico entre 4 e 5 (FERRER et al., 2000; MAYORDOMO, RANDEZ & PRIETO, 2000), ou seja, abaixo destes valores de pH a proteína apresenta cargas positivas e acima cargas negativas. Para o carvão CA4 observa-se que a adsorção foi mais eficiente em valores de pH abaixo do pI da proteína e também abaixo do pH_{pz} do carvão, o que demonstrar que nesse caso interações hidrofóbicas

governaram o processo adsorptivo. Os menores valores de capacidade adsorptiva alcançados em relação ao CB4 podem estar relacionados aos efeitos repulsivos entre as cargas superficiais e da enzima, pois o pI da enzima e pH_{pzc} são próximos. Para o CB4 tem-se melhores valores de eficiência e capacidade em valores de pH onde a superfície do carvão encontra-se carregada positivamente e a enzima negativamente ou com carga neutra (no pI).

O pH é um dos mais importantes parâmetros da atividade enzimática, pois a concentração de hidrogênio no meio pode afetar a estrutura quaternária da enzima e o grau de ionização de substratos, produtos e de resíduos que fazem parte do sítio ativo. O efeito desse parâmetro na atividade hidrolítica da enzima em sua forma solúvel, assim como em sua forma imobilizada em diferentes suportes, estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 7. Estudo do efeito do pH na adsorção da Lipase nos carvões ativados. Condições concentração inicial de proteína de 4000 mg.L^{-1} e $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$, tempo de contato 180 min.

pH	q (mg.g^{-1}) CA4	q (mg.g^{-1}) CB4
3,0	168,74± 0,37	178,67± 1,29
3,5	180,55± 1,20	179,07± 0,46
4,0	169,25± 0,33	186,62± 0,83
5,0	153,85± 0,72	184,05± 0,10
6,0	151,95± 0,32	166,72± 2,60
7,0	154,44± 2,41	161,00± 0,36
8,0	168,74± 0,82	163,16± 1,20

Tabela 8. Avaliação do efeito do pH na atividade hidrolítica da lipase imobilizada nos carvões CA4 e CB4. Condições: pH 3,5, concentração inicial de proteína de 4000 mg.L^{-1} e $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$ e tempo de contato 180 min.

pH	Atividade inicial da solução (U)	Atividade da enzima imobilizada no carvão CA4 (U/g)	Atividade da enzima imobilizada no carvão CAB (U/g)
3,0	19,1	281,4	228,0
3,5	25,2	278,4	246,0
4,0	17,7	265,1	231,0
5,0	33,9	219,7	270,0
6,0	32,1	175,5	233,0
7,0	20,1	181,5	14,70
8,0	24,3	281,4	89,0

Observa-se que em pH 5,0 a enzima em sua forma livre apresenta máxima atividade hidrolítica, esse comportamento foi mantido para a enzima imobilizada no suporte CB4. Já a enzima imobilizada no carvão CA4, apresentou uma elevada atividade hidrolítica tanto em meio ácido (pH 3,0 e 3,5) quanto em meio básico, especificamente em pH 8, apesar da capacidade adsorptiva para esse valor de pH ter sido a menor. Esse resultado evidencia que a imobilização no suporte CA4 ofereceu uma certa proteção à enzima, quando o meio reacional apresentou pH diferente do ótimo da enzima em sua forma livre, possibilitando assim sua aplicação em uma maior faixa de pH. Esses resultados indicam ainda a ocorrência de possíveis mudanças conformacionais na estrutura da enzima ou alterações de concentração entre as espécies carregadas, substrato, produto, íons hidrogênio, íons hidroxilas, tanto no microambiente da enzima imobilizada quanto no meio reacional. Alterações no pH ótimo de lipases após a imobilização também foram verificadas por outros pesquisadores (PEREZ et., 2007; ARIELA et al., 2008).

5.6.3 Influência temperatura no processo de imobilização

O efeito da temperatura sobre a capacidade de imobilização da enzima nos dois suportes está apresentado na Tabela 9. Como é possível avaliar, a elevação da temperatura promoveu um aumento na capacidade adsorptiva do suporte CB4, atingindo máxima capacidade ($194,83 \text{ mg.g}^{-1}$) na temperatura de $50 \text{ }^\circ\text{C}$. Já no suporte CA4 a capacidade de imobilização foi elevada com a temperatura de $10 \text{ }^\circ\text{C}$ a $40 \text{ }^\circ\text{C}$ apresentando diminuição em temperaturas superiores a essa. Sabe-se que o aumento na temperatura imprime maior energia cinética às moléculas de lipase, ocasionando um maior número de colisões produtivas por unidade de tempo, que são necessárias para promover a difusão na superfície dos poros, conduzindo a um aumento da capacidade de imobilização. No entanto, temperaturas mais elevadas, tendem a promover a desnaturação da enzima, diminuindo assim a capacidade de ligação enzima-suporte (KHOABI et al., 2014). A maior adsorção com aumento da temperatura sugere ainda um processo endotérmico e entropicamente dirigido. Este comportamento pode ter influenciado em alterações na configuração da enzima, a ponto de reduzir a atividade da enzima imobilizada, como pode ser observado na Tabela 10.

Tabela 9. Estudo do efeito da temperatura na adsorção da Lipase nos carvões. Condições: concentração inicial de proteína de 4000 mg.L⁻¹, tempo de contato 180 min e pH 3,5 e 5,0 para os amostra CA4 e CB4 respectivamente.

Temperatura	q (mg.g ⁻¹) CA4	q (mg.g ⁻¹)CB4
10	165,04± 1,18	160,26± 1,75
20	171,23± 1,34	172,35± 0,75
30	180,55± 1,20	184,05± 0,10
40	191,01± 0,20	193,3± 1,18
50	188,72± 1,21	194,83± 1,47

Ao analisar os resultados obtidos para a atividade hidrolítica da enzima imobilizada, observa-se que o aumento da temperatura promoveu uma redução da mesma, sendo observada uma maior atividade na temperatura de 10°C para ambos suportes, apesar do teor de proteína adsorvida ter sido favorecido com o incremento da temperatura. Dessa forma, torna-se possível inferir que algumas moléculas das enzimas imobilizadas estejam com orientações desfavoráveis, ou até mesmo desnaturadas na superfície do suporte devido às modificações conformacionais durante o processo de imobilização. Essas peculiaridades implicam em menor retenção de atividade enzimática, mesmo que os sistemas imobilizados apresentem alta carga de enzima imobilizada, em temperaturas mais elevadas. Para a realização dos demais testes, optou-se por trabalhar com a temperatura de 30°C, por sua facilidade de controle em relação demais temperaturas.

