



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

MATHEUS RODRIGUES BOFINGER

**ATIVACÃO, CARACTERIZAÇÃO E UTILIZAÇÃO DO  
CARVÃO PIROLÍTICO DE SERRAGEM DE MADEIRA E  
PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR NA IMOBILIZAÇÃO DE  
LIPASE**

MATHEUS RODRIGUES BOFINGER

**ATIVÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E UTILIZAÇÃO DO  
CARVÃO PIROLÍTICO DE SERRAGEM DE MADEIRA E  
PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR NA IMOBILIZAÇÃO DE  
LIPASE**

Dissertação de Mestrado Acadêmico  
apresentado ao Departamento de Química da  
Universidade Estadual de Londrina, como  
requisito parcial para a obtenção do título de  
Mestre em Bioenergia.

Orientadora: Profa. Dra. Carmen Luisa Barbosa  
Guedes

Londrina  
2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Bofinger, Matheus Rodrigues.

Ativação, caracterização e utilização do carvão pirolítico de serragem de madeira e palha de cana-de-açúcar na imobilização de lipase / Matheus Rodrigues Bofinger. - Londrina, 2015.  
90 f. : il.

Orientador: Carmen Luisa Barbosa Guedes.

Dissertação (Mestrado em Bioenergia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, , 2015.  
Inclui bibliografia.

1. Pirólise da biomassa - Tese. 2. Reaproveitamento - Tese. 3. Biomassa lignocelulósica - Tese. 4. Lipase - Tese. I. Guedes, Carmen Luisa Barbosa. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. . III. Título.

MATHEUS RODRIGUES BOFINGER

**ATIVÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E UTILIZAÇÃO DO  
CARVÃO PIROLÍTICO DE SERRAGEM DE MADEIRA E  
PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR NA IMOBILIZAÇÃO DE  
LIPASE**

Dissertação de Mestrado Acadêmico  
apresentado ao Departamento de Química da  
Universidade Estadual de Londrina, como  
requisito parcial para a obtenção do título de  
Mestre em Bioenergia.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Carmen Luisa Barbosa Guedes  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Dr. Helton José Alves  
Universidade Federal do Paraná - UFPR

---

Profa. Dra. Maria Inês Rezende  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 23 de Fevereiro de 2015.

Dedico este trabalho a Deus, que nunca desistiu de mim, nem nunca me deixou desistir.

## **AGRADECIMENTOS**

À minha orientadora Carmen Luisa Barbosa Guedes que sempre confiou em mim e me ensinou a pensar cientificamente. Obrigado pelos ensinamentos e orientação.

À Milena Martins Andrade, pelo encorajamento, por toda a sabedoria que me passou, e pelo apoio atemporal, sempre me ouvindo, ajudando e melhorando tudo que o que eu fazia. Deixo aqui a minha admiração.

À Larissa pela ajuda, amizade e apoio sempre, espero ter ajudado na sua formação científica e pessoal.

À minha família que me apóia em absolutamente tudo, nunca me deixando desamparado, meu muito obrigado pelo amor incondicional.

Ao meu avô que partiu me apoiando e que me apóia ainda, do lugar em que se encontra.

Igor por toda a paciência, destreza e amizade para comigo, me tirando de casa nas horas certas.

Fabiano, Eduardo, Jhonatan, Alana, Haike e Wilton pela amizade, companheirismo, alegrias, bebedeiras e tudo o que fizeram para tornar essa fase da minha vida menos árdua e muito melhor do que poderia ser.

Aos amigos do LAFLURPE, principalmente Mari, Carol e Eloá pelos momentos de descontração e amor, Talita e Bruna pela grande ajuda desde sempre, Baumi pelo companheirismo sempre, Caryna e Aroldo pelos ensinamentos e amizade.

A Deus por sempre me ouvir e me atender mesmo quando não sei o que pedir.

“A arte de escutar é como uma luz que dissipa a escuridão da ignorância.”

Dalai Lama

BOFINGER, Matheus Rodrigues. **Ativação, caracterização e utilização do carvão pirolítico de serragem de madeira e palha de cana-de-açúcar na imobilização de lipase**. 2015. 90 p. Dissertação (Mestrado em Bioenergia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

## RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial químico e físico do biocarvão produzido a partir de resíduos agroindustriais da serragem de madeira (eucalipto e peroba) e palha de cana-de-açúcar para servirem como imobilizadores enzimáticos ou material adsorvente. Os carvões foram obtidos da pirólise dos resíduos agroindustriais. A caracterização físico-química dos biocarvões mostrou que o tamanho de partículas foi característica de carvões granulares, estando a maioria entre 180 e 355  $\mu\text{m}$ . Observou-se um elevado teor de carbono fixo nos biocarvões, qualificando os mesmos para ativação química. A ativação química ou física garante um aumento na área superficial e no volume de poros de materiais adsorventes, tornando-os mais eficientes. A ativação conferiu melhores características adsorptivas aos carvões de madeira (eucalipto e peroba) mostrando maiores valores de área específica, volume de poros e adsorção de iodo. A análise de absorção no infravermelho mostrou a presença de grupamentos oxigenados na superfície do carvão, que promove interações quimissorptivas entre carvão e adsorvato nos materiais ativados, o que comprova a melhora da característica após a ativação. Espectros de RPE indicaram a presença de radicais derivados de difenóis e semiquinonas, demonstrando que, como esperado, há a presença de grupos oxigenados no carvão. Microscopia eletrônica de varredura indicou que o processo de pirólise forma cavidades que podem vir a ser precursoras de poros nos carvões e após ativação essas cavidades permaneceram, indicando que não houve obstrução. A área específica aumentou em até 90 vezes após a ativação. O volume de poros no biocarvão também aumentou, indicando que a ativação foi efetiva. As isotermas de adsorção de  $\text{N}_2$  se mostraram diferentes para os biocarvões de madeiras em relação ao de cana-de-açúcar, sendo isotermas do tipo I para madeiras, indicando adsorção em microporos, e isotermas tipos II e III para o carvão de cana-de-açúcar ativado e sem ativação, respectivamente, indicando adsorção muito fraca em ambos. O ensaio do número de iodo mostrou que o biocarvão de pirólise é semelhante ao carvão ativado comercial, corroborando com o indicativo da presença de microporos ( $<20 \text{ \AA}$ ). Os resultados de imobilização de lipase indicaram altos valores de unidade de atividade lipolítica ( $\text{U/g}_{\text{biocarvão}}$ ) após imobilização, sendo melhor o carvão de eucalipto. A validação do método da imobilização de lipase apresentou valor observado de atividade lipolítica para o biocarvão de eucalipto de  $757 \pm 70 \text{ U/g}_{\text{biocarvão}}$ , semelhante ao valor previsto ( $756 \text{ U/g}_{\text{biocarvão}}$ ) pela superfície de resposta. O estudo também permitiu observar que a variável tempo não foi significativa no processo e que o carvão de eucalipto apresentou maior relação entre a variável concentração da enzima e temperatura do meio, mostrando que há uma maior adsorção de lipase a temperatura ambiente e em maiores concentrações de lipase no meio. Conclui-se que após a ativação, os biocarvões produzidos a partir de resíduos agroindustriais se mostraram semelhante ou melhor, no caso do biocarvão de eucalipto, que os carvões comerciais relatados na literatura, indicando que podem ser usados como adsorvente e imobilizadores enzimáticos.

**Palavras-chave:** Ativação química. Adsorção. Imobilização. Biocatálise.

BOFINGER, Matheus Rodrigues. **Activation, characterization and utilization of pyrolytic charcoal of wood sawdust and sugarcane straw onto lipase immobilization**. 2015. 90 p. Dissertation (Master's Degree in Bioenergy) – Londrina State University, Londrina, 2015.

## ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the chemical and physical potential of biochar produced from organic residues from wood sawdust (eucalyptus and mahogany) and straw sugarcane to serve as enzymatic supports or adsorbent material. The coals were obtained from pyrolysis of organic residues. The physico-chemical characterization of biochars showed particle size characteristic of granular coals, with the majority between 180 and 355  $\mu\text{m}$ . There was a high fixed carbon content on biochars, qualifying them to physical or chemical activation. An activation ensures an increase in surface area and pore volume of adsorbent materials, making them more efficient. The activation conferred the best adsorptive characteristics of wood charcoal (eucalyptus and mahogany) showing higher values of specific area, pore volume and iodine adsorption. The IR analysis showed the presence of oxygen groups on the carbon surface, which promotes chemisorptive interactions between carbon and adsorbate in the activated material, which proves the improved feature after activation. EPR spectra indicated the presence of radicals derived from diphenols and semiquinone, demonstrating, as expected, the presence of oxygen groups on the carbon. Scanning electronic microscopy indicated that the pyrolysis process form cavities that may be precursors of pores on the coals and after activation of these cavities remained, indicating no obstruction. The specific area increased by up to 90 times after activation. The pore volume of the biochar also increased, indicating that activation was effective. The  $\text{N}_2$  adsorption isotherms were different for biochars, isotherm with type I for wood, indicating adsorption micropore, and isotherms types II and III for carbon of sugar cane with and without activation, respectively, indicating very weak adsorption on both. The hysteresis formed by  $\text{N}_2$  desorption indicated that the shape of the pores is conical and / or cylindrical. The testing of iodine number showed that biochar pyrolysis is similar to commercial activated carbon, corroborating indicative presence of micropores (<20 Å). Lipase immobilization showed high values of lipase activity unit ( $\text{U} / \text{g}_{\text{biochar}}$ ), the better being the eucalyptus charcoal, then chosen for validation. Validation of lipase immobilization method had observed value of lipase activity for eucalyptus biochar  $757 \pm 70 \text{ U} / \text{g}_{\text{biochar}}$ , similar to the predicted value ( $756 \text{ U} / \text{g}_{\text{biochar}}$ ) by response surface. The study also allowed observing that variable 'time' was not significant in the process and that the eucalyptus biochar showed a higher ratio of variable enzyme concentration and temperature of the medium, showing there is a higher lipase adsorption at room temperature and at higher concentrations lipase in the middle. It was shown that after activation, the coal was similar or better than the commercial charcoals, in eucalyptus sawdust case, reported in the literature and can be used as an adsorbent and enzyme supports.

**Key words:** Chemical activation. Adsorption. Immobilization. Biocatalysis.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1 -</b>	Representação esquemática da (a) estrutura de carvão ativado; (b) de um grânulo de carvão ativado.....	23
<b>Figura 2 -</b>	Grupos funcionais comumente encontrados na superfície de carvões ativados de origem vegetal.....	24
<b>Figura 3 –</b>	Classificação das isotermas segundo IUPAC.....	26
<b>Figura 4 –</b>	Modelos de histereses.....	27
<b>Figura 5 -</b>	Representação esquemática da lipase. As tampas estão representadas em azul e vermelho e o sítio ativo em amarelo.....	28
<b>Figura 6 –</b>	Mecanismo de hidrólise realizado por lipase .....	29
<b>Figura 7 –</b>	Espectro de absorção na região do infravermelho do biocarvão pirolítico de palha de cana-de-açúcar sem ativação e após ativação .....	47
<b>Figura 8 -</b>	Espectro de absorção na região do infravermelho do biocarvão pirolítico de serragem de madeira de eucalipto sem ativação e após ativação.....	47
<b>Figura 9 -</b>	Espectro de absorção na região do infravermelho do biocarvão pirolítico de serragem de madeira de peroba sem ativação e após ativação.....	48
<b>Figura 10 -</b>	Exemplos de semiquinonas a partir de orto- e/ou para-difenóis ou quinonas.....	50
<b>Figura 11.</b>	Espectro de RPE dos biocarvões de palha de cana-de-açúcar sem ativação e ativado .....	51
<b>Figura 12 -</b>	Micrografias dos carvões de serragem de madeira de eucalipto (a) sem ativação e (b) ativado .....	52
<b>Figura 13 -</b>	Micrografias dos carvões de palha de cana-de-açúcar (a) sem ativação e (b) ativado.....	53
<b>Figura 14 -</b>	Micrografias dos carvões de serragem de madeira de peroba (a) sem ativação e (b) ativado .....	54
<b>Figura 15 -</b>	Isotermas de adsorção de N <sub>2</sub> para os biocarvões de eucalipto sem ativação e ativado.....	57

