



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA – UESB**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS**

Área de Concentração: Engenharia de Alimentos

**IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES EM CARVÕES ATIVADOS OBTIDOS A PARTIR DO  
CAROÇO DE TAMARINDO E SUA APLICAÇÃO NA SÍNTESE DE BUTIRATO DE  
BUTILA**

**ITAPETINGA**  
**BAHIA- BRASIL**  
**2020**

**GABRIEL RAMOS FERREIRA GONÇALVES**

**IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES EM CARVÕES ATIVADOS OBTIDOS A PARTIR DO  
CAROÇO DE TAMARINDO E SUA APLICAÇÃO NA SÍNTESE DE BUTIRATO DE  
BUTILA**

Tese de Doutorado apresentada à Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Área de Concentração em Engenharia de Alimentos.

**Orientadora:** Cristiane Martins Veloso

**Co-Orientador (a):** Rafael da Costa Ilhéu Fontan

Renata Cristina Ferreira Bonomo

**ITAPETINGA  
BAHIA - BRASIL**

**2020**

660.634 Gonçalves, Gabriel Ramos Ferreira.  
G626i Imobilização de lipases em carvões ativados obtidos a partir do caroço de tamarindo e sua aplicação na síntese de butirato de butila. / Gabriel Ramos Ferreira Gonçalves. – Itapetinga-BA: UESB, 2020.  
125f.

Tese apresentado à Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, como parte das exigências para obtenção do título de Doutora em Engenharia e Ciência de Alimentos, no Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Área de Concentração em Engenharia de Alimentos. Sob a orientação da Profª. D. Sc. Cristiane Martins Veloso e coorientação do Prof. D. Sc. Rafael da Costa Ilhéu Fontan e Profª. D. Sc. Renata Cristina Ferreira Bonomo.

1. Carvões ativados – Produção - Caroço de tamarindo. 2. Carvões ativados – Carbonização hidrotérmica. 3. Biocatalisadores - Produção - Enzimas imobilizadas. I. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - Programa de Pós-Graduação de Doutorado em Engenharia e Ciências de Alimentos, *Campus* de Itapetinga. II. Veloso, Cristiane Martins. III. Fontan, Rafael da Costa Ilhéu. IV. Bonomo, Renata Cristina Ferreira. V. Título.

**CDD(21): 660.634**

Catálogo na Fonte:

Adalice Gustavo da Silva – CRB 535-5ª Região  
Bibliotecária – UESB – Campus de Itapetinga-BA

Índice Sistemático para desdobramentos por Assunto:

1. Imobilização de lipases - Carvões ativados
2. Caroço de tamarindo – Carvões ativados
3. Enzimas imobilizadas - Biocatalisadores



GOVERNO DO ESTADO DA BAHIA

Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia

Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos - UESB/RTR/PPG/PPGECAL

**DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO**

**Título:** IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES EM CARVÓES ATIVADOS OBTIDOS A PARTIR DO CAROÇO DE TAMARINDO E SUA APLICAÇÃO NA SÍNTESE DE BUTIRATO DE BUTILA.

**Autor (a):** GABRIEL RAMOS FERREIRA GONÇALVES

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

**Coorientador (a):** Pro.ª Dr.ª Renata Cristina Ferreira Bonomo

Prof. Dr. Rafael da Costa Ilhéu Fontan

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

**Banca Examinadora.**

|   |  |
|---|--|
| Prof. Dr. Nívio Batista Santana<br>UESB   | Prof. Dr. Rafael da Costa Ilhéu<br>Fontan UESB                   |
| Prof. Dr. Baraquizio Braga do Nascimento<br>Júnior<br>UESB                        | Prof. Dr. Márcio Luís Oliveira Ferreira<br>Membro Externo - UESC |
| Prof.ª Dr.ª Cristiane Martins Veloso<br>Orientadora - UESB<br>Presidente da Banca |  |



Documento assinado eletronicamente por Rafael Da Costa Ilhéu Fontan, Coordenador(a) do Programa, em 16/09/2020, às 10:37, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 13º, Incisos I e II, do [Decreto nº 15.805, de 30 de dezembro de 2014](#).



Documento assinado eletronicamente por Cristiane Martins veloso, Professor Titular, em 16/09/2020, às 11:34, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 13º, Incisos I e II, do [Decreto nº 15.805, de 30 de dezembro de 2014](#).



Documento assinado eletronicamente por **Marcio Luis Oliveira Ferreira, Professor Titular**, em 16/09/2020, às 13:58, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 13º, Incisos I e II, do [Decreto nº 15.805, de 30 de dezembro de 2014](#).



Documento assinado eletronicamente por Nívio Batista Santana, Professor, em 18/09/2020, às 19:07, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 13º, Incisos I e II, do [Decreto nº 15.805, de 30 de dezembro de 2014](#).



Documento assinado eletronicamente por **Baraquizio Braga do Nascimento Junior, Professor Pleno**, em 16/09/2020, às 08:54, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 13º, Incisos I e II, do [Decreto nº 15.805, de 30 de dezembro de 2014](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site

[https://seibahia.ba.gov.br/sei/controladorexterno.php?](https://seibahia.ba.gov.br/sei/controladorexterno.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0)

[acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](#), informando o código verificador

00022208912 e o código CRC C30CA447.

*“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”. (Marthin Luther King)*

**A Deus**  
**Aos meus pais**  
**Aos meus irmãos**  
**À minha companheira Olga**

**Dedico!**

## AGRADECIMENTOS

*“Seja forte e corajoso! Não se apavore nem desanime, pois o Senhor, o seu Deus, estará com você por onde você andar”. (Josué 1:9)*

Chegando ao fim de mais um ciclo em minha vida o sentimento que fica é o de gratidão pelas pessoas que me ajudaram a conquistar esse objetivo.

Agradeço primeiramente a Deus, pelo dom da vida, pela proteção, oportunidades e por me conceder saúde e sabedoria para conquistar meus objetivos.

Aos meus pais Francisco e Áurea, razão do meu viver, pelo carinho e amor incondicional, por cada gota de suor derramado, pelo esforço dispensado durante toda a vida e por se fazerem sempre presentes. Vocês são os melhores do mundo. Obrigado por tudo sempre!!

Aos meus irmãos Rafael e Ben-Hur, parceiros de toda a vida, com quem eu passei os melhores momentos, pelo companheirismo e por fazerem com que essa etapa se tornasse mais fácil. Agradeço a todos os conselhos e palavras de ânimo nos momentos de dificuldades. Amo vocês!

Um agradecimento mais do que especial à minha namorada Olga, minha companheira de vida, que batalhou comigo os percalços enfrentados durante o Doutorado, me dando forças para continuar. Reconheço que se não fosse você me ajudando no experimento até mesmo nas madrugadas, quando nada parecia dar certo, além das palavras de apoio para que eu seguisse, eu não teria chegado até aqui. Te amo demais!

À Professora Cristiane Veloso, pela excelente orientação, pelas sugestões valiosas ao longo de todo o trabalho e por estar sempre disponível para esclarecer qualquer dúvida e ajudar nas resoluções dos problemas que surgiam.

Ao professor Rafael Fontan, um profissional que com certeza tenho como referência, por todos os ensinamentos durante minha vida acadêmica e pela amizade.

Aos professores Paulo e Renata Bonomo, pelos valiosos ensinamentos e pela amizade.

À minha cunhada Grazy, por todo o apoio e amizade.

Aos grandes amigos que fiz em Itapetinga, em especial a Rui, Jequié, Gabriel e Jhones pela parceria.

À Mariana, Marília e Mylena, colegas e amigas do início da graduação ao final do Doutorado.

Ao pessoal do Grupos de Estudos em Leite pelas análises de FTIR, em especial à Josane e Lucas pela amizade.

Ao Hudson, pelas análises de microscopia eletrônica de varredura.

A todos os professores e alunos do LEP.

Aos amigos da Academia de Jiu Jitsu Casca Grossa, pelas resenhas e “porradas” diárias.

À FAPESB pela concessão da bolsa.

À CAPES, pelo auxílio com recursos do PROAP.

Ao CETENE pelas análises de área superficial.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos (PPGECAL), em especial à Jamile.

À banca examinadora pelas valiosas contribuições.

À Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB) pelo auxílio por meio do Programa de Bolsas e Aux-PPG.

A todos, que por ventura não tenha sido citados, mas contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

Muito obrigado!

## SUMÁRIO

### CAPÍTULO I

|  |    |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO .....  | 21 |
| 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....   | 24 |
| 2.1. Biomassa lignocelulósica .....  | 24 |
| 2.2. Carvão de tamarindo ( <i>Tamarindus indica</i> ) .....  | 25 |
| 2.3. Carbonização hidrotérmica de biomassa lignocelulósica .....   | 26 |
| 2.4. Carvão ativado .....  | 29 |
| 2.5. Utilização de hydrochars para a síntese de carvões ativados .....   | 32 |
| 2.6. Imobilização de enzimas .....   | 33 |
| 2.6.1. Métodos de imobilização .....   | 35 |
| 2.7. Lipases .....   | 37 |
| 2.8. Aplicação das lipases na indústria de alimentos .....   | 39 |
| 2.9. Lipase pancreática do porco (LPP) .....   | 41 |
| 2.10. Síntese de ésteres de aromas .....   | 42 |
| 2.10.1. Butirato de butila .....   | 43 |
| 3. OBJETIVOS .....   | 46 |
| 3.1. Objetivo geral .....  | 46 |
| 3.2. Objetivos específicos .....   | 46 |
| 4. REFERÊNCIAS .....   | 47 |
| CAPÍTULO II .....  | 62 |
| PRODUÇÃO DE BIOTACALISADORES PARA SÍNTESE DE ÉSTERES: EFEITO DA<br>CARBONIZAÇÃO HIDROTÉRMICA NAS PROPRIEDADES DO CARVÃO ATIVADO<br>EMPEREGADO COMO SUPORTE PARA A IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE ..... | 63 |
| RESUMO .....   | 63 |
| 1. INTRODUÇÃO .....  | 64 |
| 2. MATERIAIS E MÉTODOS .....   | 66 |
| 2.1. Materiais .....   | 66 |
| 2.2. Preparo do material precursor .....   | 66 |
| 2.3. Síntese dos hydrochars .....  | 66 |
| 2.3.1. Delineamento experimental e análises estatísticas .....   | 66 |
| 2.4. Caracterização do material precursor e do hydrochar .....   | 67 |
| 2.5. Obtenção dos carvões ativados .....   | 68 |

|   |     |
|---|-----|
| 2.5.1. Caracterização dos carvões ativados .....  | 68  |
| 2.6. Imobilização da lipase do pâncreas do porco nos carvões ativados obtidos.....  | 69  |
| 2.6.1 Efeito do pH na imobilização da lipase.....   | 69  |
| 2.7. Propriedades catalíticas do biocatalisador .....   | 70  |
| 2.8. Estabilidade ao tempo de armazenamento .....   | 70  |
| 2.9. Estabilidade da lipase imobilizada no carvão em presença de solvente orgânico .....  | 71  |
| 2.10. Síntese do butirato de butila.....  | 71  |
| 2.10.1. Estabilidade operacional do biocatalisador.....   | 71  |
| 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....   | 72  |
| 3.1. Caracterização do material precursor.....  | 72  |
| 3.2. Carbonização hidrotérmica do resíduo lignocelulósico .....   | 72  |
| 3.3. Caracterização dos carvões .....   | 76  |
| 3.3.1. Caracterização química e rendimento dos carvões produzidos .....   | 76  |
| 3.3.2. Microscopia eletrônica de varredura dos carvões .....  | 78  |
| 3.3.3. Espectrofotometria de absorção no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)....   | 78  |
| 3.3.4. Caracterização textural dos carvões ativados.....  | 80  |
| 3.4 Imobilização da lipase por adsorção .....   | 82  |
| 3.4.1. Efeito do pH inicial da solução de lipase no processo de imobilização.....   | 82  |
| 3.6.2. Efeito da adição do surfactante Triton X-100 na imobilização da lipase por adsorção.....   | 84  |
| 3.7. Efeito do pH do meio reacional na atividade hidrolítica da LPP livre e imobilizada.....  | 86  |
| 3.8. Efeito da temperatura de reação na atividade hidrolítica da LPP livre e imobilizada .....  | 87  |
| 3.9. Estabilidade ao tempo de armazenamento .....   | 89  |
| 3.10. Estabilidade em relação ao solvente orgânico .....  | 89  |
| 3.11. Síntese do butirato de butila utilizando a lipase imobilizada no CAHT como biocatalisador.  | 90  |
| 4. CONCLUSÃO .....  | 91  |
| 5. REFERÊNCIAS.....   | 92  |
| CAPÍTULO III.....   | 99  |
| INFLUÊNCIA DO MÉTODO DE IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE DO PÂNCREAS DO PORCO<br>NA ATIVIDADE HIDROLÍTICA E NA REAÇÃO DE SÍNTESE DE BUTIRATO DE BUTILA<br>..... | 100 |
| RESUMO .....  | 100 |
| 1. INTRODUÇÃO .....   | 100 |
| 2. MATERIAIS E MÉTODOS .....  | 102 |
| 2.1. Materiais e reagentes.....   | 102 |
| 2.2. Preparo e caracterização do material precursor .....   | 102 |

|  |     |
|--|-----|
| 2.2.1. Caracterização do material precursor .....                                    | 102 |
| 2.3. Síntese e funcionalização do carvão ativado.....                                | 103 |
| 2.4. Caracterização dos carvões .....  | 103 |
| 2.5. Ensaio de imobilização da lipase do pâncreas do porco (LPP) .....               | 103 |
| 2.5.1. Efeito do pH de imobilização.....   | 104 |
| 2.5.2. Efeito da adição do surfactante Triton X-100 .....                            | 104 |
| 2.6. Propriedades catalíticas do biocatalisador .....                                | 105 |
| 2.7. Estabilidade ao tempo de armazenamento .....                                    | 105 |
| 2.8. Estabilidade da lipase imobilizada no carvão em relação ao hexano .....         | 105 |
| 2.9. Síntese do butirato de butila.....  | 106 |
| 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....  | 106 |
| 3.1. Caracterização do material precursor.....                                       | 106 |
| 3.4. Imobilização da LPP nos carvões por adsorção e por ligação covalente.....       | 111 |
| 3.4.1. Efeito do pH da solução de imobilização .....                                 | 111 |
| 3.4.2. Efeito da adição do Triton X-100 na imobilização da LPP no CAT e no CFT ..... | 113 |
| 3.5. Propriedades catalíticas dos biocatalisadores .....                             | 114 |
| 3.5.1. Efeito do pH de hidrólise .....   | 114 |
| 3.5.2. Efeito da temperatura de hidrólise .....                                      | 115 |
| 3.6. Estabilidade ao tempo de armazenamento .....                                    | 117 |
| 3.7. Estabilidade ao hexano.....   | 118 |
| 3.8. Síntese do butirato de butila.....  | 118 |
| 4. CONCLUSÃO .....   | 119 |
| 5. REFERÊNCIAS.....  | 120 |
| CONSIDERAÇÕES FINAIS.....  | 125 |

## LISTA DE ABREVIATURAS

| <b>Abreviatura</b> | <b>Significado</b>   |
|--------------------|--|
| DCCR               | Delineamento Composto Central Rotacional   |
| GFOs               | Grupos funcionais oxigenados   |
| CAHT               | Carvão ativado produzido utilizando o hydrochar do caroço de tamarindo como precursor    |
| CAFT               | carvão ativado produzido utilizando o farelo bruto do caroço de tamarindo como precursor |
| LPP                | Lipase pancreática do porco  |
| CAT                | Carvão ativado (sem funcionalização)   |
| CFT                | Carvão ativado funcionalizado com glutaraldeído  |
| CHT                | Carbonização hidrotérmica  |
| FT                 | Farelo de tamarindo  |
| FTIR               | Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier                              |
| MEV                | Microscopia eletrônica de varredura  |
| pH <sub>PCZ</sub>  | pH do ponto de carga zero  |
| HPLC               | Cromatógrafo líquido de alta eficiência  |
| HT                 | Hydrochar do farelo de tamarindo   |
| Sg                 | Área superficial BET   |
| Dp                 | Diâmetro de poros  |
| V <sub>mes</sub>   | Volume de mesoporos  |
| V <sub>mic</sub>   | Volume de microporos   |
| q                  | Capacidade adsortiva   |
| AH                 | Atividade hidrolítica dos carvões  |
| AE                 | Atividade específica da enzima imobilizada   |
| GL                 | Grau de liberdade  |
| SQ                 | Soma de quadrados  |
| QM                 | Quadrado médio do resíduo  |
| Q                  | Capacidade adsortiva   |

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo II: Artigo 1

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabela 1.</b> Níveis e variáveis estudadas no DCCR.....  | 67 |
| <b>Tabela 2.</b> Caracterização química do farelo do caroço de tamarindo. ....  | 72 |
| <b>Tabela 3.</b> Quantidade de grupos funcionais oxigenados do farelo do caroço de tamarindo (GFO-T), após tratamento hidrotérmico no DCCR utilizado.....   | 73 |
| <b>Tabela 4.</b> Análise de variância da regressão do farelo de tamarindo para as variáveis codificadas.  | 74 |
| <b>Tabela 5.</b> Estimativa dos parâmetros do modelo (dados codificados). ....  | 74 |
| <b>Tabela 6.</b> Caracterização química e rendimento dos carvões ativados produzidos. CAHT: carvão ativado produzido utilizando o hydrochar do caroço de tamarindo como precursor; CAFT: carvão ativado produzido utilizando o farelo bruto do caroço de tamarindo como precursor. ....       | 77 |
| <b>Tabela 7.</b> Propriedades texturais dos carvões produzidos.....   | 82 |
| <b>Tabela 8.</b> Avaliação do efeito do pH da solução inicial de lipase na capacidade adsortiva e atividade dos carvões produzidos. Condições: concentração inicial de proteína de 6000 mg.L <sup>-1</sup> , temperatura de imobilização de 30°C e tempo de imobilização de 120 minutos. .... | 82 |
| <b>Tabela 9.</b> Efeito da adição do surfactante Triton X-100 no processo de imobilização da LPP no CAHT. Condições de imobilização: concentração inicial de proteína de 6000 mg.L <sup>-1</sup> , temperatura de 30°C, tempo de 120 minutos e pH do tampão acetato de 5,0. ....              | 85 |

### Capítulo III: Artigo 2

|  |     |
|--|-----|
| <b>Tabela 1.</b> Caracterização dos carvões. CAT: carvão ativado (sem funcionalização); CFT: carvão ativado funcionalizado com glutaraldeído.....  | 107 |
| <b>Tabela 2:</b> Efeito do pH da solução de lipase na capacidade adsortiva e atividade hidrolítica dos biocatalisadores. Condições: concentração inicial de proteína de 6000 mg.L <sup>-1</sup> , temperatura de imobilização de 30°C e tempo de imobilização de 120 minutos.....  | 111 |
| <b>Tabela 3:</b> Efeito da adição do surfactante Triton X-100 no processo de imobilização da LPP nos diferentes biocatalisadores. Condições: concentração inicial de proteína de 6000 mg.L <sup>-1</sup> , temperatura de imobilização de 30°C, tempo de imobilização de 120 minutos e pH da solução de imobilização de 5..... | 113 |

## LISTA DE FIGURAS

### Capítulo I

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1.</b> Estrutura geral de uma biomassa lignocelulósica.....   | 24 |
| <b>Figura 2.</b> Fruto e caroço do tamarindo.....   | 26 |
| <b>Figura 3.</b> Formação de GFOs durante a CHT. ....   | 28 |
| <b>Figura 4.</b> Possíveis estruturas dos grupos funcionais oxigenados presentes na superfície dos carvões ativados. (a) grupos carboxílicos; (b) grupos fenólicos; (c) anidridos carboxílicos; (d) grupo carbonila; (e) grupo éter; (f) lactonas; (g) quinonas ..... | 30 |
| <b>Figura 5.</b> Representação da estrutura porosa de um carvão ativado. ....   | 31 |
| <b>Figura 6.</b> Formação de hydrochar e ativação química eficiente devido ao elevado teor de GFOs..  | 32 |
| <b>Figura 7.</b> Reações catalisadas por lipases. ....  | 38 |
| <b>Figura 8.</b> Reação de esterificação de Fisher catalisada por ácido.....  | 43 |
| <b>Figura 9.</b> Fórmula estrutural do butirato de butila. ....   | 44 |

### Capítulo II: Artigo 1

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 1.</b> Superfície de resposta do modelo obtido para a CHT do farelo do caroço de tamarindo.....  | 75 |
| <b>Figura 2:</b> Microscopia eletrônica de varredura dos carvões produzidos. (A) CFTA; (B) CHTA....  | 78 |
| <b>Figura 3.</b> Espectros de FTIR do farelo, hydrochar e carvões ativados do caroço de tamarindo.....   | 79 |
| <b>Figura 4:</b> Isotermas de sorção dos carvões produzidos. (A) farelo bruto do caroço de tamarindo; (B) hydrochar do caroço de tamarindo.....                                  | 80 |
| <b>Figura 5:</b> Microscopia eletrônica de varredura dos biocatalisadores enzimáticos. (A) CFTA; (B) CHTA.....   | 86 |
| <b>Figura 6:</b> Efeito do pH na atividade hidrolítica da LPP livre (○) e imobilizada no CAHT (●). A atividade máxima foi definida como atividade relativa de 100%.....          | 87 |
| <b>Figura 7:</b> Efeito da temperatura na atividade hidrolítica da LPP livre (○) e imobilizada no CAHT (●). A atividade máxima foi definida como atividade relativa de 100%..... | 88 |
| <b>Figura 8:</b> Estabilidade da LPP imobilizada no CAHT ao longo do tempo de armazenamento.....   | 89 |
| <b>Figura 9:</b> Rendimento de esterificação residual do biocatalisador em função do número de ciclo.....  | 91 |

### Capítulo III: Artigo 2

|  |     |
|--|-----|
| <b>Figura 1:</b> Isotermas de sorção do nitrogênio para o CAT (A) e CFT (B).....   | 108 |
| <b>Figura 2:</b> Microscopia eletrônica de varredura do CAT (A) e CFT (B).....   | 109 |
| <b>Figura 3:</b> Espectros de FTIR do Farelo (FT), Carvão ativado (CAT) e do Carvão Funcionalizado (CFT) obtidos do caroço de tamarindo.....   | 110 |
| <b>Figura 4:</b> Efeito do pH na atividade hidrolítica da lipase. (●): imobilizada no CAT; (○): diluída no tampão de imobilização com 0,4 mM de Triton X-100; (▼) imobilizada no CFT; (Δ) diluída no tampão de imobilização sem adição de Triton X-100.....  | 115 |
| <b>Figura 5:</b> Efeito da temperatura na atividade hidrolítica da LPP livre e imobilizada nos diferentes carvões. (●): imobilizada no CAT; (○): diluída no tampão de imobilização com 0,4 mM de Triton X-100; (▼) imobilizada no CFT; (Δ) diluída no tampão de imobilização sem adição de Triton X-100..... | 116 |
| <b>Figura 6:</b> Estabilidade da LPP imobilizada nos carvões ao longo do tempo de armazenamento. (●): referente a imobilizada no CAT; (○): referente a imobilizada no CFT.....   | 117 |
| <b>Figura 7:</b> Rendimento de esterificação residual da LPP imobilizada no CAT e do CFT.....  | 119 |

## RESUMO

GONÇALVES, G. R. F. **Imobilização de lipases em carvões ativados obtidos a partir do caroço de tamarindo e sua aplicação na síntese de butirato de butila.** Itapetinga - BA: UESB, 2020. 125p. (Tese – Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos).

Os carvões ativados são materiais que apresentam elevada porosidade e área superficial, sendo uma alternativa de suporte para o processo de imobilização de enzimas. A utilização de enzimas imobilizadas em suportes apresenta vantagens relacionadas à operação e ao custo, devido à possibilidade de reutilização das mesmas. Modificações na superfície dos carvões podem ser realizadas para melhorar as propriedades dos mesmos. Entre as técnicas de modificação da superfície tem-se a carbonização hidrotérmica do material precursor e a inserção de compostos químicos específicos, como o glutaraldeído. Diante do exposto, o objetivo desse trabalho foi produzir carvões ativados a partir do caroço de tamarindo utilizando diferentes estratégias de síntese e utilizá-los na imobilização de lipase do pâncreas do porco. Na primeira etapa do trabalho foi avaliado o efeito da carbonização hidrotérmica do material precursor nas propriedades físicas, químicas e texturais do carvão. Foi observado que a utilização da carbonização hidrotérmica resultou em carvões com teor de grupos oxigenados 32,5% superior, menor pH do ponto de carga zero e menores valores para diâmetro médio dos poros. Na segunda etapa foi avaliado o efeito da funcionalização do carvão ativado com glutaraldeído visando determinar a efeito dessa modificação nas propriedades do carvão. A funcionalização resultou em um carvão com uma redução de 87% na área superficial e de 58% no volume de mesoporos, além de completa eliminação dos microporos. O pH do ponto de carga zero apresentou um aumento no seu valor, enquanto o teor de grupos oxigenados apresentou redução. Os biocatalisadores produzidos nas duas etapas do trabalho foram utilizados na imobilização da lipase, onde foi avaliado o efeito do pH e da adição de surfactante Triton X-100 na capacidade adsortiva e atividade enzimática. Posteriormente, os diferentes biocatalisadores foram caracterizados em relação ao pH e temperatura de hidrólise e em relação à estabilidade ao hexano e ao tempo de armazenamento. Para todos os biocatalisadores a melhor temperatura de hidrólise foi a de 35°C. Em relação ao pH, o carvão que foi funcionalizado com glutaraldeído apresentou melhor atividade em pH 7,0, enquanto os outros carvões em pH 8,0. A incubação no hexano até o tempo de 4 horas não alterou a atividade da lipase imobilizada em nenhum dos biocatalisadores. Além disso, os diferentes biocatalisadores apresentaram manutenção da atividade durante 60 dias de armazenamento. Por fim, os biocatalisadores foram aplicados na síntese do butirato de butila, onde apresentaram rendimento de esterificação superiores a 60 % e estabilidade ao reuso. Os resultados encontrados indicam que os

biocatalisadores produzidos são adequados para serem utilizados em reações hidrolítica e de esterificação.

**Palavras-chave:** carbonização hidrotérmica, funcionalização, hidrólise, esterificação.

## ABSTRACT

GONÇALVES, G. R. F. **Immobilization of lipases on activated carbon obtained from tamarind stone and its application in the synthesis of butyl butyrate.** Itapetinga - BA: UESB, 2020. 125 p. (Thesis - Doctorate in Food Science and Engineering).

Activated carbons are materials that have high porosity and surface area, being an alternative for the enzyme immobilization process. The use of immobilized enzymes in supports has advantages related to the operation and cost, due to the possibility of reusing them. Modifications in the surface of the carbons can be made to improve their properties. Among the surface modification techniques there is the hydrothermal carbonization of the precursor material and the insertion of specific chemical compounds, such as glutaraldehyde. In view of the above, the objective of this work was to produce activated carbon from the tamarind stone using different synthesis strategies, and use them to immobilize lipase of porcine pancreas. In the first stage of the work, the effect of hydrothermal carbonization of the precursor material on the physical, chemical and textural properties of the carbon was evaluated. It was observed that the use of hydrothermal carbonization resulted in carbons with a content of oxygenated groups 32.5% higher, lower pH of the zero charge point and lower values for mean pore diameter. In the second step, the effect of the functionalization of activated carbon with glutaraldehyde was evaluated in order to determine the effect of this change on the properties of the coal. Functionalization resulted in a charcoal with an 87% reduction in surface area and a 58% reduction in mesoporous volume, in addition to complete elimination of micropores. The pH of the zero charge point showed an increase in its value, while the content of oxygenated groups showed a decrease. The biocatalysts produced in the two stages of the work were used to immobilize the lipase, where the effect of pH and the addition of surfactant Triton X-100 on the adsorptive capacity and enzymatic activity was evaluated. Afterwards, the different biocatalysts were characterized in relation to pH and hydrolysis temperature and in relation to hexane stability and storage time. For all biocatalysts, the best hydrolysis temperature was 35 °C. Regarding pH, the functionalized carbon with glutaraldehyde showed better activity at pH 7.0, while the other carbons at pH 8.0. Incubation in hexane until 4 hours did not alter the activity of the immobilized lipase in any of the biocatalysts. In addition, the different biocatalysts maintained their activity during 60 days of storage. Finally, biocatalysts were applied in the synthesis of butyl butyrate, where they showed an esterification yield greater than 60% and stability to reuse. The results found indicate that the biocatalysts produced are suitable for use in hydrolytic and esterification reactions.

**Keywords:** hydrothermal carbonization, functionalization, hydrolysis, esterification.

## **CAPÍTULO I**

---

**INTRODUÇÃO**

**REFERENCIAL TEÓRICO**

**OBJETIVOS**

---

## 1. INTRODUÇÃO

As biomassas lignocelulósicas são os resíduos agroindustriais mais abundantes do planeta e seu descarte inadequado promove graves problemas ambientais, como a contaminação dos solos e das águas, poluição atmosférica, entre outros (GONÇALVES et al., 2013; MENDES et al., 2015). Diante disso, surge a necessidade de estudos que possibilitem um melhor aproveitamento desses materiais. Uma possibilidade que vem sendo explorada nos últimos anos para o aproveitamento da biomassa lignocelulósica é a utilização da carbonização hidrotérmica (CHT). Tal processo resulta na formação de materiais carbonáceos com características atrativas, como a presença de grupos funcionais oxigenados, fazendo com que tais materiais possam ser utilizados para uma variedade de aplicações, como adsorção (QIAN et al., 2018; LI et al., 2019), catálise (WANG et al., 2011), bioimagem (SELVI et al., 2008; GUO et al., 2008), entre outras.

A CHT é uma técnica simples e de baixo custo, na qual um material precursor é colocado em uma autoclave, utilizando preferencialmente água como solvente. A autoclave é aquecida até a temperatura desejada (geralmente na faixa de 150°C a 350°C), onde a pressão é autogerada, devido à vaporização da água. O produto sólido formado no processo recebe o nome de hydrochar (JAIN et al., 2016; NIZAMUDDIN et al., 2017).

Uma maior utilização dos hydrochars em diversas aplicações é prejudicada em virtude de sua baixa área superficial e porosidade. Para superar esses inconvenientes, uma alternativa viável seria a utilização dos hydrochars como precursores para a produção de carvões ativados (JAIN et al., 2016). Estudos recentes vêm demonstrando que as reações que ocorrem na CHT podem aumentar o conteúdo de grupos funcionais oxigenados (GFOs) da biomassa, dando origem a um precursor altamente reativo e eficaz para a produção de carvões ativados quimicamente (JAIN et al., 2016; ISLAM et al., 2017; HUANG et al., 2019).

Os carvões ativados são materiais carbonáceos que apresentam boa estabilidade química, elevada área superficial BET e porosidade altamente desenvolvida, além de apresentar diversos grupos funcionais em sua superfície (BRITO et al., 2017, AHMED et al., 2017). As propriedades adsorptivas e a reatividade dos carvões ativados estão diretamente relacionadas aos grupamentos químicos presentes na sua estrutura. Os principais grupos funcionais responsáveis por essas características são os oxigenados, tais como, carboxilas, carbonilas, hidroxilas e fenóis, entre outros. Esses grupamentos estão naturalmente presentes no material precursor ou podem ser adicionados no momento da síntese (SHAFEEYAN et al., 2010). Além dessas características, a elevada porosidade e área superficial são essenciais para um melhor desempenho do carvão ativado nas diversas aplicações (JAIN et al., 2016), como no tratamento de efluentes (KONG et al., 2013), adsorção de

biomoléculas (PEREIRA et al., 2014), processos de purificação e separação de biomoléculas (HU; LU; MEISNER, 2008), entre outros. Outra aplicação promissora para os carvões ativados é sua utilização como suporte para a imobilização de enzimas (GIRALDO; MORENO-PIRAJÁN, 2012; BRITO et al., 2017; SANTOS et al., 2019).

A utilização de enzimas imobilizadas apresenta diversas vantagens quando comparadas com as enzimas livres. O aumento da estabilidade operacional, a possibilidade de reutilização do biocatalisador, a retenção da atividade catalítica por um maior período de tempo, a possibilidade de conduzir processos em modo contínuo, a facilidade de separação do catalisador e do produto da reação e a interrupção da reação quando se atinge um determinado grau de conversão são algumas das vantagens (BRADY; JORDAAN, 2009; GONÇALVES et al., 2019), garantindo assim uma maior aplicação das enzimas em diversos processos industriais (GONÇALVES et al., 2019).

Entre os principais métodos de imobilização de enzimas em suportes, destacam-se a adsorção física e a ligação covalente. Na adsorção física a enzima é imobilizada em um suporte sólido por ligações de baixa energia, tais como ligações de hidrogênio, forças de van der Waals, interações eletrostáticas ou interações hidrofóbicas (GONÇALVES et al., 2019). Já na adsorção por ligação covalente ocorre a formação de ligações fortes entre a enzima e o suporte (SANTOS et al., 2019).

Dentre as enzimas com potencial de aplicação na forma imobilizada estão as lipases (ANGAJALA et al., 2016). Devido à sua versatilidade, tais enzimas estão entre as mais utilizadas industrialmente (JAVED et al., 2018). As lipases destacam-se pela sua estabilidade à diversas condições operacionais do meio reacional, além de reconhecer uma ampla variedade de substratos (RIOS et al., 2018). Podem ser utilizadas como catalisador de uma variedade de reações, como hidrólises, esterificações, aminólise, transesterificações, alcoólise, acidólise, entre outras (RIOS et al., 2018). Tais características permitem a sua utilização na indústria de alimentos, oleoquímica, farmacêutica, na formulação de detergentes, na síntese de biosurfactantes, no tratamento de efluentes, na síntese de ésteres aromáticos, entre outras (JAVED et al., 2018).

Diante do exposto, o objetivo desse trabalho foi a síntese de carvões ativados a partir do caroço de tamarindo e sua utilização na imobilização de lipases. Para tanto, o trabalho foi dividido em três partes.

Na primeira parte deste trabalho foi feita uma revisão de literatura sobre os temas necessários, visando à aquisição de conhecimento teórico suficiente para subsidiar as discussões subsequentes, além da definição dos principais objetivos deste trabalho. Na segunda parte foi avaliado o efeito da carbonização hidrotérmica nas características físicas, químicas, texturais e morfológicas dos carvões ativados e sua utilização para a imobilização da lipase pancreática do porco. Na terceira parte foi avaliado o efeito da funcionalização com o glutaraldeído nas propriedades físicas químicas e

texturais dos carvões. Os carvões produzidos foram utilizados como suportes para a imobilização da lipase pancreática do porco, onde as melhores condições de imobilização e de hidrólise para os diferentes suportes foram determinadas. Por fim, tais biocatalisadores foram utilizados na síntese do butirato de butila.

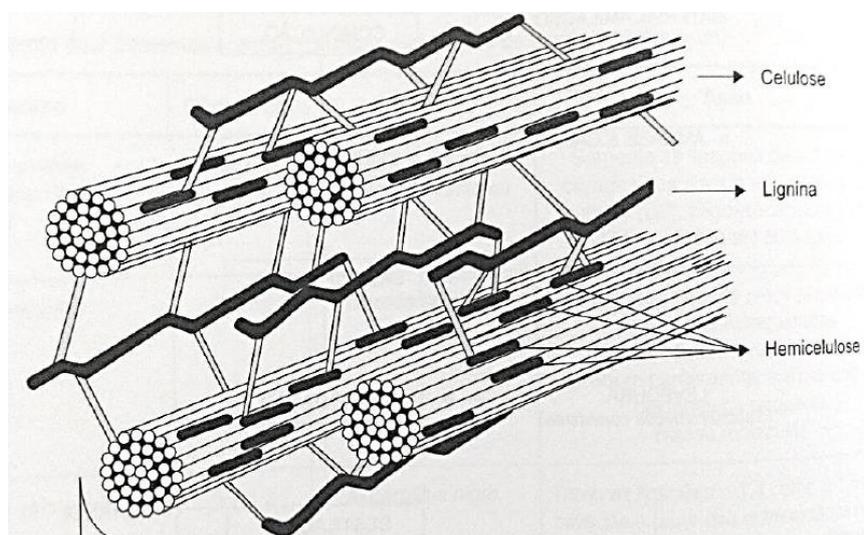
## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Biomassa lignocelulósica

Biomassa é definida como qualquer material orgânico obtido a partir de plantas e animais que possui luz solar armazenada na forma de energia química e pode ser classificada como lignocelulósica e não-lignocelulósica. As biomassas não-lignocelulósicas são, geralmente, lodo de esgoto e esterco animal e contém em sua composição ácidos graxos, proteínas e pequenas quantidades de hemicelulose, celulose e lignina (ACHINAS et al., 2017). Já os principais componentes da biomassa lignocelulósica são hemicelulose, celulose e lignina, além de pequenas quantidades de água e cinzas (ACHARYA et al., 2012).

A composição da biomassa lignocelulósica depende do tipo de matéria-prima, do estágio vegetativo, das condições climáticas, entre outros fatores, contendo aproximadamente 20%-40% de hemicelulose, 40%-60% de celulose e 10%-15% de lignina. Tais materiais apresentam uma estrutura dura e fibrosa na qual os polissacarídeos celulose e hemicelulose estão fortemente ligados com a lignina por meio de ligações covalentes e de hidrogênio (HEIDARI et al., 2019). A estrutura típica de uma biomassa lignocelulósica é mostrada na Figura 1.

**Figura 1.** Estrutura geral de uma biomassa lignocelulósica.



Fonte: Shleser et al. (1994).

A celulose, a hemicelulose e a lignina apresentam diferentes temperaturas de decomposição quando submetidas ao tratamento térmico. A hemicelulose usualmente se decompõe em cerca de 160 °C em e na faixa entre 200 °C e 300 °C em condições ambientais. A celulose inicia sua decomposição em cerca de 180 °C a 200 °C em água subcrítica e na faixa de 300 °C a 400 °C em condições ambientais. Já a lignina apresenta a maior resistência ao tratamento térmico, iniciando sua

decomposição em 220 °C em água subcrítica e em cerca de 600 °C em condições ambientais (HEIDARI et al., 2019).

Os materiais lignocelulósicos são os resíduos agroindustriais mais abundantes da biosfera, (ABIOYE; ANI, 2015). Entre as fontes de biomassa lignocelulósica estão os resíduos de colheitas, madeiras de árvores, resíduos celulósicos, biomassa herbácea e resíduos sólidos municipais, tais como resíduos de podas e aparas de grama (CARDONA et al., 2010).

A economia brasileira é fortemente baseada na agricultura, fazendo que o país produza uma quantidade expressiva de resíduos lignocelulósicos. No ano de 2005 o país produziu 558 milhões de toneladas de biomassa lignocelulósica, com uma projeção de crescimento para 1,402 bilhão de toneladas até o ano de 2030. Diante disso, o processamento desses materiais seria bastante vantajoso do ponto de vista econômico e ambiental (MORAES et al., 2017).