Tabela 10. Avaliação do efeito temperatura na atividade hidrolítica da lipase imobilizada nos carvões CA4 e CB4. Condições: concentração inicial de proteína de 4000 mg.L⁻¹ e pH 3,5 e 5,0 para os amostra CA4 e CB4 respectivamente.

Temperatura °C	Atividade inicial da solução (U)	Atividade da enzima	
		imobilizada no carvão CA4 (U/g)	imobilizada no carvão CB4 (U/g)
10	25,2	298,5	303,1
20	25,2	295,5	257,8
30	25,2	278,4	270,0
40	25,2	258,0	232,1
50	25,2	267,3	230,1

5.6.4 Influência concentração inicial da proteína no processo de imobilização

Para avaliar o efeito da concentração inicial da enzima no processo de imobilização da

lipase por adsorção, diferentes concentrações iniciais foram avaliadas. Os resultados desse estudo estão apresentados Tabela 11. Como é possível observar o aumento da concentração de enzima promoveu um aumento na capacidade adsortiva de ambos os carvões.

Tabela 11. Estudo do efeito da concentração inicial de proteína na adsorção da Lipase nos carvões, na temperatura de 30 °C, tempo de 180 min e pH 3,5 e 5,0 para as amostra CA4 e CB4 respectivamente.

Concentração	q (mg.g ⁻¹) CA4	q (mg.g ⁻¹)CB4
2000	94,68± 0,53	98,23± 0,18
3000	135,76± 1,00	147,16± 0,70
4000	180,55± 1,20	184,05± 0,10
5000	215,92± 0,49	244,41± 1,68
6000	260,30± 1,27	293,29± 1,47

Para a atividade da hidrolítica da enzima imobilizada observa-se que atividade máxima é encontrada para relações intermediárias de concentração, ou seja, com a concentração de 4000mg.L⁻¹, para ambos os carvões, como pode ser observado na Tabela 12.

Tabela 12. Avaliação do efeito da concentração inicial de proteína na atividade hidrolítica da lipase imobilizada nos carvões CA4 e CB4. Condições: temperatura de 30 °C, pH 3,5 e 5,0 para as amostra CA4 e CB4 respectivamente, tempo de 180 min.

Concentração (mg.L ⁻¹)	Atividade inicial da solução (U)	Atividade da enzima imobilizada no carvão CA4 (U/g)	Atividade da enzima imobilizada no carvão CB4 (U/g)
2000	16,4	228,7	98,0
3000	19,7	235,5	90,0
4000	25,2	278,4	270,0
5000	21,1	252,1	146,0
6000	22,9	255,0	130,9

O comportamento apresentando com a variação da carga enzimática pode ser explicado pela análise das interações entre a enzima e o suporte. A imobilização de lipases em suportes hidrofóbicos pode causar ativação da enzima e esta ativação depende da relação proteína/suporte utilizada no processo de imobilização. Quando há uma baixa relação proteína/suporte, pode haver ainda alguns sítios de adsorção disponíveis e alguma ativação pode ser observada, mas esta situação não é a ideal, pois as forças atrativas entre os sítios de

adsorção de proteínas que ainda estão livres podem distorcer a conformação estrutural da enzima. Por outro lado, o aumento da carga permite que um maior número de interação proteína-proteína sejam formadas. O aumento da carga enzimática leva a limitações difusionais, uma barreira de difusão de produto e substrato, e impedimento estérico, o qual pode explicar a baixa atividade hidrolítica em altas concentrações (PALOMO et al., 2003; SILVA et al., 2012). Dessa forma, como observado nos resultados, a atividade máxima é encontrada para relações intermediárias, quando um ambiente que maximiza a eficiência catalítica da enzima é formado.

5.7 Estabilidade térmica da enzima imobilizada

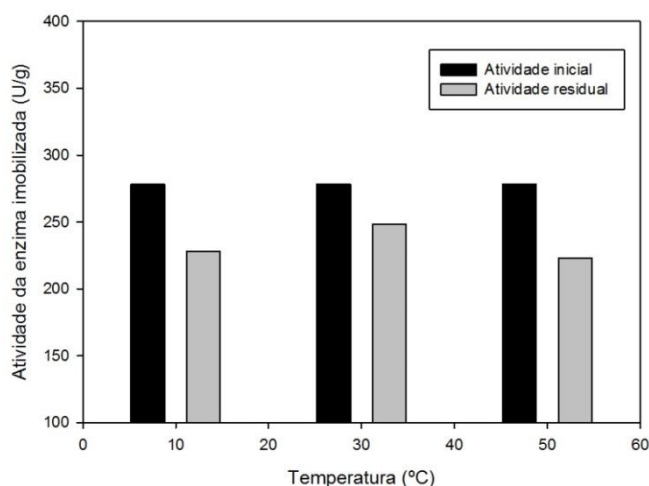
O efeito da temperatura e do tempo sobre a estabilidade e ação das enzimas imobilizadas é de grande importância para aplicação destes biocatalizadores em escala industrial. Para a avaliação da estabilidade térmica, a lipase foi imobilizada adotando as mesmas condições de imobilização para ambos os suportes (pH 3,5, temperatura 30°C, concentração 4000 mg.L⁻¹, tempo 180 minutos). As enzimas imobilizadas foram incubadas em tampão acetato de sódio (0,1 mol.L⁻¹, pH 3,5), em diferentes temperaturas.

Nota-se, que para as enzimas imobilizadas no suporte CA4 (Tabela 13 e Figura 12), independente da temperatura de incubação, a imobilização garantiu alta estabilidade térmica, chegando a 89,11% na temperatura de 30 °C. Esse resultado evidencia que as interações envolvidas no processo de imobilização foram suficientes para manter a enzima em atividade, sem sofrer grandes perdas na atividade catalítica durante o período de incubação.

Tabela 13. Estabilidade térmica da enzima imobilizada no suporte CA4. Concentração inicial de proteína de 4000 mg.L⁻¹ e pH 3,5, temperatura 30 °C.