<b>Figura 16 -</b>	Isotermas de adsorção de N <sub>2</sub> para os biocarvões de cana-de-açúcar sem ativação e ativado .....	58
<b>Figura 17 -</b>	Isotermas de adsorção de N <sub>2</sub> para os biocarvões de peroba sem ativação e ativado .....	58
<b>Figura 18 -</b>	Superfície de resposta para a imobilização de lipase em carvão ativado de eucalipto – <i>Tratamento II</i> (atividade em U/g suporte) .....	68
<b>Figura 19 -</b>	Superfície de resposta para a imobilização de lipase em carvão ativado de peroba – <i>Tratamento II</i> (atividade em U/g suporte) .....	69

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1 -</b>	Caracterização dos tipos de pirólise .....	20
<b>Tabela 2 -</b>	Matérias-primas e métodos de ativação de carvões de diversas origens.....	21
<b>Tabela 3 -</b>	Classificação dos poros de acordo com o diâmetro .....	22
<b>Tabela 4 -</b>	Níveis de variação para os fatores do planejamento fatorial $2^3$ com triplicata no ponto central para avaliação da imobilização de lipase nos biocarvões ativados. ....	40
<b>Tabela 5 -</b>	Níveis de variação para os fatores do planejamento fatorial $2^2$ adicionado de pontos axiais para avaliação da imobilização de lipase nos carvões ativados de eucalipto e peroba.....	41
<b>Tabela 6 -</b>	Percentuais de tamanho de partículas dos biocarvões pirolíticos de resíduos agroindustriais.....	43
<b>Tabela 7 -</b>	Composição percentual dos biocarvões pirolíticos e carvão comercial.....	45
<b>Tabela 8 -</b>	Parâmetros de RPE para os sinais de radicais orgânicos nos carvões de pirólise antes e após ativação .....	50
<b>Tabela 9 -</b>	Parâmetros da estrutura porosa dos biocarvões de pirólise .....	55
<b>Tabela 10 -</b>	Relação do tipo de biocarvão ativado, área específica e agente ativador para diferentes tipos de carvão de origem residual .....	56
<b>Tabela 11 -</b>	Número de iodo para os carvões pirolíticos ativados .....	59
<b>Tabela 12 -</b>	Valores de atividade enzimática e teores de proteína para diferentes concentrações do extrato de lipase utilizadas no <i>Tratamento I</i> .....	61
<b>Tabela 13 -</b>	Planejamento fatorial para avaliar os efeitos da temperatura, tempo e concentração de enzima na imobilização da lipase em carvão ativado de cana-de-açúcar e as respostas obtidas (atividades de lipase) – <i>Tratamento I</i> .....	61
<b>Tabela 14 -</b>	Planejamento fatorial para avaliar os efeitos da temperatura, tempo e concentração de enzima na	

	imobilização da lipase em carvão ativado de eucalipto e as respostas obtidas (atividades de lipase) – <i>Tratamento I</i> .....	62
<b>Tabela 15 -</b>	Planejamento fatorial para avaliar os efeitos da temperatura, tempo e concentração de enzima na imobilização da lipase em carvão ativado de peroba e as respostas obtidas (atividades de lipase) – <i>Tratamento I</i> .....	63
<b>Tabela 16 -</b>	Estimativa dos efeitos para a imobilização da lipase em carvão ativado de eucalipto - <i>Tratamento I</i> .....	64
<b>Tabela 17 -</b>	Estimativa dos efeitos para a imobilização da lipase em carvão ativado de peroba - <i>Tratamento I</i> .....	64
<b>Tabela 18 -</b>	Valores de atividade enzimática e teores de proteína para diferentes concentrações utilizadas no <i>Tratamento II</i> .....	65
<b>Tabela 19 -</b>	Planejamento fatorial $2^2$ para avaliar os efeitos da temperatura e concentração de enzima na imobilização de lipase em carvão ativado de eucalipto e as respostas obtidas (atividades de lipase) - <i>Tratamento II</i> .....	65
<b>Tabela 20 -</b>	Planejamento fatorial $2^2$ para avaliar os efeitos da temperatura e concentração de enzima na imobilização da lipase em carvão ativado de peroba e as respostas obtidas (atividades de lipase) - <i>Tratamento II</i> .....	66
<b>Tabela 21 -</b>	Análise de variância (ANOVA) do planejamento fatorial $2^2$ com pontos centrais ( $p < 0,05$ ) para o modelo linear na imobilização de lipase em carvão ativado de eucalipto e peroba - <i>Tratamento II</i> .....	67
<b>Tabela 22 -</b>	Comparação do resultado experimental com o preditivo calculado pelo modelo matemático na imobilização de lipase em carvão ativado de eucalipto.....	69
<b>Tabela 23 -</b>	Atividades da lipase imobilizada em carvão ativado de eucalipto na condição otimizada.....	70
<b>Tabela 24 -</b>	Utilização de lipases imobilizadas em biocarvões ativados utilizados para hidrólise de óleos e produção de ésteres.....	71