Grandes quantidades de biomassa lignocelulósica são descartadas inadequadamente, queimadas ou depositadas em aterros, constituindo graves problemas ambientais relacionados à contaminação das águas e dos solos, além da poluição atmosférica (GONÇALVES et al., 2013; MENDES et al., 2015). Desta forma, agregar valor a esses resíduos gerados em abundância é objetivo de muitas tecnologias propostas atualmente. Uma das biomassa lignocelulósica que vem sendo estudada nos últimos anos, visando um melhor aproveitamento e uma diminuição dos resíduos gerados pelas indústrias é o caroço de tamarindo (HUANBUTTA et al., 2019; ALPIZAR-REYES et al., 2020; SAMANTA et al., 2020).

## **2.2. Caroço de tamarindo (*Tamarindus indica*)**

O Tamarindeiro (*Tamarindus indica* L.), é uma árvore frutífera pertencente à classe *Dicotyledonae*, da família *Leguminosae*, originária da África Equatorial, de onde se dispersou para regiões tropicais e subtropicais. É uma árvore bastante decorativa, porém de crescimento lento, podendo alcançar até 30 m de altura, diâmetro de copa de 12 m e circunferência de tronco de 7 m e, sob condições favoráveis, chegar aos 200 anos de vida (SANTOS-SEREJO; BARBOSA; LUNA, 2009).

No Brasil, as plantas foram introduzidas a partir da Ásia, mostrando-se naturalizadas e subespontâneas em vários estados, além de serem cultivadas em quase toda região do país, devido à sua beleza e produção de sombra. Mesmo não sendo nativo do Nordeste, é considerada uma planta frutífera típica da região, sendo uma árvore economicamente importante que se desenvolve largamente em regiões tropicais úmidas, subtropicais ou áridas, sendo uma cultura ideal para regiões semiáridas, especialmente em áreas com seca de até 5 a 6 meses. A árvore do tamarindo apresenta

sistema radicular profundo, possuindo resistência à secas prolongadas (SILVA et al., 2000; COSTA et al., 2012).

O tamarindo, nome dado ao fruto do tamarindeiro, é uma vagem alongada, com 5 a 15 cm de comprimento, casca pardo-escura, lenhosa e quebradiça, contendo de 1 a 5 sementes lisas, marrom-escuras e achatadas, envolvidas por uma polpa parda, fibrosa e de sabor ácido-adocicado. O peso médio do fruto varia entre 10 e 15 g, consistindo em polpa (30%), casca e fibras (30%) e caroços (40%). Sua disponibilidade é sazonal e no Brasil ocorre, principalmente, na época seca do ano (julho a outubro), mas pode estar no mercado durante todo o ano na forma de polpa congelada (PEREIRA et al., 2011; GARCÍA et al., 2012). Na Figura 2, observa-se imagens do fruto e dos caroços do tamarindo.

**Figura 2.** Fruto e caroço do tamarindo



Fonte: Leal et al., 2016.

Os caroços de tamarindo geralmente são descartados sem nenhum aproveitamento tecnológico na maioria das pequenas propriedades produtoras, gerando resíduos. Dessa forma, surge a necessidade de estudos que busquem um melhor aproveitamento dos mesmos. Uma alternativa que pode ser utilizada para o aproveitamento de resíduos agroindustriais, produzindo materiais carbonáceos de alto valor agregado com diversas possibilidades de aplicação, é a utilização da carbonização hidrotérmica (JAMARI et al., 2012; HUANG et al., 2019).

### **2.3. Carbonização hidrotérmica de biomassa lignocelulósica**

Nos últimos anos o uso da carbonização hidrotérmica (CHT) para a conversão de resíduos de biomassa em materiais carbonáceos valiosos tem recebido crescente atenção (NIZAMUDDIN et al., 2017; HUANG et al., 2019). Isso se deve à sua simplicidade e capacidade de produzir materiais com

características atrativas que promovem a utilização eficiente dos mesmos para uma variedade de aplicações, tais como: adsorção (PALA et al., 2015), catálise (WANG et al., 2011), síntese de carvões ativados (SEVILLA et al., 2011a; SEVILLA et al., 2011b; JAIN et al., 2014; ROMERO-ANAYA et al., 2014), entre outros. A utilização de resíduos de biomassa lignocelulósica para a produção desses materiais é uma alternativa para o gerenciamento de resíduos sólidos, que além de reduzir custos de matérias-primas, podem ser adaptados para diferentes aplicações (JAIN et al., 2016).

O primeiro relato de utilização do termo carbonização hidrotérmica (CHT) ocorreu em 1913, quando Bergius e Specht, com o objetivo de simular o processo natural de formação do carvão, utilizaram uma mistura de celulose e água aquecida em um vaso fechado com temperaturas de operação variando entre 250°C e 310°C, obtendo materiais com alto teor de carbono, apresentando sucesso no processo de conversão. Tal estudo rendeu a Bergius o prêmio Nobel em química no ano de 1931, em reconhecimento de suas contribuições para a invenção e desenvolvimento de métodos químicos de alta pressão (ANTERO, 2015).

Em 1931, Berl e Schmidt realizaram um estudo mais sistemático, ao utilizar a CHT em diversos sacarídeos nas temperaturas entre 150°C e 350°C e observaram que a temperatura afetou diretamente a conversão das biomassas em produtos carbonáceos (JAMARI et al., 2012). No ano de 1960, Schuhmacher, Huntjens e van Krevelen analisaram a influência do pH na reação de CHT e observaram grandes diferenças na composição dos produtos formados (TITIRICI et al., 2007). Posteriormente, diversos outros trabalhos foram sendo realizados, investigando a utilização da CHT apenas em substâncias puras, como sacarídeos e celulose (WANG et al., 2001; SUN; LI, 2004; TITIRICI et al., 2008).

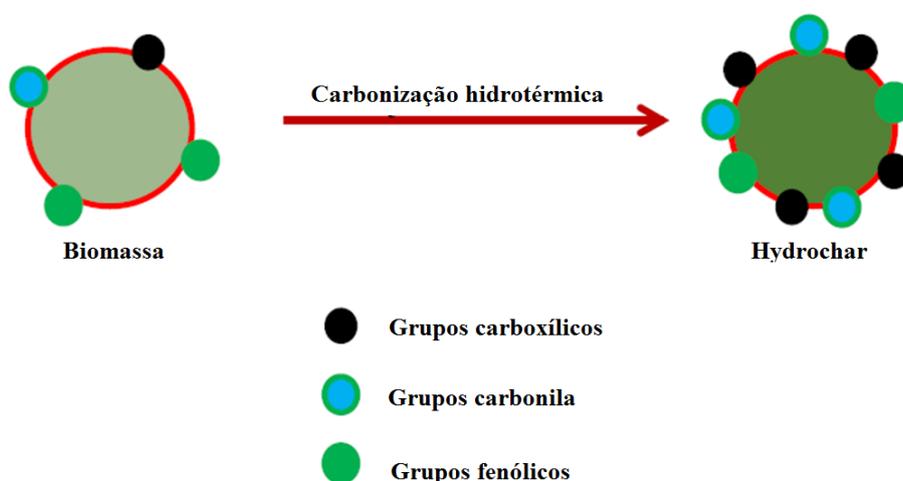
O primeiro trabalho que relatou a aplicação da CHT em biomassa lignocelulósica foi o realizado por Titirici et al. (2007), ao utilizar tal processo em cascas de laranja e agulha de pinheiro. A composição química e as características estruturais dos materiais produzidos mostraram-se similares as dos materiais obtidos utilizando substâncias puras (tais como sacarídeos e celulose), sugerindo eficiência do processo de conversão em produtos carbonáceos. Posteriormente, diversos trabalhos vêm relatando a utilização de CHT em diferentes fontes de biomassa (TITIRICI; ANTONIETTI, 2010; SEVILLA et al., 2011a; SEVILLA et al., 2011b; SUN et al., 2014; GALLIFUOCO et al., 2017; PARK et al., 2018; MARIN-BATISTA et al., 2019).

Basicamente, a CHT é uma técnica de conversão termoquímica na qual um material precursor é colocado em uma autoclave, utilizando preferencialmente água como solvente. A autoclave é aquecida até a temperatura desejada (geralmente na faixa de 150°C a 350°C), onde a pressão é autogerada, devido à vaporização da água (FIORI et al., 2014; JAIN et al., 2016). Durante a CHT, a água atua como solvente e, em altas pressões, também como catalisador, facilitando a hidrólise e

clivagem da biomassa lignocelulósica. Em altas temperaturas, a água apresenta um alto grau de ionização. No processo de CHT, é observada uma redução no pH do meio causada pela formação de ácidos orgânicos. A presença desses ácidos promove a hidrólise e decomposição de monômeros e oligômeros em fragmentos menores (JAIN et al., 2016).

Um procedimento típico de CHT emprega um tubo de teflon, um reator de aço-inox (autoclave) e um forno tipo mufla. Também é possível empregar reatores comerciais fechados com agitação mecânica (VIEIRA, 2016). O principal produto gerado é um sólido que recebe o nome de hydrochar, porém, também são formados subprodutos líquidos (solúveis em água) e gasosos (principalmente CO<sub>2</sub>) (FIORI et al., 2014). O hydrochar formado apresenta composição química e aparência física diferente da matéria-prima. Tais diferenças podem ser explicadas pelas reações que ocorrem durante a CHT, que incluem hidrólise, desidratação, descarboxilação, aromatização e recondensação (FANG et al., 2018). Essas reações conferem ao hydrochar um alto teor de grupos funcionais oxigenados (GFOs) em sua estrutura (JAIN et al., 2016), conforme ilustrado na Figura 3.

**Figura 3.** Formação de GFOs durante a CHT.



Fonte: Jain et al., 2016.

Uma maior utilização dos hydrochars em diversos processos químicos é prejudicada devido à baixa área superficial e porosidade de sua estrutura (FALCO et al., 2013). Para superar esses inconvenientes, uma alternativa viável seria a utilização dos hydrochars como precursores para a produção de carvões ativados (JAIN et al., 2016). Estudos vêm demonstrando que o alto teor de GFOs fazem do hydrochar um precursor altamente reativo e eficaz para a produção de carvões ativados quimicamente, com características atrativas (valores elevados de área superficial BET e

presença de grupos funcionais oxigenados), para diversas aplicações (FUERTES et al., 2015; SEVILLA et al., 2017; HUANG et al., 2019).

#### **2.4. Carvão ativado**

O termo carvão ativado é referido a um material carbonáceo caracterizado por apresentar estabilidade química, elevada área superficial BET ( $> 700 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$ ), alto volume de microporos, porosidade altamente desenvolvida, além de possuir diversos grupos funcionais em sua superfície (BRITO et al., 2017; AHMED et al., 2017). Devido a estas características este material é considerado um adsorvente versátil, tendo aplicação em diversas áreas, como no tratamento de efluentes (KONG et al., 2013), adsorção de biomoléculas (PEREIRA et al., 2014), suporte catalítico (GIRALDO; MORENO-PIRAJÁN, 2012), processos de purificação e separação de biomoléculas (HU; LU; MEISNER, 2008), entre outros.

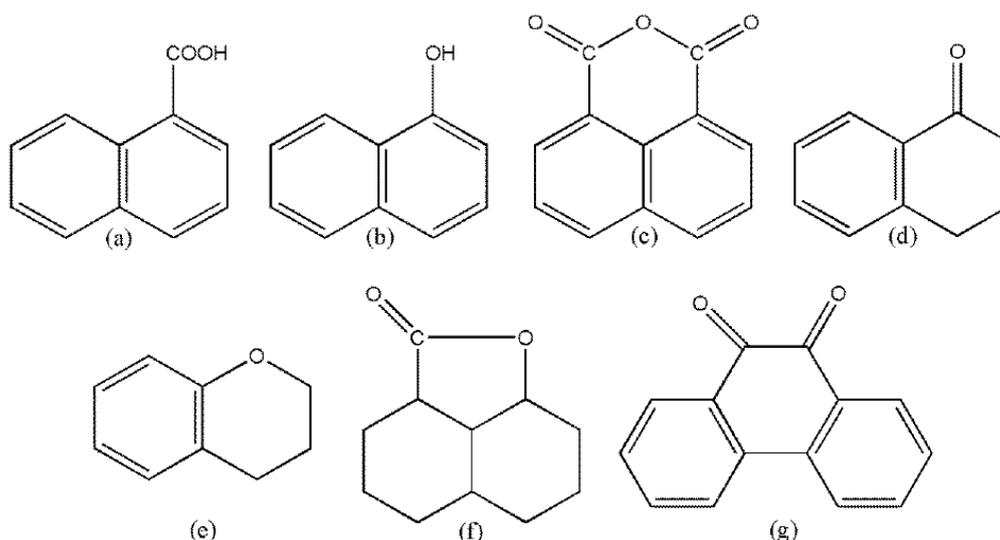
As características químicas dos carvões ativados são determinadas pela heterogeneidade de grupos funcionais em sua superfície, estando diretamente relacionada com a presença de heteroátomos, ou seja, átomos que estão presentes na cadeia carbônica não sendo carbono ou hidrogênio, podendo ser nitrogênio, enxofre, fósforo e oxigênio, encontrando-se na forma simples ou como grupos funcionais. O tipo e a quantidade desses elementos são naturalmente derivados da natureza do material precursor, ou podem ser introduzidos durante o processo de síntese do carvão. O oxigênio é o principal heteroátomo que aparece na rede de carbono, estando presente principalmente na forma de grupos funcionais, que incluem carboxilas, carbonilas, hidroxilas, fenóis, lactonas, quinonas, entre outros. As propriedades adsorptivas e a reatividade dos carvões são significativamente influenciadas por esses grupos (SHAFEEYAN et al., 2010; BHATNAGAR et al., 2013).

Na Figura 4, pode-se observar as estruturas dos grupos funcionais oxigenados comumente presentes nas superfícies dos carvões ativados.

A carbonização e a ativação representam duas etapas básicas da produção dos carvões ativados (ABBAS; AHMED, 2016). Estas etapas podem ocorrer simultaneamente ou em dois momentos distintos. A carbonização tem por objetivo reduzir o teor de compostos voláteis do material precursor por decomposição pirolítica (atmosfera inerte), liberando moléculas pequenas e alcatrões, por exemplo (YAHYA et al., 2015). Nessa etapa, o produto formado apresenta um alto teor de carbono, mas com baixa área superficial e porosidade. Conseqüentemente, a etapa de ativação é requerida para desenvolver a porosidade e melhorar a estrutura do material, resultando em um sólido altamente poroso conhecido como carvão ativado (AHMED et al., 2017). O desenvolvimento dos poros no processo de ativação pode ser dividido em três fases: abertura dos poros anteriormente

inacessíveis; desenvolvimento de novos poros por ativação seletiva; e alongamento dos poros existentes (LI et al., 2008).

**Figura 4.** Possíveis estruturas dos grupos funcionais oxigenados presentes na superfície dos carvões ativados. (a) grupos carboxílicos; (b) grupos fenólicos; (c) anidridos carboxílicos; (d) grupo carbonila; (e) grupo éter; (f) lactonas; (g) quinonas



Fonte: Rovani (2015).

As etapas de produção de carvões ativados podem ser realizadas basicamente por dois métodos: ativação física e ativação química. Na ativação física as etapas ocorrem em dois momentos distintos: carbonização do material precursor sob atmosfera inerte em temperaturas na faixa de 400°C a 800°C e ativação do produto resultante em temperaturas mais elevadas (800°C a 1100°C) utilizando agentes ativantes, como CO<sub>2</sub>, vapor d'água, ar ou a mistura desses (RIBAS et al., 2014; BRITO et al., 2017).

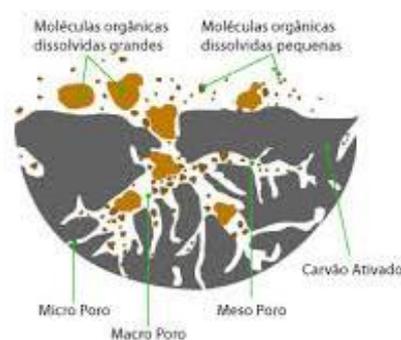
A ativação química consiste na impregnação do material precursor com agentes ativantes, como ácido fosfórico (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>), hidróxido de sódio (NaOH), hidróxido de potássio (KOH), cloreto de zinco (ZnCl<sub>2</sub>), entre outros (BRITO et al., 2017). Esses agentes químicos atuam como desidratantes e oxidantes, promovendo a decomposição do material carbonáceo, induzindo a carbonização e aromatização do carbono, além de inibir a formação do alcatrão, aumentando o rendimento do carvão formado (MIAO et al., 2013). Após a impregnação com agentes ativantes uma estrutura de poros é criada por uma ativação térmica. Neste tipo de ativação, a carbonização e a ativação são realizadas em uma única etapa (LIU et al., 2010; CHEN et al., 2011).

Algumas vantagens apresentadas pela ativação química quando comparada à física são: maior rendimento do produto formado, menor tempo de ativação e menor temperatura de síntese, além de possibilitar a obtenção de carvões com uma estrutura porosa mais desenvolvida e incorporação de

grupos funcionais na superfície (CHEN et al., 2011; BRITO et al., 2018). A principal desvantagem da ativação química é a necessidade de lavagem do material obtido após o tratamento térmico para completa remoção do agente ativante (FU et al., 2013).

Uma vez ativados, os carvões apresentam uma porosidade interna comparável a uma rede de túneis que se bifurca em canais menores, e assim sucessivamente. A estrutura de um carvão ativado pode ser representada como lâminas de anéis aromáticos, com espaços entre as mesmas, que são os poros formados durante a sua produção (CLAUDINO et al., 2003). Tal estrutura está representada na Figura 5.

**Figura 5.** Representação da estrutura porosa de um carvão ativado.



Fonte: MAMEDES et al., 201t.

Todos os carvões ativados possuem macroporos (diâmetro  $> 50$  nm), mesoporos (diâmetro entre 2 nm e 50 nm) e microporos (diâmetro  $< 2$  nm) em sua estrutura, com a proporção relativa entre os tamanhos variando consideravelmente de acordo com o precursor e o processo de produção utilizados (CLAUDINO, 2003; SIMON; GOGOTSI, 2010).

A princípio, qualquer material carbonáceo pode ser utilizado para produção de carvão ativado, mas as suas propriedades variam de acordo com a matéria-prima utilizada e com o método de ativação. Os materiais comumente utilizados para a síntese dos carvões ativados são caros e não renováveis, como resíduos de petróleo, carvão natural e madeira (AHMED et al., 2017). Nos últimos anos, os resíduos agrícolas têm sido considerados precursores importantes para a produção de carvões ativados, por serem matérias primas de baixo custo e renováveis (BRITO et al., 2018; XUE et al., 2018; MANOJ et al., 2019). Além disso, devido à composição desses resíduos apresentarem um elevado teor de compostos voláteis, a sua ativação resulta na formação de carvões ativados altamente porosos, no qual a elevada área superficial facilita o seu desempenho como adsorventes (GUPTA et al., 2011; JAIN et al., 2016).

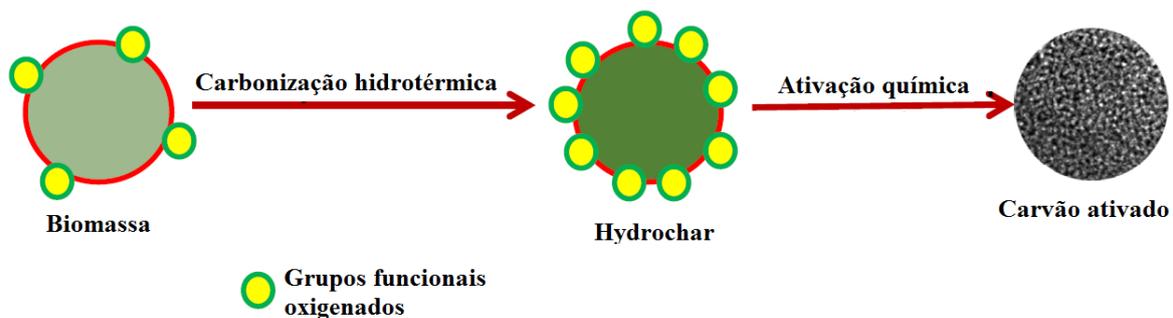
Diversos trabalhos têm sido feitos visando melhorar as características superficiais dos carvões ativados, utilizando diferentes agentes de ativação química, otimizando as condições de ativação

(temperatura, taxa de aquecimento, razão de impregnação, entre outras) ou utilizando métodos de pré-tratamento, tais como imersão ou agitação (JAIN et al., 2016). Porém, poucos estudos verificaram influência dos grupos funcionais dos materiais precursores nas características texturais e químicas dos carvões ativados (SEVILLA et al., 2011a; SEVILLA et al., 2011b; FALCO et al., 2013). Sabe-se que um alto conteúdo de grupos funcionais oxigenados (GFOs) na superfície resulta em precursores altamente reativos, auxiliando em um desenvolvimento eficiente da porosidade de carvões ativados (SEVILLA et al., 2011a; FALCO et al., 2013; JAIN et al., 2014).

## 2.5. Utilização de hydrochars para a síntese de carvões ativados

A CHT tem sido utilizada em materiais lignocelulósicos, devido ao seu potencial de produzir hydrochar com alto teor de GFOs, tornando-o um precursor eficaz para ser utilizado na síntese de carvões ativados (Figura 6) (SEVILLA et al., 2011a; SEVILLA et al., 2011b; JAIN et al., 2016).

**Figura 6.** Formação de hydrochar e ativação química eficiente devido ao elevado teor de GFOs.



Fonte: Jain et al., 2016

Sevilla et al. (2011a) foram os primeiros pesquisadores a realizar a ativação química utilizando um hydrochar como precursor. Nesse estudo, foram produzidos hydrochar a partir de fufural, glicose, amido, celulose e serragem de eucalipto, no qual o hidróxido de potássio (KOH) foi utilizado como agente de ativação química. A carbonização foi realizada na temperatura de 700°C e razão de 1:4 (massa do hydrochar/massa do KOH). Os carvões obtidos a partir de todas as fontes utilizadas apresentaram uma elevada área superficial (até 2700 m<sup>2</sup>.g<sup>-1</sup>), grande volume de poros (~1cm<sup>3</sup>.g<sup>-1</sup>) e distribuição de tamanho de poros na faixa de 0,7 a 2 nm (microporos).

Falco et al. (2013) produziram hydrochars a partir de um monossacarídeo (glicose), um polímero (celulose) e uma biomassa lignocelulósica (palha de centeio) utilizando diferentes temperaturas de CHT (180°C, 240°C e 280°C). Posteriormente, carvões ativados foram obtidos utilizando KOH como agente de ativação química nas mesmas condições de síntese. Os autores verificaram que independente da fonte, carvões ativados altamente porosos foram produzidos. A

temperatura de CHT foi considerada um parâmetro muito importante no desenvolvimento da porosidade e na área superficial dos carvões produzidos. Os precursores tratados hidrotêrmicamente a 180°C e 240°C levaram ao aumento na porosidade e área superficial dos carvões produzidos. Porém, ao se utilizar a temperatura de 280°C foi observada uma diminuição nesses parâmetros.

Jain et al. (2014) relataram que o pré-tratamento hidrotérmico em cascas de coco promoveram a síntese de hydrochar com maior teor de GFOs levando a formação de um carvão com área superficial até 67% maior em comparação com o carvão obtido sem CHT. Entretanto, foi também observado que a formação de GFOs depende das condições de CHT.

Sevilla et al. (2017) relataram a utilização de hydrochar obtidos a partir de serragem de eucalipto como precursor para a síntese de carvões ativados utilizando uma mistura de oxalato de potássio e melamina em pó como ativantes químicos. As razões de impregnação e temperaturas de ativação foram variadas. Os carvões produzidos apresentaram elevadas áreas superficiais (até 3000 m<sup>2</sup>.g<sup>-1</sup>) e volumes de poros de 1,3 a 1,6 cm<sup>3</sup>.g<sup>-1</sup>. Os autores concluíram que as variações das condições exercem influência nas propriedades dos carvões produzidos.

Huang et al. (2019) aplicaram a carbonização hidrotérmica em brotos de bambu secos e triturados, utilizando ácido sulfúrico como catalisador da reação de carbonização. O hydrochar formado foi utilizado como precursor para a produção de carvões ativados. Os carvões produzidos apresentaram áreas superficiais de até 3250 m<sup>2</sup>.g<sup>-1</sup>.

Os carvões ativados produzidos a partir de hydrochars têm sido utilizados para uma variedade de aplicações, tais como materiais para supercapacitores (JAIN et al., 2015b; SEVILLA et al., 2017), adsorção de corantes (JAIN et al., 2014; ISLAM et al., 2017), captura e armazenamento de gases (FALCO et al., 2013), entre outros. Considerando a elevada área superficial e porosidade bem desenvolvida, além dos grupos funcionais presentes em sua superfície, os carvões ativados apresentam potencial para serem utilizados como suporte voltado à imobilização de enzimas.

## **2.6. Imobilização de enzimas**

Enzimas são proteínas que catalisam reações químicas com alta especificidade e seletividade em condições suaves, como temperatura ambiente, pH fisiológico e ambiente aquoso (BILAL et al., 2018; LIU et al., 2018). Os mecanismos de interação das enzimas com os substratos ocorrem por meio de diversos tipos de ligações, tais como ligações de hidrogênio, interações de Van der Waals, interações eletrostáticas, ligações covalentes, entre outras (CARDOSO, 2009). Em virtude dessas características, essas biomoléculas são amplamente utilizadas em diversas aplicações, tais como: sínteses orgânicas (GUAN et al., 2015; MIAO et al., 2015), nas áreas química e de alimentos (DAS

et al., 2012; BILAL et al., 2017), nas áreas de saúde e farmacêutica (APETREI et al., 2013), entre outras.

Uma maior utilização de enzimas em aplicações industriais é prejudicada devido à impossibilidade de separação das mesmas dos substratos da reação, não permitindo assim a sua reutilização, aumentando o custo do seu uso. Diante disso, muitos pesquisadores sugerem que uma alternativa seria a imobilização de enzimas em suportes (LAURENT et al., 2008; TANG et al., 2014; YU et al., 2015).

A imobilização de enzimas pode ser definida como o confinamento de enzimas livres em uma matriz ou suporte diferente de um substrato ou produto. Tal técnica supera a maioria das restrições da utilização de enzimas livres em processos industriais, tais como, estabilidade térmica, estabilidade em baixos valores de pH, perda da atividade catalítica após a sua utilização, inibição da enzima por substratos ou produtos e perda da enzima durante a separação do produto (VAZ; MOREIRA; FILHO, 2016; GONÇALVES et al., 2019), o que é um atrativo para a aplicação das mesmas no setor industrial (BRADY; JORDAN, 2009; JORDAN et al., 2011).

Do ponto de vista comercial, as principais vantagens da utilização de enzimas imobilizadas são o aumento da estabilidade operacional, a possibilidade de reutilização do biocatalisador, a retenção da atividade catalítica por um maior período de tempo, a possibilidade de conduzir processos em modo contínuo, a facilidade de separação do catalisador e do produto da reação e a interrupção da reação quando se atinge um determinado grau de conversão (BRADY; JORDAN, 2009; GONÇALVES et al., 2019).

Porém, durante o processo de imobilização, deve-se atentar para questões como: mudanças conformacionais da estrutura da enzima que levem a sua imobilização numa forma inativa; perda da atividade catalítica e perdas mássicas de enzima por meio da lixiviação; efeitos difusionais ou de transferência de massa, em decorrência de limitações do acesso do substrato à enzima e do produto para o seio da solução; e o custo da imobilização, que deve ser compensado pela vida útil do biocatalisador (MATEO et al., 2007).

Uma variedade de materiais sólidos orgânicos (REBROŠ et al., 2007; KIM et al., 2009; SHU et al., 2011; CHAUHAN, 2014) ou inorgânicos (LAMMIRATO et al., 2010; YU et al., 2015) têm sido utilizados como suporte para a imobilização de enzimas. No entanto, em muitos materiais o processo de imobilização resulta na perda ou diminuição da atividade catalítica da enzima, o que acaba inviabilizando o processo (LI et al., 2016).

Diversos trabalhos têm sido realizados com o objetivo de realizar a imobilização de enzimas em suportes que mantenham a atividade catalítica da mesma após a imobilização. Segundo Li et al. (2016), os materiais porosos apresentam-se como uma alternativa para a manutenção dessa atividade.

Além disso, esses tipos de suporte apresentam a vantagem adicional de possibilitar a imobilização da enzima na superfície interna (interior dos poros), aumentando a massa de biocatalisador imobilizado (DALLA-VECCHIA et al., 2004; HWANG et al., 2004; CAO, 2005).

Entre os materiais porosos utilizados como suporte pode-se citar as sílicas (LI et al., 2016), o dióxido de titânio (WU et al., 2016), as membranas poliméricas (QIAO et al., 2016), entre outros. Além desses, alguns trabalhos têm sido realizados para a imobilização de enzimas em carvões ativados (RAMANI et al., 2010; BRITO et al., 2017).

### ***2.6.1. Métodos de imobilização***

Os métodos de imobilização de enzimas mais utilizados são a adsorção, a ligação covalente, a ligação cruzada e o confinamento (LIU et al., 2018).

#### ***Adsorção***

A adsorção é um método simples e eficiente para a imobilização de enzimas. Nesse método, a enzima é imobilizada em um suporte sólido por ligações de baixa energia, tais como ligações de hidrogênio, forças de van der Waals, interações eletrostáticas ou interações hidrofóbicas (GONÇALVES et al., 2019).

O método apresenta como vantagem o fato de ser simples e barato, além do fato da enzima não necessitar ser pré-tratada ou quimicamente modificada. Além disso, as condições de imobilização são poucos prejudiciais para as enzimas, preservando ao máximo sua atividade catalítica. No entanto, as interações entre a enzima e o suporte são fracas e reversíveis, resultando na fraca estabilidade das enzimas imobilizadas, acarretando em perdas por lixiviação com consequente contaminação do substrato (CARVALHO et al., 2006, LIU et al., 2018).

#### ***Ligação Covalente***

Na ligação covalente os átomos são ligados por meio de compartilhamento de pares de elétrons, resultando em uma forte interação entre dois biocatalisadores ou entre um biocatalisador e um suporte (CAO, 2005). Este tipo de ligação é comumente utilizado para imobilização de enzimas (LIU et al., 2018). Nesse tipo de mecanismo, ligações covalentes são formadas por meio de interações químicas entre os grupos reativos existentes no suporte e os grupos funcionais presentes na cadeia lateral dos aminoácidos que formam a enzima, tais como lisina, cisteína, ou resíduos de ácido aspártico e glutâmico (CIRILLO et al., 2014). Os grupos amino, carboxil e hidroxil são alvos preferenciais de ligação, por serem abundantes nas proteínas em geral (ARROYO, 1998).

O uso da ligação covalente para imobilização de enzimas possui como vantagens a ligação forte entre a enzima e o suporte, a fácil interação enzima/substrato devido à localização superficial do catalisador, o aumento da termoestabilidade em decorrência da forte interação com o suporte e o aumento da estabilidade operacional (por exemplo, resistência às forças de cisalhamento), tornando mais flexível à escolha do reator a ser empregado (CAO, 2005).

Contudo, nesse tipo de imobilização têm-se como desvantagens a susceptibilidade de estruturas ativas da enzima aos reagentes utilizados e/ou às tensões conformacionais impostas pela união forçada a um material estranho (suporte), a dificuldade de se estabelecer as melhores condições de imobilização e a possibilidade de redução da atividade catalítica (GROBOILLOT et al., 1994; CAO, 2005).

### ***Aprisionamento***

A imobilização por meio de confinamento em matrizes poliméricas porosas normalmente envolve a polimerização in situ da matriz porosa em torno dos biocatalisadores a serem imobilizados. Neste sistema criam-se “celas” delimitadas por uma membrana porosa na qual as enzimas ou células ficam confinadas (VILLENEUVE et al., 2000). Várias matrizes podem ser utilizadas para o aprisionamento de enzimas, tais como quitosana, alginato de cálcio, poliacrilamida, gelatina, poliuretano, ágar, entre outros (LIU et al., 2018).

A principal vantagem da utilização desta técnica é que a enzima não interage quimicamente com o polímero, evitando assim sua desnaturação e preservando sua atividade catalítica. A principal desvantagem dessa técnica é que a velocidade de difusão dos substratos e produtos através da membrana pode ser baixa, sendo necessárias altas concentrações de substratos a fim de minimizar esta influência (VILLENEUVE et al., 2000).

### ***Ligações cruzadas***

Baseado nas reações intermoleculares, as enzimas são reticuladas ao suporte utilizando reagentes bifuncionais. O reagente mais utilizado para tal finalidade é o glutaraldeído. Nessa técnica, as enzimas são fortemente ligadas ao suporte, aumentando a estabilidade e melhorando a capacidade de reutilização. Entretanto, as enzimas podem diminuir suas atividades catalíticas durante a reação (LIU et al., 2018).

## 2.7. Lipases

Enzimas são classificadas de acordo com o substrato sobre o qual atuam ou o tipo de reação que catalisam. Desse modo, as lipases (E.C. 3.1.1.3) são enzimas pertencentes à classe das hidrolases que catalisam a hidrólise de triacilgliceróis para gerar ácidos graxos livres, diacilgliceróis, monoacilgliceróis e glicerol (GEOFFRY et al., 2018). Essas enzimas possuem a propriedade de catalisar essas reações em meio aquoso e não aquoso (JAVED et al., 2018).

O seu mecanismo de ação é baseado nos sítios ativos presentes, formados pela tríade de aminoácidos serina-histidina-aspartato/glutamato, sendo necessária uma “ativação interfacial” para que se inicie a catálise (BON et al., 2008). Essa ativação é justificada pela estrutura tridimensional da lipase, pois seu sítio ativo é coberto por uma superfície entrelaçada, denominada de tampa (ou borda). Esta tampa move-se quando há ligação do substrato na superfície da enzima, alterando sua forma fechada para a forma aberta, fazendo com que o centro ativo fique acessível ao substrato e, ao mesmo tempo, expondo uma larga superfície hidrofóbica que facilita a ligação da lipase ao substrato (CASTRO et al., 2004).

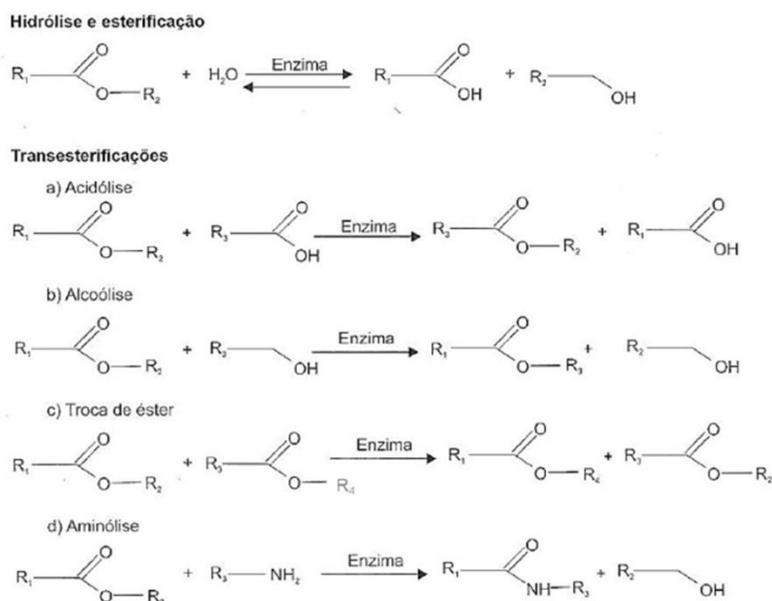
As lipases podem ser obtidas de fontes animais, vegetais e microbianas, sendo as de origem microbiana as mais utilizadas industrialmente (RAMAKRISHNAN et al., 2013). As de origem animal são obtidas, principalmente, do tecido estomacal de bovinos ou cordeiros, ou de tecidos pancreáticos de suínos, apresentando desvantagens quanto à sua utilização devido à presença de tripsina, resultando em aminoácidos com sabor amargo, além da presença de hormônios residuais dos animais (VAKHLU et al., 2006; TREICHEL et al., 2010). As lipases de origem vegetal são pouco exploradas comercialmente em função dos baixos rendimentos de catálise e dos processos envolvidos para extração (SOUISSI et al., 2009; FABISZEWSKA et al., 2014). Desta forma, lipases microbianas recebem atualmente mais atenção por causa de suas vantagens técnico-econômicas, apresentando baixo custo de produção, elevado rendimento de conversão de substrato em produto e versatilidade em adaptar-se às condições ambientais (SHU et al., 2010).

Dependendo da fonte, as lipases podem ter massa molecular variando entre 20 kDa a 75 kDa, com cerca de 300 resíduos de aminoácidos, atividade 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 entre 30 °C a 40 °C (PACKTER, 1994; JAEGER; REETZ, 1998). Essas enzimas não necessitam de cofatores e permanecem ativas em solventes orgânicos. O consumo de todos os monoglicerídeos, diglicerídeos, triglicerídeos e ácidos graxos livres no processo de transesterificação, a alta produção em meio não aquoso, o baixo tempo de reação e a resistência a baixos valores de pH são características desejáveis dessas enzimas (JAVED et al., 2018).

Em condições naturais, as lipases atuam na interface do sistema bifásico óleo/água, na qual possuem sua atividade aumentada (VERGER, 1997; SHARMA et al., 2001). A atuação da lipase, durante a hidrólise de lipídios, é uma reação interfacial que ocorre na superfície bidimensional da micela e não no volume tridimensional da gotícula de óleo (VERGER, 1997). Por este motivo, reações lipolíticas envolvendo lipases não obedecem à cinética descrita pela equação de Michaelis-Menten, que somente pode ser seguida caso a reação ocorra em uma fase homogênea (JAEGER; REETZ, 1998).

As lipases destacam-se pela sua alta estabilidade e reconhecimento de uma ampla variedade de substratos. Devido a sua ampla especificidade aos substratos, elas são capazes de catalisar uma variedade de reações, tais como, esterificações, aminólise, transesterificações, alcoólises, acidólise, entre outras (RIOS et al., 2018). Observa-se na Figura 7 algumas das reações típicas catalisadas por lipases.

**Figura 7.** Reações catalisadas por lipases.



Fonte: Adaptado de Bon et al. 2008

A especificidade das lipases é uma de suas características mais importantes. De maneira geral, as lipases podem ser classificadas em relação à regiosseletividade, enantiosseletividade e quimiosseletividade (RIOS et al., 2018).

A regiosseletividade (especificidade posicional) refere-se à habilidade da enzima reconhecer a mesma ligação química em diferentes regiões do substrato. Em relação a regiosseletividade, as lipases podem ser subdivididas em 2 classes (CASTRO et al., 2004):

- Lipases 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 e glicerol, quanto monoacilgliceróis e diacilgliceróis como intermediários;
- Lipases 1,3 específicas: promovem a hidrólise de ácidos graxos das posições 1 e 3, formando produtos com composições diferentes daquelas obtidas pelas lipases não regioseletivas.

A quimiosseletividade refere-se à habilidade das lipases atuarem especificamente ou preferencialmente na hidrólise de ésteres de determinados ácidos graxos, em função do tamanho da cadeia carbônica ou do grau de insaturação (CASTRO et al., 2004).

A enantioseletividade é uma propriedade que se refere à habilidade das enzimas reagirem com um determinado isômero do substrato exclusivamente ou mais rapidamente do que com outros isômeros da mesma substância (KOBBLITZ, 2008).