Temperatura (°C)	Atividade (U/g) inicial carvão CA4	Atividade (U/g) residual carvão CA4	Eficiência de imobilização (%)
10	278,4	228,2	81,96
30	278,4	248,1	89,11
50	278,4	222,7	79,99

Figura 12. Estabilidade térmica da enzima imobilizada no suporte CA4.

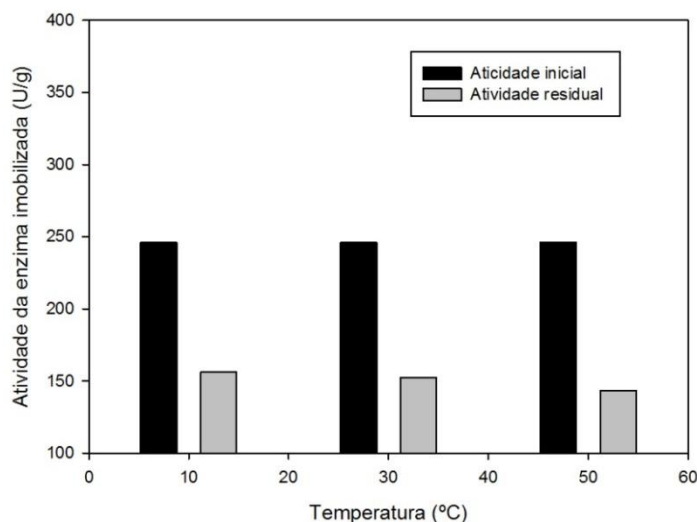


Para as enzimas imobilizadas no suporte CB4 (Tabela 14 e Figura 13) observa-se uma redução na atividade residual com o aumento da temperatura. Tanto a enzima pode ter sofrido mudanças em sua estrutura por influencia direta da temperatura como ela pode ter sido retorcida por uma mudança na estrutura do suporte, levando a uma perda de atividade.

Tabela 14. Estabilidade térmica da enzima imobilizada no suporte CB4. Concentração inicial de proteína de 4000 mg.L⁻¹ e pH 3,5.

Temperatura (°C)	Atividade (U/g) inicial carvão CB4	Atividade (U/g) residual carvão CB4	Eficiência (%)
10	246,0	156,3	63,53
30	246,0	152,1	61,82
50	246,0	143,5	58,33

Figura 13. Estabilidade térmica da enzima imobilizada no suporte CB4.



Os resultados da estabilidade térmica demonstraram que as enzimas imobilizadas no carvão CA4 apresentaram maior atividade residual em temperaturas mais elevadas se comparado com as imobilizadas na amostra CB4.

6. CONCLUSÕES

O caroço do cajá apresentou grande potencial para ser utilizado como material precursor de carbono na produção de carvão ativado. As condições de síntese exerceram influência direta nas características físicas e químicas dos adsorventes obtidos.

A ativação com ácido fosfórico conduziu a rendimentos mais elevados, proporcionou uma ação mais efetiva na superfície dos carvões e favoreceu o desenvolvimento de uma maior área superficial e maior volume médio dos poros dos adsorventes, quando comparados com os carvões ativados com hidróxido de potássio. Este comportamento indica que este agente de ativação teve ação mais efetiva na modificação da estrutura do precursor.

As diferenças nas características físicas e químicas do adsorvente exerceram influência na capacidade adsorptiva e eficiência de adsorção dos carvões ativados no processo de imobilização da lipase, assim como na atividade hidrolítica da enzima imobilizada.

Os estudos de imobilização mostram que para as enzimas imobilizadas no suporte CA4, o sistema atingiu equilíbrio em curto tempo de contato e apresentaram atividade hidrolítica em uma ampla faixa de pH. O teste de estabilidade demonstrou que o suporte apresenta eficiência na manutenção da atividade da enzima imobilizada, com a variação da temperatura.

Na imobilização com o suporte CB4, o equilíbrio foi alcançado em um tempo de contato enzima/suporte em 120 minutos. A melhor resposta de atividade enzimática foi encontrada no pH 5,0 e a máxima atividade hidrolítica da enzima imobilizada foi 270,0 U/g nas melhores condições de imobilização. A atividade residual da enzima imobilizada diminuiu com o aumento da temperatura de incubação, apresentando uma redução de aproximadamente 40 % na atividade da enzima após 24 horas.

Os resultados demonstram que adsorventes obtidos a partir do caroço de cajá, possuem potencial para serem empregados no processo de imobilização da lipase, tendo em vista que enzimas imobilizadas mostraram boa atividade enzimática, podendo os mesmos serem considerados como biocatalisadores promissores para aplicações biotecnológicas e industriais.

7. REFERÊNCIAS

AOAC (Association of Official Analytical Chemistry). **Official methods of analysis**. 16.ed. Arlington: AOAC International, 1995.

ANGKAWIDJAJA, C.; KANAYA, S. Family I.3 lipase: bacterial lipases secreted by the type I secretion system. **Cell. Mol. Life Sci.** v. 63, p. 2804–2817. 2006.

ARIELA, V.P.; MOREIRA, A.B.R.; BRAGA, L.P.; CASTRO, H.F.; BRUNO, LAURA M. Comparative performance of *Candida rugosa* lipase immobilized on polysiloxane polyvinyl alcohol hybrid support using different methodologies. **Quím. Nova**, v.31, 2008.

BAJAJ, A.; LOHAN, P; JHA, P.N.; MEHROTRA, R. Biodiesel production through lipase catalyzed transesterification: an overview. **Journal of Molecular Catalysis B Enzymatic**, v. 62, n. 1, p. 9-14, 2010.

BARBOSA, L. C. A. **Espectroscopia no Infravermelho na caracterização de compostos orgânicos**. Viçosa: Editora UFV, 189 p., 2008.

BARRET, E. P., JOYNER, L. G., HALENDA, P. P., The determination of pore volume and area distributions in porous substances. I. Computations from nitrogen isotherms, **Journal of The American Chemical Society**, v.73, 373-380, 1951.

BOSCO, J. et al. **A cultura da cajazeira**. João Pessoa: EMEPA, 2000. 29p.

BRADFORD, M. M. A. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRADY, D.; JORDAAN, J. Advances in enzyme immobilisation. **Biotechnology Letters**, v. 31, n. 11, p. 1639-1650, 2009.