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BET	Superfície adsortiva do modelo Brunauer – Emmet – Teller.
BG-250	Corante Brilliant Cromassie Blue.
CG	Cromatografia Gasosa.
E. C.	Comitê Enzimático.
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura.
MSR	Metodologia da Superfície de Resposta.
<i>p</i> NP	<i>para</i> Nitrofenil.
<i>p</i> NPP	Palmitato de <i>para</i> -Nitrofenila.
U	Unidade de atividade enzimática
USP	Universidade de São Paulo.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>16</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>18</b>
2.1	OBJETIVO GERAL.....	18
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	18
<b>3</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>19</b>
3.1	PIRÓLISE E CARBONIZAÇÃO .....	19
3.2	CARVÃO ATIVADO .....	20
3.3	ISOTERMAS DE ADSORÇÃO .....	25
3.4	PRODUÇÃO E USO DE LIPASE .....	28
3.4.1	PRODUÇÃO DE LIPASES POR <i>BOTRYOSPHERIA RIBIS</i> .....	31
3.5	CATÁLISE ENZIMÁTICA PARA A PRODUÇÃO DE BIODIESEL .....	32
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	<b>34</b>
4.1	MATERIAIS .....	34
4.2	MÉTODOS .....	34
4.2.1	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO BIOCARVÃO .....	34
4.2.1.1	Tamanho de partícula .....	34
4.2.1.2	Umidade .....	34
4.2.1.3	Material volátil .....	35
4.2.1.4	Teor de cinzas .....	35
4.2.1.5	Carbono fixo .....	35
4.2.2	OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA LIPASE .....	36
4.2.2.1	Determinação do teor de proteínas .....	36
4.2.2.2	Determinação de atividade enzimática.....	36
4.2.3	ATIVAÇÃO QUÍMICA DOS BIOCARVÕES PIROLÍTICOS .....	38
4.2.4	ANÁLISE ESPECTROSCÓPICA DOS BIOCARVÕES .....	38
4.2.4.1	Espectroscopia de absorção na região do infravermelho.....	38
4.2.4.2	Ressonância paramagnética eletrônica .....	38
4.2.5	ANÁLISE MORFOLÓGICA DA SUPERFÍCIE DOS BIOCARVÕES .....	39
4.2.5.1	Microscopia eletrônica de varredura .....	39

4.2.5.2	Área específica e volume de poros .....	39
4.2.6	NÚMERO DE IODO .....	40
4.2.7	IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE NO BIOCARVÃO .....	40
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>43</b>
5.1	CARACTERÍSTICAS E PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DOS BIOCARVÕES PIROLÍTICOS .....	43
5.2	BIOCARVÕES ATIVADOS .....	46
5.2.1	ANÁLISE ESPECTROSCÓPICA PARA IDENTIFICAÇÃO DE GRUPOS FUNCIONAIS E ESPÉCIES QUÍMICAS PARAMAGNÉTICAS .....	46
5.2.1.1	Absorção molecular na região do infravermelho .....	46
5.2.1.2	Ressonância paramagnética eletrônica .....	49
5.2.2	ANÁLISE MORFOLÓGICA E CARACTERIZAÇÃO MICROESTRUTURAL .....	51
5.2.2.1	Microscopia eletrônica de varredura .....	51
5.2.2.2	Área específica e volume de poros dos biocarvões .....	54
5.3	NÚMERO DE IODO .....	59
5.4	IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE NOS BIOCARVÕES .....	60
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>72</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>74</b>
	<b>ANEXOS .....</b>	<b>86</b>
	<b>ANEXO A. Espectros de Ressonância Paramagnética Eletrônica das amostras de biocarvões de pirólise com campo magnético 3450±50 Gauss. ....</b>	<b>87</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Dentre as muitas maneiras de se obter combustíveis a partir de fontes renováveis, a pirólise é a mais utilizada para a conversão de biomassa lignocelulósica residual em combustíveis líquidos, sólidos e gasosos. Trata-se de um processo de decomposição térmica em que a matéria orgânica é submetida à uma faixa de temperatura compreendida entre 400 e 800 °C em atmosfera redutora, havendo, portanto, a redução da biomassa e conversão de uma boa parte em carvão, abrindo uma vasta gama de possibilidades de uso para o mesmo. O carvão de pirólise pode ser usado in natura ou sofrer algum tratamento específico dependendo de sua utilização.

A ativação de carvões é um processo térmico que pode ser química ou física, dependendo do meio reacional e é utilizado para melhorar as características tecnológicas do produto. O carvão ativado é derivado principalmente de matérias-primas vegetais. Sua grande área superficial e a presença de poros de diversos tamanhos garante a adsorção de grandes quantidades de material tendo uma ampla utilização como adsorvente, catalisador ou suporte para catalisadores de reações de grande interesse industrial, como por exemplo, a produção de biocombustíveis.

A produção de biodiesel é alvo de estudos que buscam sua otimização e produção por maneiras ambientalmente menos prejudiciais. Uma proposta é a utilização de catalisadores heterogêneos que permitem fácil recuperação, dos quais estão incluídos os processos enzimáticos. Dentre as enzimas que podem ser utilizadas está a lipase, que é específica para a hidrólise de triacilglicerídeos e formação de ácidos graxos ou ésteres, dependendo do meio reacional. A imobilização dessas enzimas em um suporte, muitas vezes garante maior estabilidade e melhores rendimentos, sendo que o suporte deve possuir dureza, hidrofobicidade e grande área específica, requisitos esses supridos por carvões de natureza vegetal.