Devido às suas propriedades catalíticas, as lipases estão entre as enzimas mais utilizadas em diversos setores industriais, tais como indústria de alimentos, oleoquímica, farmacêutica, na formulação de detergentes, na síntese de biosurfactantes, no tratamento de efluentes, entre outras (IFTIKHAR et al., 2012; KUMAR; KANWAR, 2012; ANANTHI et al., 2014; THAKUR et al., 2014).

## **2.8. Aplicação das lipases na indústria de alimentos**

Lipases apresentam aplicações em diversos setores da indústria de alimentos. Na indústria de laticínios elas são utilizadas para a hidrólise da gordura do leite, maturação do queijo, enriquecimento do aroma, lipólise da gordura da manteiga e produção de ésteres aromatizantes de queijo para produtos salgados e petiscos (JAVED et al., 2018).

A lipase obtida a partir do *Lactobacillus plantarum* é usada na síntese de diferentes produtos alimentícios fermentados, como massa azeda, azeitonas, salsichas vegetais e queijo (ESTEBAN-TORRES et al., 2015). Um produto análogo à manteiga de cacau é produzido por interesterificação catalisada por lipase de óleo de palma ou girassol. Além disso, a lipase pode ser utilizada para aumentar a vida de prateleira, sabores e propriedades reológicas de sucos de frutas, molhos, sopas queijos e alimentos assados. A vida de prateleira de diferentes produtos de panificação pode ser melhorada com a utilização de lipases. As fosfolipases também foram utilizadas no tratamento de gema de ovo para produção de maionese e vários emulsificantes (RAY, 2012).

Lipases também são utilizadas para produção de ésteres de aroma, como butirato de etila, butirato de butila, valerato de etila e caprilato de etila. O caprilato de etila, que possui fragrância floral e frutada, é aplicado para promoção de aromas frutados, como pêssego, maçã, banana e abacaxi

(AHMED et al., 2010). Outra importante aplicação da lipase na indústria de alimentos é na catálise da hidrólise de óleo vegetal para a produção de ácidos livres (JAVED et al., 2018).

Na indústria de panificação, a utilização de lipase proporciona aumento da elasticidade e fortalecimento da massa, melhoram o volume específico e maciez do miolo e retardam o envelhecimento dos pães (GOESAERT et al., 2005; GANDRA et al., 2008).

As lipases podem ainda ser aplicadas na obtenção de monoacilgliceróis, que são usados como agentes emulsificantes (FREIRE; CASTILHO, 2008); empregadas para realçar o aroma e sabor de margarina, bebidas alcoólicas, chocolates e doces (JAEGER; EGGERT, 2002); em processos como na fermentação de salsichas, lipólise da gordura da manteiga e do creme de leite (JAEGER; EGGERT, 2002; HASAN; SHAH; HAMEED, 2006; FREIRE; CASTILHO, 2008) e na formação de produtos voláteis que conferem sabor ao chá preto (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006).

A maioria dos protocolos de utilização de lipases nas indústrias envolve a utilização das mesmas na forma livre. Porém, na última década diversos trabalhos têm sido realizados para estudar a possibilidade de aplicação das mesmas imobilizadas em suportes sólidos (GRICAJEVA et al., 2018; PADILHA et al., 2018; BRITO et al., 2017).

Ramani et al. (2010) realizaram a imobilização da lipase a partir de *Pseudomonas gessardii* por meio de ligações covalentes em carvões ativados mesoporosos. O biocatalisador obtido foi então aplicado na hidrólise do azeite de oliva. Os resultados demonstraram uma atividade máxima da lipase imobilizada no carvão ativado de 3570 U/g sob condições ótimas de imobilização (tempo de contato de 180 min, pH 5,0 e temperatura de 30 °C) utilizando o método do glutaraldeído. Foi verificado também que a lipase imobilizada apresentou uma melhor estabilidade térmica e reutilização do que a lipase em sua forma solúvel. Os autores concluíram que o biocatalisador produzido apresenta potencial para aplicações industriais.

Naranjo et al. (2010) imobilizaram lipase, obtida a partir da *Candida antarctica B.* por adsorção em carvões ativados para a síntese de ésteres de ácidos graxos (biodiesel) utilizando o método de adsorção. Os ésteres foram produzidos pela transesterificação do óleo de palma com diferentes álcoois (metanol, etanol, 1-propanol, 1-butanol, isopropanol e isobutanol), onde foram obtidos rendimentos mínimos de conversão do biodiesel de 48%, atingindo até 100% de conversão quando foi utilizado o isobutanol como o álcool da reação.

Padilha et al. (2018) realizaram a imobilização de lipase a partir de *Burkholderia cepacia* em esferas de alginato por encapsulamento, para aplicação na síntese de aroma de banana (acetato de isoamila). Diferentes solventes foram utilizados para avaliar o comportamento para produção do acetato de isoamila e o n-heptano apresentou os melhores resultados. Os autores obtiveram um

rendimento de até 92% na produção do éster. Foi concluído que o biocatalisador produzido foi adequado para síntese do aroma de banana.

A maior parte das lipases disponíveis comercialmente são obtidas a partir de fontes microbianas, principalmente fungos e bactérias (MENDES et al., 2012). Porém, a utilização de lipases a partir de outras fontes também vem sendo exploradas nos últimos anos. Entre essas, uma que merece atenção e pode ser utilizada para uma variedade de aplicações é a lipase pancreática do porco (SILVA et al., 2014; RIAL et al., 2020; CHEN et al., 2020).

## **2.9. Lipase pancreática do porco (LPP)**

A Lipase pancreática do porco (LPP) é uma proteína globular pequena, composta por uma cadeia simples contendo um total de 449 aminoácidos (RIAL et al., 2020). Apresenta uma massa molecular entre 50 e 52 kDa, dimensões de 4,6 nm x 2,6 nm x 1,1 nm e diâmetro molecular de cerca de 4 nm (MENDES et al., 2012; SILVA et al., 2014). Tal enzima vem sendo utilizada em reações de biotransformação, apresentando menor custo do que outras lipases comerciais disponíveis. O extrato bruto da LPP contém um número significativo de outras hidrolases (esterases, amilases e proteases) como contaminantes (MENDES et al., 2012).

A determinação da estrutura tridimensional da LPP revelou a presença de dois domínios bem definidos. O domínio N-terminal que compreende os resíduos de aminoácido 1 a 336 e a tríade catalítica serina, asparagina e histidina conservada nas posições 153, 177 e 264, respectivamente, e o domínio C-terminal composto pelos aminoácidos 337 a 449, que interage exclusivamente com uma colipase. A colipase é um pequeno cofator proteico secretado pelo pâncreas com massa molecular de 10 kDa que fixa a lipase aos sais biliares na interface óleo-água. A atividade hidrolítica da LPP resulta do efeito combinado entre a lipase, a colipase e os sais biliares (HERMOSO et al., 1996; MENDES et al., 2012).

As propriedades catalíticas dessas enzimas são fortemente afetadas pelas condições do meio. Diversos trabalhos que utilizaram a LPP verificaram que a mesma apresenta pH ótimo de atuação em meio alcalino, principalmente na faixa entre 7,3 e 9,0. A temperatura é outro fator que afeta fortemente na atividade dessa enzima, com maiores valores de atividade na faixa entre 35°C e 45°C (MENDES et al., 2012; RIAL et al., 2020).

Uma propriedade de fundamental importância para as enzimas é a sua especificidade, principalmente em relação ao substrato e à posição. Para a LPP os substratos naturais são os ésteres de glicerol (monoacilgliceróis, diacilgliceróis e triacilgliceróis), fosfolípidos, ésteres de colesterol e galactolipídios). A hidrólise dos triacilgliceróis pela LPP ocorre nas posições sn-1 e sn-3 do esqueleto

de glicerol, liberando duas moléculas de ácidos graxos, enquanto o ácido graxo esterificado na posição sn-2 permanece não hidrolisado (MENDES et al., 2012).

A LPP vem sendo utilizada nas mais diversas aplicações biotecnológicas, apresentando atividade em meio aquoso e orgânico (MENDES et al., 2012). As aplicações em meio aquoso envolvem a hidrólise de triacilgliceróis para a produção de ácidos graxos (BAGI et al., 1997), o pré-tratamento de águas residuais ricas em lipídios (MASSE et al., 2001), a síntese de álcoois racêmicos e ácidos carboxílicos por meio da hidrólise enantiosseletiva dos ésteres correspondentes (MIURA et al., 2008), o tratamento de termoplásticos da engenharia, como poliésteres e policarbonatos, para melhorar suas propriedades (ARTHAM et al., 2011), entre outras.

A sua utilização em meio orgânico geralmente envolve a síntese de biodiesel (LUNA et al., 2013), produtos farmacêuticos (ZHENG et al., 2011), emulsificantes e cosméticos (YVERGNAUX et al., 2017). Outra aplicação em meio orgânico que a LPP pode ser utilizada e merece um destaque especial é na síntese de ésteres aromáticos (SILVA et al., 2014).

## **2.10. Síntese de ésteres de aromas**

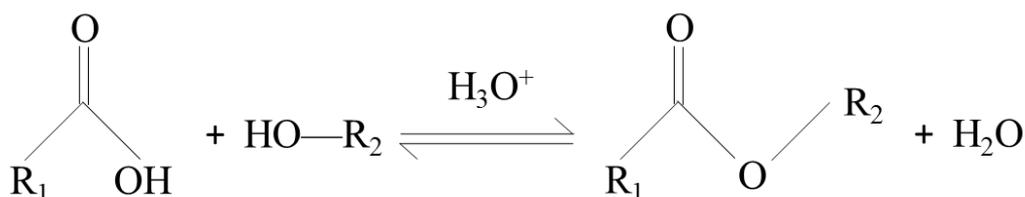
Os ésteres são compostos orgânicos frequentemente encontrados na natureza e desempenham um papel importante em diversos setores, sendo utilizados na indústria de alimentos e bebidas, cosmético, produtos farmacêuticos, produtos químicos, entre outros, devido às suas propriedades de flavor e fragrância. Tais compostos apresentam baixa massa molecular e alta volatilidade (SÁ et al., 2017).

Os ésteres de aromas podem ser obtidos de várias formas. Uma possibilidade é por meio da extração direta a partir de plantas e frutas. Entretanto, algumas desvantagens tornam essa técnica inadequada para aplicações industriais, tais como a dependência climática e sazonal da fonte, além do baixo rendimento e alto custo de produção necessário para sua extração e purificação (SANTOS et al., 2016; SÁ et al., 2017).

Diante disso, o método mais utilizado em processos laboratoriais e industriais para a produção de ésteres é por meio da reação reversível entre um ácido carboxílico e um álcool (Figura 8). Essa reação é conhecida como reação de esterificação de Fisher, em homenagem ao químico Emil Fisher, que a descobriu no ano de 1895. Observa-se que essas reações geram água e são facilitadas pelo aumento da temperatura do meio reacional e na presença de um catalisador de Brønsted-Lowry. Sem catalisador e em condições normais de temperatura e pressão a reação ocorre lentamente. A reação é reversível, pois o éster obtido pode reagir com a água (reação de hidrólise), regenerando o ácido carboxílico e o álcool, embora a reação inversa seja lenta (OLIVEIRA et al., 2014; DIAS et al., 2018).

A síntese química convencional consiste na utilização de catalisadores e produtos químicos perigosos, utilização de solventes tóxicos e utilização de elevadas pressões e temperaturas. Além disso, apresenta altos custos devido à falta de seletividade dos substratos, longos tempos de reação, consumo excessivo de energia, corrosão dos reatores e equipamentos utilizados e liberação de resíduos tóxicos para o meio ambiente. Por fim, os produtos finais não podem ser rotulados como naturais e os ésteres sintetizados contêm vestígios de impurezas tóxicas, o que pode resultar em complicações para a saúde dos seres humanos (MANAN et al., 2016).

**Figura 8.** Reação de esterificação de Fisher catalisada por ácido.



Fonte: Adaptado de Oliveira et al., 2014.

Para superar os inconvenientes dos métodos citados anteriormente, as transformações biotecnológicas vêm sendo empregadas na síntese dos ésteres aromáticos e a catálise enzimática utilizando lipases é considerada a de maior viabilidade para a produção desses compostos. A esterificação catalisada por lipases é considerada uma alternativa ambientalmente correta que oferece diversas vantagens, tais como: alta especificidade e seletividade, elevado rendimento em condições de reação moderadas (baixa temperatura e pressão), redução da formação de subprodutos, possibilidade de reutilização do biocatalisador, baixo consumo de energia e redução dos custos globais de produção (SÁ et al., 2017).

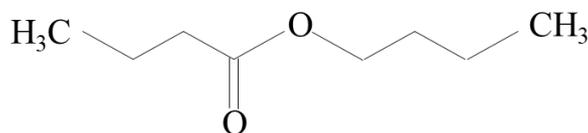
A produção biotecnológica dos ésteres aromáticos é uma alternativa à fonte natural e apresenta possibilidade de aumento de escala para produções industriais. Alguns estudos foram realizados nessa área com a utilização de diferentes lipases imobilizadas e diferentes biocatalisadores para a produção de diversos ésteres (ASMAT et al., 2019; ELIAS et al., 2019; PADILHA et al., 2018). Um éster que pode ser produzido por meio da utilização de lipases como biocatalisadora da reação é o butirato de butila (ELIAS et al., 2019; VERÍSSIMO et al., 2018).

### 2.10.1. Butirato de butila

O butirato de butila (Figura 9) é um éster de cadeia curta que possui oito átomos de carbono em sua estrutura molecular, apresentando um aroma frutado semelhante à banana, abacaxi e pera. Tal éster tem sido amplamente utilizado como composto de aroma e de fragrância nas indústrias de

bebidas, alimentos, perfumes e cosméticos. Além disso, tem sido utilizado como solvente nas indústrias de plásticos, texturas e fibras, além de ser um importante extrator no processamento de derivados de petróleo (DIAS et al., 2018; XIN et al., 2019).

**Figura 9.** Fórmula estrutural do butirato de butila.



Fonte: Adaptado de Dias et al., 2018.

Na natureza, o butirato de butila é rotineiramente encontrado em flores, frutas e bebidas fermentadas. Para utilização em escala industrial, a síntese do butirato de butila é feita por meio da reação de esterificação entre o ácido butírico e o butanol (NOH et al., 2019). A reação de esterificação para a síntese desse éster pode ser catalisada por via ácida ou enzimática, com a via enzimática apresentando diversas vantagens, conforme citado na seção 2.10. Diante disso, diversos trabalhos para a produção do butirato de butila utilizando lipases imobilizadas são observados na literatura (ELIAS et al., 2019; ONOJA et al., 2018; VERÍSSIMO et al., 2018).

Veríssimo et al. (2018) realizaram a síntese do butirato de butila utilizando lipase de *Aspergillus niger* imobilizada pela técnica de confinamento em um criogel supermacroporoso de poli(acrilamida) e obteve uma conversão máxima do ácido em éster em torno de 49,25% após 24 horas de reação. Além disso, após 6 ciclos o biocatalisador produzido apresentou cerca 32% do rendimento do ciclo inicial.

Matte et al. (2016) realizaram a síntese do butirato de butila utilizando lipase de *Thermomyces lanuginosus* imobilizada em um reator Immobead 150 e obtiveram um rendimento de esterificação máximo de 84% após 4 horas de reação. Após 8 ciclos de reutilização o biocatalisador apresentou cerca de 86% de sua capacidade de conversão inicial.

Silva et al. (2014) realizaram a síntese do butirato de butila utilizando LPP imobilizada em partículas de poli-hidroxibutirato por meio de adsorção física e obtiveram um rendimento máximo de conversão de 92,2% após duas horas de reação. Após 6 ciclos de reação o biocatalisador apresentou cerca de 63% de sua capacidade de conversão inicial.

Pode-se observar que diferentes tipos de materiais podem ser utilizados como suportes para a imobilização de lipases obtidas de diferentes fontes, e, os biocatalisadores obtido, apresentam potencial de uso nas reações de síntese de butirato de butila. Porém, o efeito do método de síntese de carvão ativado obtido de caroço de tamarindo e das condições de imobilização de lipase nos mesmos

ainda não foram avaliados. Outro aspecto relevante é a utilização dos biocatalisadores na reação de síntese de butirato de butila, um éster de aroma de interesse para indústria de alimentos.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo geral

Imobilização de lipase do pâncreas do porco em carvões ativados obtidos a partir do caroço de tamarindo, visando produzir biocatalisadores capazes de atuar na reação de síntese de butirato de butila de maneira eficiente, mesmo após vários ciclos de uso.

#### 3.2. Objetivos específicos

- Otimização das condições da carbonização hidrotérmica (tempo, temperatura e concentração) do farelo do caroço de tamarindo para a obtenção de precursores com maior teor de grupos funcionais oxigenados;

- Síntese dos carvões ativados pelo método da ativação química com ácido fosfórico a partir do precursor com e sem carbonização hidrotérmica;

- Imobilização das lipases nos carvões produzidos por meio de adsorção física e por interação com grupos funcionais superficiais, mediante funcionalização da superfície do carvão pelo método do glutaraldeído;

- Caracterização textural, química e morfológica dos diferentes carvões produzidos;

- Determinação das melhores condições na reação de hidrólise nos diferentes carvões produzidos;

- Utilização dos suportes produzidos para a síntese do butirato de butila e avaliação da estabilidade durante os ciclos de reutilização.

#### 4. REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. F.; AHMED, M. J. Mesoporous activated carbon from date stones (*Phoenix dactylifera* L.) by one-step microwave assisted  $K_2CO_3$  pyrolysis. **Journal of Water Process Engineering**, v. 9, p. 201-207, 2016.
- ABIOYE, A. M.; ANI, F. N. Recent development in the production of activated carbon electrodes from agricultural waste biomass for supercapacitors: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 52, p. 1282-1293, 2015.
- ACHARYA, B.; SULE, I.; DUTTA, A. A review on advances of torrefaction technologies for biomass processing. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v. 2, p. 349-369, 2012.
- ACHINAS, S.; ACHINAS, V.; EUVERINK, G. J. W. A technological overview of biogas production from biowaste. **Engineering**, v. 3, p. 299-307, 2017.
- AHMED, E. H.; RAGHAVENDRA, T.; MADAMWAR, D. An alkaline lipase from organic solvent tolerant *Acinetobacter* sp. EH28: application for ethyl caprylate synthesis. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 3628-3634, 2010.
- AHMED, M. J. Adsorption of quinolone, tetracycline, and penicillin antibiotics from aqueous solution using activated carbons: Review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 50, p. 1-10, 2017.
- ALPIZAR-REYES, E.; VARELA-GUERRERO, V.; CRUZ-OLIVARES, J. et al. Microencapsulation of sesame seed oil by tamarind seed mucilage. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 145, p. 207-215, 2019
- ANANTHI, S.; RAMASUBBURAYAN, R.; PALAVESAM, A.; IMMANUEL, G. Optimization and purification of lipase through solid state fermentation by *Bacillus cereus* MSU as isolated from the gut of a marine fish *Sardinella longiceps*. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 6, p. 291-298, 2014.
- ANGAJALA, G.; PAVAN, P.; SUBASHINI, R. Lipases: An overview of its current challenges and prospectives in the revolution of biocatalysis. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 7, 257-270, 2016.
- ANTERO, R. V. P. **Obtenção de carvão ativado nanoporoso de alta performance a partir de resíduos poliméricos via carbonização hidrotermal**. 2015. 142 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Sustentáveis). Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Goiás, Goiânia-Go.

APETREI, I. M.; RODRIGUEZ-MENDEZ, M. L.; APETREI, C.; DE SAJA, J. A. Enzyme sensor based on carbon nanotubes/cobalt (II) phthalocyanine and tyrosinase used in pharmaceutical analysis. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 177, p. 138-144, 2013.

ARROYO, M. Inmovilización de enzimas: Fundamentos, métodos y aplicaciones. **Ars Pharmaceuti**, v. 39, p. 23-39, 1998.

ARTHAM, T.; MOHANALAKSHMI, N.; PARAGI-VEDANTHI, P.; DOBLE, M. Mechanistic investigations of lipase-catalyzed degradation of polycarbonate in organic solvents. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 48, p. 71-79, 2011.

ASMAT, S.; ANWER, A. H.; HUSAIN, Q. Immobilization of lipase onto novel constructed polydopamine grafted multiwalled carbon nanotube impregnated with magnetic cobalt and its application in synthesis of fruit flavours. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 140, p. 484-495, 2019.

BAGI, K.; SIMON, L. M.; SZAJÁNI, B. Immobilization and characterization of porcine pancreas lipase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 20, p. 531-535, 1997.

BHATNAGAR, A. et al. An overview of the modification methods of activated carbon for its water treatment applications. **Chemical Engineering Journal**, v. 219, p. 499-511, 2013.

BILAL, M.; ASGHER, M.; PARRA-SALDIVAR, R.; HU, H.; WANG, W.; ZHANG, X.; IQBAL, H. M. Immobilized ligninolytic enzymes: an innovative and environmental responsive technology to tackle dye-based industrial pollutants—a review. **Science of The Total Environment**, v. 576, p. 646-659, 2017.

BILAL, M.; ZHAO, Y.; RASHEED, T.; IQBAL, H. M. N. Magnetic nanoparticles as versatile carriers for enzymes immobilization: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 120, p. 2530-2544, 2018.

BON, E. P. S.; MARIA, A.; FERRERA, M. A.; CORVO, M. L.; VERMELHO, A. B.; PAIVA, C. L. A.; ALENCASTRO, R. B.; COELHO, R. R. R. **Enzimas em Biotecnologia: Produção, Aplicação e Mercado**. Rio de Janeiro: Ed. Interciência, 2008.

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

BRITO, M. J. P.; VELOSO, C. M.; BONOMO, R. C. F.; FONTAN, R. C. I.; SANTOS, L. S.; MONTEIRO, K. A. Activated carbons preparation from yellow mombin fruit stones for lipase immobilization. **Fuel Processing Technology**, v. 156, p. 421-428, 2017.

BRITO, M. J. P.; VELOSO, C. M.; SANTOS, L. S.; BONOMO, R. C. F.; FONTAN, R. C. I. Adsorption of the textile dye Dianix® royal blue CC onto carbons obtained from yellow mombin fruit stones and activated with KOH and H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>: Kinetics, adsorption equilibrium and thermodynamic studies. **Powder Technology**, v. 339, p. 334-343, 2018.

CAO, L. Immobilised enzymes: science or art? **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 9, p. 217-226, 2005.

CARDONA, C. A.; QUINTERO, J. A.; PAZ, I. C. Production of bioethanol from sugarcane bagasse: Status and perspectives. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4754-4766, 2010.

CARVALHO, W.; CANILHA, L.; DA SILVA, S. S. Uso de biocatalisadores imobilizador: uma alternativa para a condução de bioprocessos. **Revista Analytica**, v. 23, p. 60-70, 2006.

CASTRO, H. F.; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C.; AGUIAR, C. L. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. **Química Nova**, v.27, p.146-156, 2004.

CHAUHAN, G. Evaluation of nanogels as supports for enzyme immobilization. **Polymer International**, v. 63, n. 11, p. 1889-1894, 2014.

CHEN, X.; XUE, S.; LIN, Y.; LUO, J.; KONG, L. Immobilization of porcine pancreatic lipase onto a metal-organic framework, PPL@MOF: A new platform for efficient ligand discovery from natural herbs. **Analytica Chimica Acta**, v. 1099, p. 94-102, 2020.

CHEN, Y.; ZHU, Y.; WANG, Z.; LI, Y.; WANG, L.; DING, L.; GAO, X.; MA, Y.; GUO, Y. Application studies of activated carbon derived from rice husks produced by chemical-thermal process - A review. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 163, p. 39-52, 2011.

CIRILLO, G.; NICOLETTA, F. P.; CURCIO, M.; SPIZZIRRI, U. G.; PICCI, N.; IEMMA, F. Iemma, Enzyme immobilization on smart polymers: catalysis on demand, **Reactive and Functional Polymers**, v. 83, 62-69, 2014.

CLAUDINO, A. **Preparação de Carvão Ativado a partir de Turfa e sua Utilização na Remoção de Poluentes**. 2003. 90 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis-SC.

COSTA, E.; FERREIRA, A. F. A.; SILVA, P. N. L.; NARDELLI, E. M. V. Diferentes composições de substratos e ambientes protegidos na formação de mudas de pé-franco de tamarindeiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.34, p. 1189-1198, 2012.

DALLA-VECCHIA, R. et al. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, v. 27, p. 623-630, 2004.

DAS, R.; GHOSH, S.; BHATTACHARJEE, C. Enzyme membrane reactor in isolation of antioxidative peptides from oil industry waste: A comparison with nonpeptidic antioxidants. **LWT-Food Science and Technology**, v. 47, p. 238-245, 2012.

DIAS, A. L. B.; SANTOS, P.; MARTÍNEZ, J. Supercritical CO<sub>2</sub> technology applied to the production of flavor ester. **Journal of CO<sub>2</sub> Utilization**, v. 23, p. 159-178, 2018.

ELIAS, N.; WAHAB, R. A.; CHANDREN, S. et al. Effect of operative variables and kinetic study of butyl butyrate synthesis by *Candida rugosa* lipase activated by chitosan-reinforced nanocellulose derived from raw oil palm leaves. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 130, p. 1-11, 2019.

ESTEBAN-TORRES, M.; MANCHENO, J. M.; DE LAS RIVAS, B.; MUNOZ, R. Characterization of a halotolerant lipase from the lactic acid bacteria *Lactobacillus plantarum* useful in food fermentations. **LWT - Food Science and Technology**, v. 60, p. 246-252, 2015.

FABISZEWSKA, A. U.; STOLARZEWICZ, I. A.; ZAMOJSKA, W. M.; BIALECKA-FLORJAŃCZYK, E. Carbon source impact on *Yarrowia lipolytica* KKP 379 lipase production. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 50, p. 404-410, 2014.

FALCO, C.; SIEBEN, J. M.; BRUN, N.; SEVILLA, M.; VAN DER MAUELEN, T.; MORALLÓN, E.; CAZORLA-AMORÓS, D.; TITIRICI, M. M. Hydrothermal carbons from hemicellulose-derived aqueous hydrolysis products as electrode materials for supercapacitors. **ChemSusChem**, v. 6, 374-382, 2013.

FANG, J.; ZHAN, L.; OK, Y. S.; GAO, B. Minireview of potential applications of hydrochar derived from hydrothermal carbonization of biomass. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 57, p. 15-21, 2018.

FIORI, L.; BASSO, D.; CASTELLO, D.; BARATIERI, M. Hydrothermal carbonization of biomass: design of a batch reactor and preliminary experimental results, **Chemical Engineering Transactions**, v. 37, p. 55-60, 2014.

FREIRE, D. M. A.; CASTILHO, L. R. Lipases em biocatálise. In: BON, E. P. S.; FERRARA, M. A., et al (Ed.). **Enzimas em biotecnologia - produção, aplicações e mercado**. Rio de Janeiro: Editora Interciência, 2008. p. 506

FU, K.; YUE, Q.; GAO, B.; SUN, Y.; ZHU, L. Preparation, characterization and application of lignin-based activated carbon from black liquor lignin by steam activation. **Chemical Engineering Journal**, v. 228, p. 1074-1083, 2013.

FUERTES, A. B.; SEVILLA, M. Superior capacitive performance of hydrochar-based porous carbons in aqueous electrolytes. **ChemSusChem**, v. 8, p. 1049-1057, 2015.

GALLIFUOCO, A.; TAGLIERI, L.; SCIMIA, F.; PAPA, A. A.; DI GIACOMO, G. Hydrothermal Carbonization of Biomass: New Experimental Procedures for Improving the Industrial Processes. **Bioresource Technology**, v. 244, p. 160-165, 2017.

GANDRA, K. M.; BIANCHI, M. D.; GODOY, V. P.; QUEIROZ, F. P. C.; STEEL, C. J. Application of lipase na monoglyceride in fiber enriched pan bread. **Food Science and Technology**. v.28, p. 182-192, 2008.

GARCÍA, J. C. V.; RODRÍGUEZ, K. A. F.; LÓPEZ, F. G.; PÉREZ, E. G.; ROSADO, O. L.; ROSAS, F. H. Systems management and marketing of tamarind (*Tamarindus indica L.*) in three municipalities of Veracruz. **Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas**, v. 3, p. 1217-1230, 2012.

GEOFFRY, K.; ACHUR, R. N. Screening and production of lipase from fungal organisms. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.03.009>.

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.

GOESAERT, H.; BRIJS, K.; VERAVERBEKE, W. S.; COUTIN, C. M.; GEBRUERS, K.; DELCOUR, J. A. Wheat flour constituents: how they impact bread quality, and how to impact their functionality. **Trends in Food Science and Technology**, v.16, p.12-30, 2005.

GONÇALVES, M. C. P.; KIECKBUSCH, T. G.; PERNA, R. F.; FUJIMOTO, J. P.; MORALES, S. A. V.; ROMANELLI, J. P. Trends on enzyme immobilization researches based on bibliometric analysis. **Process Biochemistry**, v. 76, p. 95-110, 2019.

GONÇALVES, M.; GUERREIRO, M. C.; OLIVEIRA, L. C. A.; SOLAR, C.; NAZARRO, M.; SAPAG, K. Micro Mesoporous Activated Carbon from Coffee Husk as Biomass Waste for Environmental Applications. **Waste and Biomass Valorization**, v. 4, p. 395-400, 2013.

GRICAJEVA, A.; KAZLAUSKAS, S.; KALEDIENE, L.; BENDIKIENE, V. Analysis of Aspergillus sp. lipase immobilization for the application in organic synthesis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 108, p. 1165-1175, 2018.

GROBOILLOT, A.; BOADI, D. K.; PONCELET, D.; NEUFELD, R. J. Immobilization of Cells for Application in the Food Industry. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 14, p. 75-107, 1994.

GUAN, Z.; LI, L. Y.; HE, Y. H. Hydrolase-catalyzed asymmetric carbon-carbon bond formation in organic synthesis. **RSC Advances**, v. 5, p. 16801-16814, 2015.

GUO, S. R.; GONG, J. Y.; JIANG, P.; WU, M.; LU, Y.; YU, S. H. Biocompatible, luminescent silver@phenol formaldehyde resin core/shell nanospheres: large-scale synthesis and application for in vivo bioimaging. **Advanced Functional Materials**, v. 18, p. 872-879, 2008.

GUPTA, R., RATHI, P., BRADDOO, S. Lipase Mediated Upgradation of Dietary Fats and Oils. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 43, p. 635-644, 2003.

GUPTA, V. K.; GUPTA, B.; RASTOGI, A.; AGARWAL, S.; NAYAK, A. A comparative investigation on adsorption performances of mesoporous activated carbon prepared from waste rubber tire and activated carbon for a hazardous azo dye-Acid Blue 113. **Journal of Hazardous Materials**, v. 186, p. 891-901, 2011.

HASAN, F.; SHAH, A.A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 235-251, 2006.

HEIDARI, M.; DUTTA A.; ACHARYA, B.; MAHMUD, S. A review of the current knowledge and challenges of hydrothermal carbonization for biomass conversion. **Journal of the Energy Institute**, v. 92, p. 1779-1799, 2019.

HERMOSO, J.; PIGNOL, D.; KERFELEC, BRIGITTE; CRENON, ISABELLE. Lipase Activation by Nonionic Detergents. The crystal structure of the porcine lipase-colipase-tetraethylene glycol monoethyl ether complex. **The Journal of biological chemistry**, v. 271, p. 18007–18016, 1996.

HU, Q.; LU, Y.; MEISNER, G.P. Preparation of nanoporous carbon particles and their cryogenic hydrogen storage capacities. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 12, p. 1516-1523, 2008.

HUANBUTTA, K.; YUNSIR, A.; SRIAMORNSAK, P.; SANGNIM, T. Development and in vitro/in vivo evaluation of tamarind seed gum-based oral disintegrating tablets after fabrication by freeze drying. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 54, 2019.

HUANG, G.; WANG, Y.; ZHANG, T.; WU, X.; CAI, J. High-performance hierarchical N-doped porous carbons from hydrothermally carbonized bamboo shoot shells for symmetric supercapacitors. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2018.12.024>.

HWANG, S. et al. Evaluation of cellulose-binding domain fused to a lipase for the lipase immobilization. **Biotechnology Letters**, v. 26, p. 603-605, 2004.

IFTIKHAR, T.; NIAZ, M.; ALI, E.A.; JABEEN, R.; ABDULLAH, R. Production process of extracellular lipases by *Fusarium* sp. using agricultural by products. **Pakistan Journal of Botany**, v. 44, p. 335-339, 2012.

ISLAM, M. A.; AHMED, M. J.; KHANDAY, W. A.; ASIF, M.; HAMEED, B. H. Mesoporous activated coconut shell-derived hydrochar prepared via hydrothermal carbonization-NaOH activation for methylene blue adsorption. **Journal of Environmental Management**, v. 203, p. 237-244, 2017.

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

JAEGER, K.-E.; REETZ, M. T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. **Trends in Biotechnology**, v. 16, p. 396-403, 1998.

JAIN, A.; BALASUBRAMANIAN, R.; SRINIVASAN, M. P. Hydrothermal conversion of biomass waste to activated carbon with high porosity: A review. **Chemical Engineering Journal**, v. 283, p. 789-805, 2016.

JAIN, A.; JAYARAMAN, S.; BALASUBRAMANIAN, R.; SRINIVASAN, M. P. Hydrothermal pre-treatment for mesoporous carbon synthesis: enhancement of chemical activation. **Journal of Materials Chemistry A**, v. 2, p. 520-528, 2014.

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: Solid-State Materials for Advanced Technology**, v. 183, p. 54-60, 2014.

JAIN, A.; XU, C.; JAYARAMAN, S.; BALASUBRAMANIAN, R.; LEE, J. Y.; SRINIVASAN, M. P. Mesoporous activated carbons with enhanced porosity by optimal hydrothermal pre-treatment of biomass for supercapacitor applications. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 218, p. 55-61, 2015.

JAMARI, S. S.; HOWSE, J. R. The effect of the hydrothermal carbonization process on palm oil empty fruit bunch. **Biomass and Bioenergy**, v. 47, p. 82-90, 2012.

JAVED, S.; AZEEM, F.; HUSSAIN, S.; RASUL, I.; SIDDIQUE, M. H.; RIAZ, M.; AFZAL, M.; KOUSER, A.; NADEEM, H. Bacterial lipases: A review on purification and characterization. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 132, p. 23-34, 2018.

- JORDAN, J.; KUMAR, C. S. S. R.; THEEGALA, C. Preparation and characterization of cellulase bound magnetite nanoparticles. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 68, p. 139-146, 2011.
- KIM, J.; KIM, S. I.; YOO, K. H. Polypyrrole nanowire-based enzymatic biofuel cells. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 25, p. 350-355, 2009.
- KOBLITZ, M. G. B. **Bioquímica de Alimentos: Teoria e Aplicações Práticas**. Rio de Janeiro. Editora Guanabara Koogan, 2008.
- KONG, J.; YUE, Q.; WANG, B.; HUANG, L.; GAO, B.; WANG, Y.; LI, Q. Preparation and characterization of activated carbon from leather waste microwave-induced pyrophosphoric acid activation. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**. v. 104, p. 710-713, 2013.
- KUMAR, A., KANWAR, S. S. Lipase Production in Solid-state Fermentation (SSF): Recent Developments and Biotechnological Applications. **Dynamic Biochemistry, Process Biotechnology and Molecular Biology**, v. 6, p. 13-27, 2012.
- LAMMIRATO, C.; MILTNER, A.; WICK, L.Y.; KÄSTNER, M. Hydrolysis of cellobiose by  $\beta$ -glucosidase in the presence of soil minerals - interactions at solid-liquid interfaces and effects on enzyme activity levels. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 42, p. 2203-2210, 2010.
- LAURENT, N.; HADDOUB, R.; FLITSCH, S. L. Enzyme catalysis on solid surfaces. **Trends in Biotechnology**. v. 26, p. 328-337, 2008.
- LI, J.; LI, L-S.; XU, L. Hierarchically macro/mesoporous silica sphere: A high efficient carrier for enzyme immobilization. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 231. p. 147-153, 2016.
- 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.
- LI, Y.; TSEND, N.; LI, T.; LIU, H.; YANG, R.; GAI, X.; WANG, H.; SHAN, S. Microwave assisted hydrothermal preparation of rice straw hydrochars for adsorption of organics and heavy metals. **Bioresource Technology**, v. 273, p. 136-143, 2019.
- LIU Q. S.; ZHENG, T.; WANG, P.; GUO, L. Preparation and characterization of activated carbon from bamboo by microwave-induced phosphoric acid activation. **Industrial Crops and Products**, v. 31, p. 233-238, 2010.
- LIU, D. M.; CHEN, J.; SHI, Y. P. Advances on methods and easy separated support materials for enzymes immobilization. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 102, p. 332-342, 2018.

LUNA, C.; SANCHO, E.; LUNA, D. et al. Biofuel that keeps glycerol as monoglyceride by 1,3-selective ethanolysis with pig pancreatic lipase covalently immobilized on AlPO<sub>4</sub> support. **Energies**, v. 6, p. 3879–3900, 2013.

MANAN, F. M. A.; RAHMAN, I. N. A.; MARZUKI, N. H. C.; MAHAT, N. A. Statistical modelling of eugenol benzoate synthesis using *Rhizomucor miehei* lipase reinforced nanobioconjugates. **Process Biochemistry**, v. 51, p. 249-262, 2016.

MANOJ, M.; ASHRAF, M.; JASNA, M.; ANILKUMAR, K. M.; JINISHA, B.; PRADEEP, V. S.; JAYALEKSHMI, S. Biomass-derived, activated carbon-sulfur composite cathode with a bifunctional interlayer of functionalized carbon nanotubes for lithium-sulfur cells. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 535, p. 287-299, 2019.

MARIN-BATISTA, J. D.; VILLAMIL, J. A.; RODRIGUEZ, J. J.; MOHEDANO, A. F.; RUBIA, M. A. Valorization of microalgal biomass by hydrothermal carbonization and anaerobic digestion. **Bioresource Technology**, v. 274, p. 395-402, 2019.

MASSE, L.; KENNEDY, K. J.; CHOU, S. Testing of alkaline and enzymatic hydrolysis pretreatments for fat particles in slaughterhouse wastewater. **Bioresource Technology**, v. 77, p. 145-155, 2001.

MATTE, C. R.; BORDINHÃO, C.; POPPE, J. K. et al. Synthesis of butyl butyrate in batch and continuous enzymatic reactors using *Thermomyces lanuginosus* lipase immobilized in Immobead 150. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 127, p. 67-75, 2016.

MENDES, A. A.; OLIVEIRA, P. C.; CASTRO, H. F. Properties and biotechnological applications of porcine pancreatic lipase. **Journal of Molecular Catalysis B. Enzymatic**, v. 78, p. 199-134, 2012.

MENDES, F. M. T.; MARQUES, A. C. C.; MENDONÇA, D. L.; OLIVEIRA, M. S.; MOUTTA, R. O.; FERREIRA-LEITÃO, V. S. High Surface Area Activated Carbon from Sugar Cane Straw. **Waste and Biomass Valorization**, v. 6, p. 433-440, 2015.