BRUNAUER, S., EMMET, P. H., TELLER, E., Adsorption of Gases in multimolecular layers, **Journal of The American Chemical Society**, v.60, 309-319, 1938.

CAGNON, B.; PY, X.; GUILLOT, A.; STOECKLI, F.; CHAMBAT, G. Contributions of hemi-cellulose, cellulose and lignin to the mass and the porous properties of chars and steam activated carbons from various lignocellulosic precursors. **Bioresour Technol**, v.100, p.292–298, 2009.

CAMMAROTA, M.C.; FREIRE, D.M.G. A review on hydrolytic enzymes in the treatment of wastewater with high oil and grease content. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 2195-2210, 2006.

CARROTT, P.J.M.; RIBEIRO, C.M.M.L.; MOURAO, P.A.M. Pore size control in activated carbons obtained by pyrolysis under different conditions of chemically impregnated cork. **J Anal Appl Pyrol**, v.75, p.120-7, 2006.

CARVALHO, A.V.; CAVALCANTE, M.A.; SANTANA, C.L.; ALVES, R.M. Características físicas, químicas e atividade antioxidante de frutos de matrizes de cajazeira no estado do Pará. **Alim. Nutr.**, v. 22, p. 45-53, 2011.

- CASTRO, H.F.; MENDES, A.A; SANTOS, J.C.; AGUIAR, C.L. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. **Química Nova**, v. 27, n. 1, p. 146-156, 2004.
- CASTRO-OCHOA, L.D.; RODRIGUEZ-GÓMEZ, C.; VALERIO-ALFARO, G.; ROS, R.O. Screening, purification and characterization of the thermoalkalophilic lipase produced by *Bacillus thermoleovorans* CCR11. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, p. 648-654, 2005.
- CAVALCANTE¹, L.F.; LIMA, E.M.; FREIRE, J.L.O.; PEREIRA, W.E.; COSTA, A.P.M.; CAVALCANTE, Í.H.L. Componentes qualitativos do cajá em sete municípios do brejo Paraibano. **Frutas nativas**, v. 31, n. 4, p. 627-632, 2009.
- CHANG, S.F.; CHANG, S.W.; YEN, Y.H; SHIEH, C.J. Optimum immobilization of *Candida rugosa* lipase on celite by RSM. **Applied Clay Science**, v.37, p.67-73, 2007.
- CONTESINIA, F.J.; LOPESA, D.B.; MACEDO, G.A.; NASCIMENTO, M.G.; CARVALHO, P.O. *Aspergillus* sp. lipase: Potential biocatalyst for industrial use. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.67, p.163–171, 2010.
- DAFFALLA, S.B.; MUKHTAR, H.; SHAHARUN, M.S. Properties of activated carbon prepared from rice husk with chemical activation. **Int J Glob Environ Issues**, v.12, p.107–29, 2012.
- DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. G.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, v.27, p.623-630, 2004.
- DENG, H., ZHANG, G., XU, X., TAO, G., DAI, J. Optimization of preparation of activated carbon from cotton stalk by microwave assisted phosphoric acid-chemical activation. **J. Hazard. Mater**, v.182, p.217–224, 2010.
- DJILANI, C.; ZAGHDOUDI, R.; DJAZI, F.; BOUCHEKIMA, B.; LALLAM, A.; MODARRESSI, A.; ROGALSKI, M. Adsorption of dyes on activated carbon prepared from apricot stones and commercial activated carbon. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v.53, p.112–121, 2015.
- DOMÍNGUEZ, A.; MENÉNDEZ, J. A.; FENÁNDEZ, Y.; PIS, J. J.; NABAIS, J. M. V.; CARROTT, P. J.; CARROTT, M. M. L. R. Conventional and microwave induced pyrolysis of coffee hulls for the production of a hydrogen rich fuel gas. **J. Anal. Appl. Pyrolysis**, v.79, p.128–135, 2007.
- ERICSSON, D.J; KASRAYAN, A; JOHANSSON, P. X-ray structure of *Candida Antarctica* lipase A shows a novel lid structure and a likely mode of interfacial activation. **Journal of Molecular Biology**, v. 376, p. 109-119, 2008.
- FERRER, M.; PLOU, F. J.; NUERO, O. M.; REYES, F.; BALLESTEROS, A.; Purification and properties of a lipase from *Penicillium chrysogenum* isolated from industrial wastes. **J. Chem. Technol. Biotechnol.** v.75, 569-576, 2000.
- FIERRO, V.; MUNIZ, G.; BASTA, A.H.; EL-SAIED, H.; CELZARD, A. Rice straw as precursor of activated carbons: activation with orthophosphoric acid. **J Hazard Mater**, v.181, p, 27-34, 2010.

- FIUZA, R.A. J.; NETO, R.M.J.; CORREIA, L.B.; ANDRADE, H.M.C. Preparation of granular activated carbons from yellow mombin fruit stones for CO₂ adsorption. **Journal of Environmental Management**, v.161, p.198-205, 2015.
- GANESH, A.; KUMAR, S.; SWARNALATHA, P.; KAMATCHI, G.; SEKARAN. Immobilization of high catalytic acid protease on functionalized mesoporous activated carbon particles. **Biochemical Engineering Journal**, v.43, p. 185-190, 2009.
- GHATTASA, N.; FILICEB, M.; ABIDIA, F.; GUISANB, J.M.; SALAH, A.B. Purification and improvement of the functional properties of Rhizopusoryzae lipase using immobilization techniques. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.110, p.111–116, 2014.
- GIRALDO, L.; MORENO-PIRAJÁN, J.C. Lipase supported on mesoporous materials as a catalyst in the synthesis of biodiesel from Persea americana mill oil. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.77, p.32– 38, 2012.
- GIRELLI, A.M.; MATTEI, E. Application of immobilized enzyme reactor in on-line high performance liquid chromatography: A review. **Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v.819, p.3-16, 2005.
- GUO, S.; PENG, J.; LI, W.; YANG, K.; ZHANG, L.; ZHANG, S. Effects of CO₂ activation on porous structures of coconut shell-based activated carbons. **Appl Surf Sci**, v.255, p.8443–8449, 2009.
- GUPTA, R.; GUPTA, N.; RATHI, P. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 64, p.763–781, 2004.
- GUPTA, S.; BHATTACHARYA, A.; MURTHY, C.N. Tune to immobilize lipases on polymer membranes: Techniques, factors and prospects. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v.2, p.171–190, 2013.
- HANEFELD, U.; GARDOSI, L.; MAGNER, E. Understanding enzyme immobilization. **Chem. Soc. Rev.**, p. 38, p. 453–468, 2009.
- HASAN, F.; SHAH, A.A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 235-251, 2006.
- HESASA, R.H.; ARAMI-NIYAA, A.; DAUDA, W.M.A.; WAN,.; SAHU, J.N. Preparation of granular activated carbon from oil palm shell by microwave-induced chemical activation: Optimisation using surface response methodology. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 91, p. 2447–2456, 2013.
- HORIKAWA, T.; KITAKAZE, Y.; SEKIDA, T.; HAYASHI, J.; KATOH, M. Characteristics and humidity control capacity of activated carbon from bamboo. **Bioresource Technology** v.101, p.3964–3969, 2010.
- HU, Q.; LU, Y.; MEISNER, G.P. Preparation of nanoporous carbon particles and their cryogenic hydrogen storage capacities. **J Phys Chem C**, v.12, p.1516-1523, 2008.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4^a edição. São Paulo, 2004.