O grande problema na produção de biodiesel enzimático é o alto custo do processo como um todo, já que demanda mais tempo e matérias-primas mais refinadas. Porém a metodologia da transesterificação por via enzimática permite a reutilização do complexo suporte e enzima, podendo diminuir esses custos

em larga escala. Desta maneira a presente dissertação irá avaliar o potencial químico e físico dos carvões de pirólise de resíduos agroindustriais da serragem de madeira (eucalipto e peroba) e palha de cana-de-açúcar para servirem para a imobilização enzimática e, portanto, para a produção de biodiesel.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial químico e físico do biocarvão produzido a partir de resíduos agroindustriais da serragem de madeira (eucalipto e peroba) e palha de cana-de-açúcar para servirem como imobilizadores enzimáticos ou material adsorvente.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar através de ensaios físico-químicos o biocarvão pirolítico dos resíduos agroindustriais (palha de cana-de-açúcar e das serragens de madeira de eucalipto e peroba).
- Ativar o biocarvão pirolítico através de método químico;
- Identificar grupos funcionais do biocarvão pirolítico por espectroscopia de absorção no infravermelho;
- Identificar espécies paramagnéticas no biocarvão pirolítico por espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (RPE);
- Caracterizar morfológicamente o biocarvão pirolítico por microscopia eletrônica de varredura (MEV);
- Avaliar a capacidade de adsorção do biocarvão pirolítico através de análise da área específica;
- Imobilizar lipase do ascomiceto *Botryosphaeria ribis* EC-01 no biocarvão pirolítico ativado para a produção de ésteres de ácidos graxos.

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 PIRÓLISE E CARBONIZAÇÃO

O processo de pirólise, como qualquer outro que engloba a produção de biocombustíveis, advém da necessidade da substituição do monopólio energético agregado aos combustíveis fósseis. A necessidade do desenvolvimento de novos biocombustíveis aumentou o foco na conversão de resíduos da agricultura, florestas e indústrias de alimentos em substâncias com valor energético efetivo, tornando a pirólise da biomassa um importante escopo para o avanço dos biocombustíveis.

Trata-se por pirólise o processo de óxido-redução na qual uma parte da biomassa é reduzida a carbono, enquanto a outra parte é oxidada e hidrolisada, dando origem a compostos fenólicos, carboidratos, alcoóis aldeídos, cetonas e ácidos carboxílicos. Vários métodos de pirólise existem, estando esses relacionados na Tabela 1. Quando a biomassa é aquecida, ocorre a degradação térmica, por meio da ruptura das ligações dos componentes orgânicos (ligações C-C), e a formação de ligações C-O. O rearranjo dessas moléculas gera produtos mais complexos, como ésteres, produtos poliméricos, entre outros. A pirólise é entendida como uma decomposição térmica de um material orgânico em uma atmosfera livre, ou parcialmente livre de oxigênio. A temperatura varia, geralmente, de 400 a 800 °C e gera produtos líquidos, sólidos e gasosos, em proporções dependentes dos parâmetros utilizados (DENG et al., 2008; FAAIJ et al., 2005; MAHINPEY et al., 2009)

A mais utilizada, é a pirólise rápida e tem como características o curto tempo de residência para vapores dentro do reator, altas taxas de aquecimento, altos coeficientes de transferência de calor e a temperatura relativamente baixa da fonte de aquecimento. Apresenta um maior rendimento de produto líquido, denominado bio-óleo. (GIANNAKOPOULOU et al., 2010; MAHINPEY et al., 2009; MOENS et al., 2009; XIONG et al., 2009)

**Tabela 1** - Caracterização dos tipos de pirólise

Processo	Tempo de permanência	Aquecimento	Temperatura (°C)	Produto principal
Carbonização	vários dias	muito lento	400	carvão
Pirólise lenta	5 a 30 min	lento	500	bio-óleo e carvão
Pirólise rápida	0,5 a 5 s	muito rápido	650	bio-óleo
Pirólise ultrarrápida	< 0,5 s	muito rápido	1000	gás e líquidos

Fonte: Diniz, 2005.

Após o processo de pirólise, o material carbonáceo sólido é, normalmente, considerado resíduo, sendo utilizado para suprir a demanda energética da própria planta de conversão da biomassa. Entretanto, há na literatura estudos destinados à caracterização de carvões derivados da pirólise, os quais mostram características tecnológicas promissoras quanto a matriz carbonácea. (FAAIJ *et al.*, 2005; GIANNAKOPOULOU *et al.*, 2010; MAHINPEY *et al.*, 2009; MARTINS *et al.*, 2007; MOENS *et al.*, 2009; ROCHA *et al.*, 2004). Os materiais carbonáceos, ou carvões, podem ser utilizados após o processo de pirólise ou pode ainda sofrer um tratamento de ativação para torná-lo mais eficiente em processos industriais específicos.

A ativação desse resíduo é uma maneira alternativa de utilização do carvão e contribui para a produção de outros biocombustíveis, como também para tratamento de efluentes da indústria de biocombustíveis, entre outras (MOHAN; PITTMAN; STEELE, 2006).

### 3.2 CARVÃO ATIVADO

Carvão ativado pode ter origem vegetal, animal ou ainda mineral (Tabela 2), sendo os de origem vegetal os mais utilizados. Tem sido usado como um sorvente universal, sua obtenção pode ocorrer a partir de diferentes fontes carbonáceas, podendo ser vegetais ou minerais. Os carvões minerais mais utilizados são a hulha e o antracito, porém a prática de ativação de carvão mineral não é usual (MUCCIACITO, 2006).