MIAO, Q.; TANG, Y.; XU, J.; LIU, X.; XIAO, L.; CHEN, Q. J. Activated carbon prepared from soybean straw for phenol adsorption. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 44, p. 458-465, 2013.

MIAO, Y.; RAHIMI, M.; GEERTSEMA, E. M.; POELARENDS, G. J. Recent developments in enzyme promiscuity for carbon-carbon bond-forming reactions. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 25, p. 115-123, 2015.

MIURA, T.; UMETSU, S.; KANAMORI, D. et al. Convenient synthesis of Z-monoacetates of 2-alkylidene-1,3-propanediols. *Tetrahedron*, v. 64, p. 9305-9308, 2008.

MORAES, S. L.; MASSOLA, C. P.; SACCOCCIO, E. M.; SILVA, D. P.; GUIMARÃES, Y. B. T. Cenário brasileiro da geração e uso de biomassa adensada. **Revista IPT - Tecnologia e Inovação**, v.1, p. 58-73, 2017.

NARANJO, J. C.; CÓRDOBA, A.; GIRALDO, L.; GARCIA, 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.

NIZAMUDDIN, S.; BALOCH, H. A.; GRIFFIN, G. J.; MUBARAK, N. M.; BHUTTO, A. W.; ABRO, R.; MAZARI, S. A.; ALI, B. S. An overview of effect of process parameters on hydrothermal carbonization of biomass. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 73, p. 1289-1299, 2017.

NOH, H. J.; LEE, S. Y.; JANG, Y. S. Microbial production of butyl butyrate, a flavor and fragrance compound. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, 2079-2086, 2019.

OLIVEIRA, C. A.; SOUZA, A. C. J.; SANTOS, A. P. B.; SILVA, B. V.; LACHTER, E. R.; PINTO, A. C. Síntese de Ésteres de Aromas de Frutas: Um Experimento para Cursos de Graduação dentro de um dos Princípios da Química Verde. **Revista Virtual de Química**, v. 6, p. 152-167, 2014.

ONOJA, E.; CHANDREN, S.; RAZAK, F. I. A.; WAHAB, R. A. Enzymatic synthesis of butyl butyrate by *Candida rugosa* lipase supported on magnetized-nanosilica from oil palm leaves: Process optimization, kinetic and thermodynamic study. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, p. 1-14, 2018.

PACKTER, N. M. Lipases - their structure, biochemistry and application: Edited by P Woolley and S B Petersen. pp 363. Cambridge University Press. 1994. £45. **Biochemical Education**, v. 22, p. 216-216, 1994.

PADILHA, S. G.; TAMBOURGI, E. B.; ALEGRE, R. M. Evaluation of lipase from *Burkholderia cepacia* immobilized in alginate beads and application in the synthesis of banana flavor (isoamyl acetate). **Chemical Engineering Communications**, v. 205, p. 23-33, 2018.

PALA, M.; KANTARLI, I. C.; BUYUKISIK, H. B.; YANIK, J. Hydrothermal carbonization and torrefaction of grape pomace: A comparative evaluation. **Bioresource Technology**, v. 161, p. 255-262, 2014.

PARK, K. Y., LEE, K., KIM, D. Characterized hydrochar of algal biomass for producing solid fuel through hydrothermal carbonization. **Bioresource Technology**, v. 258, p. 119-124, 2018.

PEREIRA, P. C.; MELO, B.; FRANZÃO, A. A.; ALVES, P. R. B. **A cultura do tamarindeiro (Tamarindus indica L.)**. 2011. Universidade Federal de Uberlândia. Disponível em: <<http://www.fruticultura.iciag.ufu.br/tamarindo.htm>>. Acesso em: dezembro de 2019.

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 cocoa shells and siriguela seeds using H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> and ZnCl<sub>2</sub> as activating agents for BSA and  $\alpha$ -lactalbumin adsorption. **Fuel Processing Technology**, v. 126, p. 476-486. 2014.

QIAN, W.; LUO, X.; WANG, X.; GUO, M.; LI, B. Removal of methylene blue from aqueous solution by modified bamboo hydrochar. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 157, p. 300-306, 2018.

RAMAKRISHNAN, V.; GOVEAS, L. C.; NARAYAN, B.; HALAMI, P. M. Comparison of Lipase Production by *Enterococcus faecium* MTCC 5695 and *Pediococcus acidilactici* MTCC 11361 Using Fish Waste as Substrate: Optimization of Culture Conditions by Response Surface Methodology. **ISRN Biotechnology**, v.27, p.9, 2013.

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: Enzymatic**, v. 62, p. 58-65, 2010.

RAY, A. Application of lipase in industry. **Asian Journal of Pharmaceutical Technology**, v. 2, p. 33-37, 2012.

REBROŠ, M.; ROSENBERG, M.; MLICHOVÁ, Z.; KRIŠTOFÍKOVÁ, L. Hydrolysis of sucrose by invertase entrapped in polyvinyl alcohol hydrogel capsules. **Food Chemistry**, v. 102, n. 3, p. 784–787, 2007.

RIAL, R.C.; FREITAS, O. N.; NAZÁRIO, C. E. D.; VIANA, L. H. Biodiesel from soybean oil using *Porcine pancreas* lipase immobilized on a new support: p-nitrobenzyl cellulose xanthate. **Renewable Energy**, v. 149, p. 970-979, 2020.

RIBAS, M. C.; ADEBAYO, M. A.; PROLA, L. D. T.; LIMA, E. C.; CATALUÑA, R.; FERIS, L. A.; PUCHANA-ROSETO, M. J.; MACHADO, F. M.; PAVAN, F. A.; CALVETE, T. Comparison of a homemade cocoa shell activated carbon with commercial activated carbon for the removal of reactive violet 5 dye from aqueous solutions. **Chemical Engineering Journal**, v. 248, p. 315-326, 2014.

RIOS, S. N.; PINHEIRO, B. B.; PINHEIRO, M. P.; BEZERRA, R. M.; SANTOS, J. C. S.; GONÇALVES, L. R. B. Biotechnological potential of lipases from *Pseudomonas*: Sources, properties and applications. **Process Biochemistry**, v. 75, p. 99-120, 2018.

ROMERO-ANAYA, A.; OUZZINE, M.; LILLO-RÓDENAS, M.; LINARES-SOLANO, A. Spherical carbons: synthesis, characterization and activation processes. **Carbon**, v. 68, p. 296-307, 2014.

ROVANI, S. **Preparo e caracterização de carvão e carvão ativado a partir de resíduos agroindustriais e aplicação na remoção de estrogênios**. 2015. 132 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Materiais). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS.

SÁ, A. G. A.; Meneses, A. C.; ARAÚJO, P. H. H.; OLIVEIRA, D. A review on enzymatic synthesis of aromatic esters used as flavor ingredients for food, cosmetics and pharmaceuticals industries. **Trends in Food Science and Technology**, v. 69, p. 95-105, 2017.

SAMANTA, S.; CHOWDHURY, SOMNATH; DASSHARMA, DEBASIS; HALDER, GOPINATH. The biosorptive uptake of enrofloxacin from synthetically produced contaminated water by tamarind seed derived activated carbon. **RSC Advances**, v. 10, p. 1204-1218, 2020.

SANTOS, MATEUS P. F.; BRITO, MYLENA J. P. ; JUNIOR, EVALDO C. S. ; BONOMO, RENATA C. F. ; VELOSO, CRISTIANE M. . Pepsin immobilization on biochar by adsorption and covalent binding and its application for hydrolysis of bovine casein. **Journal Of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 94, p. 1982-1990, 2019.

SANTOS, P.; ZABOT, G. L.; MEIRELES, M. A. A.; MAZUTTI, M. A. Synthesis of eugenyl acetate by enzymatic reactions in supercritical carbon dioxide. **Biochemical Engineering Journal**, v. 114, p. 1-9, 2016.

SANTOS-SEREJO, J. A.; BARBOSA, A. M. M.; LUNA, J. V. U. Tamarindo. In SANTOS SEREJO, J. A.; DANTAS, J. L. L.; SAMPAIO, C. V.; COELHO, Y. S. (Ed). *Fruticultura Tropical: espécies regionais e exóticas*. 1. ed. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2009. Cap. 20, p. 437-455.

SELVI, B. R.; JAGADEESAN, D.; SUMA, B.; NAGASHANKAR, G.; ARIF, M.; BALASUBRAMANYAM, K.; ESWARAMOORTHY, M.; KUNDU, T. K. Intrinsically fluorescent carbon nanospheres as a nuclear targeting vector: delivery of membrane-impermeable molecule to modulate gene expression in vivo. **Nano Letters**, v. 8, p. 3182-3188, 2008.

SEVILLA, M.; FERRERO, G. A.; FUERTES, A. B. Beyond KOH activation for the synthesis of superactivated carbons from hydrochar. **Carbon**, v. 114, p. 50-58, 2017.

SEVILLA, M.; FUERTES, A. B. Sustainable porous carbons with a superior performance for CO<sub>2</sub> capture. **Energy and Environmental Science**, v. 4, p. 1765-1771, 2011b.

SEVILLA, M.; FUERTES, A. B.; MOKAYA, R. High density hydrogen storage in superactivated carbons from hydrothermally carbonized renewable organic materials. **Energy and Environmental Science**, v. 4, p. 1400-1410, 2011a.

SHAFEEYAN, M. S. et al. A review on surface modification of activated carbon for carbon dioxide adsorption. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 89, p. 143-151, 2010.

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

SHU, C.; CAI, J.; HUANG, L.; ZHU, X.; XU, Z. Biocatalytic production of ethyl butyrate from butyric acid with immobilized *Candida rugosa* lipase on cotton cloth. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 72, p. 139-144, 2011.

SHU, Z.-Y.; JIANG, H.; LIN, R.-F.; JIANG, Y.-M.; LIN, L.; HUANG, J.-Z. Technical methods to improve yield, activity and stability in the development of microbial lipases. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 62, p. 1-8, 2010.

SILVA, G. G.; PRAÇA, E. F.; JUNIOR, J. G. et al. Caracterização física e química de tamarindo (*Tamarindus indica L*) em diferentes estádios de maturação. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 22, p. 291-293, 2000.

SILVA, M. J. A.; LOSS, R. A.; LAROQUE, D. A.; LERIN, L. A. Lipozyme TL IM as catalyst for the synthesis of eugenyl acetate in solvent-free acetylation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 176, p. 782-795, 2015.

SILVA, N. C. C.; MIRANDA, J. S.; BOLINA, I. C. A.; SILVA, W. C.; HIRATA, D. B.; CASTRO, H. F.; MENDES, A. A. Immobilization of porcine pancreatic lipase on poly-hydroxybutyrate particles for the production of ethyl esters from macaw palm oils and pineapple flavor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 82, p. 139-149, 2014.

SIMON, P.; GOGOTSI, Y. Charge storage mechanism in nanoporous carbons and its consequence for electrical double layer capacitors. **Philosophical Transactions of the Royal Society a-Mathematical Physical and Engineering Sciences**, v. 368, p. 3457-3467, 2010.

SOUISSI, N.; BOUGATEF, A.; TRIKI-ELLOUZ, Y.; NASRI, M. Production of lipase and biomass by *Staphylococcus simulans* grown on sardinella (*Sardinella aurita*) hydrolysates and peptone. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, p. 451-457, 2009.

SUN, X. M.; LI, Y. D. Colloidal Carbon Spheres and Their Core/Shell Structures with Noble-Metal Nanoparticles. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 43, 597-601, 2004.

SUN, Y.; GAO, B.; YAO, Y.; FANG, J.; ZHANG, M.; ZHOU, Y.; CHEN, H.; YANG, L. Effects of feedstock type, production method, and pyrolysis temperature on biochar and hydrochar properties. **Chemical Engineering Journal**, v. 240, p. 574-578, 2014.

TANG, C.; SAQUING, C. D.; SARIN, P. K.; KELLY, R. M.; KHAN, S. A. Nanofibrous membranes for single-step immobilization of hyperthermophilic enzymes. **Journal of Membrane Science**, v. 472, p. 251-260, 2014.

THAKUR, V.; TEWARI, R.; SHARMA, R. Evaluation of production parameters for maximum lipase production by *P. stutzeri* MTCC 5618 and scale-up in bioreactor. **Chinese Journal of Biology**, 2014. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/208462>.

TITIRICI, M. M.; ANTONIETTI, M. Chemistry and materials options of sustainable carbon materials made by hydrothermal carbonization. **Chemical Society Reviews**, v. 39, 103-116, 2010.

TITIRICI, M. M.; ANTONIETTI, M.; BACCILE, N. Hydrothermal carbon from biomass: a comparison of the local structure from poly- to monosaccharides and pentoses/hexoses. **Green Chemical**, v. 10, p. 1204-1212, 2008.

TITIRICI, M. M.; THOMAS, A.; YU, S.-H.; MÜLLER, J.-O.; ANTONIETTI, M. A Direct Synthesis of Mesoporous Carbons with Bicontinuous Pore Morphology from Crude Plant Material by Hydrothermal Carbonization. **Chemistry of Materials**, v. 19, p. 4205-4212, 2007.

TREICHEL, H.; DE OLIVEIRA, D.; MAZUTTI, M.; DI LUCCIO, M.; OLIVEIRA, J. V. A Review on Microbial Lipases Production. **Food and Bioprocess Technology**, v.3, p.182-196, 2010.

VAKHLU, J.; KOUR, A. Yeast lipases: enzyme purification, biochemical properties and gene cloning. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 9, p. 69-85, 2006.

VAZ, R. P.; MOREIRA, L. R. S.; FILHO, E. X. F. An overview of holocellulose-degrading enzyme immobilization for use in bioethanol production. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 33, p. 127-135, 2016.

VERGER, R. Interfacial activation of lipases: facts and artifacts. **Trends in Biotechnology**, v. 15, p. 32-38, 1997.

VERÍSSIMO, L. A. A.; SOARES, W. C. L.; MOL, P. C. G. et al. Development of a bioreactor based on lipase entrapped in a monolithic cryogel for esterification and interesterification reactions. **Revista Mexicana de Ingeniería Química**, v. 17, p. 177-187, 2018.

VIEIRA, L. H. S. **Preparação e caracterização de materiais híbridos ferro-carbono e avaliação de suas propriedades catalíticas**. 2016. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-CE.

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, n. 4-6, p. 113-148, 2000.

WANG, Q.; LI, H.; CHEN, L. Q.; HUANG, X. J. Monodispersed hard carbon spherules with uniform nanopores. **Carbon**, v. 39, p. 2211-2214, 2001.

WANG, X.; HU, C.; XIONG, Y.; LIU, H.; DU, G.; HE, X. Carbon-nanosphere-supported Pt nanoparticles for methanol and ethanol electro-oxidation in alkaline media. **Journal of Power Sources**, v. 196, 1904-1908, 2011.

WU, L.; WU, S.; XU, Z.; QIU, Y.; LI, S.; XU, H. Modified macroporous titanium dioxide as a novel carrier for enzyme immobilization. **Biosensors and Bioelectronics**, v.80, p. 59-66, 2016.

XIN, F.; ZHANG, W.; JIANG, M. Bioprocessing Butanol into More Valuable Butyl Butyrate. **Trends in Biotechnology**, v. 37, p. 923-926, 2019.

XUE, M.; CHEN, C.; TAN, Y.; REN, Z.; LI, B.; ZHANG, C. Mangosteen peel-derived porous carbon: synthesis and its application in the sulfur cathode for lithium sulfur battery. **Journal of Materials Science**, v. 53, p. 11062-11077, 2018.

YAHYA M. A.; AL-QODAH Z.; ZANARIAH, N. C. W. Agricultural bio-waste materials as potential sustainable precursors used for activated carbon production: a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 46, p. 218-235, 2015.

YU, W. H.; TONG, D. S.; FANG, M.; SHAO, P.; ZHOU, C. H. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on MSU-H type mesoporous silica for selective esterification of conjugated linoleic acid isomers with ethanol. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 111, p.43-50, 2015.

YVERGNAUX, F. Lipases: particularly effective biocatalysts for cosmetic active ingredients. **Oilseeds and Fats Crops and Lipids**, v. 24, p. 1-4, 2017.

ZHENG, C.-Z. et al. Regioselective synthesis of amphiphilic metoprolol-saccharide conjugates by enzymatic strategy in organic media. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 123-127, 2011.

**ARTIGO 1**

**PRODUÇÃO DE BIOTACALISADORES PARA SINTESE DE ESTERES: EFEITO DA  
CARBONIZAÇÃO HIDROTÉRMICA NAS PROPRIEDADES DO CARVÃO ATIVADO  
EMPEREGADO COMO SUPORTE PARA A IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE**

---

# PRODUÇÃO DE BIOTACALISADORES PARA SÍNTESE DE ESTERES: EFEITO DA CARBONIZAÇÃO HIDROTÉRMICA NAS PROPRIEDADES DO CARVÃO ATIVADO EMPREGADO COMO SUPORTE PARA A IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE

## RESUMO

O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito da carbonização hidrotérmica nas propriedades do carvão ativado do caroço de tamarindo, suporte utilizado na imobilização da lipase pancreática do porco (LPP), e avaliar o biocatalisador suportado na reação de síntese do butirato de butila. Para tal, foram produzidos hydrochars a partir do caroço de tamarindo, avaliando-se o efeito da concentração de substrato (15% m/m a 50% m/m), da temperatura (200°C a 280°C) e do tempo de carbonização hidrotérmica (3 h a 12 h) no teor de grupos oxigenados. Posteriormente, foram produzidos carvões a partir do farelo bruto (CAFT) e do hydrochar obtido na condição que levou a produção de hydrochar com maior teor de grupos oxigenados (CAHT), avaliando-se o efeito da carbonização hidrotérmica nas propriedades do carvão. Os carvões produzidos foram utilizados no processo de imobilização da LPP por adsorção em diferentes valores de pH (4,0, 5,0, 6,0, 7,0 e 8,0) do meio de imobilização. O CAHT apresentou em teor de grupos funcionais oxigenados superior a 33% em comparação com o CAFT, além de um menor pH do ponto de carga zero (4,42). Observou-se também diferenças nas propriedades texturais, com o CAHT apresentando um diâmetro médio dos poros de 3,20 nm, enquanto o CAFT apresentou um valor de 6,46 nm. O CAHT, apesar de ter apresentado uma menor capacidade adsortiva, levou à obtenção de um biocatalisador com uma maior atividade hidrolítica em todas as condições de pH avaliadas, sendo selecionado para ser utilizado nas etapas posteriores. O pH 5,0 foi o escolhido, por apresentar o maior valor de atividade hidrolítica (257,18 U.g<sup>-1</sup>). A adição de 0,025 m.v<sup>-1</sup> de Triton X-100 ao tampão de imobilização (tampão acetato 0,1 mol. L<sup>-1</sup>) promoveu um aumento próximo a 7% na atividade hidrolítica. Em seguida, as propriedades catalíticas do biocatalisador CAHT foram avaliadas, onde o pH ótimo de hidrólise foi o de 8,0 e a temperatura ótima foi a de 35°C. O biocatalisador reteve cerca de 68% de sua atividade inicial após 60 dias de armazenamento a ±6°C, além de reter 100% de sua atividade inicial após incubação em hexano por 4 horas a 40°C. A LPP imobilizada em pH 8,0 e 35°C foi utilizada na síntese do butirato de butila, com rendimento de esterificação de ±83%. O biocatalisador apresentou estabilidade ao reuso, com cerca de 84% do rendimento de esterificação do primeiro ciclo após 5 ciclos. Os resultados encontrados sugerem que o carvão produzido pode ser considerado uma alternativa promissora para a imobilização de lipases, com potencial de uso em processos de hidrólise de lipídios e síntese de aroma de frutas.

**Palavras-chave:** esterificação; éster de aroma; hydrochar; carvão ativado; ciclos de reuso.

## 1. INTRODUÇÃO

As biomassas lignocelulósicas são os resíduos agroindustriais mais abundantes do planeta e o descarte inadequado desses materiais promove graves problemas ambientais, como a contaminação dos solos e das águas, poluição atmosférica, entre outros (GONÇALVES et al., 2013; MENDES et al., 2015). Diante disso, surge a necessidade de estudos que possibilitem um melhor aproveitamento desses materiais.

Uma possibilidade que vem sendo explorada para o aproveitamento das biomassas lignocelulósicas é a utilização da carbonização hidrotérmica (CHT) para obtenção de materiais carbonáceos com características atrativas para uma variedade de aplicações, tais como adsorção, performance eletroquímica, bioimagem e catálise, entre outras (JAIN et al., 2016; QIAN et al., 2018; HUANG et al., 2019);

A CHT é uma técnica considerada simples e de baixo custo, na qual um material precursor é colocado em uma autoclave, utilizando preferencialmente água como solvente. A autoclave é aquecida até a temperatura desejada (geralmente na faixa de 150°C a 350°C), onde a pressão é autogerada, devido à vaporização da água. O produto sólido formado ao fim do processo recebe o nome de hydrochar (NIZAMUDDIN et al., 2017).

Uma maior utilização dos hydrochars, produzidos a partir de biomassa lignocelulósica, em diversas aplicações é prejudicada em virtude de sua baixa área superficial e porosidade. Para superar esses inconvenientes, uma alternativa viável seria a utilização dos hydrochars como precursores para a produção de carvões ativados (JAIN et al., 2016). Os carvões ativados são materiais carbonáceos que apresentam boa estabilidade química, elevada área superficial interna, porosidade altamente desenvolvida, além de apresentar diversos grupos funcionais em sua superfície (BRITO et al., 2017, AHMED et al., 2017).

Na última década, alguns estudos foram realizados visando avaliar o efeito da CHT em diversos materiais precursores de carbono. Esses estudos demonstraram que se realizada em condições adequadas, as reações que ocorrem na CHT podem aumentar o conteúdo de grupos funcionais oxigenados (GFOs) da biomassa, dando origem a um precursor altamente reativo e eficaz para a produção de carvões ativados quimicamente (ROMERO-ANAYA et al., 2014; JAIN et al., 2016).

Os carvões ativados produzidos a partir de hydrochars têm sido utilizados para uma variedade de aplicações, tais como materiais para supercapacitores (JAIN et al., 2015; SEVILLA et al., 2017), adsorção de corantes (JAIN et al., 2014; ISLAM et al., 2017), captura e armazenamento de gases (FALCO et al., 2013), entre outros. Considerando a área superficial BET e porosidade bem

desenvolvida, além dos grupos funcionais presentes em sua superfície, tais adsorventes apresentam potencial para serem utilizados como suporte voltado à imobilização de enzimas.

A utilização de enzimas imobilizadas apresenta diversas vantagens quando comparadas com as enzimas livres. O aumento da estabilidade operacional, a possibilidade de reutilização do biocatalisador, a retenção da atividade catalítica por um maior período de tempo, a possibilidade de conduzir processos em modo contínuo, a facilidade de separação do catalisador e do produto da reação e a interrupção da reação quando se atinge um determinado grau de conversão são algumas das vantagens, garantindo assim uma maior aplicação das enzimas em diversos processos industriais (GANAIE et al., 2014; GONÇALVES et al., 2019).

Dentre as enzimas com potencial de aplicação na forma imobilizada estão as lipases (RIAL et al., 2020; BINHAYEEDING et al., 2020). Devido à sua versatilidade, tais enzimas estão entre as mais utilizadas industrialmente (JAVED et al., 2018). Elas são pertencentes à classe das hidrolases, que catalisam a hidrólise de triacilgliceróis insolúveis para gerar ácidos graxos livres, diacilgliceróis, monoacilgliceróis e glicerol (GEOFFRY et al., 2018). As lipases destacam-se pela sua estabilidade às diversas condições operacionais do meio, além de reconhecer uma ampla variedade de substratos (RIOS et al., 2018). Tais características permitem a sua utilização na síntese de ésteres de aromas para a indústria de alimentos e bebidas, na indústria oleoquímica, farmacêutica, na formulação de detergentes, na síntese de biosurfactantes, no tratamento de efluentes, entre outras (JAVED et al., 2018). A utilização de surfactantes no meio de diluição das lipases é recomendada por alguns autores, pelo fato de estas tenderem a formar agregados quando em solução. De acordo com Veríssimo et al. (2018) e Oliveira et al. (2017), a adição de surfactantes no meio de diluição pode inibir a formação desses agregados, estabilizando a enzima em sua forma mais aberta, com consequente aumento na sua atividade catalítica.

As lipases podem ser obtidas a partir de fontes microbianas, animais ou vegetais. Entre as lipases obtidas a partir de fontes animais uma que vem apresentando destaque nos últimos anos é a lipase pancreática do porco - LPP (RIAL et al., 2020; CHEN et al., 2020). A LPP é uma proteína globular pequena, composta por uma cadeia simples contendo um total de 449 aminoácidos (RIAL et al., 2020). Apresenta uma massa molecular entre 50 e 52 kDa, dimensões de 4,6 nm x 2,6 nm x 1,1 nm e diâmetro molecular de cerca de 4 nm. Tal enzima vem sendo bastante utilizada em diversas reações de biotransformação, apresentando menor custo do que outras lipases comerciais disponíveis (MENDES et al., 2012). Duas possíveis aplicações para a LPP são na síntese de ésteres de aromas e em reações que envolvem a hidrólise de lipídios (SILVA et al., 2014).

Diante do exposto, o objetivo principal desse trabalho foi avaliar o efeito da carbonização hidrotérmica nas propriedades do carvão ativado do caroço de tamarindo, suporte utilizado na

imobilização da lipase pancreática do porco (LPP), e avaliar o biocatalisador imobilizado na reação de síntese do butirato de butila. As propriedades hidrolíticas do biocatalisador imobilizado também foram determinadas. Os caroços de tamarindo apresentam composição lignocelulósica adequado para emprego como precursor de carbono e são geralmente descartados sem nenhum aproveitamento tecnológico na maioria das propriedades produtoras, gerando resíduos. Dessa forma, surge a necessidade de estudos que busquem um melhor aproveitamento dos mesmos.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. Materiais

Nesse trabalho foi utilizada a lipase comercial de pâncreas do porco tipo II obtida da Sigma Aldrich (CAS number: 9001-62-1). Os reagentes utilizados possuíam, no mínimo, grau analítico PA-ACS e estão descritos ao longo da metodologia. O material precursor utilizado na produção dos carvões foi o caroço de tamarindo (*Tamarindus indica*) obtido a partir de uma agroindústria da região Sul da Bahia.

### 2.2. Preparo do material precursor

Os caroços de tamarindo foram lavados em água corrente para remoção das sujidades mais grosseiras. Em seguida foram secos em estufa a 105°C por 24 h. Após esse período foram triturados em moinho de facas e peneirados em peneira de 20 mesh.

### 2.3. Síntese dos hydrochars

Para a carbonização hidrotérmica do resíduo foi adaptada a metodologia proposta por Tag, Dugman e Yanik (2018). Primeiramente, 10 g do farelo do caroço de tamarindo foram pesados, colocados em uma cápsula de teflon e adicionada água em diferentes proporções, de acordo com o delineamento experimental apresentado na Tabela 1. Posteriormente, as cápsulas de teflon foram fechadas e colocadas em autoclaves de aço inoxidável. As autoclaves foram fechadas e aquecidas em forno mufla com taxa de 5 °C.min<sup>-1</sup> nas temperaturas e tempos estudados. Após a reação, as autoclaves foram rapidamente resfriadas em banho de gelo. O sólido obtido (hydrochar) foi filtrado e lavado com 100 mL de água destilada e seco em estufa a 105°C por 12 h.

#### 2.3.1. Delineamento experimental e análises estatísticas

Um delineamento composto central rotacional (DCCR) foi utilizado para verificar as melhores condições de formação dos grupos funcionais oxigenados (variável resposta) no hydrochar produzido,

para as variáveis independentes temperatura de carbonização, tempo de carbonização e concentração da biomassa. Foram realizados 18 ensaios, sendo 8 fatoriais (combinação entre os níveis -1 e +1), 6 axiais e 1 central com 4 repetições, conforme apresentado na Tabela 1.

Os resultados obtidos para os diferentes tratamentos foram submetidos à análise de regressão linear múltipla, adotando-se o modelo adequado ao delineamento em questão (Equação 1).

$$\hat{Y} = \hat{\beta}_0 + \hat{\beta}_1 X_1 + \hat{\beta}_2 X_2 + \hat{\beta}_3 X_3 + \hat{\beta}_4 X_1^2 + \hat{\beta}_5 X_2^2 + \hat{\beta}_6 X_3^2 + \hat{\beta}_7 X_1 X_2 + \hat{\beta}_8 X_1 X_3 + \hat{\beta}_9 X_2 X_3 \quad (1)$$

Onde:  $\hat{Y}$  é a variável resposta (quantidade de grupos funcionais oxigenados,  $\text{mEq.g}^{-1}$ ),  $\hat{\beta}_0$  é o intercepto do modelo,  $\hat{\beta}_1$ ,  $\hat{\beta}_2$  e  $\hat{\beta}_3$  são os coeficientes lineares,  $\hat{\beta}_4$ ,  $\hat{\beta}_5$  e  $\hat{\beta}_6$  são os coeficientes quadráticos,  $\hat{\beta}_7$ ,  $\hat{\beta}_8$  e  $\hat{\beta}_9$  são os coeficientes de interação e  $X_1$ ,  $X_2$  e  $X_3$  são as variáveis independentes estudadas.

**Tabela 1.** Níveis e variáveis estudadas no DCCR.

| Variáveis           | Níveis |        |        |        |        |
|---------------------|--------|--------|--------|--------|--------|
|                     | -1,68  | -1     | 0      | +1     | +1,68  |
| Tempo (h)           | 3,00   | 4,84   | 7,50   | 10,18  | 12,00  |
| Temperatura (°C)    | 200,00 | 216,19 | 240,00 | 263,61 | 280,00 |
| Concentração (%m/m) | 15,00  | 22,08  | 32,50  | 42,92  | 50,00  |

#### 2.4. Caracterização do material precursor e do hydrochar

O farelo do caroço de tamarindo foi caracterizado em relação aos teores de cinzas e umidade através das metodologias propostas pela AOAC (1995). Para os teores de lignina, celulose e hemicelulose utilizou-se a metodologia de fibra detergente neutra (FDN) e fibra detergente ácida (FDA), descrita por Van Soest et al (1991).

Os grupos funcionais do farelo e do hydrochar utilizados na síntese dos carvões ativados foram avaliados por Espectrofotometria no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR). As amostras avaliadas foram analisadas de forma direta utilizando a técnica de reflectância total atenuada (ATR), detector de sulfato de triglicina deuterado (DTGS), na região infravermelha de  $4000\text{-}650\text{ cm}^{-1}$  em espectrofotômetro Infravermelho médio Cary 630 FTIR (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA), utilizando o Agilent MicroLab PC software.

A quantificação dos grupos funcionais oxigenados totais presentes no farelo e nos hydrochars foi realizada utilizando a metodologia titulométrica descrita por Boehm (1966).

## 2.5. Obtenção dos carvões ativados

Para a síntese do carvão ativado foi utilizado o hydrochar do farelo do caroço de tamarindo na condição experimental que levou à obtenção de um material com o maior teor de grupos funcionais oxigenados. Para efeito de comparação, o carvão também foi produzido a partir do resíduo sem tratamento hidrotérmico. Os diferentes precursores (hydrochar ou farelo) foram impregnados utilizando o ácido fosfórico (Vetec 85% P.A.) como ativante químico, na razão de impregnação de 3:1 (massa de ativante:massa do precursor) e secos em estufa a 105 °C por 24 h. Após este período os mesmos foram carbonizados em 680°C a uma taxa de aquecimento de 5°C.min<sup>-1</sup>, sob fluxo de nitrogênio (50 mL.min<sup>-1</sup>) durante 2 h. Após a carbonização, os carvões foram lavados com água quente, até à neutralização da água de lavagem. Após a lavagem, as amostras foram secas a 105°C durante 24 h, peneirados em peneira de 20 mesh e acondicionadas em embalagens herméticas.

### 2.5.1. Caracterização dos carvões ativados

Os carvões ativados com e sem carbonização hidrotérmica foram caracterizados em relação ao rendimento, teor de cinzas, espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), pH do ponto de carga zero, teor de grupos oxigenados totais, microscopia eletrônica de varredura (MEV) e medidas de porosidade e área superficial específica.

O rendimento do processo de síntese dos carvões foi calculado através da Equação 2.

$$R_c(\%) = \frac{m_c}{m_p} \times 100 \quad (2)$$

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

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

Os grupos funcionais foram avaliados por Espectrofotometria no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) empregando metodologia apresentada no item 2.4.

O pH do ponto de carga zero ( $pH_{PCZ}$ ) é definido como o pH em que a superfície do carvão possui carga neutra e o mesmo foi determinado empregando a metodologia descrita por Regalbuto e Robles (2004).

O teor de grupos oxigenados totais foi determinado nos diferentes carvões utilizando o método titulométrico de Boehm (1966), para verificar se a carbonização hidrotérmica dos resíduos resulta em carvões com um maior teor de grupos funcionais oxigenados.

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). As isotermas de adsorção e dessorção utilizadas foram determinadas em um equipamento Micromeritics modelo ASAP 2420 (Micromeritics Instrument Corporation, Norcross, GA 30093 USA), utilizando aproximadamente 0,15 g de amostra a 77 K.

Para melhor conhecimento da estrutura dos carvões produzidos, foi realizada a análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos mesmos. Para isso, as diferentes amostras foram desidratadas, fixadas em suportes apropriados (stubs) e levadas para análise em um microscópio eletrônico de varredura (QUANTA 250, FEI COMPANY, Waltham, Massachusetts, EUA).

## **2.6. Imobilização da lipase do pâncreas do porco nos carvões ativados obtidos**

### **2.6.1 Efeito do pH na imobilização da lipase.**

Foi avaliada a imobilização da lipase de pâncreas de porco (LPP) pelo método de adsorção nos carvões ativados com e sem carbonização hidrotérmica em diferentes valores de pH (4,0, 5,0, 6,0, 7,0 e 8,0), para verificar as diferenças nos valores de atividade da enzima imobilizada nos mesmos. A imobilização foi conduzida utilizando-se condições determinadas em ensaios preliminares. Cerca de 0,1g de carvão e 5mL de solução com uma concentração inicial de lipase de 6000 mg.L<sup>-1</sup> em tampão acetato 0,1 mol. L<sup>-1</sup>, foram mantidos durante 2h sob agitação (20 rpm) a 30°C em estufa BOD. Após esse tempo, os tubos foram centrifugados e o sobrenadante foi filtrado. Os carvões foram lavados com o tampão de imobilização, para remoção da enzima não ligada. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Para determinação da quantidade de enzima imobilizada nos carvões ativados foi feita a determinação de proteína no sobrenadante antes e após a imobilização, utilizando-se o método de Bradford (1976). A atividade das soluções de lipase (antes e após o processo de imobilização) e dos carvões contendo a lipase imobilizada foram determinadas utilizando o método da hidrólise de emulsão do azeite de oliva, conforme descrito por Brito et al (2017). Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 μmol de ácido graxo por minuto de reação, nas condições de reação (40°C, pH 8,0 e 200 rpm). Um experimento controle (branco) também foi feito. O branco para as soluções enzimáticas (antes e após a imobilização) foi feito utilizando tampão acetato utilizado na imobilização, sem adição de lipase. O branco para o carvão contendo a lipase imobilizada foi feito utilizando-se o carvão sem a enzima. A atividade do biocatalisador foi expressa em U/g.

Após verificar qual carvão ativado com a enzima imobilizada apresentou maior atividade enzimática, este foi selecionado para ser utilizado nas etapas posteriores.

### **2.6.2. Efeito da adição do surfactante Triton X-100 na imobilização da lipase**

Após avaliar o efeito do pH da solução inicial na imobilização da lipase, foi verificado que a lipase imobilizada no carvão obtido a partir do hydrochar apresentou maior atividade enzimática, sendo então selecionado para ser utilizado nas etapas posteriores.

Visando avaliar o efeito do surfactante Triton X-100 na imobilização e atividade da lipase no carvão ativado, foram realizados estudos em diferentes concentrações de surfactante (0,025% m.v<sup>-1</sup>, 0,0375% m.v<sup>-1</sup> e 0,05% m.v<sup>-1</sup>) e os resultados foram comparados com o carvão sem utilização de surfactante, selecionado na etapa anterior. Alíquotas de 5 mL da solução enzimática 6000 mg.L<sup>-1</sup> com o surfactante, no pH ótimo de imobilização, foram adicionadas em tubos de 15 mL contendo 0,1 g do CHT. Os tubos foram mantidos sob agitação orbital constante (20 rpm), em estufa BOD na temperatura de 30°C. Após 2 h, os tubos foram retirados da BOD e o sobrenadante foi retirado do contato com o carvão, sendo lavado com tampão acetato 0,1 mol.L<sup>-1</sup> (pH 5,0), para remoção da enzima não ligada. A capacidade adsortiva e atividade enzimática foram determinadas utilizando as mesmas metodologias descritas no item 2.6.1.

### **2.7. Propriedades catalíticas do biocatalisador**

Foram determinadas as propriedades catalíticas do biocatalisador imobilizado (atividade hidrolítica) no pH e com a concentração de Triton definidos nas etapas anteriores e da enzima livre (concentração de 6000 mg.L<sup>-1</sup>). Os parâmetros avaliados nessa etapa foram o pH e temperatura ótima de hidrólise. O pH ótimo de hidrólise foi determinado na LPP livre e imobilizada por meio da variação do pH (faixa de 5,0 a 9,0) utilizando a mesma metodologia descrita no item 2.6.1. Após determinação do pH ótimo de hidrólise do azeite de oliva, este foi utilizado na determinação da temperatura ótima de hidrólise na LPP livre e imobilizada, a qual foi variada na faixa de 20 °C a 55 °C. Os resultados da influência do pH e temperatura de hidrólise para a LPP livre e imobilizada foram plotados em gráficos, onde as maiores atividades foram consideradas como 100% e as demais atividades relativas (%) foram calculadas a partir destas.

### **2.8. Estabilidade ao tempo de armazenamento**

Com o intuito de se avaliar a estabilidade da lipase imobilizada no carvão em relação ao tempo de armazenamento, a mesma foi armazenada em tampão acetato (100 mM) em pH 5,0, por um período máximo de 60 dias em uma temperatura de  $\pm 6$  °C. A atividade enzimática foi determinada em diferentes tempos de armazenamento (1, 5, 10, 20, 30, 45, 60 dias) nas condições ótimas de cada variável determinada anteriormente, utilizando procedimento descrito no item 2.6.1.

## 2.9. Estabilidade da lipase imobilizada no carvão em presença de solvente orgânico

Com o intuito de verificar a estabilidade da enzima imobilizada em relação ao solvente orgânico hexano, uma massa conhecida do biocatalisador imobilizado foi colocado em contato com hexano puro na razão 1:10 (massa de biocatalisador:volume de hexano) por um período máximo de 4 h, sob condições estáticas, na temperatura de 40 °C. Após esse período, os carvões foram lavados com tampão acetato em pH 5,0 (100 mM), para remoção do hexano, e a atividade do biocatalisador foi determinada nas condições ótimas de cada variável determinada anteriormente, utilizando procedimento descrito no item 2.6.1. A atividade do biocatalisador que não foi colocado em contato com o hexano foi utilizado como controle (100% de atividade).