IOANNIDOU, O.; ZABANIOTOU, A. Agricultural residues as precursors for activated carbon production – A Review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.11, p.1966–2005, 2007.

ITTRAT, P.; CHACHO, T.; PHOLPRAYOON, J.; SUTTIWARAYANON, N.; CHAROENPANICH, J. Application of agriculture waste as a support for lipase immobilization. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v.3, p.77–82, 2014.

IUPAC: União Internacional de Química Pura e Aplicada. **Reporting Physicochemical Data for Gases/Solid Systems**. v.54, p. 2201-2218, 1982.

JAEGER, K. E.; EGGERT, T. Lipases for biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, p. 390-397, 2002.

JAIN, A.; TRIPATHI, S.K. Fabrication and characterization of energy storing supercapacitor devices using coconut shell based activated charcoal electrode. **Materials Science and Engineering B**, v.183, p.54–60, 2014.

JEGANATHAN, J.; BASSI, A.; NAKHLA, G. Pre-treatment of high oil and grease pet food industrial wastewaters using immobilized lipase hydrolyzation. **Journal of Hazardous Materials B**, v.137, p.121–128, 2006.

JUNG, W.M.; AHN, H.K.; LEE, Y.; KIM, P.K.; RHEE, S.J.; PARK, T.J.; PAENG, J.K. Adsorption characteristics of phenol and chlorophenols on granular activated carbons (GAC). **Microchemical Journal** 70, 123-131, 2001.

KALDERIS, D., BETHANIS, S., PARASKEVA, P., DIAMADOPOULOS, E. Production of activated carbon from bagasse and rice husk by a single-stage chemical activation method at low retention times. **Bioresour. Technol.**, v. 99, p.6809-6816, 2008.

KALUDJEROVIC, V.; JOVANOVIC, V.M.; STEVANOVIC, S.I.; BOGDANOV, Z.D. Characterization of nanoporous carbon fibrous materials obtained by chemical activation of plane tree seed under ultrasonic irradiation. **Ultrason. Sonochem.**, v.21, p.782–789, 2014.

KANDASAMYA, R.; KENNEDY, L.J.; VIDYAA, C.; BOOPATHYA, R.; SEKARANA, G. Immobilization of acidic lipase derived from *Pseudomonas gessardii* onto mesoporous activated carbon for the hydrolysis of olive oil. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.62, p.59–66, 2010.

KANG, Y.; HE, J.; GUO, X.; GUO, X.; SONG, Z. Influence of pore diameters on the immobilization of lipase in SBA-15. **Ind. Eng. Chem. Res.**, v. 46, p.4474–4479, 2007.

KAPOOR, M.; GUPTA, M. N. Lipase promiscuity and its biochemical applications. **Process Biochemistry**, v. 47, p. 555–569, 2012.

KARRA-CHAABOUNIA, M.; BOUAZIZ, I.; BOUFIB, S.; REGOC, A.M.B.; GARGOURI, Y. Physical immobilization of *Rhizopusoryzae* lipase onto cellulose substrate: Activity and stability studies. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.66, p.168–177, 2008.

KATO, K.; NAKAGAKI, S.; NISHIDA, M.; HIRAO, K. Enzyme encapsulation in silica particles prepared using enzyme-assisted sol–gel reactions in ionic liquids.**J. Ceram. Soc.**, v.119, p.140, 2011.

KAZLAUSKAS, R.J. Enhancing catalytic promiscuity for biocatalysis.**Curr.Op. Chem. Biol.** 9, 195-201, 2005.

KETCHA, J.M; DINA, D.J.D.; NGOMO, H.M. Preparation and characterization of activated carbons obtained from maize cobs by zinc chloride activation.**AmChemSci J.**, v.4, p.1360, 2012.

KHARRATA, N.; ALI, Y.B.; MARZOUKB, S.; GARGOURIA,Y.T.; KARRA-CHAABOUNI, M. Immobilization of *Rhizopusoryzae* lipase on silica aerogels by adsorption: Comparison with the free enzyme. **Process Biochemistry**, v.46, p.1083–1089, 2011.

KHOABI, M. MOTEVALIZADEH, S.F.; ASADGOL, Z.; FOROOTANFAR, H.; SHAFIEE, A.; FARAMARZI, M.A. Synthesis of functionalized polyethylenimine-grafted mesoporous silica spheres and the effect of side arms on lipase immobilization and application. **Biochemical Engineering Journal**, v.88, p.131–141, 2014.

KUMAR S., MATHUR A., SINGH V., NANDY S., KHARE S. K. NEGI S. Bioremediation of waste cooking oil using a novel lipase produced by *Penicilliumchrysogenum*SNP5 grown in solid medium containing waste grease. **Bioresource Technology**, v.120, p.300–304, 2012.

LACERDA, S.V.; JUAN, B.L.S.;GUIMARAES, A.C.; NAVARRO, S.H.;, MERCEDES, S.B.; GRACIA, L.M.N.; RAMOS, R.M.; GIL, J.M. Rhodamine B removal with activated carbons obtained from lignocellulosic waste. **Journal of Environmental Management**, v.155, p. 67-76, 2015.