**Tabela 2** - Matérias-primas e métodos de ativação de carvões de diversas origens

<b>Matéria-Prima</b>	<b>Método de ativação</b>	<b>Referência</b>
<b>Animal</b>		
Carvão de ossos	Física	Cheung, Porter e McKay, 2000
<b>Mineral</b>		
Carvão betuminoso	Química (H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> )	Teng, Yeh e Hsu, 1998
	Química (ZnCl <sub>2</sub> , KOH)	Ahmadpour, 1996
	Física (CO <sub>2</sub> )	Muñoz-Guillena et al., 1992
<b>Vegetal</b>		
Casca de amêndoas	Física (CO <sub>2</sub> )	Omri; Benzina; Ammar, 2013
Casca de mandioca	Química (KOH)	Sudaryanto et al., 2006
Sementes de cereja	Física (H <sub>2</sub> O)	Fan et al., 2004
Espiga de milho	Física (H <sub>2</sub> O) e	Song et al., 2013
	Química (KOH)	
Palha de milho	Física (H <sub>2</sub> O)	Fan et al., 2004
Hastes de algodão	Química (H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> )	Nahil; Williams, 2012
Casca de dendê	Química (ZnCl <sub>2</sub> )	Hesas et al., 2013
Casca de arroz	Química (H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> )	Guo; Rockstraw, 2007
	Química (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	Liu et al., 2011
Caule de arroz	Física (N <sub>2</sub> )	Huang et al., 2015
Casca de pistache	Química (KOH)	Lua; Yang, 2004

**Fonte:** Próprio autor.

Seu precedente, carvão, foi utilizado primeiramente na indústria de açúcar, na Inglaterra em 1974 para branqueamento (descoloração). Porém, seu maior desenvolvimento ocorreu durante a Primeira Guerra Mundial, em filtros para remoção de agentes químicos no ar. O carvão ativado comercial tomou sua forma atual desde os anos 30 (JANKOWSKA et al., 1991).

As condições para preparação são cuidadosamente controladas para se alcançar a força mecânica e a estrutura porosa desejada. O material de

partida é, impreterivelmente, carbonácea, como madeira, carvões, turfa, coque de petróleo, ossos, casca de coco e caroço de frutas. O processo de ativação produz, além dos poros já existentes, mais poros com distribuição de tamanho desejável. Dois métodos são mais utilizados quando se trata de ativação de carvões: químico e físico (HADOUN et al., 2013; LIOU, 2008).

O carvão ativado possui uma vasta aplicação para compostos apolares e parcialmente polares, pela presença de uma grande matriz carbonácea e de heteroátomos que configuram características parcialmente polares (YANG, 2003).

A composição do material precursor pode diferenciar o produto final, dependendo da quantidade de lignina e celulose, há uma diferenciação dos tipos e quantidades de poros. Precursores ricos em celulose dão origem a materiais mais ricos em microporos, já os mais ricos em lignina apresentam maior quantidade de macroporos (IOANNIDOU; ZABANIOTOU, 2007). Alguns resultados demonstraram que carvões com maior quantidade de celulose do que de lignina apresentam maiores capacidades adsorventes e são mais facilmente ativáveis (DAUD; ALI, 2004).

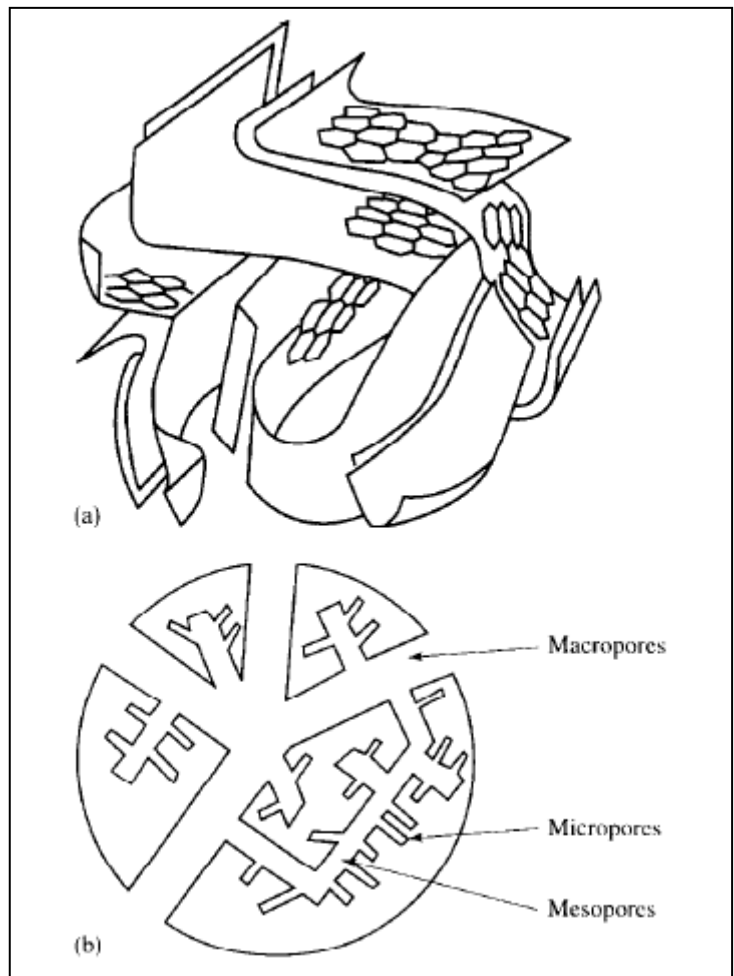
A dimensão da ativação vai condicionar a porosidade do carvão ativado final, como indica a Figura 1 (a e b), porém normalmente possui poros da ordem de microporos, mesoporos e macroporos (Tabela 3).