## 2.10. Síntese do butirato de butila

A reação de síntese do butirato de butila foi realizada utilizando uma mistura de butanol (240 mM) e ácido butírico (120 mM), solubilizados em hexano, na razão molar de 2:1. O meio reacional (5 mL) foi incubado com cerca de 0,5 g do carvão contendo a lipase imobilizada em frascos Duran de 50 mL, sob agitação de 200 rpm em shaker orbital, na temperatura controlada de 40°C, por um período de 4 h. As variáveis razão molar do substrato, massa do carvão e tempo de reação foram definidos em estudos preliminares. O rendimento da esterificação (Y %) na síntese do butirato de butila foi determinado por meio do conteúdo de ácido butírico antes e após a reação, utilizando a Equação 3 (SILVA et al., 2014; VERÍSSIMO et al., 2018).

$$Y = \left( \frac{A_I - A_F}{A_I} \right) \times 100 \quad (3)$$

Onde: Y é o rendimento de esterificação (%),  $A_I$  é a concentração inicial de ácido butírico (mM) e  $A_F$  é a concentração final de ácido butírico (mM).

O conteúdo de ácido butírico foi determinado utilizando um cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC) da marca Shimadzu (Japan), com detector de matriz de diodo (Shimadzu, Japan). Uma coluna de aço inoxidável CLC (M) (250 mm x 4,6 mm, Shimadzu, Japan) foi utilizada para separação cromatográfica. A fase móvel foi composta por acetonitrila/água (75:25, v/v) com taxa de fluxo de 0,8 mL.min<sup>-1</sup>. Um volume de amostra de 20 µL foi injetado no cromatógrafo e o ácido foi eluído da coluna utilizando método isocrático.

### 2.10.1. Estabilidade operacional do biocatalisador

A estabilidade operacional do biocatalisador foi avaliada pela realização de 5 ciclos sucessivos de reações de esterificação, utilizando o mesmo procedimento descrito anteriormente. Após cada ciclo, o biocatalisador era lavado com hexano para remoção dos substratos remanescentes, em seguida

colocado em contato com uma nova solução de substrato e a reação era realizada nas mesmas condições anteriores. O rendimento de esterificação residual foi determinado, considerando o rendimento do primeiro ciclo como 100% e os demais rendimentos residuais foram calculados em relação a este.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Caracterização do material precursor

Na Tabela 2 são apresentados os resultados de caracterização química do farelo do caroço de tamarindo.

**Tabela 2.** Caracterização química do farelo do caroço de tamarindo.

| Amostra                    | Celulose (%) | Hemicelulose (%) | Lignina (%) | Cinzas (%) | GFO (mEq.g <sup>-1</sup> ) |
|----------------------------|--------------|------------------|-------------|------------|----------------------------|
| <b>Caroço de tamarindo</b> | 33,31±3,56   | 10,45±1,45       | 33,07±1,40  | 1,82±0,01  | 1,95±0,14                  |

Pode-se observar que o farelo do caroço de tamarindo apresenta relação celulose/lignina de aproximadamente igual a 1,0. Segundo Jain et al. (2016), a carbonização hidrotérmica de resíduos lignocelulósicos é adequada para a formação de hydrochars com elevado teor de GFO. Entretanto, esse teor depende fortemente da composição do material precursor, bem como das condições de carbonização hidrotérmica, tais como temperatura, tempo e concentração de substrato. Além disso, a composição química dos precursores influencia diretamente no rendimento dos carvões ativados. Carvões produzidos a partir de materiais com elevado teor de lignina tendem a apresentar maiores rendimentos, pois a mesma apresenta maior estabilidade térmica do que a celulose e hemicelulose (REED; WILLIAMS, 2004). Observa-se que o material precursor apresentou um baixo teor de cinzas. De acordo com Li e Wang (2008), um baixo teor de cinzas dos precursores pode levar à produção de carvões ativados com maior área superficial e melhor desenvolvimento dos poros.

#### 3.2. Carbonização hidrotérmica do resíduo lignocelulósico

Na Tabela 3 estão apresentadas as quantidades de grupos funcionais oxigenados do farelo do caroço de tamarindo após o tratamento hidrotérmico nas condições experimentais estudadas utilizando o DCCR como ferramenta estatística. O teor de grupos funcionais oxigenados, determinados pelo método de Boehm, foi escolhida como variável resposta.

**Tabela 3.** Quantidade de grupos funcionais oxigenados do farelo do caroço de tamarindo (GFO-T), após tratamento hidrotérmico no DCCR utilizado.

| <b>Ensaio</b> | <b>Tempo (h)</b> | <b>Temperatura (°C)</b> | <b>Conc. Substrato (% m/m)</b> | <b>GFO-T (mEq/g)</b> |
|---------------|------------------|-------------------------|--------------------------------|----------------------|
| 1             | -1 (4,82)*       | -1 (216,19)             | -1 (22,08)                     | 3,5472               |
| 2             | +1 (10,18)       | -1 (216,19)             | -1 (22,08)                     | 3,3433               |
| 3             | -1 (4,82)        | +1 (263,81)             | -1 (22,08)                     | 2,7955               |
| 4             | +1 (10,18)       | +1 (263,81)             | -1 (22,08)                     | 1,2235               |
| 5             | -1 (4,82)        | -1 (216,19)             | +1 (42,92)                     | 3,4986               |
| 6             | +1 (10,18)       | -1 (216,19)             | +1 (42,92)                     | 3,5528               |
| 7             | -1 (4,82)        | +1 (263,81)             | +1 (42,92)                     | 3,1000               |
| 8             | +1 (10,18)       | +1 (263,81)             | +1 (42,92)                     | 1,7935               |
| 9             | -1,68 (3,00)     | 0 (240,00)              | 0 (32,50)                      | 3,7564               |
| 10            | +1,68 (12,00)    | 0 (240,00)              | 0 (32,50)                      | 2,7390               |
| 11            | 0 (7,50)         | -1,68 (200,00)          | 0 (32,50)                      | 3,4445               |
| 12            | 0 (7,50)         | +1,68 (280,00)          | 0 (32,50)                      | 0,7756               |
| 13            | 0 (7,50)         | 0 (240,00)              | -1,68 (15,00)                  | 2,9371               |
| 14            | 0 (7,50)         | 0 (240,00)              | +1,68 (50,00)                  | 2,8931               |
| 15            | 0 (7,50)         | 0 (240,00)              | 0 (32,50)                      | 3,1834               |
| 16            | 0 (7,50)         | 0 (240,00)              | 0 (32,50)                      | 2,8409               |
| 17            | 0 (7,50)         | 0 (240,00)              | 0 (32,50)                      | 3,2358               |
| 18            | 0 (7,50)         | 0 (240,00)              | 0 (32,50)                      | 2,9476               |

\* Os números em parênteses representam os valores das variáveis não codificadas.

Os resultados obtidos para os grupos funcionais oxigenados (GFO) foram submetidos à análise de variância (ANOVA) ( $p < 0,05$ ) e a significância do modelo foi verificada pelo teste F. Para isso, as variáveis independentes foram submetidas à análise de regressão utilizando seus valores codificados. Todos os parâmetros que não foram significativos foram agrupados ao erro e um novo modelo reduzido foi obtido. Os resultados da análise estão apresentados na Tabela 4.

Observa-se que o modelo de regressão foi significativo e a falta de ajuste não significativa. As significâncias dos parâmetros do modelo gerado para o caroço de tamarindo são apresentadas na Tabela 5. Verifica-se que nenhum parâmetro contendo a variável concentração (%m/m) apresentou efeito sobre os grupos oxigenados totais a 5% de significância, sendo retirados do modelo. Pode-se observar que a temperatura apresentou um efeito quadrático para os grupos oxigenados totais e o

tempo apresentou um efeito linear. Além disso, a interação entre as variáveis tempo e temperatura foi significativa.

**Tabela 4.** Análise de variância da regressão do farelo de tamarindo para as variáveis codificadas.

| FV              | GL | SQ      | QM     | F     | Prob.   |
|-----------------|----|---------|--------|-------|---------|
| Regressão       | 4  | 10,6042 | 2,6510 | 54,61 | <0,0001 |
| Falta de ajuste | 5  | 0,2211  | 0,0442 | 1,25  | 0,4564  |
| Resíduo         | 8  | 0,4099  | 0,0512 |       |         |
| Total           | 17 | 11,2352 |        |       |         |

**Tabela 5.** Estimativa dos parâmetros do modelo (dados codificados).

| Parâmetro              | Estimativa | Valor-p |
|------------------------|------------|---------|
| $\beta_0$ (intercepto) | 3,1101     | <0,0001 |
| $\beta_1$ ( $X_1$ )    | -0,3472    | <0,0001 |
| $\beta_2$ ( $X_2$ )    | -0,6972    | <0,0001 |
| $\beta_3$ ( $X_2^2$ )  | -0,3206    | 0.0001  |
| $\beta_4$ ( $X_1X_2$ ) | -0,3411    | 0.0007  |

$X_1$ = tempo (min);  $X_2$ = temperatura ( $^{\circ}$ C).

Para um melhor entendimento do efeito das variáveis independentes sobre a variável resposta GFO, o modelo para as variáveis decodificadas foi determinado (Equação 4).

$$\text{GFO-T} = -31,08206 + 1,15336X_1 + 0,28222X_2 - 0,00056544X_2^2 - 0,00535X_1X_2 \quad (4)$$

$$R^2 = 0,9438$$

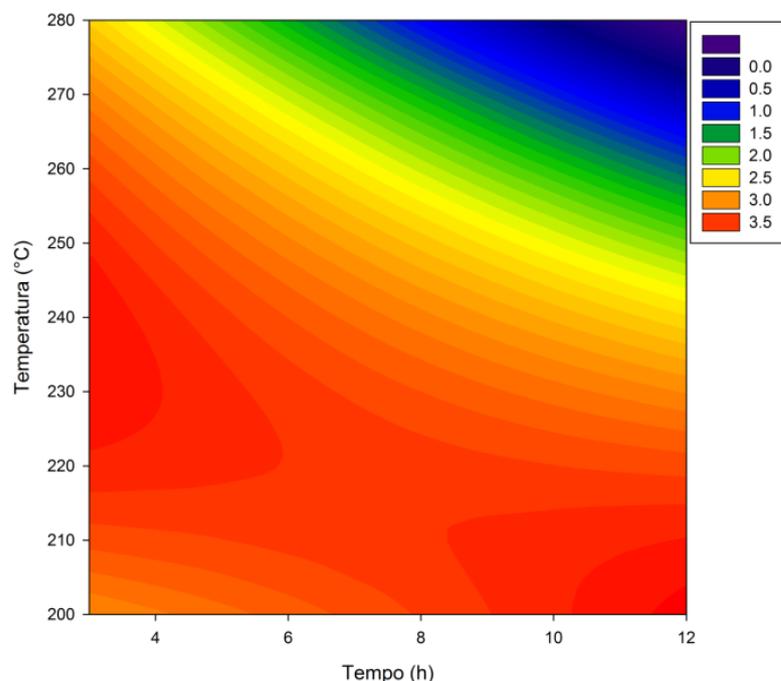
Onde: GFO-T é quantidade de grupos funcionais oxigenados do farelo de tamarindo ( $\text{mEq.g}^{-1}$ );  $X_1$  é o tempo (h) e  $X_2$  é a temperatura ( $^{\circ}$ C).

Posteriormente, a partir da Equação 4 foi plotado um gráfico de superfície de resposta para melhor visualização do efeito das variáveis (Figura 1).

A partir da análise do gráfico é possível observar as melhores faixas de tempo e temperatura para se obter maiores valores de grupos funcionais oxigenados nos hydrochars produzidos. Nas condições experimentais estudadas, a combinação de longos tempos e elevadas temperaturas promoveram uma redução no teor de GFO. Observa-se na Figura 1 duas regiões com maiores concentrações de GFO. A primeira utilizando intervalos de tempo entre 3 h e 4 h e em temperaturas entre  $223^{\circ}\text{C}$  e  $248^{\circ}\text{C}$  e a segunda no intervalo de tempo de 10,18 h a 12 h utilizando temperatura entre  $200^{\circ}\text{C}$  e  $210^{\circ}\text{C}$ . Para efeitos de otimização, a região de trabalho escolhida para a síntese do hydrochar

do caroço de tamarindo nas etapas posteriores foi a primeira, por apresentar menores tempos. O hydrochar do farelo do caroço de tamarindo foi então produzido na temperatura de 235°C e no tempo de 3 h, pois, nessas condições ele encontra-se na região com maior produção de GFO.

**Figura 1.** Superfície de resposta do modelo obtido para a CHT do farelo do caroço de tamarindo.



O valor predito a partir da Equação 4 nessas condições foi de 3,70 mEq.g<sup>-1</sup> de grupos oxigenados no hydrochar produzido. Para confirmação dos resultados, 3 repetições de carbonização hidrotérmica foram realizadas nas condições de tempo e temperatura escolhidas. A concentração, apesar de não apresentar efeito significativo a 5% de probabilidade, foi fixada em 32,5 %, pois, após análise da Tabela 3, verifica-se que o ensaio 9 apresentou o maior valor experimental e as condições de tempo e temperatura estão próximas as selecionadas pela superfície de resposta. O teor de GFO obtido experimentalmente para o hydrochar foi de 3,67±0,12 mEq.g<sup>-1</sup>, indicando que o modelo obtido é adequado e o valor da região de ótimo estimado pelo modelo está em concordância com o valor experimental. Comparando o teor de GFO do farelo do caroço de tamarindo, 1,95±0,14 mEq.g<sup>-1</sup>, com o valor para o hydrochar obtido da região ótima, verifica-se que a carbonização hidrotérmica foi eficiente para aumentar o teor desses grupos em 87,91%. Esses resultados estão relacionados com a composição lignocelulósica dos materiais precursores. O caroço de tamarindo, por possuir um elevado teor de lignina em sua composição, apresentou um elevado aumento no teor de GFO em função de a lignina possuir uma estrutura mais aberta, sendo mais acessível para reagir. Kang et al. (2012), verificaram que a CHT de lignina ou materiais lignocelulósicos promovem a hidrólise da

estrutura e dão origem a hydrochars fenólicos, que apresentam muitos grupos contendo oxigênio em sua estrutura.

O rendimento em hydrochar nas condições definidas para produção do mesmo (235°C, 3h e 32,5% m.m<sup>-1</sup>) foi aproximadamente 56%. Esse valor justifica-se pelo fato do precursor possuir uma relação lignina:celulose próximo a 1 em sua composição (Tabela 2). Sabe-se que em condições hidrotérmicas a hemicelulose inicia a sua decomposição em cerca de 160°C, a celulose na faixa de 180°C a 200°C e a lignina inicia sua decomposição a partir de 220°C (HEIDARI et al. 2019). Um maior teor de lignina garante, portanto, um alto rendimento, visto que sua degradação ocorre em temperaturas superiores quando comparada com a hemicelulose e a celulose.

### **3.3. Caracterização dos carvões**

#### ***3.3.1. Caracterização química e rendimento dos carvões produzidos***

Foram produzidos carvões ativados com ácido fosfórico utilizando o hydrochar produzido na etapa anterior e o farelo bruto do caroço de tamarindo. Na Tabela 6 estão apresentados os resultados de rendimento e caracterização dos diferentes carvões ativados produzidos.

Observa-se na Tabela 6 que os carvões ativados produzidos apresentaram valores de rendimentos próximos, demonstrando que a carbonização hidrotérmica não afetou no rendimento do carvão. O tratamento hidrotérmico expôs os grupos funcionais oxigenados, mas não degradou de forma efetiva os compostos lignocelulósicos, sendo o rendimento do CAHT governado pela temperatura utilizada na síntese dos carvões. Quando comparados com outros trabalhos da literatura os rendimentos obtidos foram superiores. Pinto et al. (2013) obtiveram um rendimento de 22,32% ao produzir carvão ativado a partir do buriti, enquanto Pereira et al. (2014) obtiveram um rendimento de cerca de 20% e 30% ao produzir carvões ativados a partir de casca de cacau e semente de siriguela, respectivamente. Sabe-se que o rendimento do carvão ativado está diretamente ligado aos componentes lignocelulósicos do material precursor, além das condições operacionais da etapa de carbonização. Durante a carbonização, a hemicelulose apresenta temperatura de degradação entre 200 °C-280 °C, a celulose entre 260 °C-350 °C e a lignina entre 280 °C-500 °C (JAIN; TRIPATHI, 2014). Assim sendo, um maior teor de lignina favorece o aumento do rendimento dos carvões ativados. Além dos componentes lignocelulósicos, a ativação química utilizando ácido fosfórico resulta em carvões com elevados rendimentos (YAHYA et al., 2015; BRITO et al., 2017). Segundo Brito et al. (2017), a ativação com ácido fosfórico promove a formação de ligações ésteres de fosfato entre os polímeros presentes na cadeia lignocelulósica, formando assim uma camada protetora (matriz rígida) na estrutura interna dos poros que evita a queima excessiva do precursor e limita as perdas de voláteis

durante o aquecimento, levando a um maior rendimento.

**Tabela 6.** Caracterização química e rendimento dos carvões ativados produzidos. CAHT: carvão ativado produzido utilizando o hydrochar do caroço de tamarindo como precursor; CAFT: carvão ativado produzido utilizando o farelo bruto do caroço de tamarindo como precursor.

| Caracterização         | Amostras   |            |
|------------------------|------------|------------|
|                        | CAFT       | CAHT       |
| Rendimento (%)         | 35,75±0,04 | 34,21±0,01 |
| GFO (mEq/g)            | 2,15±0,07  | 2,85±0,07  |
| Teor de cinzas (% m/m) | 9,12±0,02  | 8,56±0,03  |
| pH <sub>PCZ</sub>      | 5,13       | 4,42       |

Os teores de cinzas para ambos os carvões foram inferiores a 10 % (Tabela 6). De acordo com Mahamad et al. (2015), o teor de cinzas do carvão ativado deve variar entre 1,0 % a 12 %, sendo composto principalmente por aditivos minerais não carbônicos, provenientes do material precursor, além de componentes derivados dos agentes ativantes, que podem ficar retidos ou ligados ao material carbonáceo após o processo de pirólise, não sendo lixiviados no processo de lavagem. Teores mais elevados são indesejáveis nos carvões ativados, pois podem reduzir a capacidade adsortiva devido ao bloqueio dos poros dos carvões, além de adsorver preferencialmente água, pelo fato destas apresentarem caráter hidrofílico (SAYGILI; GÜZEL; ÖNAL, 2015).

Em relação ao teor de grupos funcionais oxigenados (GFO), observa-se que a carbonização hidrotérmica foi eficiente para produzir um carvão com maior teor desses grupos na superfície (Tabela 6). O carvão ativado a partir do hydrochar (CAHT) apresentou um teor de GFO cerca de 32,5% superior quando comparado com o obtido a partir do farelo bruto (CAFT). A maior presença desses grupos nos carvões ativados pode resultar em uma maior capacidade adsortiva (SHAFEEYAN et al., 2010; BHATNAGAR et al., 2013), além de ampliar a possibilidade de funcionalizações posteriores nos carvões (DAUD; HOUSHAMND, 2010).

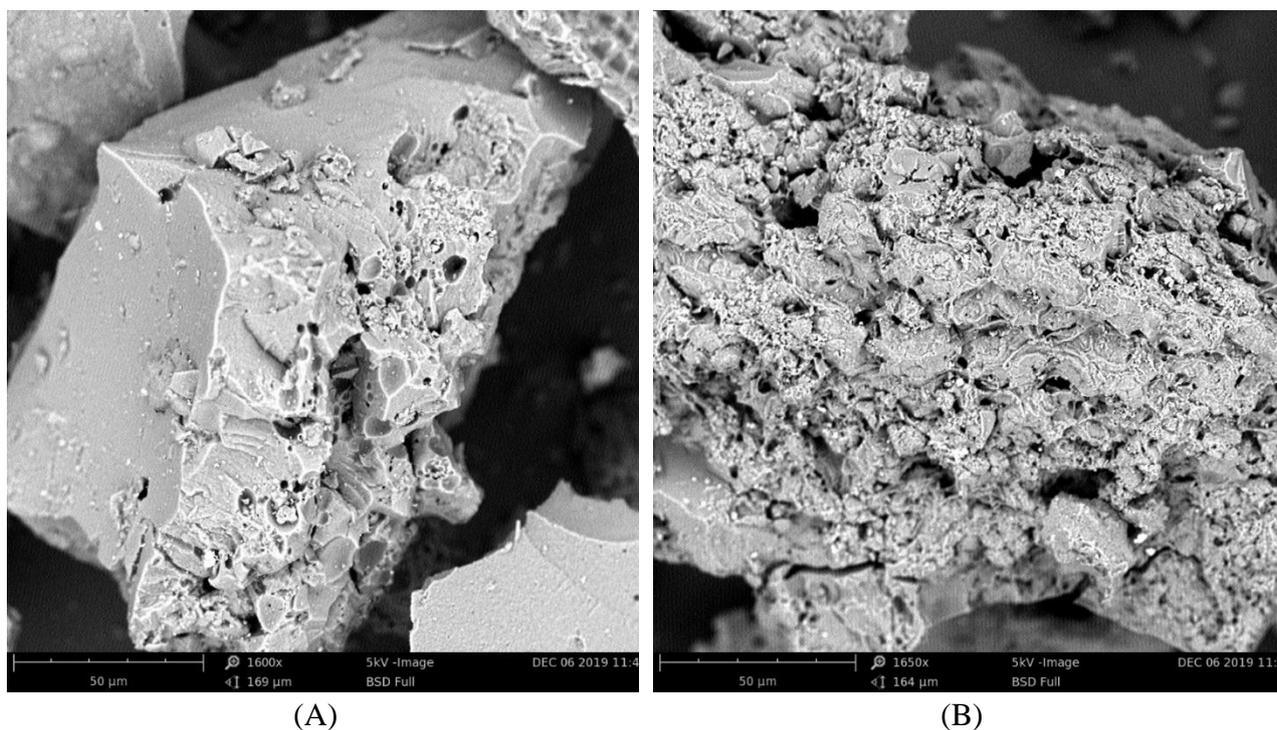
O ponto de carga zero (pH<sub>PCZ</sub>) também foi determinado para investigar as cargas superficiais dos carvões produzidos. Os carvões apresentaram pH<sub>PCZ</sub> ácido, com o CAHT apresentando valor inferior para tal variável (Tabela 6). Os resultados encontrados estão condizentes ao teor de GFO, indicando maior presença de grupos oxigenados (ácidos) na superfície do CAHT. O menor valor do pH<sub>PCZ</sub> para o CAHT pode ser decorrente da maior quantidade de grupos oxigenados do hydrochar em relação ao farelo bruto, promovendo uma maior reação com o agente ativante. A determinação do pH<sub>PCZ</sub> é importante pelo fato de o pH do sistema afetar diretamente no processo de adsorção, devido a dissociação de grupos funcionais sobre os sítios ativos da superfície do adsorvente (BRITO et al.,

2017). O  $pH_{PCZ}$  é definido como o pH em que a superfície do adsorvente apresenta a densidade de cargas elétricas superficiais nulas, ou seja, o número de cargas positivas é igual ao de cargas negativas. Quando o adsorvente entra em contato com uma solução com pH abaixo do  $pH_{PCZ}$  a superfície do carvão é carregada positivamente, gerando uma maior eficiência para a adsorção de compostos aniônicos. De modo oposto, quando o carvão entra em contato com uma solução com pH superior ao  $pH_{PCZ}$  sua superfície torna-se carregada negativamente, adsorvendo preferencialmente compostos catiônicos (BRITO et al., 2017; SANTOS et al., 2019).

### 3.3.2. Microscopia eletrônica de varredura dos carvões

As imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura dos carvões produzidos são apresentadas na Figura 2. Em ambos os carvões pode-se observar a presença de poros irregulares na estrutura, com formação de poros de diferentes tamanhos. Observa-se nas imagens que o CAHT apresentou uma estrutura mais irregular e menos densa, com aspecto esponjoso. Verifica-se ainda que no CAHT há um maior formação de pequenos poros por toda a estrutura, possivelmente decorrente da etapa de pré-tratamento hidrotérmico ao material precursor.

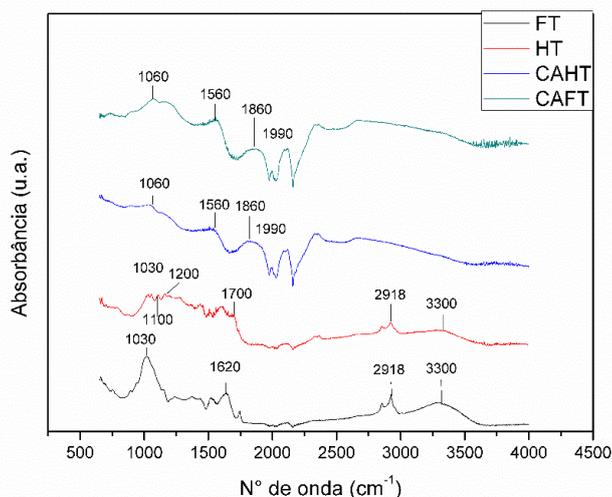
**Figura 2:** Microscopia eletrônica de varredura dos carvões produzidos. (A) CAFT; (B) CAHT.



### 3.3.3. Espectrofotometria de absorção no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Observa-se na Figura 3 os espectros de FTIR do farelo (FT), hydrochar (HT) e carvões ativados (CAHT, CAFT) obtidos a partir do caroço de tamarindo e derivados.

**Figura 3.** Espectros de FTIR do farelo, hydrochar e carvões ativados do caroço de tamarindo.



Analisando as bandas para o FT, observa-se que o mesmo apresentou bandas nos comprimentos característicos da matéria lignocelulósica: 3300 cm<sup>-1</sup>, atribuídos ao estiramento das vibrações do grupo hidroxila (-OH) pertencentes à estrutura da celulose; 2918 cm<sup>-1</sup>, resultantes da deformação axial de ligações C-H característicos de celulose, hemicelulose e lignina; 1030 cm<sup>-1</sup>, referente aos estiramentos do grupo C-O das estruturas de lignina, celulose e hemicelulose; 1620 cm<sup>-1</sup>, referentes a C=O presentes na carboximetilcelulose (BRUM et al., 2008; MORETTI et al., 2014; PEREIRA et al., 2014).

Verifica-se através dos espectros de FTIR do HT, que após a carbonização hidrotérmica são mantidos os grupos funcionais de maior intensidade presentes no farelo, porém algumas bandas sofreram redução de intensidade. Destacam-se: 3300 cm<sup>-1</sup>, atribuído à hidroxila (-OH) presente na estrutura da celulose; 2918 cm<sup>-1</sup>, atribuído a ligação C-H característicos de celulose, hemicelulose e lignina; 1030 cm<sup>-1</sup>, referente ao estiramento do grupo C-O ou C-O-C da lignina, celulose e hemicelulose apresentou redução acentuada. A redução dessas bandas demonstra que a carbonização hidrotérmica promoveu transformações na estrutura do material precursor. A não eliminação total das bandas no HT provavelmente ocorreu devido à temperatura utilizada não ser suficiente para degradar completamente a estrutura que forma a biomassa lignocelulósica. Outra diferença do espectro referente ao HT em comparação com o FT foi o aumento de intensidade ou surgimento de bandas referentes a ligações de oxigênio. Observa-se no HT um deslocamento da banda de 1620 cm<sup>-1</sup> (atribuída ao alongamento C=O de carboximetilcelulose) quando comparado com o farelo. Na região entre 1100 cm<sup>-1</sup>-1200 cm<sup>-1</sup> ocorreu o surgimento de algumas bandas, que são atribuídas ao estiramento das ligações C-O (grupos carboxila, éster e éter) e de deformações OH do grupamento

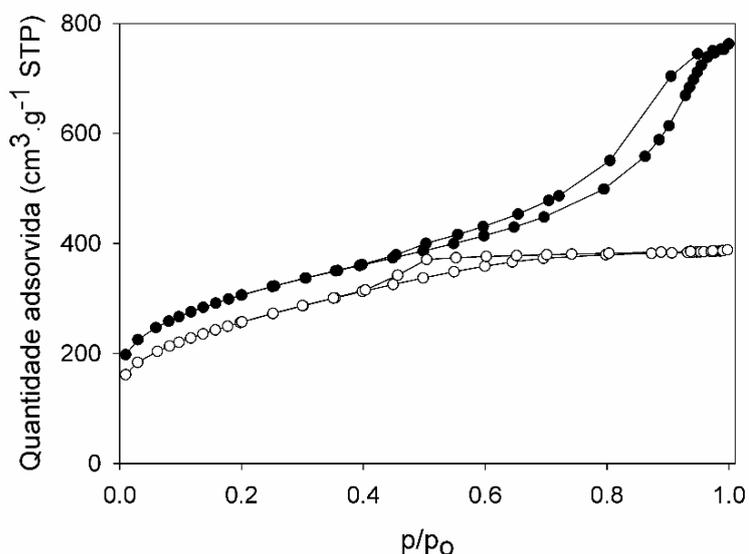
carboxil (FONTS, 2009; ARELLANO et al., 2016). Tais resultados sugerem que a carbonização hidrotérmica foi eficiente para o aumento de GFO a partir do farelo do caroço de tamarindo.

Observando os espectros do CAHT e do CAFT, verifica-se que os mesmos são similares. Para ambos os carvões ocorreu uma redução ou eliminação de bandas de maior intensidade quando comparados com o farelo, causados pela decomposição da matéria orgânica no processo de carbonização em elevadas temperaturas, a banda de  $1030\text{ cm}^{-1}$  apresentou uma elevada redução, enquanto a de  $3300\text{ cm}^{-1}$  desapareceu. Dentre as bandas identificadas destacam-se:  $1860\text{ cm}^{-1}$  e  $1560\text{ cm}^{-1}$ , referentes ao alongamento C=O e C=C;  $1060\text{ cm}^{-1}$  atribuído às ligações ésteres de fosfato, causado pela ativação química com ácido fosfórico;  $1990\text{ cm}^{-1}$  referente ao estiramento de grupos simétricos e assimétricos para o ácido carboxílico derivado de anidros (C=O; C-O-C) (SEGNEANU et al., 2012; ACEVEDO; BARRIOCANAL, 2015; OLIVEIRA et al., 2017).

### 3.3.4. Caracterização textural dos carvões ativados

As isotermas de sorção para os carvões CAFT e CAHT estão apresentadas na Figura 4. A obtenção dessas isotermas em adsorventes é importante por fornecer informações qualitativas sobre o mecanismo de adsorção do nitrogênio a 77 K e da estrutura porosa do material em estudo (SING et al., 1985).

**Figura 4:** Isotermas de sorção dos carvões produzidos. (●) CAFT; (○) CAHT.



De acordo com a forma, a isoterma do CAHT foi classificada como tipo I, com formação de histerese, mostrando que ocorre condensação capilar. Tal isoterma caracteriza-se por apresentar microporos mais largos e possíveis mesoporos estreitos, na qual a adsorção é limitada pelo volume de microporos. Já a isoterma do CAFT foi classificada como tipo IV, referente a sólidos porosos que

apresentam microporos e mesoporos em sua estrutura (IUPAC, 1982). A adsorção de nitrogênio em pressões relativas baixas ( $p/p_0 \leq 0,3$ ) evidencia a presença de microporos na estrutura desse adsorvente. Para o CAFT, observa-se um aumento na quantidade de nitrogênio adsorvida com o aumento da pressão relativa. Tal aumento indica a disponibilidade de mesoporos e o processo de preenchimento da multicamada dos poros (LIM et al., 2010). Para o CAHT, observa-se que ocorre a saturação da superfície com a formação de um patamar. Nesse tipo de sólido a adsorção ocorre na monocamada. Ambas isotermas apresentam histerese, que está associada ao processo de condensação capilar do nitrogênio nos mesoporos. A histerese encontrada para o CAFT pode ser classificada como tipo H1, frequentemente associadas a materiais porosos constituídos por aglomerados de estrutura regular com distribuição de tamanho dos poros estreita, apresentando uma curva de histerese mais próxima da curva de adsorção. A histerese encontrada para o CAHT é classificada como tipo H2, estando associadas a uma estrutura mais complexa, na qual a distribuição de tamanho dos poros e a forma dos poros não estão bem definidas (THOMMES et al., 2015). Por meio dessas análises é possível inferir ainda que as isotermas que apresentam uma curva de histerese mais larga a altas pressões relativas possuem uma estrutura mista, constituída de microporos e mesoporos (BRITO et al., 2017).

A confirmação da estrutura micro-mesoporosa dos carvões, bem como as diferenças nas propriedades texturais dos mesmos são apresentadas na Tabela 7. Verifica-se que o CAFT apresentou maiores valores para todas as variáveis estudadas (área superficial, diâmetro de poros, volume de mesoporos e volume de microporos). A estrutura dos poros de um carvão limita as dimensões das moléculas a serem adsorvidas e a área superficial limita a quantidade de material que pode ser adsorvido pela matriz (PEREIRA et al., 2014). De acordo com a IUPAC (1982), os poros são classificados em função do diâmetro como: microporos (menor que 2 nm), mesoporos (entre 2 e 50 nm) e macroporos (maior que 50 nm). Baseado no diâmetro médio dos poros, ambos os carvões produzidos são essencialmente mesoporosos. A maior área superficial, bem como o maior diâmetro de poros e volume de mesoporos do CAFT em relação ao CAHT geralmente resulta em uma maior acessibilidade do material a ser adsorvido ao interior dos poros. Comparando tais resultados com a quantidade de nitrogênio adsorvida (Figura 4), verifica-se que o CAFT apresentou uma capacidade adsortiva próxima a  $800 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$  de nitrogênio, enquanto o CAHT apresentou uma capacidade adsortiva inferior, com valor próximo a  $400 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$ , nas condições de análise. Os resultados de área superficial do presente trabalho são superiores ao obtido por Jamion e Hashim (2018) e próximos ao encontrado por Samanta et al. (2020), que obtiveram áreas de  $594 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$  e  $962 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ , respectivamente, ao produzirem carvões ativados a partir do farelo bruto do caroço de tamarindo utilizando o mesmo agente ativante (ácido fosfórico).

**Tabela 7.** Propriedades texturais dos carvões produzidos.

| Amostra | Sg (m <sup>2</sup> /g) | Dp (nm) | V <sub>meso</sub> (cm <sup>3</sup> /g) | V <sub>micro</sub> (cm <sup>3</sup> /g) |
|---------|------------------------|---------|--|---|
| CAFT    | 1028,33                | 6,46    | 0,8055                                 | 0,1141                                  |
| CAHT    | 921,27                 | 3,20    | 0,3742                                 | 0,0534                                  |

Sg: área superficial BET; Dp: Diâmetro médio dos poros; V<sub>meso</sub>: volume de mesoporos; V<sub>micro</sub>: volume de microporos.

### 3.4 Imobilização da lipase por adsorção

#### 3.4.1. Efeito do pH inicial da solução de lipase no processo de imobilização

O estudo do pH de imobilização de uma proteína/enzima em um suporte é fundamental, pois tal parâmetro afeta diretamente as cargas da mesma. A LPP foi inicialmente imobilizada nos dois carvões produzidos a fim de se verificar o efeito das propriedades dos carvões na imobilização e atividade hidrolítica. Os valores da capacidade adsortiva dos carvões ativados, atividade hidrolítica e atividade específica da enzima imobilizada são apresentados na Tabela 8.

**Tabela 8.** Avaliação do efeito do pH da solução inicial de lipase na capacidade adsortiva e atividade dos carvões produzidos. Condições: concentração inicial de proteína de 6000 mg.L<sup>-1</sup>, temperatura de imobilização de 30°C e tempo de imobilização de 120 minutos.

| Amostra | pH | q <sup>a</sup> (mg.g <sup>-1</sup> ) | AH <sup>b</sup> (U.g <sup>-1</sup> de carvão) | AE <sup>c</sup> (U.mg <sup>-1</sup> de proteína imobilizada) |
|---------|----|--------------------------------------|---|--|
| CAFT    | 4  | 89,50±0,24                           | 131,05±9,87                                   | 1,60±0,12  |
|         | 5  | 71,80±1,42                           | 222,47±2,80                                   | 3,32±0,02  |
|         | 6  | 52,96±0,96                           | 178,90±4,16                                   | 3,56±0,06  |
|         | 7  | 44,61±0,42                           | 161,56±8,75                                   | 3,78±0,24  |
|         | 8  | 42,23±1,23                           | 128,39±4,15                                   | 3,17±0,01  |
| CAHT    | 4  | 56,53±1,31                           | 186,13±5,63                                   | 3,38±0,06  |
|         | 5  | 53,03±0,31                           | 257,18±7,31                                   | 5,11±0,15  |
|         | 6  | 34,86±1,22                           | 176,12±4,20                                   | 5,23±0,15  |
|         | 7  | 27,87±1,15                           | 174,66±10,63                                  | 6,46±0,64  |
|         | 8  | 25,10±0,83                           | 140,29±2,91                                   | 5,74±0,27  |

<sup>a</sup> Capacidade adsortiva; <sup>b</sup> Atividade hidrolítica dos carvões; <sup>c</sup> Atividade específica da enzima imobilizada.

Observa-se que para todos os valores de pH estudados o CAFT apresentou uma maior capacidade adsortiva que o CAHT. Isso provavelmente ocorreu em função deste carvão apresentar uma maior área superficial e diâmetro médio dos poros (Tabela 7). A LPP utilizada apresenta um

diâmetro molecular médio de cerca de 4 nm (SILVA et al., 2014). Os carvões produzidos apresentam uma estrutura irregular contendo microporos e mesoporos em sua estrutura, conforme discutido detalhadamente na seção anterior. O CAFT apresenta um diâmetro médio dos poros superior ao diâmetro molecular da LPP, permitindo que a enzima tenha uma maior acessibilidade ao interior dos seus poros. Já o CAHT possui um diâmetro médio dos poros inferior ao diâmetro molecular da LPP, fazendo com que a enzima tenha um menor acesso ao interior dos poros quando comparado com o CAFT. Além disso, o CAFT apresenta uma maior área superficial e provavelmente essa combinação de fatores tenha promovido uma maior capacidade adsortiva para tal carvão.

Verifica-se ainda que ambos os carvões apresentaram maior capacidade adsortiva quando se utilizou a solução inicial de LPP em pH 4,0 e a medida que o pH foi elevado ocorreu uma redução no valor dessa variável. Sabe-se que o pH afeta diretamente as cargas líquidas superficiais das proteínas/enzimas e ao se estudar o efeito desse parâmetro pode-se determinar a contribuição das interações eletrostáticas sobre a interação enzima/carvão (BRITO et al., 2017). A LPP possui o ponto isoelétrico de cerca de 4,9 (BROCKERHOFF; JENSEN, 1974). Observa-se que o ponto isoelétrico da enzima é relativamente próximo ao ponto de carga zero dos carvões (Tabela 6). Em pH 4,0, tanto o CAFT quanto o CAHT possuem cargas superficiais positivas e a LPP também estará carregada positivamente. A medida que o pH da solução aumenta para valores superiores a 5, os carvões e a LPP tendem a diminuir as cargas positivas e ficar com a carga superficial negativa. Desse modo, como a adsorção ocorreu mesmo em condições de cargas superficiais similares, provavelmente, houve pouca contribuição de interações eletrostáticas e maior contribuição de interações hidrofóbicas. Além disso, de acordo com as informações técnicas da Sigma Aldrich, a LPP utilizada apresenta diversas enzimas contaminantes em sua composição, tais como, proteases (tripsina, quimotripsina e carboxipeptidase B), amilases, entre outras. Desse modo, um maior valor de capacidade adsortiva não necessariamente refere-se à maior adsorção da LPP, podendo nas condições avaliadas ter ocorrido adsorção de outras proteínas.