LEAL, M. C. M. R; FREIRE, D. M. G.; CAMAROTTA, M. C.; SANT'ANNA JR, G. L. Effect of enzymatic hydrolysis on anaerobic treatment of dairy wastewater. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 1173-1178, 2006.

LI, T., & WANG, T. Preparation of silica aerogel from rice hull ash by drying at atmospheric pressure.**Materials Chemistry and Physics**, v.112, p.398-401, 2008.

LILLO-RÓDENAS, M.A.; JUAN-JUAN, J.; CAZORLA-AMORÓS, D.; LINARES-SOLANO, A.About reactions occurring during chemical activation with hydroxides.**Carbon**, v.42, p.1371-1375, 2004.

LIM, W.C.; SRINIVASAKANNAN, C.; BALASUBRAMANIAN, N. Activation of palm shells by phosphoric acid impregnation for high yielding activated carbon. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 88, p.181–186, 2010.

LIM, W.C.; SRINIVASAKANNAN, C.; SHOAIBI, A.A. Cleaner production of porous carbon from palm shells through recovery and reuse of phosphoric acid.**Journal of Cleaner Production**, v.102, p.501-511, 2015.

LIPPENS, B. C., LINSEN, B. G., BÔER, J. H., Studies on pore systems in catalysts I. The adsorption of nitrogen; apparatus and calculation, **Journal of Catalysis**, v.3, 32-37, 1964.

LIU, L., LIN, Y., LIU, Y., ZHU, H., HE, Q. Removal of methylene blue from aqueous solutions by sewage sludge based granular activated carbon: adsorption equilibrium, kinetics, and thermodynamics. *J. Chem. Eng. Data*, v.58, p.2248–2253, 2013.

MAHAMAD, M.N.; ZAINI, M.A.A.; ZAKARIA, Z.A. Preparation and characterization of activated carbon from pineapple waste biomass for dye removal. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.102, p.274-280, 2015.

MARCHETTI, J. M.; MIGUEL, V. U.; ERRAZU, A. F. Heterogeneous esterification of oil with high amount of free fatty acids. **Fuel**, v. 86, n. 5-6, p. 906-910, 2007.

MATEO, C.; PALOMO, J.M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUISAN, J.M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology**, v.40, p.1451-1463, 2007.

MAYORDOMO, I.; RANDEZ, G. F.; PRIETO, J. A. Isolation, purification, and characterization of a cold-active lipase from *Aspergillus nidulans*. *J. Agric. Food Chem.* v.48, 105-109, 2000.

MENDES, A. A.; OLIVEIRA, P. C. D.; CASTRO, H. F. D.; GIORDANO, R. D. L. C. Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. **Química Nova**, v.34, n., p.831-840, 2011.

MENDES, A.A. et al. Aplicação de lipases no tratamento de águas residuárias com elevados teores de lipídeos. **Química Nova**, v.28, n.2, p. 296-305, 2005.

MITA L., SICAC V., GUIDAD M., NICOLUCCIA C., GRIMALDIA T., CAPUTOE L., BIANCOA M., ROSSIE S., BENCIVENGAE U., ELDIR M. S. M., TUFANO M. A., MITA D. G. Employment of immobilised lipase from *Candida rugosa* for the bioremediation of waters polluted by dimethylphthalate, as a model of endocrine disruptors. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.62, p.133–141, 2010.

MORETTI, M.M.S.; BOCCHINI-MARTINS, D.A.; NUNES, C.C.C.; VILLENA, M.A.; PERRONE, O.M.; SILVA, R.; BOSCOLO, M.; GOMES, E. Pretreatment of sugarcane bagasse with microwaves irradiation and its effects on the structure and on enzymatic hydrolysis. **Applied Energy**.v.122, p.189 -195, 2014.

MOTEVALIZADEH, S.F.; KHOBI, M.; SADIGHI, A.; KHALILVAND-SEDAGHEH, M.; PAZHOUHANDEH, M.; RAMAZANI A.; FARAMARZI, M.A.; SHAFIEE, A. Lipase immobilization onto polyethylenimine coated magnetic nanoparticles assisted by divalent metal chelated ions. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.120, p.75–83, 2015.

MOURA, L.G.N.; FREITAS, E.M.; ROCHA, F.; AFONSO, M.R.A.; RODRIGUES, S.; CORREIRA, J.M.COSTA. PHYSICO-CHEMICAL AND SENSORY EVALUATION OF YELLOW MOMBIN (*Spondiasmombin L.*) ATOMIZED POWDER. **Revista Caatinga**, v. 28, p. 244 – 252, 2015.

NABAISA, J.M.V.; LAGINHAS, C.; CARROTT, M.M.L.R.; CARROTT, P.J.M.; AMOROS, J.E.C.; GISBERT, A.V.N. Surface and porous characterization of activated carbons made from a novel biomass precursor, the esparto grass. **Appl. Surf. Sci.**, v.265, p.919-924, 2013.

NAMASIVAYAM, C.; KAVITHA, D. IR, XDR, and SEM studies on the mechanism of adsorption of dyes and phenols by coir pith carbon from aqueous phase. **Microchemical Journal**, vol. 82, p. 43 – 48, 2006.

NARANJO, J.C.; CÓRDOBA, A.; GIRALDO, L.; GARCÍA, V.S.; MORENO-PIRAJÁN, J.C. Lipase supported on granular activated carbon and activated carbon cloth as a catalyst in the synthesis of biodiesel fuel. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.66, p.166–171, 2010.

NOWICKI, P.; KAZMIERCZAK, J.; PIETRZAK, R. Comparison of physicochemical and sorption properties of activated carbons prepared by physical and chemical activation of cherry stones. **Powder Technology**, v.269, p.312–319, 2015.

NUNELL, G.V.; FERNANDEZ, M.E.; BONELLI, P.R.; CUKIERMAN, A.L. Conversion of biomass from an invasive species into activated carbons for removal of nitrate from wastewater. **Biomass and bioenergy**, v.44, p.87-95, 2012.

OKMAN, I.; KARAGÖZ, S.; TAY, T.; ERDEM, M. Activated Carbons From Grape Seeds By Chemical Activation With Potassium Carbonate And Potassium Hydroxide. **Applied Surface Science**, v.293, p.138–142, 2014.

OLIVEIRA, G. S.; COSTA, J. M. C.; AFONSO, M. R. A. Caracterização e comportamento higroscópico do pó da polpa de cajá liofilizada. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 18, p.1059-1064, 2014.