**Tabela 3** - Classificação dos poros de acordo com o diâmetro

<b>Tipos de Poros</b>	<b>Diâmetro (Å)</b>
Microporos	< 20
Mesoporos	20 – 500
Macroporos	> 500

**Fonte:** IUPAC, 1982.

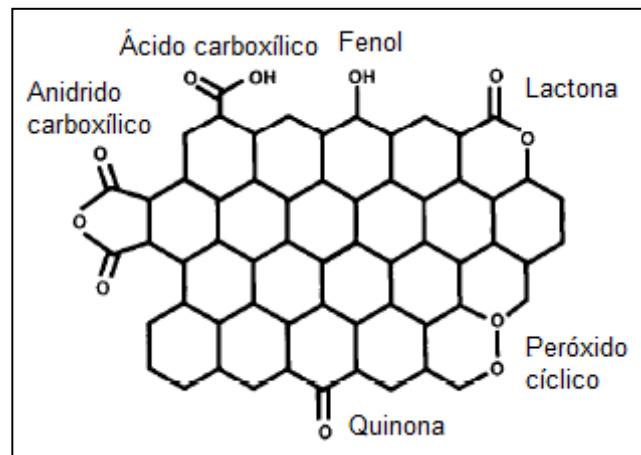
**Figura 1** - Representação esquemática da (a) estrutura de carvão ativado; (b) de um grânulo de carvão ativado



**Fonte:** Rodriguéz-Reinoso, 1998

A desorganização dos planos aromáticos confere ao carvão ativado valências incompletamente saturadas e elétrons desemparelhados, e isso influencia no comportamento adsorptivo, especialmente para moléculas polares ou polarizáveis, além disso, há a presença de heteroátomos (Figura 2), como oxigênio (aproximadamente 15 mol%) e hidrogênio (aproximadamente 30 mol%), que são derivados do material de partida ou ligados quimicamente à estruturas durante a preparação, e também componentes das cinzas inorgânicas (RODRIGUÉZ-REINOSO, 1998).

**Figura 2** - Grupos funcionais comumente encontrados na superfície de carvões <sup>24</sup> ativados de origem vegetal



**Fonte:** Rodriguez-Reinoso, 1997

O método de ativação física, também chamada de gaseificação, é o processo pelo qual o precursor desenvolve poros, aumentando a área, através de um tratamento térmico a uma temperatura que varia entre 700 - 1000 °C sob fluxo de um gás oxidante apropriado, vapor d'água, CO<sub>2</sub> ou ar atmosférico, usados combinados ou individualmente. O gás oxidante retira seletivamente carbonos da estrutura, formando interstícios na mesma e produzindo poros, sendo que esses carbonos, agora oxidados, abandonam o material na forma de voláteis (BANSAL et al., 1988).

No método de ativação química, há a prévia impregnação do material precursor com um agente ativador, por exemplo, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, ZnCl<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ou hidróxidos, entre outros. Esses ativadores possuem, em comum, a capacidade desidratante, inibindo a formação de betuminosos no interior dos poros. Os ativadores químicos possuem vantagens e desvantagens em relação à ativação física, por exemplo, ter maior rendimento do que a ativação física, baixas temperaturas de pirólise, obtenção de maior área superficial, possibilidade de um controle, manutenção e distribuição de poros. As desvantagens são o desenvolvimento de produtos altamente corrosivos e a necessidade de um passo extra de lavagem do produto final (EL-HENDAWY; SAMRA; GIRGIS, 2001; SYCH et al., 2012; KLIJANIENKO; LORENC-GRABOWSKA; GRYGLEWICZ, 2008).

O método de ativação química permite que o material seja desidratado a uma menor temperatura do que o método de ativação físico. O ácido fosfórico, em particular, é conhecido por promover uma despolimerização,

desidratação e redistribuição dos biopolímeros existentes, durante a decomposição pirolítica da biomassa lignocelulósica (YUSO; RUBIO; IZQUIERDO, 2014).

Após a ativação, seja ela química ou física, espera-se que o material apresente um maior volume de poros em sua superfície, aumentando-se assim a área superficial e estando este mais capacitado para adsorção de substâncias que possuam afinidade pelos constituintes do suporte.

A qualidade do carvão depende da necessidade e aplicação do carvão como adsorvente, sendo que maiores áreas específicas e maiores tamanhos de poros são utilizados para maiores adsorvatos e menores são utilizados para pequenas moléculas de adsorvato.

### 3.3 ISOTERMAS DE ADSORÇÃO

Adsorção é um processo espontâneo que trata da concentração (acumulação) de uma substância na interface de outra, sendo ambas imiscíveis. Ocorre pois os átomos de qualquer superfície não possuem as forças de atração perpendiculares sobre o seu plano balanceadas.

Dependendo da força de adsorção, ou seja, da força de ligação entre as partículas de adsorvato e as moléculas de adsorvente, podemos diferenciar dois tipos de adsorções, a química e a física. A adsorção química envolve o rearranjo dos elétrons gerando uma ligação química, como resultado de uma reação química que esta restrita à área superficial do adsorvente. A adsorção física envolve forças de Van der Waals, como dipolos induzidos, permanentes ou atração quadripolar, sendo reversível e sem presença de ligações químicas (CIOLA, 1981; MCBRIDE, 1994).