Tal fato fica evidente ao se comparar os valores da capacidade adsortiva com a atividade hidrolítica dos biocatalisadores e atividade específica da LPP imobilizada nos mesmos. Observa-se que quando se realizou a imobilização da LPP em uma solução tampão de pH 4,0, ambos os carvões apresentaram maior capacidade adsortiva, mas isso não resultou em uma maior atividade. Ao se realizar a imobilização da LPP em pH 5,0 a quantidade de proteína imobilizada foi inferior ao pH 4,0, mas a atividades hidrolíticas da enzima imobilizada alcança seu valor de máximo. A medida que o pH da solução de imobilização aumenta, a atividade hidrolítica dos suportes diminuiu. Ao se comparar os valores da Tabela 8 para o ponto de maior atividade hidrolítica para os 2 carvões (imobilização em pH 5,0), observa-se que o CAHT apesar de ter apresentado uma menor capacidade

adsortiva apresentou uma maior atividade hidrolítica. Além disso, a atividade específica da LPP imobilizada nesse carvão foi superior.

De acordo com Silva et al. (2014), a distribuição de moléculas de lipase na superfície de um suporte depende fortemente do tamanho dos poros do mesmo. Como a LPP possui um diâmetro superior ao diâmetro médio de poros do CAHT, provavelmente tal biocatalisador apresentou uma maior atividade hidrolítica e específica pelo fato de a enzima ter ficado imobilizada em sua maior parte na superfície externa do carvão. Desse modo, as moléculas de substrato (gotículas de óleo de oliva) possuem acesso ao centro ativo da LPP, mantendo ao máximo sua atividade. De modo oposto, a menor atividade hidrolítica para o CAFT, provavelmente, deve-se ao fato de tal carvão possuir diâmetro de poros superior ao diâmetro médio da enzima. Assim sendo, a LPP provavelmente ficou adsorvida no interior dos poros do carvão e como as gotículas de óleo são estruturas grandes, apresentam acessibilidade reduzida aos poros do suporte, dificultando o contato desse substrato com o centro ativo da enzima imobilizada, com conseqüente redução na sua atividade hidrolítica (HERNANDEZ et al., 2011).

Outra possibilidade para a maior atividade hidrolítica e específica do CAHT em todas as condições testadas está relacionado aos grupos funcionais oxigenados presentes na sua superfície. Tais grupamentos podem ter influenciado na forma como a enzima ligou-se à superfície desse carvão, provavelmente tendo sido estabelecido ligações covalentes entre os grupo amino da enzima e os grupos oxigenados do suporte, resultando na maior atividade hidrolítica e específica mesmo com menor capacidade adsortiva. Além disso, a maior capacidade adsortiva do CAFT pode ter feito com que as lipases se sobrepusessem umas as outras, fazendo com que o substrato não tivesse acesso às camadas inferiores ou a configuração da enzima sofreu modificações devido a proximidade molecular, promovendo, conseqüentemente, uma redução nas atividades hidrolítica e específica da enzima imobilizada (MERÇON et al., 1997). Como o CAHT apresentou atividade hidrolítica superior, este foi selecionado para ser utilizado nas etapas posteriores desse trabalho.

### ***3.6.2. Efeito da adição do surfactante Triton X-100 na imobilização da lipase por adsorção***

Após escolha do suporte e do pH de imobilização que levaram à maior atividade hidrolítica, foi realizado um estudo para avaliar o efeito da adição do surfactante Triton X-100 na imobilização da LPP. Para isso, diferentes concentrações do surfactante foram empregadas. As concentrações foram escolhidas em valores próximos a concentração micelar crítica do Triton X-100, que de acordo com as informações técnicas da Sigma Aldrich, varia entre 0,025 %m/v e 0,05625 %m/v, e baseado em trabalhos da literatura apresentam efeito na atividade da lipase imobilizada (HELISTÖ; KORPELA, 1998; OLIVEIRA et al., 2017). Os valores de capacidade adsortiva do CAHT, atividade

hidrolítica e atividade específica da enzima imobilizada no mesmo para as diferentes concentrações de Triton X-100 utilizadas estão apresentados na Tabela 9.

**Tabela 9.** Efeito da adição do surfactante Triton X-100 no processo de imobilização da LPP no CAHT. Condições de imobilização: concentração inicial de proteína de 6000 mg.L<sup>-1</sup>, temperatura de 30°C, tempo de 120 minutos e pH do tampão acetato de 5,0.

| Concentração (%m.v <sup>-1</sup> ) | q (mg.g <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup> | AH <sup>b</sup> (U.g <sup>-1</sup> de carvão) | AE <sup>c</sup> (U.mg <sup>-1</sup> de proteína imobilizada) |
|------------------------------------|--------------------------------------|---|--|
| Sem Triton X-100                   | 53,03±0,31                           | 257,18±7,31                                   | 5,11±0,15  |
| 0,025                              | 57,27±1,06                           | 273,14±4,08                                   | 5,04±0,16  |
| 0,0375                             | 56,64±0,75                           | 238,02±1,83                                   | 4,44±0,02  |
| 0,05                               | 55,89±0,66                           | 205,88±5,75                                   | 3,89±0,06  |

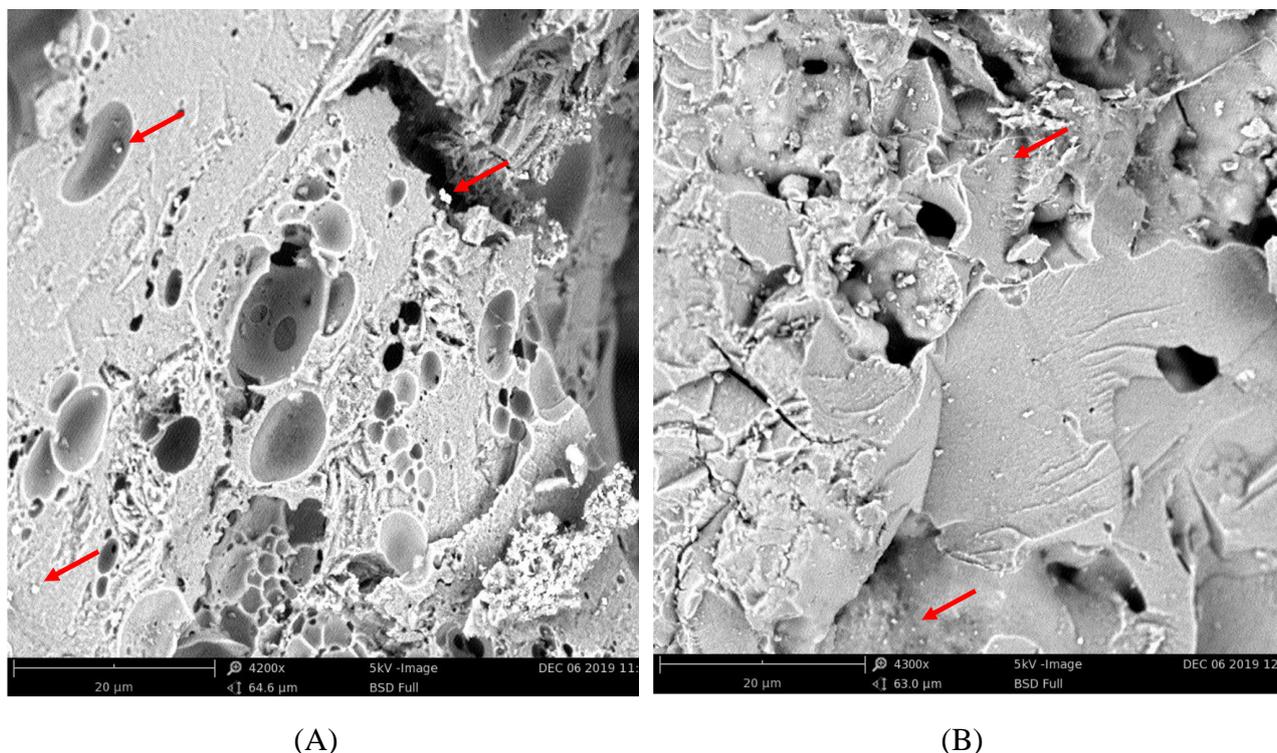
<sup>a</sup> Capacidade adsortiva; <sup>b</sup> Atividade hidrolítica dos carvões; <sup>c</sup> Atividade específica da enzima imobilizada.

Observa-se que a utilização do Triton X-100 aumentou a capacidade adsortiva a capacidade adsortiva do carvão em cerca de 8% quando comparado com a solução sem adição do surfactante. Ao avaliar os resultados da atividade hidrolítica, verifica-se que a utilização do surfactante apresentou aumento de 6% na atividade apenas quando foi utilizado 0,025% m.v<sup>-1</sup> do surfactante no tampão de imobilização. Acima dessa concentração, foi observada uma diminuição na atividade quando comparada com a amostra controle (sem adição de Triton X-100). De acordo com Veríssimo et al. (2018), as lipases tendem a formar agregados em solução, podendo afetar negativamente a atividade da mesma. A adição do surfactante pode promover a quebra desses agregados, estabilizando-as em sua conformação mais ativa (forma aberta), aumentando desse modo sua atividade. Por outro lado, em concentrações com excesso do surfactante pode ocorrer a ligação do mesmo na região do sítio ativo da enzima, bloqueando o acesso ao substrato, reduzindo assim a sua atividade (OLIVEIRA et al., 2017). Diante disso, pode-se inferir que a concentração de 0,025% m.v<sup>-1</sup> de Triton X-100 no tampão promoveu a imobilização da LPP no CAHT em sua forma aberta, mantendo o sítio ativo exposto, com consequente aumento na atividade hidrolítica. Já em concentrações superiores a essa, provavelmente o Triton X-100 ligou-se ao sítio ativo da LPP, reduzindo a atividade da mesma. Além disso, como a LPP não está em sua forma pura e com o aumento da concentração de Triton X-100 outras proteínas começaram a ser adsorvidas, por isso a capacidade adsortiva aumenta e a atividade específica diminui. Diante desse resultado, a concentração de 0,025% m.v<sup>-1</sup> de Triton X-100 no tampão de imobilização foi selecionada para ser utilizada nas demais etapas desse trabalho por ter promovido um aumento na atividade hidrolítica do biocatalisador CAHT.

### 3.6.3. Microscopia Eletrônica de varredura dos biocatalisadores enzimáticos produzidos

As imagens de MEV dos biocatalisadores produzidos são apresentadas na Figura 5. Após a análise das imagens pode-se observar a presença da LPP immobilizada aos carvões. Observa-se que no CAFT a immobilização da LPP também ocorreu na entrada e interior dos poros, enquanto no CAHT as enzimas ficaram immobilizadas na superfície externa. Provavelmente isso resultou na maior atividade hidrolítica para o CAHT, conforme observado na seção 3.6.1. Além disso, não foi verificada a formação de muitos agregados de enzimas nas imagens.

**Figura 5:** Microscopia eletrônica de varredura dos biocatalisadores enzimáticos. (A) CAFT; (B) CFHT.

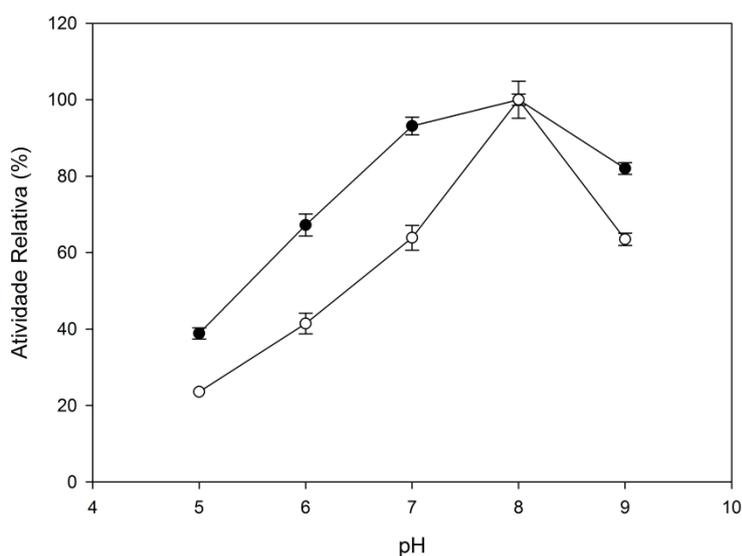


### 3.7. Efeito do pH do meio reacional na atividade hidrolítica da LPP livre e immobilizada

Após definição das melhores condições de immobilização no CAHT para as propriedades estudadas, foi realizado um estudo do efeito do pH do meio de reação na atividade da LPP livre e immobilizada no CAHT. Para isso, foi realizada a hidrólise da emulsão do azeite de oliva na faixa de pH entre 5,0 e 9,0. Os maiores valores de atividade para a LPP livre e immobilizada foram encontrados no pH 8,0. Nessa condição de pH, o valor de atividade refere-se a  $39,45 \pm 1,91 \text{ U.g}^{-1}$  de solução, para a solução de enzima livre (solução bruta de LPP com concentração de  $6000 \text{ mg.L}^{-1}$  diluída em tampão acetato pH 5,0 – solução utilizada na immobilização). Já o valor da atividade hidrolítica para o carvão contendo a LPP immobilizada corresponde a  $273,14 \pm 4,09 \text{ U.g}^{-1}$  do carvão. Tais valores de atividade

foram considerados como 100% de atividade relativa. Os demais valores foram calculados a partir desse e um gráfico para avaliar o comportamento da LPP livre e imobilizada foi plotado (Figura 6).

**Figura 6:** Efeito do pH na atividade hidrolítica da LPP livre (○) e imobilizada no CAHT (●). A atividade máxima foi definida como atividade relativa de 100%.



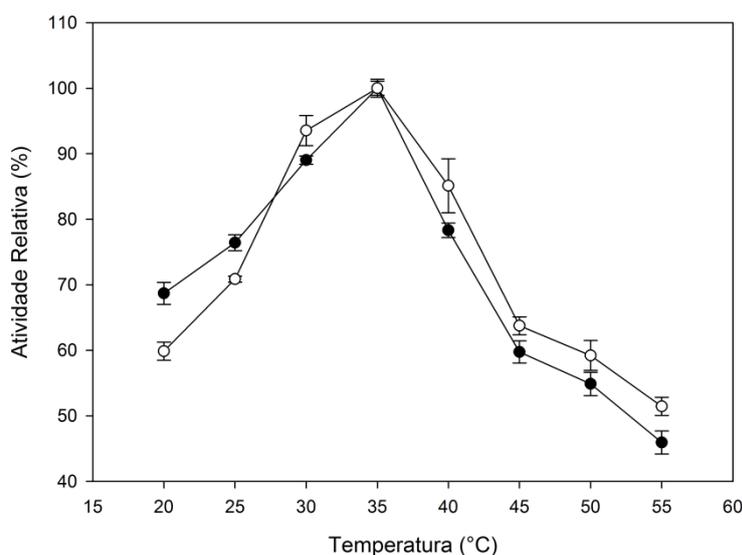
Após análise da Figura 6, observa-se que a imobilização da enzima no suporte conferiu certa estabilidade à enzima, visto que a LPP imobilizada apresentou maiores valores de atividade relativa nos valores de pH estudados. Verifica-se também, que à medida que se elevou o pH do meio reacional, a LPP livre e imobilizada no CAHT teve sua atividade aumentada, até atingir o seu máximo no pH 8,0. Em seguida houve uma nova redução nas respectivas atividades no pH 9,0. Tais resultados estão em acordo ao obtido por Silva et al. (2014), que observaram um aumento da atividade da LPP livre e imobilizada em partículas de poli-hidroxibutirato em pH na faixa de 5,0 a 8,0, seguido de redução no pH 9,0. Além desse, diversos trabalhos da literatura encontraram a maior atividade hidrolítica da LPP em valores de pH alcalino e próximos ao obtido no presente trabalho, utilizando o mesmo método de hidrólise da emulsão do azeite de oliva (BAGI et al., 1997; DESAI et al., 2006; ZOU et al., 2010). A partir dos resultados obtidos, o pH do meio reacional no valor de 8,0 foi selecionado para ser utilizado nas etapas posteriores de hidrólise desse trabalho.

### 3.8. Efeito da temperatura de reação na atividade hidrolítica da LPP livre e imobilizada

A influência da temperatura na atividade hidrolítica da LPP livre e imobilizada no CAHT foi determinada na faixa entre 20°C a 55°C. Os resultados são apresentados na Figura 7. Observa-se que as LPP livre e imobilizada apresentaram maiores valores de atividade entre 30°C e 40°C. Tanto a LPP livre quanto a imobilizada apresentaram atividade ótima na temperatura de 35°C, sendo tal

condição considerada como 100% de atividade relativa. Nessa temperatura, a solução de LPP livre apresentou atividade hidrolítica de  $46,35 \pm 0,64 \text{ U.g}^{-1}$  de solução bruta de LPP (concentração de  $6000 \text{ mg.L}^{-1}$  diluída em tampão acetato pH 5,0). Já o valor da atividade hidrolítica para a LPP imobilizada no CAHT correspondeu a  $348,76 \pm 3,78 \text{ U.g}^{-1}$  de carvão. De acordo com Mendes et al. (2012) e Rial et al. (2020), a LPP apresenta maior atividade na faixa de temperatura entre  $35^\circ\text{C}$  e  $45^\circ\text{C}$  e os resultados encontrados estão condizentes com a faixa informada nesses trabalhos.

**Figura 7:** Efeito da temperatura na atividade hidrolítica da LPP livre ( $\circ$ ) e imobilizada no CAHT ( $\bullet$ ). A atividade máxima foi definida como atividade relativa de 100%.



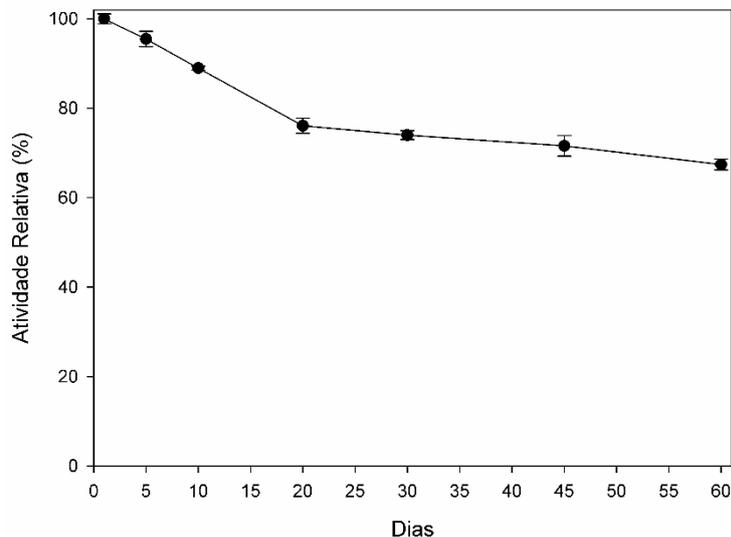
Observa-se que a LPP livre apresentou maior atividade relativa, quando comparada a imobilizada, em temperaturas a partir de  $30^\circ\text{C}$ . Segundo Silva et al. (2014), essa menor termoestabilidade da LPP imobilizada pode ser atribuída à redução da concentração de agentes estabilizadores (como sais, polióis e açúcares presentes no extrato inicial de LPP) após a imobilização da enzima no suporte. De acordo com os autores, esses compostos estabilizadores ficam retidos preferencialmente no sobrenadante, reduzindo sua concentração no microambiente da enzima imobilizada, com conseqüente redução da estabilidade da enzima com o aumento da temperatura. Na faixa de temperatura entre  $20^\circ\text{C}$  e  $35^\circ\text{C}$  ocorreu um aumento na atividade da LPP livre e imobilizada. Provavelmente, nessa faixa o aumento da temperatura provocou um aumento da agitação molecular e conseqüentemente favoreceu o contato enzima-suporte, além de diminuir a viscosidade do meio, o que resultou no aumento da atividade. A partir de  $35^\circ\text{C}$  o aumento da temperatura provocou uma redução da atividade, provavelmente causada pelo efeito de inativação térmica das enzimas (FERREIRA et al., 2018). A partir dos resultados encontrados, a temperatura de  $35^\circ\text{C}$  foi utilizada

nas etapas posteriores em que se utilizou a hidrólise, no presente trabalho.

### 3.9. Estabilidade ao tempo de armazenamento

Normalmente, enzimas imobilizadas mantêm sua atividade em condições de estocagem, quando não são submetidas a condições adversas de pH e temperatura. A LPP imobilizada no CAHT foi estocada em tampão acetato em temperatura próxima a  $\pm 6^{\circ}\text{C}$  por um período de 60 dias. Os resultados da atividade hidrolítica do biocatalisador nos tempos de 1, 5, 10, 20, 30, 45 e 60 dias podem ser observados na Figura 8. O primeiro dia (dia 1) foi considerado como sendo 100% de atividade relativa e o seu valor corresponde a  $348,76 \pm 3,78 \text{ U.g}^{-1}$ . Observa-se que a lipase imobilizada apresentou boa estabilidade ao longo do tempo de armazenamento. Nos primeiros 10 dias de armazenamento, o biocatalisador manteve uma retenção próxima a 90% de sua atividade inicial. Após esse período foi verificada uma redução mais acentuada em sua atividade, com o biocatalisador produzido conseguindo manter cerca de 68% de sua atividade inicial após 60 dias. Tais resultados sugerem que a LPP pode ser imobilizada em carvão ativado para uso posterior, visto que apresentou boa retenção da atividade catalítica nas condições experimentais testadas.

**Figura 8:** Estabilidade da LPP imobilizada no CAHT ao longo do tempo de armazenamento.



### 3.10. Estabilidade em relação ao solvente orgânico

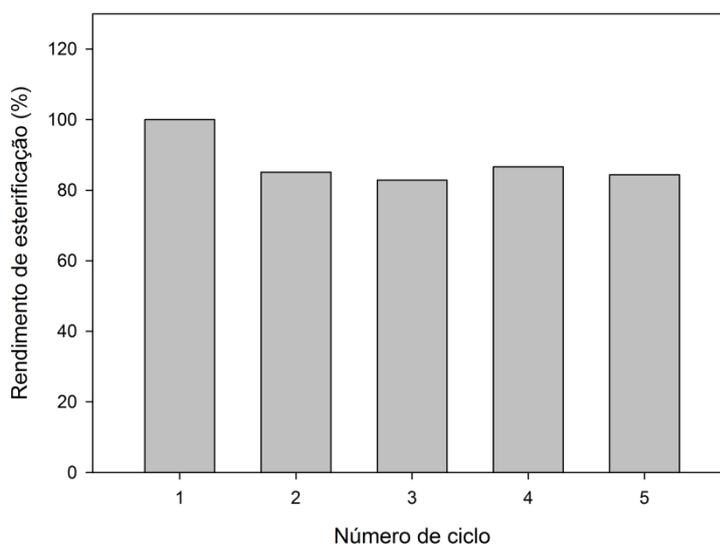
Foi realizada a avaliação da atividade da LPP imobilizada no solvente orgânico hexano, com o intuito de verificar se a mesma apresenta estabilidade em tal solvente. Tal análise foi realizada para avaliar se o hexano poderia ser utilizado na etapa posterior de síntese do éster butirato de butila sem afetar na atividade da LPP imobilizada no biocatalisador.

A atividade inicial do biocatalisador (0 min) corresponde a  $348,76 \pm 3,78 \text{ U.g}^{-1}$  e foi considerada como sendo 100% de atividade relativa. As demais atividades relativas foram calculadas a partir desta. As lipases, de maneira geral, caracterizam-se por apresentarem alta estabilidade em solventes orgânicos, sendo amplamente utilizadas em processos químicos orgânicos (GEOFFRY et al., 2018; JAVED et al., 2018). A LPP apresenta uma maior tolerância aos solventes orgânicos do que as lipases de origem microbiana, sendo muito utilizadas nesse tipo de meio (MENDES et al., 2012). Verificou-se com os testes realizados que a LPP apresentou retenção de sua atividade catalítica após 240 minutos de incubação no hexano ( $100,40 \pm 0,37 \%$  de atividade relativa). Os resultados estão de acordo ao encontrado por Silva et al. (2014), que verificaram que a LPP imobilizada em partículas de poli-hidroxibutirato mantiveram 100% da atividade catalítica após 120 min. De acordo com Sun et al. (2010), a utilização de solventes orgânicos apolares, tais como o hexano, mantém a atividade catalítica das lipases pelo fato de estes não competirem pelas moléculas de água na camada aquosa ao redor do biocatalisador, fazendo com que tal camada permaneça intacta. Isso faz com que a lipase mantenha sua estrutura conformacional, preservando ao máximo sua atividade. Os resultados encontrados sugerem que o hexano pode ser utilizado como meio de diluição dos substratos em reações de esterificação utilizando a LPP imobilizada no CAHT, visto que o mesmo manteve 100% da atividade após incubação em hexano.

### **3.11. Síntese do butirato de butila utilizando a lipase imobilizada no CAHT como biocatalisador**

Para avaliação do potencial de uso do biocatalisador produzido em processos orgânicos da indústria de alimentos, foi realizada a síntese do butirato de butila utilizando o CAHT contendo a LPP imobilizada nas melhores condições de imobilização obtidas previamente. A síntese do butirato de butila envolve uma reação entre o ácido butírico e o butanol, dando origem a um éster muito utilizado na indústria de bebidas (NOH et al., 2019). Nas condições experimentais estudadas, o rendimento da esterificação foi cerca de  $83,16 \pm 4,93\%$  em um tempo de reação de 4 h. Tal resultado é superior ao obtido por Veríssimo et al. (2018), que obteve um rendimento máximo de 49,25% de conversão do ácido butírico em éster após 24 h de reação ao utilizar um criogel monolítico contendo lipase aprisionada, e similar aos obtidos por Matte et al. (2016) ao imobilizar lipase em Immobead 150 e Martins et al. (2013) ao imobilizar lipase em partículas de estireno-divinilbenzeno, que obtiveram conversão de 83,4% e 80,0%, respectivamente, após 4 h de reação. Para avaliar a estabilidade operacional do biocatalisador, este foi utilizado repetidamente por 5 ciclos na síntese do butirato de butila e o rendimento de esterificação residual (%) como função do número de ciclo foi avaliado (Figura 9).

**Figura 9:** Rendimento de esterificação residual do biocatalisador em função do número de ciclo.



Observa-se que a LPP imobilizada no CAHT apresentou boa estabilidade ao longo do tempo de uso, visto que após 5 ciclos de reutilização o biocatalisador produzido apresentou rendimento de esterificação residual de cerca de 84% do rendimento apresentado no primeiro ciclo. Os resultados encontrados são similares ao obtido por Matte et al. (2016), que observou um rendimento de esterificação residual próximo a 87% em comparação com o primeiro ciclo de síntese do butirato de butila ao utilizar um Imobead 150 contendo lipase imobilizada e superior ao obtido por Veríssimo et al. (2018), que obteve um rendimento de esterificação residual inferior a 40% no quinto ciclo. Observa-se, portanto, que a LPP imobilizada no CAHT apresentou uma boa capacidade de síntese do butirato de butila, além de ter apresentado uma boa estabilidade ao longo do tempo de uso. Os resultados encontrados sugerem que o CAHT contendo a LPP imobilizada pode ser utilizado na obtenção de ésteres aromáticos que são frequentemente utilizados na indústria de alimentos.

#### 4. CONCLUSÃO

Foram produzidos hydrochars a partir do caroço de tamarindo utilizando um DCCR, variando a concentração de substrato, a temperatura e o tempo de carbonização hidrotérmica, visando o aumento dos grupos funcionais oxigenados no resíduo. O hydrochar obtido, na condição que levou à obtenção de um material com maior teor de grupos oxigenados (temperatura de 235°C e tempo de 3h), e o farelo bruto do caroço de tamarindo foram utilizados como precursores para produção de carvões ativados com o intuito de avaliar o efeito da carbonização hidrotérmica nas características do carvão. Os carvões apresentaram valores de área superficial similares, porém, a carbonização hidrotérmica do farelo promoveu a síntese de um carvão com diâmetro médio de poros cerca de 50%

inferior ao carvão obtido a partir do farelo bruto. Além disso, a carbonização hidrotérmica do farelo promoveu a síntese de um carvão com maior teor de grupos oxigenados e menor valor de ponto de carga zero. Os carvões produzidos foram utilizados no processo de imobilização da LPP em diferentes valores de pH, onde foi verificado que, apesar de possuir menor capacidade adsortiva, o carvão obtido a partir do hydrochar apresentou uma maior atividade hidrolítica em todas as condições de pH avaliadas, sendo então utilizado nas etapas posteriores. A utilização de Triton X-100 na solução enzimática resultou em um aumento na atividade hidrolítica do biocatalisador suportado. O pH ótimo de hidrólise do biocatalisador suportado foi de 8,0 e a temperatura ótima foi de 35°C. Além disso, o biocatalisador reteve cerca de 68% de sua atividade após 60 dias de armazenamento e não apresentou perda de atividade ao ser incubada em hexano. O biocatalisador produzido foi utilizado na síntese orgânica do butirato de butila (aroma de abacaxi), onde foi verificado que o mesmo apresentou um rendimento de esterificação superior a 80 %, além de ter apresentado estabilidade ao longo de 5 ciclos de reutilização. Os resultados encontrados sugerem que o biocatalisador suportado produzido apresenta potencial para ser utilizado em meio aquoso e orgânico, como reações hidrolíticas de lipídios ou síntese de aromas frequentemente utilizados na indústria de alimentos.

## 5. REFERÊNCIAS

- ACEVEDO, B.; BARRIOCANAL, C. Texture and surface chemistry of activated carbons obtained from tyre wastes. **Fuel Processing Technology**, v. 134, p. 275-283, 2015.
- AHMED, M. J. Adsorption of quinolone, tetracycline, and penicillin antibiotics from aqueous solution using activated carbons: Review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 50, p. 1-10, 2017.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemistry). **Official methods of analysis**. 16ed. Arlington: AOAC International, 1995.
- ARELLANO, O.; FLORES, M.; GUERRA, J.; HIDALDO, A.; ROJAS, D.; STRUBINGER, A. Hydrothermal carbonization of corncob and characterization of the obtained hydrochar. **Chemical Engineering Transactions**, v. 50, 235-240, 2016.
- BAGI, K.; SIMON, L. M.; SZAJÁNI, B. Immobilization and characterization of porcine pancreas lipase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 20, p. 531-535, 1997.
- 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, p. 373-380, 1951.

BHATNAGAR, A. et al. An overview of the modification methods of activated carbon for its water treatment applications. **Chemical Engineering Journal**, v. 219, p. 499-511, 2013.

BINHAYEEDING, N.; YUNU, T.; PICHID, N.; KLOMKLAO, S.; SANGKHARAK, K. Immobilisation of *Candida rugosa* lipase on polyhydroxybutyrate via a combination of adsorption and cross-linking agents to enhance acylglycerol production. **Process Biochemistry**, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.02.007>.

BOEHM, H. P. Chemical identification of surface groups, in: ELEY, D. D.; PINES, H.; WEISZ, P. B. (Eds.), **Advances in Catalysis**, Academic Press, New York, v. 16, p. 179, 1966.

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.

BRITO, M. J. P.; VELOSO, C. M.; BONOMO, R. C. F.; FONTAN, R. C. I.; SANTOS, L. S.; MONTEIRO, K. A. Activated carbons preparation from yellow mombin fruit stones for lipase immobilization. **Fuel Processing Technology**, v. 156, p. 421-428, 2017.

BROCKERHOFF, H.; JENSEN, R.G. (1974). in *Lipolytic Enzymes*, pp. 10–24, Academic Press, New York.

BRUM, S. S.; BIANCHI, M. L.; DA SILVA, V. L.; GONÇALVES, M.; GUERREIRO, M. C.; DE OLIVEIRA, L. C. A. Preparação e caracterização de carvão ativado produzido a partir de resíduos do beneficiamento do café. **Química Nova**, v. 31, p. 1048-1052, 2008.

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

CHEN, X.; XUE, S.; LIN, Y.; LUO, J.; KONG, L. Immobilization of porcine pancreatic lipase onto a metal-organic framework, PPL@MOF: A new platform for efficient ligand discovery from natural herbs. **Analytica Chimica Acta**, v. 1099, p. 94-102, 2020.

DAUD, W. M. A. W.; HOUSHAMND, A. H. Textural characteristics, surface chemistry and oxidation of activated carbon. **Journal of Natural Gas Chemistry**, v. 19, p. 267-279, 2010.

DESAI, P. D.; DAVE, A. M.; DEVI, S. Alcoholysis of salicornia oil using free and covalently bound lipase onto chitosan beads. **Food Chemistry**, v. 95, p. 93-199, 2006.

FALCO, C.; SIEBEN, J. M.; BRUN, N.; SEVILLA, M.; VAN DER MAUELEN, T.; MORALLÓN, E.; CAZORLA-AMORÓS, D.; TITIRICI, M. M. Hydrothermal carbons from hemicellulose-derived

aqueous hydrolysis products as electrode materials for supercapacitors. **ChemSusChem**, v. 6, 374-382, 2013.

FONTES, I.; AZUARA, M.; GEA, G.; MURILLO, M. B. Study of the pyrolysis liquids obtained from different sewage sludge. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 85, p. 184-191, 2009.

GANAIIE, M. A.; RAWATB, H. K.; WANIA, O. A.; GUPTA, U. S.; KANGO, N. Immobilization of fructosyltransferase by chitosan and alginate for efficient production of fructooligosaccharides. **Process Biochemistry**, v. 49, p. 840-844, 2014.

GEOFFRY, K.; ACHUR, R. N. Screening and production of lipase from fungal organisms. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.03.009>.

GONÇALVES, M. C. P.; KIECKBUSCH, T. G.; PERNA, R. F.; FUJIMOTO, J. P.; MORALES, S. A. V.; ROMANELLI, J. P. Trends on enzyme immobilization researches based on bibliometric analysis. **Process Biochemistry**, v. 76, p. 95-110, 2019.

GONÇALVES, M.; GUERREIRO, M. C.; OLIVEIRA, L. C. A.; SOLAR, C.; NAZARRO, M.; SAPAG, K. Micro Mesoporous Activated Carbon from Coffee Husk as Biomass Waste for Environmental Applications. **Waste and Biomass Valorization**, v. 4, p. 395-400, 2013.

HEIDARI, M.; DUTTA A.; ACHARYA, B.; MAHMUD, S. A review of the current knowledge and challenges of hydrothermal carbonization for biomass conversion. **Journal of the Energy Institute**, v. 92, p. 1779-1799, 2019.

HERNÁNDEZ, K.; GARCIA-GALAN, C.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Simple and efficient immobilization of lipase B from *Candida antarctica* on porous styrene-divinylbenzene beads. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 49, p. 72-78, 2011.

HUANG, G.; WANG, Y.; ZHANG, T.; WU, X.; CAI, J. High-performance hierarchical N-doped porous carbons from hydrothermally carbonized bamboo shoot shells for symmetric supercapacitors. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2018.12.024>.

ISLAM, M. A.; AHMED, M. J.; KHANDAY, W. A.; ASIF, M.; HAMEED, B. H. Mesoporous activated coconut shell-derived hydrochar prepared via hydrothermal carbonization-NaOH activation for methylene blue adsorption. **Journal of Environmental Management**, v. 203, p. 237-244, 2017.

IUPAC: União Internacional de Química Pura e Aplicada. **Reporting Physisorption data for gás/solid systems**. v.54, p. 2201-2218, 1982.

JAIN, A.; BALASUBRAMANIAN, R.; SRINIVASAN, M. P. Hydrothermal conversion of biomass waste to activated carbon with high porosity: A review. **Chemical Engineering Journal**, v. 283, p. 789-805, 2016.

JAIN, A.; JAYARAMAN, S.; BALASUBRAMANIAN, R.; SRINIVASAN, M. P. Hydrothermal pre-treatment for mesoporous carbon synthesis: enhancement of chemical activation. **Journal of Materials Chemistry A**, v. 2, p. 520-528, 2014.

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: Solid-State Materials for Advanced Technology**, v. 183, p. 54-60, 2014.

JAIN, A.; XU, C.; JAYARAMAN, S.; BALASUBRAMANIAN, R.; LEE, J. Y.; SRINIVASAN, M. P. Mesoporous activated carbons with enhanced porosity by optimal hydrothermal pre-treatment of biomass for supercapacitor applications. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 218, p. 55-61, 2015b.

JAMION, N. A.; HASHIM, I. N. Preparation of activated carbon from tamarind seeds and methylene blue (MB) removal. **Journal of Fundamental and Applied Sciences**, v. 9, p. 102-114, 2018.

JAVED, S.; AZEEM, F.; HUSSAIN, S.; RASUL, I.; SIDDIQUE, M. H.; RIAZ, M.; AFZAL, M.; KOUSER, A.; NADEEM, H. Bacterial lipases: A review on purification and characterization. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 132, p. 23-34, 2018.

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.

LI, W.; YANG, K.; PENG, J.; GUO, S.; XIA, H. Effects of carbonization temperatures on characteristics of porosity in coconut shell chars and activated carbons derived from carbonized coconut shell chars. **Industrial Crops and Products**, v. 28, p. 190-198. 2008.

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.

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, p. 32-37, 1964.

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 and Biodegradation**, v. 102, p. 274-280, 2015.

MATTE, C. R.; BORDINHÃO, C.; POPPE, J. K. et al. Synthesis of butyl butyrate in batch and continuous enzymatic reactors using *Thermomyces lanuginosus* lipase immobilized in Immobead 150. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 127, p. 67-75, 2016.

MENDES, A. A.; OLIVEIRA, P. C.; CASTRO, H. F. Properties and biotechnological applications of porcine pancreatic lipase. ***Journal of Molecular Catalysis B. Enzymatic***, v. 78, p. 199-134, 2012.

MENDES, F. M. T.; MARQUES, A. C. C.; MENDONÇA, D. L.; OLIVEIRA, M. S.; MOUTTA, R. O.; FERREIRA-LEITÃO, V. S. High Surface Area Activated Carbon from Sugar Cane Straw. ***Waste and Biomass Valorization***, v. 6, p. 433-440, 2015.

MERÇON, F.; ERBES, V. L.; SANT'ANNA, G. L.; NOBREGA, R. Lipase immobilized membrane reactor applied to babassu oil hydrolysis. ***Brazilian Journal of Chemical Engineering***, v. 14, p. 1-9, 1997.

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.

NIZAMUDDIN, S.; BALOCH, H. A.; GRIFFIN, G. J.; MUBARAK, N. M.; BHUTTO, A. W.; ABRO, R.; MAZARI, S. A.; ALI, B. S. An overview of effect of process parameters on hydrothermal carbonization of biomass. ***Renewable and Sustainable Energy Reviews***, v. 73, p. 1289-1299, 2017.

NOH, H. J.; LEE, S. Y.; JANG, Y. S. Microbial production of butyl butyrate, a flavor and fragrance compound. ***Applied Microbiology and Biotechnology***, v. 103, p. 2079-2086, 2019.