PAIVA, A. L.; BALCÃO, V. M.; MALCATA, F. X. Kinetics and mechanisms of reactions catalyzed by immobilized lipase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, p. 187-204, 2000.

PALOMO, J.M.; FUENTES, M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; MATEO, C.; GUIBAN, J.M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. General trend of lipase to self-assemble giving bimolecular aggregates greatly modifies the enzyme functionality. **Biomacromolecules**, v.4, p.1–6, 2003.

PAQUES, F.W.; MACEDO, G.A. Lipases de látex vegetais: propriedades e aplicações industriais. **Quim. Nova**, v. 29, p.93-99, 2006.

PEREIRA, R. G., VELOSO, C. M., DA SILVA, N. M., DE SOUSA, L. F., BONOMO, R. C. F., DE SOUZA, A. O., DA GUARDA, M. O. & FONTAN, R. D. C. I. Preparation of activated carbons from coco shells and siriguelase seeds using H₃PO₄ and ZnCl₂ as activating agents for BSA and α -lactalbumin adsorption. **Fuel Processing Technology**, 126, 476-486. 2014.

PEREZ, V.H.; SILVA, G.S.; GOMES, F.M.; CASTRO, H.F. Influence of the functional activating agent on the biochemical and kinetic properties of *Candida rugosa* lipase immobilized on chemically modified cellulignin. **Biochemical Engineering Journal**, v.34, p.13-19, 2007.

PINTO, W. S.; DANTAS, A. C. V. L.; FONSECA, A.; LEDO, C. A. S.; CALAGANGE, P.; ANDRADE, E. Caracterização física, físico-química e química de frutos de genótipos de cajazeiras. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, p. 1059-1066, 2003.

PRAHAS, D.; KARTIKA, Y.; INDRASWATI, N.; ISMADJI, S. Activated carbon from Jack fruit peel waste by H₃PO₄ chemical activation: pore structure and surface chemistry characterization. **ChemEng J**, v.140, p.32–42, 2008.

RAMANI, K.; KARTHIKEYAN, S.; BOOPATHY, R.; KENNEDY, L.; MANDAL, A.B.; SEKARAN, G. Mesoporous activated carbon surface functionalized for the immobilization of lipase and its application acidic hydrolysis waste oil prepared : Isotherm and kinetic studies. **Process Biochemistry**, v.47, p.435-445, 2012.

RAMANI, K.; LOURDUSAMY, J. K.; VIDYA, C.; BOOPATHY, R.; SEKARAN, G. Immobilization of acidic lipase derived from *Pseudomonas gessardii* onto mesoporous activated carbon for the hydrolysis of olive oil. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzimática**, v. 62, p. 58-65, 2010.

REGALBUTO, J. R.; ROBLES, J. **The engineering of Pt/Carbon Catalyst Preparation**, University of Illinois: Chicago, 2004.

RIGO, E.; RIGONI, R. E.; LODEA, P.; OLIVEIRA, D.; FREIRE, D. M. G.; DI LUCCIO, M. Application of different lipases as pretreatment in anaerobic treatment of wastewater. **Environmental Engineering Science**, v. 25, p. 1243-1248, 2008.

RODRIGUES, R. C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Lipase from *Rhizomucormiehei* as a biocatalyst in fats and oils modification. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 66, p. 15–32, 2010.

SACRAMENTO, C. K.; SOUZA, F. X. Cajá (*Spondias mombim* L.). **Jaboticabal: FUNEP**, p.42, 2000.

SAHU, J.N; ACHARYA, J.; MEIKAP, B.C. Optimization of production conditions for activated carbons from tamarind wood by zinc chloride using response surface methodology. **Bioresour Technol**, v.101, p.1974–82, 2010.

SALIHU, H.; MD. ALAM, Z.; ABDULKARIM, M. I.; SALLEH, H.M. Lipase production: A vision in the use of renewable agricultural waste. **Resources, Conservation and Recycling**, v.58, p.36-44, 2012.

SANDSTROM, A. G.; WIKMARK, Y.; ENGSTROM, K.; NYHLÉN, J.; BACKVALL, JAN-E. Combinatorial reshaping of the *Candida antarctica* lipase A substrate pocket for enantioselectivity using an extremely condensed library. **Exploring Copper Compounds**, v. 3, p. 78-83, 2012.

SAYGILI, H.; GUZEL, F.; ONAL, Y. Conversion of grape industrial processing waste to activated carbon sorbent and its performance in cationic and anionic dyes adsorption. **Journal of Cleaner Production**, v. 93, p.84-93, 2015.

SEITZ, E. Industrial Application of Microbial Lipases: A Review. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.51, n.2, p.12-16, 2007.

SERRA, E.; DÍEZ, E.; DÍAZ, I.; M, R. Blanco. A comparative study of periodic mesoporous organosilica and different hydrophobic mesoporous silicas for lipase immobilization. **Microporous and Mesoporous Materials**, v.132, p.487–493, 2010.

SHAKERI, M.; KAWAKAMI, K. Enhancement of Rhizopusoryzae lipase activity immobilized on alkyl-functionalized spherical mesocellular foam: Influence of alkyl chain length. **Microporous and Mesoporous Materials**, v.118, p.115–120, 2009.

SHARMA, ATUL.; KYOTANI, TAKASHI.; TOMITA, AKIRA. Comparison of structural parameters of PF carbon from XDR and HRTEM techniques. **Carbon**, v.38, p.1977-84, 2000.

SHARMA, R; CHISTI, Y; BANERJEE, U.C. Production, purification, characterization, and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, v. 19, p. 627-662, 2001.

SILVA, D.J.; QUEIROZ, A.C. **Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos**. 3.ed. – Viçosa: UFV, p.235, 2002.

SILVA, J. A.; MACEDO, G. P.; RODRIGUES, D. S.; GIORDANO, R. C. L.; GONÇALVES, L. R. B. Immobilization of Candida antarctica lipase B by covalent attachment on chitosan-based hydrogels using different support activation strategies. **Biochemical Engineering Journal**, v. 60, p. 16-24, 2012.

SILVA, W. O. B.; MITIDIERI, S.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M.H. Production and extraction of an extracellular lipase from the entomopathogenic fungus *Metarhiziumanisophae*. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 321-326, 2005.

SING, K. S. W. Reporting physisorption data for gas/solid systems with special reference to the determination of surface area and porosity. **Pure Appl. Chem.**, v. 57, p. 603, 1985.

SOARES, C.M.F.; DE CASTRO, H.F.; ZANIN, G.M.; DE MORAES, F.F. Characterization and utilization of Candida rugosa lipase immobilized on controlled pore silica. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 77/79, p. 745-757, 1999.

SOARES, E. B. Caracterização física e química de frutos de cajazeira. **Rev. Bras. Frutic.**, v. 28, p. 518-519, 2006.

SONGA, H.; ZHOU, L.; ZHANG, L.; GAO, B.; WEI, D.; SHEN, Y.; WANG, R.; MADZAK, C.; JIANG, Z. Construction of a whole-cell catalyst displaying a fungal lipase for effective treatment of oily wastewaters. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.71, p.166–170, 2011.

SUN, J.; JIANG, Y.; ZHOU, L.; GAO, J. Immobilization of Candida antarctica lipase B by adsorption inorganic medium. **Nat Biotechnol**, v.27, p.53–58, 2010.

TAY, T.; UCAR, S.; KARAGOZ, S. Preparation and characterization of activated carbon from waste biomass. **J. Hazard. Mater.**, v.165, p.481–485, 2009.

TIBURSKI, JÚLIA HAUCK; ROSENTHAL, AMAURI.; DELIZA, ROSIRES.; GODOY, R.L.O.; PACHECO, SIDNEY. Nutritional properties of yellow mombin (*Spondias mombin* L.) pulp. **Food Research International**, v. 44. p. 2326–2331. 2011.

VERMA, N.; THAKUR, S.; BHATT, A. K. Microbial Lipases : Industrial Applications and Properties (A Review). **International Research Journal of Biological Sciences**, v. 1, n. 8, p. 88–92, 2012.

VIEIRA, A. P., SANTANA, S. A., BEZERRA, C. W., SILVA, H. A., DE MELO, J. C., DA SILVA FILHO, E. C., & AIROLDI, C. Copper sorption from aqueous solutions and sugar cane spirits by chemically modified babassu coconut (*Orbignyaspermosa*) mesocarp. **Chemical Engineering Journal**, v.161, p. 99-105, 2010.

VILLENEUVE, P.; MUDERHWA, J.M.; GRAILLE, J.; HAAS, M.J.; Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.9, p. 113–148, 2000.

VINU, A.; MIYAHARA, M.; ARIGA, K. Biomaterial immobilization in nanoporous carbon molecular sieves: influence of solution pH, pore volume, and pore diameter. **The Journal of Physical Chemistry B**, v.109, n.13, p. 6436-41, 2005.

XI, W.-W., XU, J.-H. Preparation of enantiopure (S)-ketoprofen by immobilized *Candida rugosa* lipase in packed bed reactor. **Proc. Biochem.** 40, 2161-2166, 2005.

XU, J.; CHENA, L.; QUA, H.; JIAOA, Y.; XIEA, J.; XING, G. Preparation and characterization of activated carbon from reedy grassleaves by chemical activation with H₃PO₄. **Applied Surface Science**, v.320, p.674–680, 2014.

XU, J.H.; ZHOU, R.; BORNSCHEUER, U.T. Comparison of differently modified *Pseudomonas cepacia* lipases in enantioselective preparation of a chiral alcohol for agrochemical use. **Biocatal. Biotransformation**, v. 23, n. 6, p. 415-422, 2005.

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 Mat.** v. 86, n. 1-3, p. 215-222, 2005.

YAKOUT, S.M.; SHARAF, G. S. Characterization of activated carbon prepared by phosphoric acid activation of olive stones. **Arabian Journal of Chemistry**, p.1-8, 2012.

YANG, K., PENG, J., SRINIVASAKANNAN, C., ZHANG, L., XIA, H., DUAN, X. Preparation of high surface area activated carbon from coconut shells using microwave heating. **Bioresour. Technol.** v.101, p.6163–6169, 2010.

YANG, X.; WANG, B.; CUI, F.; TAN, T. Production of lipase by repeated batch fermentation with immobilized *Rhizopus arrhizus*. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 6, p. 2095–2103, 2005.

YE, P.; XU, Z.K.; WU, J. INNOCENT, C.; SETA, P. Entrusting poly(acrylonitrile-co-maleic acid) ultrafiltration hollow fiber membranes with biomimetic surfaces for lipase immobilization. **J. Mol. Catal. B:Enzymatic**, v. 40, n. 1-2, p. 30-37, 2006.

YORGUN, S.; VURAL, N.; DEMIRAL, H. Preparation of high-surface area activated carbon from Paulownia by ZnCl₂ activation. **Micropor. Mesopor. Mater.**, v.122, p.189–194, 2009.

YU, L.; ZHONG, Q. Preparation of adsorbents made from sewage sludges for adsorption of organic materials from wastewater. **J. Hazard. Mater.**, v.137, p.359–366, 2006.

YUCEL, Y. Optimization of immobilization conditions of the *rmomyces lanuginosus* lipase on olive pomace powder using response surface methodology. **Biocatal. Agr. Biotechnol.** v.1, 39–44, 2012.

YUSO, A.M.; RUBIO, B.; IZQUIERDO, M.T. Influence of activation atmosphere used in the chemical activation of almond shell on the characteristics and adsorption performance of activated carbons. **Fuel Processing Technology**, v. 119, p. 74–80, 2014.

ZANETTE, A.F.; AWADALLAK, J.; FILHO, L.C. Immobilization of lipases regioselectivas dies in sol-gel and partial hydrolysis reaction. **Journal of Exact Sciences**, v.3, p.05-08, 2014.

ZHAO, X.; FAN, M.; ZENG, J.; DU, W.; LIU, C.; LIU, D. Kinetics of lipase recovery from the aqueous phase of biodiesel production by macroporous resin adsorption and reuse of the adsorbed lipase for biodiesel preparation. **Enzyme Microb Technol**, v.52, p.226–233, 2013.

ZYOUS, A.; NASSAR, H.N.I; EL-HAMOUZ, A.; HILAL, H.S. Solid olive waste in environmental cleanup: Enhanced nitrite ion removal by ZnCl₂-activated carbon. **Journal of Environmental Management**, v.152, p.27-35, 2015.