OLIVEIRA, G.F.; ANDRADE, R.C.; TRINDADE, M. A. G.; ANDRADE, H. M. C.; CARVALHO, C. T. Thermogravimetric And Spectroscopic Study (TG-DTA/FTIR) Of Activated Carbon From The Renewable Biomass Source Babassu. ***Quimica Nova***, v. 40, p. 284-292, 2017.

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 cocoa shells and siriguela seeds using H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> and ZnCL as activating agents for BSA and  $\alpha$ -lactalbumin adsorption. ***Fuel Processing Technology***, v. 126, p. 476-486. 2014.

PINTO, M. V. D. S.; SILVA, D. L. D.; SARAIVA, A. C. F. Production and characterization of the activated carbon from buriti stone (*Mauritia flexuosa L.*) to evaluate the adsorption's process of copper (II). ***Acta Amazonica***, v. 43, p. 73-80, 2013.

QIAN, W.; LUO, X.; WANG, X.; GUO, M.; LI, B. Removal of methylene blue from aqueous solution by modified bamboo hydrochar. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 157, p. 300-306, 2018.

REED, A. R.; WILLIAMS, P. T. Thermal processing of biomass natural fibre wastes by pyrolysis. **International Journal of Energy Research**, v. 28, p. 131-145, 2004

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

RIAL, R.C.; FREITAS, O. N.; NAZÁRIO, C. E. D.; VIANA, L. H. Biodiesel from soybean oil using *Porcine pancreas* lipase immobilized on a new support: p-nitrobenzyl cellulose xanthate. **Renewable Energy**, v. 149, p. 970-979, 2020.

RIOS, S. N.; PINHEIRO, B. B.; PINHEIRO, M. P.; BEZERRA, R. M.; SANTOS, J. C. S.; GONÇALVES, L. R. B. Biotechnological potential of lipases from *Pseudomonas*: Sources, properties and applications. **Process Biochemistry**, v. 75, p. 99-120, 2018.

ROMERO-ANAYA, A.; OUZZINE, M.; LILLO-RÓDENAS, M.; LINARES-SOLANO, A. Spherical carbons: synthesis, characterization and activation processes. **Carbon**, v. 68, p. 296-307, 2014.

SAMANTA, S.; CHOWDHURY, SOMNATH; DASSHARMA, DEBASIS; HALDER, GOPINATH. The biosorptive uptake of enrofloxacin from synthetically produced contaminated water by tamarind seed derived activated carbon. *RSC Advances*, v. 10, p. 1204-1218, 2020.

SANTOS, MATEUS P. F.; BRITO, MYLENA J. P. ; JUNIOR, EVALDO C. S. ; BONOMO, RENATA C. F. ; VELOSO, CRISTIANE M. . Pepsin immobilization on biochar by adsorption and covalent binding and its application for hydrolysis of bovine casein. **Journal Of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 94, p. 1982-1990, 2019.

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.

SEGNEANU, A. E.; GOZESCU, I.; DABICI, A.; SFIRLOAGA, P.; SZABADAI, Z. Organic Compounds FT-IR Spectroscopy. in *Macro to Nano Spectroscopy*, J. UDDIN (Ed.), **InTech**, v. 145, 2012.

SEVILLA, M.; FERRERO, G. A.; FUERTES, A. B. Beyond KOH activation for the synthesis of superactivated carbons from hydrochar. **Carbon**, v. 114, p. 50-58, 2017.

SHAFEEYAN, M. S. et al. A review on surface modification of activated carbon for carbon dioxide adsorption. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 89, p. 143-151, 2010.

SILVA, N. C. C.; MIRANDA, J. S.; BOLINA, I. C. A.; SILVA, W. C.; HIRATA, D. B.; CASTRO, H. F.; MENDES, A. A. Immobilization of porcine pancreatic lipase on poly-hydroxybutyrate particles for the production of ethyl esters from macaw palm oils and pineapple flavor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 82, 139-149, 2014.

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

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

TAG, A. T.; DUMAN, G.; YANIK, J. Influences of feedstock type and process variables on hydrochar properties. **Bioresource Technology**, v. 250, p. 337-344, 2018.

THOMMES, M.; KANEKO, K.; NEIMARK, A. V.; OLIVIER, J. P.; RODRIGUEZ-REINOSO, F.; ROUQUEROL, J.; SING, K. S. W. Physisorption of gases, with special reference to the evaluation of surface area and pore size distribution (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 87, p. 1051-1069, 2015.

VAN SOEST, P. J.; ROBERTSON, J. B.; LEWIS, B. A. Methods for dietary fiber, neutral VAZ, R. P.; MOREIRA, L. R. S.; FILHO, E. X. F. An overview of holocellulose-degrading enzyme immobilization for use in bioethanol production. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 33, p. 127-135, 2016.

VERÍSSIMO, L. A. A.; SOARES, W. C. L.; MOL, P. C. G. et al. Development of a bioreactor based on lipase entrapped in a monolithic cryogel for esterification and interesterification reactions. **Revista Mexicana de Ingeniería Química**, v. 17, p. 177-187, 2018.

YAHYA M. A.; AL-QODAH Z.; ZANARIAH, N. C. W. Agricultural bio-waste materials as potential sustainable precursors used for activated carbon production: a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 46, p. 218-235, 2015.

ZOU, B.; HU, YI.; YU, DINGHUA. et al. Immobilization of porcine pancreatic lipase onto ionic liquid modified mesoporous silica SBA-15. **Biochemical Engineering Journal**, v. 53, p. 150-153, 2010.

**INFLUÊNCIA DO MÉTODO DE IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE DO PÂNCREAS DO  
PORCO NA ATIVIDADE HIDROLÍTICA E NA REAÇÃO DE SÍNTESE DE BUTIRATO  
DE BUTILA**

---

# INFLUÊNCIA DO MÉTODO DE IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE DO PÂNCREAS DO PORCO NA ATIVIDADE HIDROLÍTICA E NA REAÇÃO DE SÍNTESE DE BUTIRATO DE BUTILA

## RESUMO

O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito da imobilização da lipase pancreática do porco (LPP) em carvões ativados, obtidos a partir do caroço de tamarindo, por meio de adsorção física e ligação covalente, e utilizar os biocatalisadores obtidos na síntese do butirato de butila. Inicialmente foi produzido um carvão ativado a partir do caroço de tamarindo (CAT). Posteriormente, foi realizada a funcionalização da superfície do carvão utilizando o método do glutaraldeído (CFT). Os carvões foram caracterizados em relação às suas propriedades físicas, químicas e texturais. Para determinação das melhores condições de imobilização da LPP foram avaliados o pH da solução de imobilização e o efeito da concentração do surfactante Triton X-100 no tampão de imobilização, na capacidade adsorptiva e atividade dos biocatalisadores. A funcionalização levou ao aumento no pH do ponto de carga zero e redução no teor de grupos oxigenados. Além disso, promoveu uma redução de 87% na área superficial BET, redução de 58% no volume de mesoporos e eliminação dos microporos. O pH de imobilização que levou à resultados mais satisfatórios para ambos os biocatalisadores imobilizados foi o 5,0. Para o Triton X-100 foi observada melhor atividade hidrolítica na concentração de 0,6 mM para o CAT, enquanto para o CFT o maior valor de atividade foi encontrado sem a adição desse surfactante. Os biocatalisadores foram utilizados na síntese do butirato de butila onde foi verificado que a enzima imobilizada no CAT apresentou um rendimento de esterificação de 82%, enquanto no CFT obteve um rendimento próximo a 66%. Além disso, ambos apresentaram rendimento de esterificação residual superiores a 86% após 5 ciclos de reuso. Os resultados encontrados sugerem que os carvões produzidos podem ser utilizados como suporte para imobilização de lipases e aplicados em reações de hidrólise e esterificação.

**Palavras-chave:** carvão ativado, adsorção física, ligações covalentes, lipase, esterificação.

## 1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas tem se observado um aumento da utilização de enzimas em diversos processos químicos em função de sua capacidade de promover reações com maior facilidade (JAVED et al., 2018). Devido à versatilidade de aplicações, as lipases estão entre as enzimas mais utilizadas nos diversos setores industriais. Tais enzimas pertencem à classe das hidrolases, catalisando a hidrólise de triacilgliceróis insolúveis para gerar ácidos graxos livres, diacilgliceróis,

monoacilgliceróis e glicerol (GEOFFRY et al., 2018). Além disso, elas apresentam alta estabilidade e especificidade aos substratos, podendo catalisar uma variedade de reações, tais como, esterificação, aminólise, transesterificações, alcoólise, acidólise, entre outras (RIOS et al., 2018).

As lipases podem ser obtidas a partir de fontes animais, vegetais e microbianas. Entre as lipases de origem animal uma que vem sendo bastante explorada nos últimos anos é a lipase pancreática do porco (LPP) (SILVA et al., 2014; RIAL et al., 2020; CHEN et al., 2020). Tal enzima é composta por uma cadeia única contendo 449 aminoácidos, apresentando melhor atividade em pH alcalino e temperaturas entre 35°C e 45°C (MENDES et al., 2012). A LPP é uma das lipases mais utilizadas pelo fato de apresentar um menor custo quando comparada com outras lipases (RIAL et al., 2020), e vem sendo utilizada em diversas aplicações biotecnológicas, como na síntese de ácidos graxos (BAGI et al., 1997), no pré-tratamento de águas residuais ricas em lipídios (MASSE et al., 2001), no tratamento de termoplásticos (ARTHAM et al., 2011), além de ser utilizado em diversas sínteses orgânicas, como na produção de biodiesel (LUNA et al., 2012), produtos farmacêuticos (ZHENG et al., 2011), emulsificantes (YVERGNAUX et al., 2017) e ésteres de aromas (SILVA et al., 2014).

Apesar da grande eficiência catalítica das lipases, sua utilização como biocatalisadora em alguns processos industriais é limitada, devido a fatores relacionados ao custo, reutilização e estabilidade da mesma. Para contornar esses problemas, muitos pesquisadores sugerem como alternativa a utilização das lipases imobilizadas em suportes porosos (GILANI et al., 2016; BRITO et al., 2017; YVERGNAUX et al., 2017; CHEN et al., 2020). Uma possibilidade de suporte poroso a ser utilizado para a imobilização de lipases são os carvões ativados (RAMANI et al., 2010; BRITO et al., 2017). O carvão ativado é um material carbonáceo caracterizado por possuir elevada área superficial, porosidade bem desenvolvida, alta estabilidade química, além de apresentar diversos grupos funcionais em sua superfície. Tais características fazem desse material um adsorvente eficaz para ser utilizado em processos de imobilização de enzimas (LACERDA et al., 2015; GONZÁLEZ-GARCÍA, 2018).

Entre os diversos métodos existentes para a imobilização de lipases, dois que podem ser utilizados são a adsorção física e a por formação de ligação covalente. A adsorção física é o método mais utilizado para a imobilização de enzimas (ZHAO et al., 2015). Nessa técnica, a enzima é imobilizada no suporte por meio de ligações de baixa energia, tais como ligações de hidrogênio, forças de van der Waals, interações eletrostáticas e interações hidrofóbicas (GONÇALVES et al., 2019). Tal método apresenta um baixo custo, além de manter ao máximo a atividade catalítica da enzima. Entretanto, a baixa força de ligação entre a enzima e o suporte faz com que ocorra a perda da enzima por lixiviação durante sua aplicação como biocatalisador (LIU et al., 2018).

Na imobilização por ligações covalentes as enzimas são ligadas ao suporte por meio de ligações

fortes entre os grupos tióis e aminas das enzimas com grupos ativos do suporte (ZHAO et al., 2015), corrigindo os efeitos de perda por lixiviação que ocorre na adsorção física, além de aumentar a estabilidade térmica e operacional da enzima (CAO, 2006, SANTOS et al., 2019). Para que ocorra a imobilização via ligação covalente no carvão ativado é necessário que esses materiais sofram modificações em suas superfícies, por meio da inserção de monômeros específicos, tal como o glutaraldeído, que tem sido utilizado em processos de imobilização enzimática, devido à facilidade de execução e até mesmo a possibilidade de aumento da atividade enzimática. Esse processo de funcionalização é mais indicado em materiais com elevada área superficial, porosidade bem desenvolvida e resistência ao processo de funcionalização, que em alguns casos utilizam temperaturas elevadas (RAMANI et al., 2012; UYGUN et al., 2015; SANTOS et al., 2019).

Diante do exposto, esse trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da imobilização da lipase pancreática do porco em carvões ativados, obtidos a partir do caroço de tamarindo, por meio de adsorção física e ligação covalente, e utilizar os biocatalisadores obtidos na síntese do butirato de butila.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1. Materiais e reagentes**

Para a síntese dos carvões ativados foi utilizado caroço de tamarindo obtido a partir de uma agroindústria localizada na região Sul da Bahia como material precursor. Foi utilizada lipase comercial de pâncreas do porco (LPP) tipo II da marca Sigma Aldrich co. Os demais reagentes utilizados possuíam, no mínimo, grau analítico e estão descritos ao longo da metodologia.

### **2.2. Preparo e caracterização do material precursor**

Os caroços de tamarindo foram lavados em água corrente e secos em estufa na temperatura de 105°C, por 24 h. Posteriormente, foram triturados utilizando um moinho de facas e peneirados utilizando uma peneira de 20 mesh, para padronização do farelo. O farelo obtido foi utilizado como precursor para a síntese dos carvões.

#### **2.2.1. Caracterização do material precursor**

O farelo de tamarindo foi caracterizado em relação ao teor de celulose, hemicelulose e lignina utilizando metodologia descrita por Van Soest et al. (1991). O teor de cinzas foi determinado utilizando metodologia descrita pela AOAC (1995).

Os grupos funcionais do farelos foram avaliados por Espectrofotometria no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR). As amostras foram analisadas de forma direta utilizando a técnica

de refletância total atenuada (ATR), detector de sulfato de triglicina deuterado (DTGS), na região infravermelha de 4000-650  $\text{cm}^{-1}$  em espectrofotômetro Infravermelho médio Cary 630 FTIR (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA), utilizando o Agilent MicroLab PC software.

### **2.3. Síntese e funcionalização do carvão ativado**

O farelo do caroço de tamarindo foi impregnado utilizando ácido fosfórico (VETEC 85% P.A.) como agente ativante químico na razão de impregnação de 3:1 (massa de ativante/massa do precursor). Posteriormente, o material impregnado foi seco em estufa a 105 °C por 24 h. Em seguida o material foi carbonizado em forno mufla, sob fluxo de nitrogênio (50  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ) com taxa de aquecimento de 5°C.min<sup>-1</sup>, até a temperatura final de 680°C, sendo mantida constante por 120 minutos. Os carvões obtidos foram lavados com água quente para eliminação do ácido residual, sendo a lavagem finalizada quando o filtrado atingisse pH 7,0. Por fim, os carvões foram secos em estufa a 105°C por 24 h. O carvão produzido nessa etapa recebeu o código CAT.

O carvão produzido teve sua superfície modificada utilizando o método do glutaraldeído, conforme descrito por Santos et al. (2019). Ao final do processo, o carvão apresenta a superfície aldeído-ativada, capaz de formar ligações covalentes com grupos amina de proteínas e enzimas. O carvão obtido nessa etapa foi codificado como CFT.

### **2.4. Caracterização dos carvões**

Os grupos funcionais dos carvões antes e após a funcionalização (CAT e CFT) foram avaliados utilizando FTIR, conforme descrito no item 2.2.1. Os teores de cinzas foram determinados utilizando metodologia proposta pela AOAC (1995). O pH do ponto de carga zero (pH<sub>PCZ</sub>) foi determinado conforme Santos et al. (2019). A morfologia dos carvões foi determinada utilizando microscopia eletrônica de varredura. Para isso, as diferentes amostras foram secas, fixadas em suporte apropriado (stub) e levadas para análise em um microscópio eletrônico de varredura (QUANTA 250, FEI COMPANY, Waltham, Massachusetts, EUA). As medidas de porosidade e área superficial específica foram determinadas conforme Brito et al. (2017).

### **2.5. Ensaio de imobilização da lipase do pâncreas do porco (LPP)**

A LPP foi imobilizada no CAT e no CFT com o intuito de verificar o efeito do método de imobilização na capacidade adsortiva e atividade da LPP. No CAT a imobilização ocorre por adsorção física, enquanto no CFT a imobilização ocorre, preferencialmente, pela formação de ligações covalentes. Foi avaliado o efeito do pH da solução de imobilização e a adição de surfactante Triton

X-100 na capacidade adsortiva e atividade da LPP imobilizada. Todo o experimento foi realizado em triplicata.

### **2.5.1. Efeito do pH 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 enzimática com concentração inicial de  $6 \text{ mg.mL}^{-1}$ . Os valores de pH da solução inicial de lipase avaliados foram: 3,0, 4,0, 5,0, 6,0, 7,0 e 8,0. Para isso, foi utilizada solução tampão acetato de sódio (100 mM). Alíquotas de 5 mL da solução de lipase, em cada valor de pH avaliado, foram adicionados em tubos contendo aproximadamente 0,1 g de cada suporte. Os tubos foram mantidos sob agitação constante (20 rpm), em um agitador orbital à temperatura de  $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$  por 2h. Uma vez atingido o tempo de contato, os tubos foram retirados e em seguida centrifugados, sendo o sobrenadante filtrado. A capacidade adsortiva dos carvões foi obtida por meio da determinação da concentração de proteínas na solução antes e após a imobilização, utilizando o método de Bradford (1976).

A atividade hidrolítica da LPP na forma livre e imobilizada foi determinada utilizando o método de hidrólise da emulsão do azeite de oliva de acordo com Brito et al. (2017). Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima que libera  $1 \text{ } \mu\text{mol}$  de ácido graxo por minuto de reação, nas condições de ensaio ( $40^{\circ}\text{C}$ , pH 8 e 200 rpm). Um experimento controle (branco) foi feito utilizando o mesmo método de hidrólise da emulsão do azeite de oliva. O branco para as soluções enzimáticas (antes e após a imobilização) foi feito utilizando tampão acetato utilizado na imobilização, sem adição de lipase. O branco para o carvão contendo a lipase imobilizada foi feito utilizando o carvão sem a enzima. A atividade hidrolítica do biocatalisador foi expressa em  $\text{U.g}^{-1}$ .

### **2.5.2. Efeito da adição do surfactante Triton X-100**

Após definição do valor de pH a ser utilizado na imobilização da LPP, foi avaliado o efeito da adição do surfactante Triton X-100 na solução enzimática para os dois carvões produzidos (CAT e CFT). Para isso, foram realizados estudos em diferentes concentrações de surfactante (0,2 mM, 0,4 mM, 0,6 mM e 0,8 mM) e os resultados foram comparados com os respectivos ensaios sem utilização do surfactante selecionado na etapa anterior. Partindo-se de uma solução inicial de enzima de  $6 \text{ mg.mL}^{-1}$ , no pH ótimo de imobilização, alíquotas de 5 mL da solução enzimática foram adicionadas em tubos de 15 mL contendo 0,1 g dos carvões. Os tubos foram mantidos sob agitação orbital constante (20 rpm), em estufa BOD na temperatura de  $30^{\circ}\text{C}$ . Após 2 h, os tubos foram retirados da BOD e o sobrenadante foi retirado, sendo os carvões lavados com tampão acetato 100 mM (pH 5,0),

para remoção da enzima não ligada. A capacidade adsortiva e atividade enzimática foram determinadas utilizando as mesmas metodologias descritas na seção 2.5.1.

## **2.6. Propriedades catalíticas do biocatalisador**

Após definição das melhores condições de imobilização as propriedades catalíticas dos biocatalisadores obtidos nestas condições foram determinadas. O pH ótimo de hidrólise foi avaliado por meio da medição da atividade hidrolítica do meio reacional na faixa entre 5,0 e 9,0, utilizando para tal solução tampão fosfato de sódio 100 mM. Após definição do pH ótimo de hidrólise para os carvões CAT e CFT, foi avaliada a temperatura ótima de hidrólise na faixa entre 20°C e 55°C. Os resultados da influência do pH e temperatura de hidrólise foram plotados em gráficos, onde as maiores atividades foram consideradas como 100% de atividade e as demais atividades relativas (%) foram calculadas a partir destas.

## **2.7. Estabilidade ao tempo de armazenamento**

A estabilidade em relação ao tempo de armazenamento foi determinada por meio do armazenamento da lipase imobilizada nos carvões CAT e CFT em tampão acetato (100 mM) pH 5,0, até um período de 60 dias. Em tempos pré-definidos (1, 5, 10, 20, 30, 45 e 60 dias) a atividade hidrolítica dos diferentes biocatalisadores foram determinadas. As atividades hidrolíticas iniciais dos diferentes biocatalisadores foram consideradas como 100% de atividade e as atividades relativa nos dias posteriores foram calculadas a partir destas.

## **2.8. Estabilidade da lipase imobilizada no carvão em relação ao hexano**

Com o intuito de verificar a estabilidade da LPP imobilizada nos diferentes dois carvões (CAT e CFT) em relação ao solvente hexano, uma massa conhecida dos carvões contendo a LPP imobilizada foi colocada em contato com hexano puro na razão 1:10 (massa de biocatalisador:volume de hexano) por um período máximo de 4 h, sob condições estáticas, na temperatura de 40°C. Após esse período, os carvões foram lavados com tampão acetato pH 5,0 (100 mM) para remoção do hexano e as atividades dos biocatalisadores foram determinadas nas condições ótimas de hidrólise, utilizando procedimento descrito na seção 2.5.1. As atividades hidrolíticas dos biocatalisadores imobilizados que não foram colocados em contato com o hexano foram consideradas como 100% de atividade relativa para os respectivos carvões.

## 2.9. Síntese do butirato de butila

A reação de síntese do butirato de butila foi realizada utilizando a lipase imobilizada no CAT e no CFT, com o objetivo de avaliar o efeito do tipo de ligação da LPP no suporte na síntese do éster. Para ambos biocatalisadores, uma mistura consistindo de butanol (240 mM) e ácido butírico (120 mM) solubilizados em hexano, na razão molar 2:1 foi utilizada como substrato. O meio reacional (5 mL) foi incubado com cerca de 0,5 g dos respectivos carvões contendo a LPP imobilizada (equivalente em massa seca) em frascos Duran de 50 mL, sob agitação em shaker orbital de 200 rpm, na temperatura controlada de 40°C, por um período de 4 h. As variáveis razão molar do substrato, massa do carvão e tempo de reação foram definidas em estudos preliminares. O rendimento da esterificação na síntese do butirato de butila foi determinado por meio do conteúdo de ácido butírico antes e após a reação, utilizando a Equação 1 (SILVA et al., 2014; VERÍSSIMO et al., 2018).

$$Y = \left( \frac{A_I - A_F}{A_I} \right) \times 100 \quad (1)$$

Onde: Y é o rendimento de esterificação (%),  $A_I$  é a concentração inicial de ácido butírico (mM) e  $A_F$  é a concentração final de ácido butírico (mM).

O conteúdo de ácido butírico foi determinado utilizando um cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC) da marca Shimadzu (Japan), com detector de matriz de diodo (Shimadzu, Japan). Uma coluna de aço inoxidável CLC (M) (250 mm x 4,6 mm, Shimadzu) foi utilizada para separação cromatográfica. A fase móvel foi composta por acetonitrila/água (75:25, v/v) com taxa de fluxo de 0,8 mL.min<sup>-1</sup>. Um volume de amostra de 20 µL foi injetado no cromatógrafo e o ácido foi eluído da coluna utilizando método isocrático.

Para avaliar a estabilidade operacional do biocatalisador, foram realizadas sucessivas reações de esterificação utilizando as mesmas amostras dos biocatalisadores por 5 ciclos consecutivos. Após cada ciclo, os biocatalisadores eram lavados com hexano para remoção do ácido butírico residual e colocados novamente em contato com a solução de substrato inicial. As reações eram realizadas nas mesmas condições anteriores. O rendimento de esterificação residual foi determinado, considerando o rendimento do primeiro ciclo como 100% e os demais rendimentos residuais foram calculados a partir deste.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1. Caracterização do material precursor

O farelo do caroço de tamarindo apresentou 33,31% de celulose, 10,45% de hemicelulose, 33,07% de lignina e 1,82% de cinzas. A composição química dos resíduos possui influência direta no

processo de síntese dos carvões ativados, afetando nas características físico-químicas do mesmo (SANTOS et al., 2019). De acordo com Fujishige et al. (2017), materiais com elevado teor de celulose tendem a apresentar maiores valores de área superficial. Carvões produzidos com materiais com maior teor de lignina apresentam um maior rendimento, pois esta apresenta maior resistência térmica do que a celulose e hemicelulose (REED; WILLIAMS, 2004). Além disso, um baixo teor de cinzas do precursor pode resultar em um aumento na área superficial dos carvões produzidos (LI; WANG, 2008).

### 3.2. Caracterização química e textural dos carvões

Observam-se na Tabela 1 os resultados da caracterização das amostras dos carvões produzidos.

**Tabela 1.** Caracterização química e textural dos carvões. CAT: carvão ativado (sem funcionalização); CFT: carvão ativado funcionalizado com glutaraldeído.

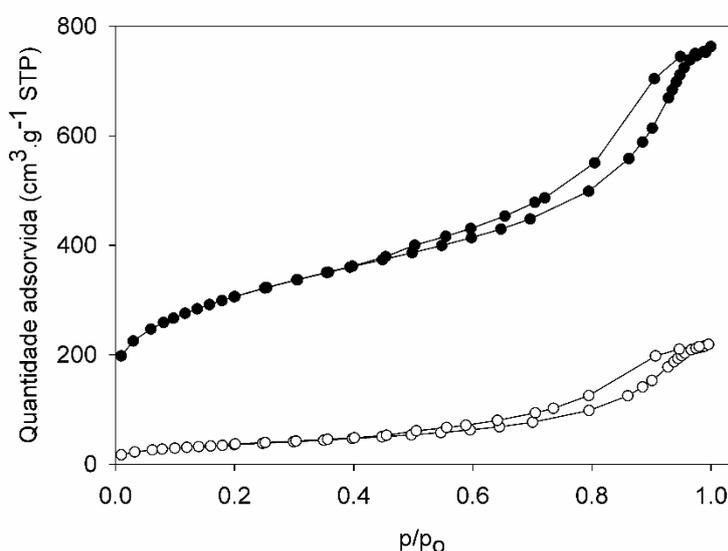
| Amostra | pH <sub>pcz</sub> | GFO (meq/g) | Sg (m <sup>2</sup> /g) | Dp (nm) <sup>a</sup> | V <sub>mes</sub> (cm <sup>3</sup> /g) | V <sub>mic</sub> (cm <sup>3</sup> /g) |
|---------|-------------------|-------------|------------------------|----------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| CAT     | 5,13              | 2,15±0,07   | 1028,33                | 3,23                 | 0,81                                  | 0,11                                  |
| CFT     | 6,11              | 1,99±0,07   | 132,02                 | 4,35                 | 0,34                                  | 0,00                                  |

pH<sub>pcz</sub>: ponto de carga zero; GFO: teor de grupos funcionais oxigenados; Sg: área superficial; Dp: diâmetro dos poros; V<sub>mes</sub>: volume de mesoporos; V<sub>mic</sub>: volume de microporos.

Observa-se que após a funcionalização com glutaraldeído ocorreu um aumento no ponto de carga zero e uma redução no teor de grupos oxigenados do carvão ativado. O ponto de carga zero é definido como o pH em que a superfície do carvão apresenta uma carga neutra, ou seja, a densidade de cargas elétricas numa superfície é zero, e foi determinado para os carvões com o objetivo de verificar as faixas de valores de pH onde as cargas da superfície do carvão variam de positiva para negativa. Portanto, quando o material entra em contato com uma solução com pH inferior ao do ponto de carga zero a superfície do carvão é carregada positivamente, gerando uma maior eficiência adsorptiva para remoção de materiais aniônicos. Quando a solução apresenta valor superior ao do pH do ponto de carga zero, a superfície é carregada negativamente, adsorvendo preferencialmente compostos catiônicos (BRITO et al., 2017). O aumento do pH do ponto de carga zero no CFT provavelmente está relacionado ao processo de funcionalização, principalmente à etapa de aminação, que pode ter deixado grupos amino residuais, que possuem caráter mais alcalino. Tal resultado é corroborado pelo teor de grupos funcionais oxigenados (GFO), que apresentou redução no seu valor após a inserção do glutaraldeído.

Observa-se na Figura 1 as isotermas de adsorção/dessorção do nitrogênio para o CAT e o CFT. De acordo com a classificação da IUPAC (1982), as isotermas de adsorção são do tipo IV e representam sólidos porosos, com microporos e mesoporos em sua estrutura. A curva de histerese observada para ambos os carvões são classificadas como sendo do tipo H1 e ocorre devido a condensação capilar do nitrogênio nos mesoporos (JAIN; TRIPATHI, 2014). As mesmas são associadas a materiais porosos constituídos por aglomerados de estrutura regular com distribuição de tamanho de poros estreita, apresentando a curva de dessorção mais próxima a curva de adsorção (THOMMES et al., 2015).

**Figura 1:** Isotermas de adsorção/dessorção de nitrogênio para o CAT (A) e CFT (B).

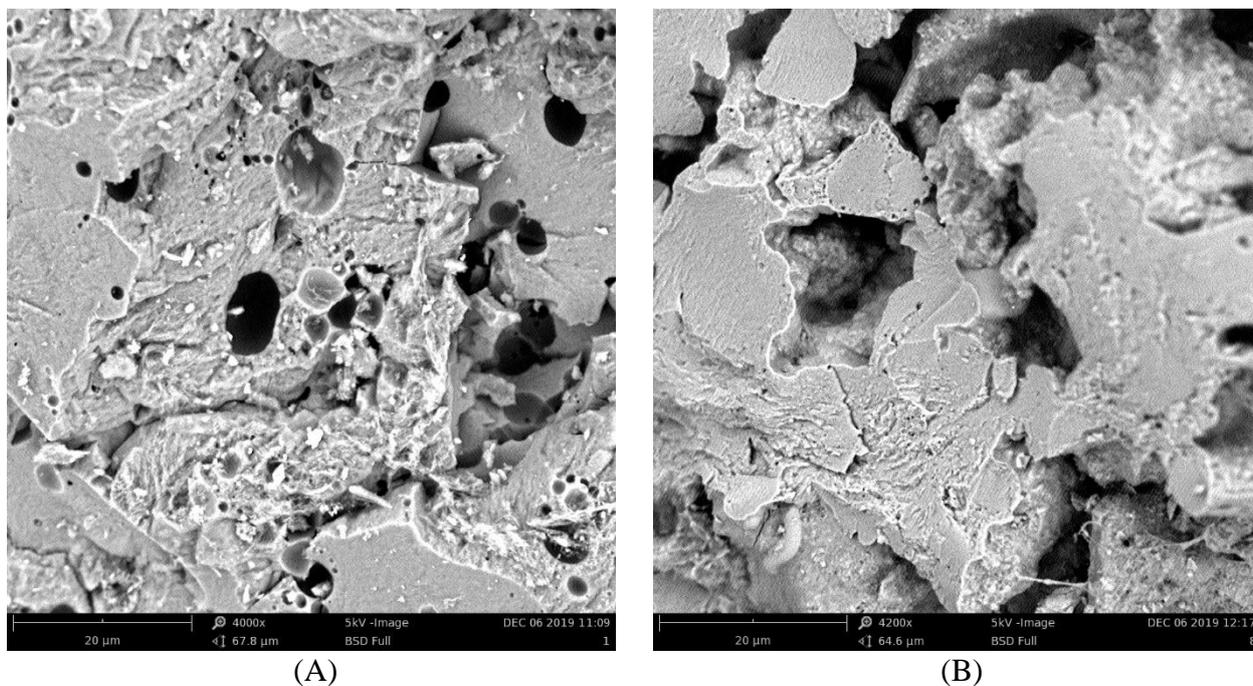


Ao se analisar os resultados das propriedades texturais dos carvões (Tabela 1), verifica-se que após a funcionalização com glutaraldeído o CFT apresentou uma redução de cerca de 87% em sua área superficial. Além disso, o CAT apresentou uma estrutura mista contendo microporos e mesoporos, enquanto o CFT apresentou uma redução no volume de mesoporos quando comparado com o CAT, além da ausência de microporos. Segundo Ramani et al. (2012) e Santos et al. (2019), após a funcionalização os microporos e mesoporos são obstruídos pelos braços espaçadores da molécula de glutaraldeído, resultando, conseqüentemente, em uma redução significativa na área superficial. Tais resultados estão em acordo aos encontrados por esses autores, que também observaram elevada redução na área superficial, além de eliminação dos microporos, ao realizar a funcionalização da superfície do carvão utilizando o mesmo método. Como consequência da obstrução destes poros após inserção dos braços espaçadores, foi observado um aumento no seu diâmetro médio de poros, podendo estar relacionada com a obstrução dos microporos. Comparando os resultados da área superficial com as isotermas (Figura 1), observa-se que devido a menor área

superficial o carvão funcionalizado adsorveu uma menor quantidade de  $N_2$ , ficando em torno de  $220 \text{ cm}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ , enquanto o carvão ativado apresentou uma maior capacidade de adsorção, cerca de  $760 \text{ cm}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ , em função de sua maior área superficial e volume de poros.

As imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos carvões ativado e funcionalizado podem ser observada na Figura 2.

**Figura 2:** Microscopia eletrônica de varredura do CAT (A) e CFT (B).



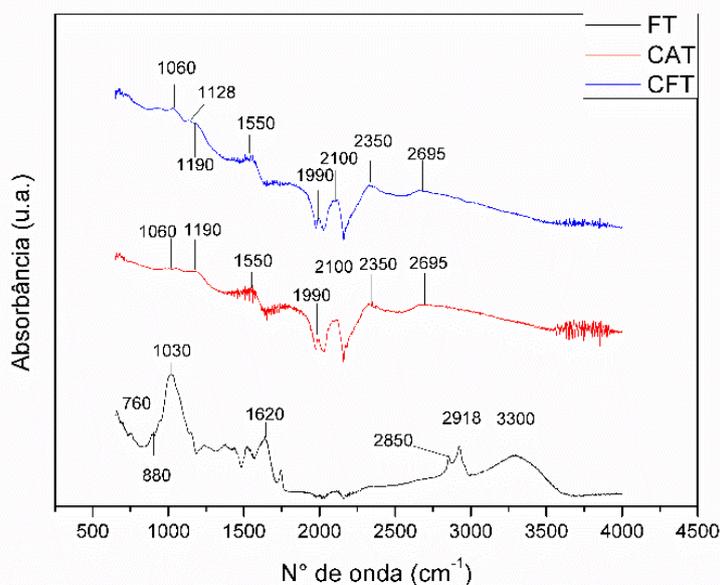
Observa-se que o CAT (Figura 2-A) apresentou uma estrutura rugosa e irregular, com a formação de poros de diferentes tamanhos, confirmando os resultados das propriedades texturais (Tabela 1), onde foi verificado que o CAT apresentou microporos e mesoporos em sua estrutura. Ao analisar a imagem da Figura 2-B para o CFT, verifica-se que a funcionalização do carvão com o glutaraldeído promoveu um bloqueio dos poros menores do carvão, com consequente redução da área superficial, volume de poros e ausência de microporos, corroborando com os resultados da Tabela 1.

A Espectrofotometria no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) foi utilizada para caracterizar o material precursor (FT), CAT e CFT, com o objetivo de avaliar os grupos funcionais superficiais dos mesmos (Figura 3).

Pode-se observar no espectro do farelo de tamarindo que o mesmo apresentou diversos grupos funcionais em sua superfície. Dentre as quais destacam-se as bandas em  $760 \text{ cm}^{-1}$  e  $880 \text{ cm}^{-1}$ , atribuídas ao estiramento C-H de compostos aromáticos;  $1030 \text{ cm}^{-1}$ , atribuída ao estiramento do grupo C-O das estruturas de lignina, celulose e hemicelulose;  $1620 \text{ cm}^{-1}$  que é atribuída ao grupo C=O presente na carboximetilcelulose;  $2918 \text{ cm}^{-1}$ , atribuída a deformação axial de ligações C-H

característicos da lignina, celulose e hemicelulose;  $3300\text{ cm}^{-1}$  resultante do estiramento das vibrações do grupo hidroxila (-OH) pertencentes à estrutura da celulose (MORETTI et al., 2014; PEREIRA et al., 2014; BRITO et al., 2017; SANTOS et al., 2019).

**Figura 3.** Espectros de FTIR do Farelo (FT), Carvão ativado (CAT) e do Carvão Funcionalizado (CFT) obtidos do caroço de tamarindo.



Após o processo de ativação química e carbonização foi observada uma redução de várias bandas de maior intensidade relacionadas com a degradação da estrutura lignocelulósica do precursor, com destaque para as bandas situadas nos números de onda  $3300\text{ cm}^{-1}$ ,  $2918\text{ cm}^{-1}$ ,  $2850\text{ cm}^{-1}$  e  $1030\text{ cm}^{-1}$ , referentes a compostos lignocelulósicos. Além disso, foi verificado o surgimento de algumas bandas referentes aos grupos funcionais dos carvões, tais como:  $1550\text{ cm}^{-1}$  atribuídas ao alongamento C=C;  $1170\text{ cm}^{-1}$  atribuídas aos grupos ésteres de fosfato, relacionados a utilização do ácido fosfórico na ativação química;  $1990\text{ cm}^{-1}$  referente ao estiramento de grupos simétricos e assimétricos para o ácido carboxílico derivado de anidros (C=O; C-O-C);  $2100\text{ cm}^{-1}$  atribuída ao grupamento C=O derivado do grupo cetona e a em banda  $2350\text{ cm}^{-1}$  atribuída do grupamento C-H (OLIVEIRA et al., 2017; SEGNEANU et al., 2012; SANTOS et al., 2019)

Comparando os espectros obtidos para o carvão ativado e funcionalizado, observa-se que os mesmos apresentaram espectros bem similares. Porém, para o espectro referente ao CFT pode ser observado o surgimento ou aumento de intensidade de duas bandas:  $1060\text{ cm}^{-1}$  que pode estar associado ao grupo amina (C-N) oriundo da etilenodiamina e  $2695\text{ cm}^{-1}$  atribuída ao grupamento C=O do glutaraldeído, que foram utilizadas no processo de funcionalização, indicando que ocorreu a modificação química da superfície do carvão (RAMANI et al., 2012; SEGNEANU et al., 2012).

### 3.4. Imobilização da LPP nos carvões por adsorção e por ligação covalente

#### 3.4.1. Efeito do pH da solução de imobilização

Foi realizado o estudo do efeito do pH da solução de lipase na imobilização da LPP no CAT e no CFT, com o objetivo de verificar o efeito dessa variável na capacidade adsortiva e atividade dos biocatalisadores. Sabe-se que o pH é um parâmetro que afeta fortemente a carga superficial das proteínas. A LPP apresenta ponto isoelétrico próximo a 4,9 (BROCKERHOFF; JENSEN, 1974). Se essa enzima entra em contato com uma solução em pH acima do pI a sua carga líquida é negativa. De modo oposto, se for adicionada em solução com pH abaixo desse valor a carga líquida é positiva. Os valores da capacidade adsortiva e atividade hidrolítica dos biocatalisadores, bem como a atividade específica da LPP imobilizada para os diferentes valores de pH estudados estão apresentados na Tabela 2.

**Tabela 2:** Efeito do pH da solução de lipase na capacidade adsortiva e atividade hidrolítica dos biocatalisadores. Condições: concentração inicial de proteína de 6000 mg.L<sup>-1</sup>, temperatura de imobilização de 30°C e tempo de imobilização de 120 minutos.

| Amostra | pH | q <sup>a</sup> (mg.g <sup>-1</sup> ) | AH <sup>b</sup> (U.g <sup>-1</sup> de carvão) | AE <sup>c</sup> (U.mg <sup>-1</sup> de proteína imobilizada) |
|---------|----|--------------------------------------|---|--|
| CAT     | 4  | 89,50±0,24                           | 131,05±9,87                                   | 1,60±0,12  |
|         | 5  | 71,80±1,42                           | 222,47±2,80                                   | 3,32±0,02  |
|         | 6  | 52,96±0,96                           | 178,90±4,16                                   | 3,56±0,06  |
|         | 7  | 44,61±0,42                           | 161,56±8,75                                   | 3,78±0,24  |
|         | 8  | 42,23±1,23                           | 128,39±4,15                                   | 3,17±0,01  |
| CFT     | 4  | 65,41±1,37                           | 98,23±0,16                                    | 1,60±0,03  |
|         | 5  | 55,20±0,81                           | 208,63±1,79                                   | 3,99±0,11  |
|         | 6  | 29,35±1,21                           | 117,84±2,92                                   | 4,14±0,19  |
|         | 7  | 24,97±1,03                           | 111,00±4,12                                   | 4,37±0,54  |
|         | 8  | 21,11±0,98                           | 97,67±6,08                                    | 4,73±0,36  |

<sup>a</sup> Capacidade adsortiva;

<sup>b</sup> Atividade hidrolítica dos carvões;

<sup>c</sup> Atividade específica da enzima imobilizada.

Para ambos os carvões foi observada uma maior capacidade adsortiva em pH 4,0, próximo ao pI da proteína e abaixo do ponto de carga zero dos carvões. À medida que se aumentou o pH da solução de imobilização observou-se uma redução na capacidade adsortiva. Ao elevar o pH a enzima

e o suporte estarão acima do pI e ponto de carga zero, respectivamente, aumentando a quantidade de cargas líquidas superficiais negativas, ocorrendo assim uma repulsão eletrostática entre os mesmos, reduzindo a adsorção. Tal comportamento também foi observado por Brito et al. (2017), ao estudarem a imobilização da lipase obtida a partir da mesma fonte em carvões ativados. Observa-se que o CAT apresentou maiores valores para capacidade adsortiva que o CFT em todas as condições experimentais testadas. Este comportamento pode estar relacionado, provavelmente, ao fato da funcionalização com o glutaraldeído ter reduzido consideravelmente a área superficial BET do CFT (Tabela 1), com conseqüente redução na capacidade adsortiva do carvão.

Ao analisar os resultados para atividade hidrolítica dos biocatalisadores foi verificado que o pH 4, apesar de ter apresentado uma maior capacidade adsortiva, não apresentou o maior valor para atividade hidrolítica. Para ambos os carvões a maior atividade hidrolítica ocorreu em pH 5. Isso pode ter ocorrido pelo fato da LPP comercial da *Sigma Aldrich co.* apresentar diversas outras proteínas contaminantes, tais como esterases, proteases e amilases (MENDES et al., 2012). Assim sendo, o pH 4 pode ter favorecido a adsorção dessas outras proteínas contaminantes, com a enzima alvo LPP tendo sido imobilizada em menor quantidade. Outra possibilidade é que nesse valor de pH a LPP pode ter sido imobilizada em uma conformação menos ativa, como os grupos responsáveis pela reação de hidrólise ficando não acessíveis para reagir. A enzima imobilizada no CAT apresentou maior valor de atividade que no CFT em todos os valores de pH testados. Isso pode ser decorrente da sua maior capacidade adsortiva, resultando em uma maior imobilização da LPP. Além disso, no CAT a imobilização ocorre por adsorção física, enquanto no CFT a imobilização ocorre por ligações covalentes entre o grupamento amina da LPP com o grupo aldeído inserido no suporte (RAMANI et al. (2012). Alguns autores relatam que a imobilização de lipases via ligações covalentes pode resultar em redução da atividade hidrolítica (ZHANG et al., 2012; ZHAO et al., 2015). Ao analisar os resultados da atividade específica da LPP imobilizada, verifica-se que tal parâmetro foi superior no CFT para todos os valores de pH, com exceção do pH 4, que apresentou valor similar. A menor atividade específica no CAT em comparação com o CFT pode estar relacionada ao fato a maior quantidade de LPP imobilizada. Porém, mesmo apresentando menor atividade específica, a maior capacidade adsortiva do CAT garantiu uma maior atividade hidrolítica total para esse biocatalisador, conforme discutido anteriormente. Pelo fato de apresentar maior capacidade hidrolítica, o pH 5 foi selecionado para ser utilizado nas etapas posteriores do presente trabalho.

### 3.4.2. Efeito da adição do Triton X-100 na imobilização da LPP no CAT e no CFT

Observa-se na Tabela 3 os resultados da atividade hidrolítica, capacidade adsortiva e atividade específica para os diferentes biocatalisadores produzidos nas diferentes concentrações de surfactante. A amostra controle corresponde ao ensaio sem a adição do Triton X-100.

**Tabela 3:** Efeito da adição do surfactante Triton X-100 no processo de imobilização da LPP nos diferentes biocatalisadores. Condições: concentração inicial de proteína de 6000 mg.L<sup>-1</sup>, temperatura de imobilização de 30°C, tempo de imobilização de 120 minutos e pH da solução de imobilização de 5.

| Amostra | Triton X-100 (%m.v <sup>-1</sup> ) | q <sup>a</sup> (mg.g <sup>-1</sup> ) | AH <sup>b</sup> (U.g <sup>-1</sup> de carvão) | AE <sup>c</sup> (U.mg <sup>-1</sup> de proteína imobilizada) |
|---------|------------------------------------|--------------------------------------|---|--|
| CAT     | Controle                           | 71,80±1,42                           | 222,47±2,80                                   | 3,32±0,22  |
|         | 0,0125                             | 80,05±0,39                           | 231,86±5,95                                   | 2,86±0,09  |
|         | 0,0250                             | 80,51±0,06                           | 240,95±1,80                                   | 3,23±0,03  |
|         | 0,0375                             | 81,99±0,49                           | 239,60±3,81                                   | 3,16±0,03  |
|         | 0,05                               | 82,51±2,27                           | 213,17±7,38                                   | 2,80±0,03  |
| CFT     | Controle                           | 55,20±0,81                           | 208,63±1,79                                   | 3,99±0,11  |
|         | 0,0125                             | 57,38±0,83                           | 188,67±1,86                                   | 3,48±0,01  |
|         | 0,0250                             | 59,17±1,69                           | 175,34±5,35                                   | 3,14±0,01  |
|         | 0,0375                             | 59,33±1,00                           | 152,78±6,07                                   | 2,73±0,07  |
|         | 0,0500                             | 58,17±0,70                           | 84,88±4,06                                    | 1,54±0,09  |

<sup>a</sup> Capacidade adsortiva;

<sup>b</sup> Atividade hidrolítica dos carvões;

<sup>c</sup> Atividade específica da enzima imobilizada.

Ao analisar os resultados da Tabela 3, observa-se que a adição do surfactante promoveu um pequeno aumento na capacidade adsortiva do CAT a medida que se aumentou a concentração do mesmo. Para o CFT, verifica-se que adição de surfactante promoveu um pequeno aumento na capacidade adsortiva até a concentração de 0,6 mM, seguida de uma redução na concentração de 0,8 mM. Porém, ao analisar os resultados da atividade hidrolítica dos biocatalisadores, ficou evidente que o tipo de ligação entre a enzima e o suporte influenciou nos resultados da adição de surfactante. Para o CAT, onde a imobilização ocorre por adsorção física, a adição até a concentração de 0,6 mM promoveu um aumento na atividade hidrolítica do biocatalisador, quando comparada com a amostra controle (sem adição de surfactante). Já para o CFT, onde a imobilização entre a enzima e o suporte ocorre por ligações covalentes, o maior valor de atividade foi obtido na amostra controle. Além disso,

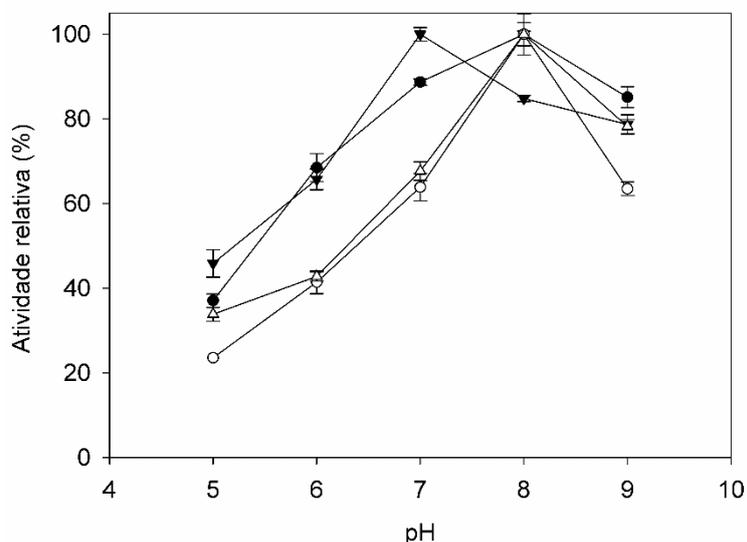
a medida que concentração do Triton X-100 aumentou, ocorreu uma redução gradual da atividade hidrolítica e da atividade específica da LPP immobilizada neste suporte. Segundo Veríssimo et al. (2018), as lipases em solução podem formar agregados que reduzem a sua atividade. Porém, segundo Oliveira et al. (2017), a adição de surfactante evita a formação desses agregados, mantendo as enzimas na sua forma aberta (mais ativa). Tal autor afirma ainda que elevadas concentrações de surfactante podem reduzir a atividade das lipases, pois quando em excesso, pode ligar-se ao sítio ativo das mesmas. Sabe-se que no CFT a imobilização ocorre entre o grupamento amina da lipase com o grupamento aldeído do glutaraldeído, no qual há a formação de um braço espaçador entre a LPP e o carvão (RAMANI et al., 2012). Desse modo, a LPP é imobilizada a uma pequena distância da superfície do carvão, fazendo provavelmente com que os sítios ativos da LPP imobilizada nesse biocatalisador fiquem mais expostos. Desse modo, acredita-se que o surfactante tenha bloqueado esses sítios ativos, o que provocou a redução gradual da atividade da mesma com o aumento da concentração de Triton X-100. Já para o CAT, a adição de Triton X-100 até a concentração de 0,6 mM não se configurou como um excesso de surfactante, pois até esse valor a atividade hidrolítica foi maior que a amostra controle. Definiu-se então que nas etapas posteriores do trabalho seria utilizado o tampão de imobilização contendo 0,6 mM de Triton X-100 para o CAT, e sem adição do surfactante para o CFT.

### **3.5. Propriedades catalíticas dos biocatalisadores**

#### ***3.5.1. Efeito do pH de hidrólise***

Após a definição das melhores condições de imobilização da LPP no CAT e no CFT foi realizado um estudo com o objetivo de determinar as melhores condições de pH e temperatura para a hidrólise da emulsão do azeite de oliva. O efeito do pH na atividade da LPP livre também foi avaliado. Para tal, a atividade hidrolítica foi medida na solução tampão contendo 6 mg.L<sup>-1</sup> de LPP sem a adição de Triton X-100 e na solução 6 mg.L<sup>-1</sup> de LPP contendo 0,4 mM de Triton X-100. Os maiores valores obtidos para a enzima livre foram 39,45±1,91 U.g<sup>-1</sup> e 38,55±1,06 U.g<sup>-1</sup>, para a LPP com e sem adição de Triton X-100, respectivamente, em pH igual a 8. Para a LPP imobilizada no CAT foi obtido um valor de 240,95±1,80 U.g<sup>-1</sup> no pH 8, enquanto no CFT o maior valor obtido foi de 221,94±5,94 U.g<sup>-1</sup> no pH 7. Esses valores de atividade foram considerados como 100% de atividade relativa e as demais atividades relativas foram calculadas a partir dos mesmos, onde foi plotado um gráfico para visualização do efeito do pH do meio reacional na atividade hidrolítica dos biocatalisadores (Figura 4).

**Figura 4:** Efeito do pH na atividade hidrolítica da lipase. (●): imobilizada no CAT; (○): diluída no tampão de imobilização com 0,025% m.v<sup>-1</sup> de Triton X-100; (▼) imobilizada no CFT; (Δ) diluída no tampão de imobilização sem adição de Triton X-100.



É possível observar que ocorreu uma mudança no pH ótimo de hidrólise após imobilização da lipase para o CFT. A formação de ligações covalentes entre a enzima e o suporte pode ter promovido mudanças conformacionais da enzima ou alterações de concentração entre espécies carregadas, substrato, produto, íons hidrogênio e íons hidroxila, tanto no microambiente da enzima imobilizada, quanto no meio reacional (GOMES et al., 2006). Tal comportamento também foi observado por outros autores, como Silva et al. (2014) ao imobilizar LPP em um suporte de poli-hidroxibutirato utilizando adsorção física, Gomes et al. (2006), após imobilizar a lipase da *Candida Rugosa* em suporte de celulignina utilizando ligações covalentes e Ferreira et al. (2018), ao imobilizar lipase a partir da *Geotrichum candidum* no suporte MANAE-agarose. Para todas as situações a LPP apresentou maior atividade na região alcalina. Tais resultados estão em acordo ao encontrado por diversos autores que utilizaram a LPP livre e imobilizada (ZOU et al., 2010; SILVA et al., 2014; CHEN et al., 2019). A partir dos resultados encontrados, o pH de hidrólise das etapas posteriores desse trabalho foi de 8 para a enzima imobilizada no CAT e 7 para a imobilizada no CFT.

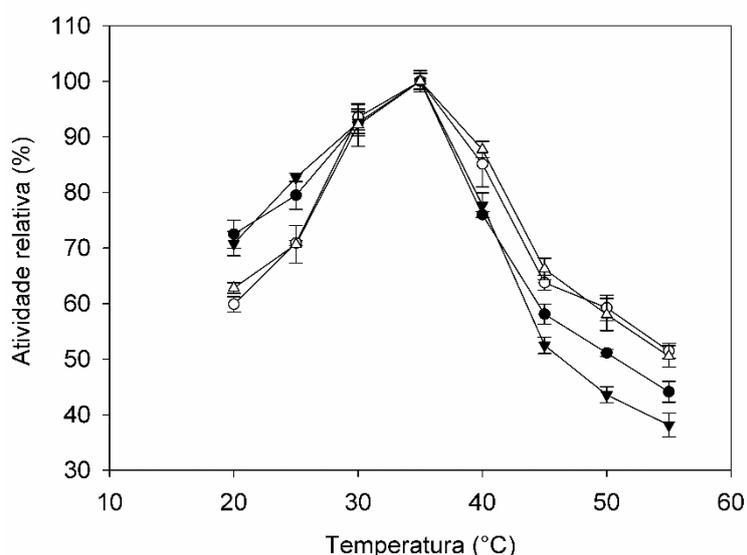
### 3.5.2. Efeito da temperatura de hidrólise

O efeito da temperatura de hidrólise da emulsão do azeite de oliva foi avaliado para os diferentes biocatalisadores na faixa entre 20°C e 55°C, nos valores de pH ótimos obtidos na etapa anterior e estão apresentados na Figura 5.

O CAT contendo a LPP imobilizada e a solução livre de LPP utilizada para imobilização nesse biocatalisador (com Triton X-100 0,4 mM) tiveram a reação realizada no pH 8. Já o CFT contendo a

LPP immobilizada e a solução livre de LPP utilizada para imobilização nesse biocatalisador (sem adição de Triton X-100) tiveram a atividade medida utilizando o pH do meio reacional no valor de 7. Em todas as condições experimentais testadas, a temperatura de 35°C levou aos maiores valores de atividade. A solução inicial de LPP livre utilizada para imobilização no CAT apresentou atividade máxima de  $46,35 \pm 0,65 \text{ U.g}^{-1}$ . A LPP immobilizada no CAT apresentou valor máximo de  $317,11 \pm 6,08 \text{ U.g}^{-1}$ . A solução de LPP livre utilizada para imobilização no CFT apresentou valor máximo de  $43,95 \pm 0,64 \text{ U.g}^{-1}$ , enquanto a immobilizada no CFT apresentou maior valor de  $285,56 \text{ U.g}^{-1}$ . Esses valores foram considerados como sendo 100% de atividade relativa e um gráfico para visualização do comportamento foi plotado (Figura 5).

**Figura 5:** Efeito da temperatura na atividade hidrolítica da LPP livre e immobilizada nos diferentes carvões. (●): immobilizada no CAT; (○): diluída no tampão de imobilização com 0,4 mM de Triton X-100; (▼) immobilizada no CFT; (Δ) diluída no tampão de imobilização sem adição de Triton X-100.



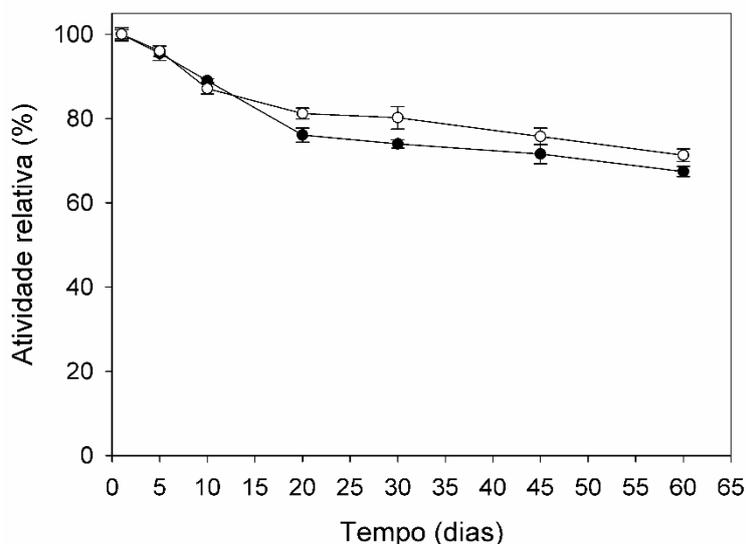
Como pode ser visualizado na Figura 5, o aumento da temperatura promoveu um aumento gradual na atividade da LPP livre e immobilizada até a temperatura de 35°C para todas as situações estudadas. A partir desse valor, o aumento da temperatura provocou uma redução na atividade da LPP. De acordo Guo et al. (2006), o aumento da temperatura aumenta a frequência de colisões entre a lipase e as moléculas do substrato e diminui a viscosidade do meio reacional, favorecendo a reação de hidrólise, até o valor de temperatura em que a inativação térmica assume papel relevante, promovendo redução da atividade. Nas temperaturas a partir de 50 °C a LPP immobilizada no CAT e no CFT apresentaram atividade relativa inferior a 50%. Possivelmente, tais temperaturas promoveram uma maior desnaturação térmica da LPP. De acordo com Mendes et al. (2012), a LPP apresenta maior atividade de hidrólise na faixa de temperatura entre 35°C e 45°C. Assim sendo, os valores encontrados

no presente trabalho estão dentro da faixa descrita. A partir dos resultados encontrados, a temperatura de 35°C foi selecionada para ser utilizada nas etapas posteriores.

### 3.6. Estabilidade ao tempo de armazenamento

Uma das principais vantagens da imobilização de lipases é a sua praticidade para ser utilizada posteriormente, pois, após a imobilização, a mesma pode ser armazenada por um determinado tempo com manutenção da sua atividade. Diante disso, o efeito do tempo de armazenamento em tampão acetato (tampão de imobilização) foi avaliado para LPP imobilizada no CAT e no CFT por um período máximo de 60 dias. Os resultados encontrados estão representados na Figura 6. Para ambos os biocatalisadores a atividade inicial (dia 1) foi considerada como 100% de atividade relativa. Para a LPP imobilizada no CAT a atividade inicial corresponde a  $317,11 \pm 6,08 \text{ U.g}^{-1}$ , enquanto para a imobilizada no CFT corresponde a  $285,56 \text{ U.g}^{-1}$ .

**Figura 6:** Estabilidade da LPP imobilizada nos carvões ao longo do tempo de armazenamento. (●): referente a imobilizada no CAT; (○): referente a imobilizada no CFT.



Observa-se que os dois biocatalisadores apresentaram uma estabilidade ao longo do tempo de armazenamento considerada adequada. Após 10 dias, ambos apresentaram retenção de cerca de 90 % de sua atividade inicial. Porém, a partir desse tempo verifica-se que a LPP imobilizada no CAT apresentou uma maior perda relativa de atividade em comparação com a atividade inicial. Após 60 dias de armazenamento a LPP imobilizada no CAT apresentou  $62,44 \pm 0,66\%$  de atividade relativa, enquanto a LPP imobilizada no CFT apresentou  $71,29 \pm 1,50\%$  de atividade relativa. Como a interação da LPP com o suporte ocorre por meio de ligações para o CFT e por adsorção física (interações de menor energia) para o CAT, a ligação de maior energia promoveu a menor perda de atividade da LPP

ao longo do armazenamento. Uma hipótese para tal fato seria que a ligação mais forte com o CFT evitou a dessorção da enzima para o tampão utilizado no armazenamento, enquanto para o CAT uma pequena dessorção pode ter ocorrido. Porém, em ambos biocatalisadores foi observada uma manutenção adequada da atividade ao longo do tempo de 60 dias. Os resultados encontrados sugerem que a LPP pode ser imobilizada nos carvões por adsorção e ligação covalente para uso posterior.

### **3.7. Estabilidade ao hexano**

A estabilidade ao hexano foi avaliada com o intuito de verificar o efeito de tal solvente na atividade da LPP imobilizada. Para isso, os carvões contendo a LPP imobilizada tiveram sua atividade hidrolítica determinada nos tempos 0 min (controle), 60 min, 120 min e 240 min. Essa análise foi realizada para avaliar a possibilidade de utilização do hexano como solvente na reação de síntese do éster butirato de butila, a qual geralmente é realizada pela diluição dos reagentes em um solvente orgânico.

Foi verificado que para os diferentes tempos de incubação em hexano testados a LPP imobilizada manteve sua atividade inicial, demonstrando que a utilização do hexano como solvente não afetou a atividade da LPP. O hexano é frequentemente utilizado como o solvente de diluição de reagentes na produção de ésteres pelo fato de ser conhecido que as lipases apresentam manutenção da atividade ao serem colocadas em contato com tal solvente (HAZARIKA et al., 2002; SILVA et al., SUN et al., 2010; 2014; SOSE et al., 2017). Sabe-se que tal solvente apresenta a característica de ser bastante hidrofóbico. Segundo Sun et al. (2010), a utilização de solventes orgânicos hidrofóbicos promove a manutenção da atividade dessas enzimas pelo fato de eles não competirem pela molécula de água que circunda as lipases. Desse modo, as lipases mantêm a sua estrutura conformacional, com conseqüente manutenção de sua atividade catalítica. Os resultados encontrados sugerem que o hexano pode ser utilizado como solvente de diluição dos reagentes em reações de síntese de ésteres utilizando a LPP imobilizada no CAT e no CFT.

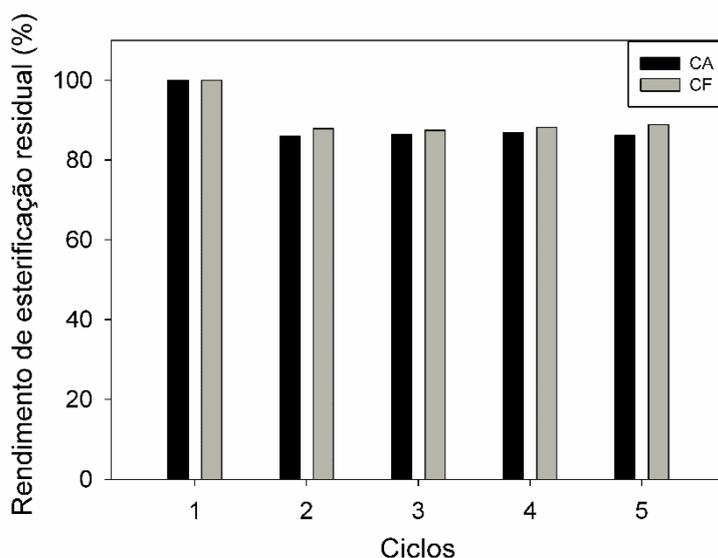
### **3.8. Síntese do butirato de butila**

Para avaliar a utilização dos biocatalisadores contendo a LPP imobilizada em meio orgânico, foi realizada a síntese do éster butirato de butila. As condições experimentais de tempo, temperatura e razão molar foram definidas a partir de testes preliminares. Para a LPP imobilizada no CAT, o rendimento de esterificação obtido foi de  $82,21 \pm 2,91\%$  e para a imobilizada no CFT, o rendimento de esterificação obtido foi de  $66,26 \pm 1,17\%$ . O maior valor de rendimento de esterificação obtido para a lipase imobilizada no CAT está em acordo aos resultados obtidos anteriormente, pois o mesmo apresentou uma maior atividade e capacidade adsortiva para a LPP. A estabilidade operacional dos

biocatalisadores foi avaliada pela realização da reação de esterificação por 5 ciclos consecutivos. Os resultados encontrados para os dois biocatalisadores estão expressos na Figura 7.

Observa-se que ambos biocatalisadores imobilizados apresentaram uma pequena queda no rendimento após o primeiro ciclo. Nos ciclos seguintes os valores apresentaram-se similares, indicando que a lipase imobilizada no CAT e no CFT apresenta estabilidade ao reuso. Os valores de rendimento de esterificação obtidos para ambos biocatalisadores são inferiores ao obtido por Silva et al. (2014), ao imobilizar a LPP em partículas de poli-hidroxibutirato, que obteve um rendimento de síntese do butirato de butila próximo a 90%. Porém, ao se comparar o rendimento residual, os biocatalisadores produzidos no presente trabalho apresentaram-se superiores, visto que após o quinto ciclo ambos apresentaram rendimentos de esterificação residual superiores a 86%, enquanto Silva et al. (2014) obtiveram um rendimento residual próximo a 60% após o quinto ciclo. Os resultados encontrados no presente trabalho sugerem que os biocatalisadores produzidos podem ser utilizados em processos de síntese de butirato de butila.

**Figura 7:** Rendimento de esterificação residual da LPP imobilizada no CAT e do CFT.



#### 4. CONCLUSÃO

Foi produzido um carvão ativado a partir do farelo do caroço de tamarindo, que passou por um processo de funcionalização pelo método do glutaraldeído. Verificou-se que a funcionalização levou a um aumento no pH do ponto de carga zero, uma redução no teor de grupos funcionais oxigenados do carvão ativado, redução na área superficial BET e no volume de mesoporos (confirmada pelas imagens de MEV dos carvões). Nos ensaios de imobilização foi observado que a adição de Triton X-100 promoveu um aumento na atividade hidrolítica da LPP imobilizada no CAT

até a concentração de 0,6 mM, enquanto que para a LPP imobilizada no CFT a adição de tal surfactante provocou redução da atividade em todas as condições testadas. O pH ótimo de hidrólise foi diferente para os biocatalisadores imobilizados e a LPP imobilizada manteve sua atividade ao ser incubada em hexano por até 4 horas. A estabilidade em meio aquoso ao longo de 60 dias também foi determinada, onde foi verificado que ambos os carvões apresentaram uma pequena redução na atividade. Quando testados na reação de síntese do butirato de butila em meio orgânico, a LPP imobilizada no CAT apresentou uma maior capacidade de síntese do butirato de butila. Além disso, ambos os biocatalisadores imobilizados foram reutilizados por 5 ciclos sem perda significativa da atividade, indicando que os mesmos apresentam potencial para serem utilizados em processos de produção de ésteres com aplicação nas indústrias química e de alimentos.

## 5. REFERÊNCIAS

- AOAC (Association of Official Analytical Chemistry). **Official methods of analysis**. 16ed. Arlington: AOAC International, 1995.
- ARTHAM, T.; MOHANALAKSHMI, N.; PARAGI-VEDANTHI, P.; DOBLE, M. Mechanistic investigations of lipase-catalyzed degradation of polycarbonate in organic solvents. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 48, p. 71-79, 2011.
- BAGI, K.; SIMON, L. M.; SZAJÁNI, B. Immobilization and characterization of porcine pancreas lipase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 20, p. 531-535, 1997.
- 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, p. 373-380, 1951.
- 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.
- BRITO, M. J. P.; VELOSO, C. M.; BONOMO, R. C. F.; FONTAN, R. C. I.; SANTOS, L. S.; MONTEIRO, K. A. Activated carbons preparation from yellow mombin fruit stones for lipase immobilization. **Fuel Processing Technology**, v. 156, p. 421-428, 2017.
- BROCKERHOFF, H.; JENSEN, R.G. (1974). in *Lipolytic Enzymes*, pp. 10–24, Academic Press, New York.
- BRUNAUER, S., EMMET, P. H., TELLER, E., Adsorption of Gases in multimolecular layers. **Journal of The American Chemical Society**, v. 60, p. 309-319, 1938.

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

CAO, L. Immobilised enzymes: science or art? **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 9, p. 217-226, 2005.

CHEN, X.; XUE, S.; LIN, Y.; LUO, J.; KONG, L. Immobilization of porcine pancreatic lipase onto a metal-organic framework, PPL@MOF: A new platform for efficient ligand discovery from natural herbs. **Analytica Chimica Acta**, v. 1099, p. 94-102, 2020.

FERREIRA, M. M.; SANTIAGO, F. L. B.; SILVA, N. A. G. et al. Different strategies to immobilize lipase from *Geotrichum candidum*: Kinetic and thermodynamic studies. **Process Biochemistry**, v. 67, p. 55-63, 2018.

GEOFFRY, K.; ACHUR, R. N. Screening and production of lipase from fungal organisms. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.03.009>.

GOMES, F. M.; PAULA, A. V.; SILVA, G. S.; CASTRO, H. F. Determinação das propriedades catalíticas em meio aquoso e orgânico da lipase de *Candida rugosa* imobilizada em celulignina quimicamente modificada por carbonildiimidazol. **Química Nova**, v. 29, p. 710-718, 2006.

GONÇALVES, M. C. P.; KIECKBUSCH, T. G.; PERNA, R. F.; FUJIMOTO, J. P.; MORALES, S. A. V.; ROMANELLI, J. P. Trends on enzyme immobilization researches based on bibliometric analysis. **Process Biochemistry**, v. 76, p. 95-110, 2019.

GONZÁLEZ-GARCÍA, P. Activated carbon from lignocellulosics precursors: A review of the synthesis methods, characterization techniques and applications. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**.v.82, p.1393-1414, 2018.

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: Solid-State Materials for Advanced Technology**, v. 183, p. 54-60, 2014.

JAVED, S.; AZEEM, F.; HUSSAIN, S.; RASUL, I.; SIDDIQUE, M. H.; RIAZ, M.; AFZAL, M.; KOUSER, A.; NADEEM, H. Bacterial lipases: A review on purification and characterization. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 132, p. 23-34, 2018.

LACERDA, S.V.; JUAN, B.L.S.; GUIMARAES, A.C. et al. Rhodamine B removal with activated carbons obtained from lignocellulosic waste. **Journal of Environmental Management**, v. 155, p. 67-76, 2015.

LI, W.; YANG, K.; PENG, J.; GUO, S.; XIA, H. Effects of carbonization temperatures on characteristics of porosity in coconut shell chars and activated carbons derived from carbonized coconut shell chars. **Industrial Crops and Products**, v. 28, p. 190-198, 2008.

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, p. 32-37, 1964.

LIU, D. M.; CHEN, J.; SHI, Y. P. Advances on methods and easy separated support materials for enzymes immobilization. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 102, p. 332-342, 2018.

LUNA, C.; SANCHO, E.; LUNA, D. et al. Biofuel that keeps glycerol as monoglyceride by 1,3-selective ethanolysis with pig pancreatic lipase covalently immobilized on AlPO<sub>4</sub> support. **Energies**, v. 6, p. 3879–3900, 2013.

MASSE, L.; KENNEDY, K. J.; CHOU, S. Testing of alkaline and enzymatic hydrolysis pretreatments for fat particles in slaughterhouse wastewater. **Bioresource Technology**, v. 77, p. 145-155, 2001.

MENDES, A. A.; OLIVEIRA, P. C.; CASTRO, H. F. Properties and biotechnological applications of porcine pancreatic lipase. **Journal of Molecular Catalysis B. Enzymatic**, v. 78, p. 199-134, 2012.

MERÇON, F.; ERBES, V. L.; SANT'ANNA, G. L.; NOBREGA, R. Lipase immobilized membrane reactor applied to babassu oil hydrolysis. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 14, p. 1-9, 1997.

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.

OLIVEIRA, G.F.; ANDRADE, R.C.; TRINDADE, M. A. G.; ANDRADE, H. M. C.; CARVALHO, C. T. Thermogravimetric And Spectroscopic Study (TG-DTA/FTIR) Of Activated Carbon From The Renewable Biomass Source Babassu. **Quimica Nova**, v. 40, p. 284-292, 2017.

OLIVEIRA, U. M. F.; MATOS, L. J. B. L.; SOUZA, M. C. M. et al. Effect of the Presence of Surfactants and Immobilization Conditions on Catalysts' Properties of *Rhizomucor miehei* Lipase onto Chitosan. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 184, p. 1263-1285, 2018.

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

cocoa shells and siriguela seeds using  $H_3PO_4$  and  $ZnCl$  as activating agents for BSA and  $\alpha$ -lactalbumin adsorption. **Fuel Processing Technology**, v. 126, p. 476-486, 2014.

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.

REED, A. R.; WILLIAMS, P. T. Thermal processing of biomass natural fibre wastes by pyrolysis. **International Journal of Energy Research**, v. 28, p. 131-145, 2004.

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

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

RIAL, R.C.; FREITAS, O. N.; NAZÁRIO, C. E. D.; VIANA, L. H. Biodiesel from soybean oil using *Porcine pancreas* lipase immobilized on a new support: p-nitrobenzyl cellulose xanthate. **Renewable Energy**, v. 149, p. 970-979, 2020.

RIBAS, M. C.; ADEBAYO, M. A.; PROLA, L. D. T.; LIMA, E. C.; CATALUÑA, R.; FERIS, L. A.; PUCHANA-ROSETO, M. J.; MACHADO, F. M.; PAVAN, F. A.; CALVETE, T. Comparison of a homemade cocoa shell activated carbon with commercial activated carbon for the removal of reactive violet 5 dye from aqueous solutions. **Chemical Engineering Journal**, v. 248, p. 315-326, 2014.

RIOS, S. N.; PINHEIRO, B. B.; PINHEIRO, M. P.; BEZERRA, R. M.; SANTOS, J. C. S.; GONÇALVES, L. R. B. Biotechnological potential of lipases from *Pseudomonas*: Sources, properties and applications. **Process Biochemistry**, v. 75, p. 99-120, 2018.

SANTOS, MATEUS P. F.; BRITO, MYLENA J. P. ; JUNIOR, EVALDO C. S. ; BONOMO, RENATA C. F. ; VELOSO, CRISTIANE M. . Pepsin immobilization on biochar by adsorption and covalent binding and its application for hydrolysis of bovine casein. **Journal Of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 94, p. 1982-1990, 2019.

SEGNEANU, A. E.; GOZESCU, I.; DABICI, A.; SFIRLOAGA, P.; SZABADAI, Z. Organic Compounds FT-IR Spectroscopy. in Macro to Nano Spectroscopy, J. UDDIN (Ed.), **InTech**, v. 145, 2012.

SILVA, N. C. C.; MIRANDA, J. S.; BOLINA, I. C. A.; SILVA, W. C.; HIRATA, D. B.; CASTRO, H. F.; MENDES, A. A. Immobilization of porcine pancreatic lipase on poly-hydroxybutyrate particles for the production of ethyl esters from macaw palm oils and pineapple flavor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 82, 139-149, 2014.

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

THOMMES, M.; KANEKO, K.; NEIMARK, A. V.; OLIVIER, J. P.; RODRIGUEZ-REINOSO, F.; ROUQUEROL, J.; SING, K. S. W. Physisorption of gases, with special reference to the evaluation of surface area and pore size distribution (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 87, p. 1051-1069, 2015.

UYGUN, M.; UYGUN, D. A.; Ö ÇALIŞKAN, E.; AKGÖL, S.; DENİ LI, A. Concanavalin A immobilized poly(ethylene glycol dimethacrylate) based affinity cryogel matrix and usability of invertase immobilization. **Journal of Chromatography B**, v. 887-888, p. 73-78, 2015.

VERÍSSIMO, L. A. A.; SOARES, W. C. L.; MOL, P. C. G. et al. Development of a bioreactor based on lipase entrapped in a monolithic cryogel for esterification and interesterification reactions. **Revista Mexicana de Ingeniería Química**, v. 17, p. 177-187, 2018.

YVERGNAUX, F. Lipases: particularly effective biocatalysts for cosmetic active ingredients. **Oilseeds and Fats Crops and Lipids**, v. 24, p. 1-4, 2017.

ZHAO, X.; QI, F.; YUAN, C.; DU, W.; LIU, D. Lipase-catalyzed process for biodiesel production: Enzyme immobilization, process simulation and optimization. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 44, p. 182-197, 2015.

ZHENG, C.-Z. et al. Regioselective synthesis of amphiphilic metoprolol–saccharide conjugates by enzymatic strategy in organic media. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 123-127, 2011.

ZOU, B.; HU, YI.; YU, DINGHUA. et al. Immobilization of porcine pancreatic lipase onto ionic liquid modified mesoporous silica SBA-15. **Biochemical Engineering Journal**, v. 53, p. 150-153, 2010.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foram produzidos diferentes carvões ativados a partir do caroço de tamarindo voltados para o processo de imobilização de lipases. A carbonização hidrotérmica levou a produção de um carvão ativado com propriedades adequadas para ser empregada no processo de imobilização de lipase. Quando foi feita a funcionalização do carvão, o biocatalisador obtido apresentou atividade hidrolítica inferior à observada no carvão sem funcionalização. Os diferentes biocatalisadores apresentaram boa retenção da atividade hidrolítica ao longo de 60 dias imobilizada em tampão acetato na temperatura de 6°C. O rendimento de esterificação foi de 83 % para o CAHT, 82 % para o CAFT e 66 % para o CFT. Isso demonstra que a inclusão de uma etapa de tratamento hidrotérmico levou à obtenção de um biocatalisador com melhor performance que a funcionalização com glutaraldeído.

Os resultados encontrados para todos os biocatalisadores produzidos sugerem que estes são adequados para serem utilizados em processos de hidrólise de lipídios em meio aquoso, além de reações para síntese de ésteres aromáticos com aplicações nas indústrias químicas, de alimentos, de cosméticos, entre outras, permitindo um maior reaproveitamento das enzimas por vários ciclos, resultando em vantagens relacionadas à operação e aos custos envolvidos nesses processos.