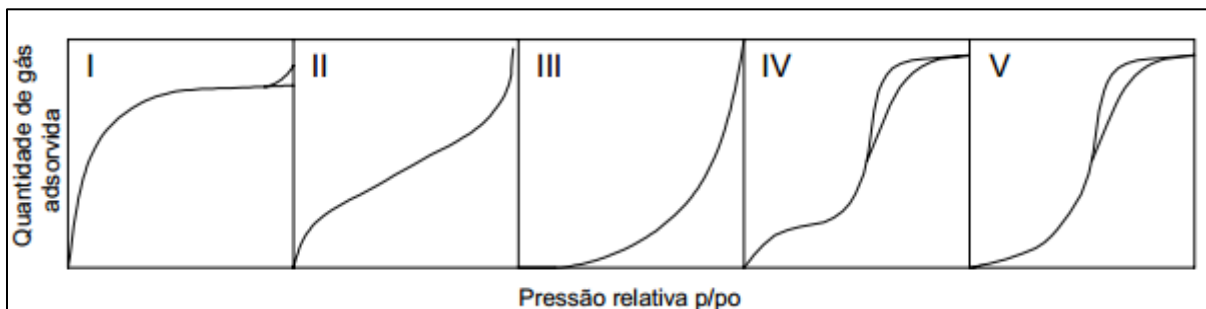
A adsorção é um processo muito utilizado na remoção de corantes, agentes odorizantes e impurezas em soluções (MAHMOODI et al., 2011; AHMAD, PUAD; BELLO, 2014; MUI et al., 2010; SALIMA et al., 2013; DURÁN-JIMÉNEZ et al., 2014; CHEN et al., 2013; MEZOHEGYI et al., 2012), sendo afetada por alguns fatores como a superfície química, o volume e tipo de poros, as propriedades e composição química do adsorvente, a temperatura, pH, velocidade e tempo de agitação (FOUST *et al.*, 1980; CIOLA, 1981)

As isotermas de adsorção podem fornecer dados de equilíbrio de sorção e adsorção de substâncias, o que pode elucidar os tipos de interação e a cinética envolvidas. São dependentes também das variáveis citadas acima (FERNANDES, 2005).

As isotermas de adsorção representam o equilíbrio existente entre a fase sólida e a fase líquida de um sistema adsortivo. Elas são a maneira mais conveniente para se especificar o equilíbrio da adsorção e seu respectivo teórico (CIOLA, 1981). Nada mais são do que informações experimentais utilizadas para se definir dentre muitos qual o melhor adsorvente para sua substância de interesse.

A forma das isotermas pode dizer muito sobre o comportamento do processo, podendo essa ter até 5 classes, que foram propostas por Brunauer, Emmet e Teller (classificação BET), como mostra a Figura 3.

**Figura 3** – Classificação das isotermas segundo IUPAC



**Fonte:** IUPAC, 1982.

Cada tipo de isoterma está relacionado ao tipo de poro envolvido, sendo que:

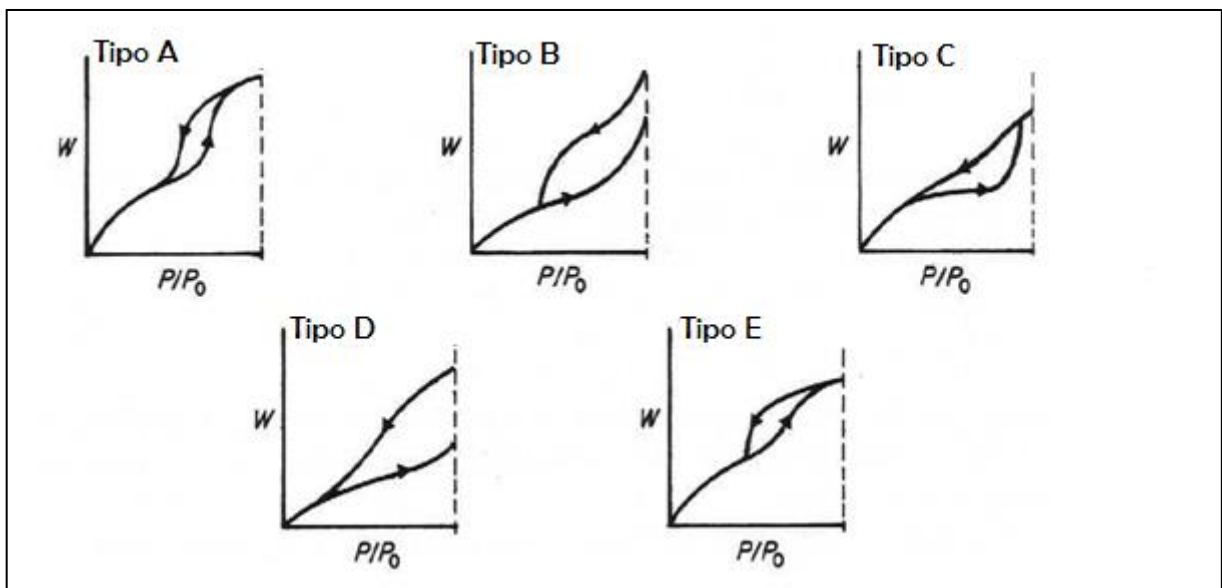
- A isoterma do tipo I está relacionada à adsorção em microporos;
- A do tipo II está relacionada à adsorção em sistemas não porosos;
- Tipo III e V apresentam relação com interações muito fracas em sistemas contendo macro e mesoporos;
- Nas do tipo IV a dessorção não coincide com a adsorção, formando a chamada histerese (também observados no tipo V), consequência da ocorrência condensações capilares (BRUNAUER; EMMET; TELLER, 1938).

As isotermas são também representadas por equações simples que relacionam diretamente a quantidade adsorvida em função da concentração do adsorvato, sendo essas equações modelos teóricos, e como os mais utilizados o de Langmuir, Freundlich e BET.

Assim como as isotermas, as histereses elucidam muitas características da superfície do carvão, como demonstra a Figura 4, dando informações sobre o tipo de mesoporo presente

- Tipo A representa mesoporos de forma cilíndrica;
- Tipo B está ligado a mesoporos tipo fenda;
- Tipo C ou D representam mesoporos de forma cilíndrica ou cônica;
- Tipo E relaciona-se a mesoporos em formato de garrafa.

**Figura 4** – Modelos de histereses



**Fonte:** JUHOLA; WIIG, 1949.

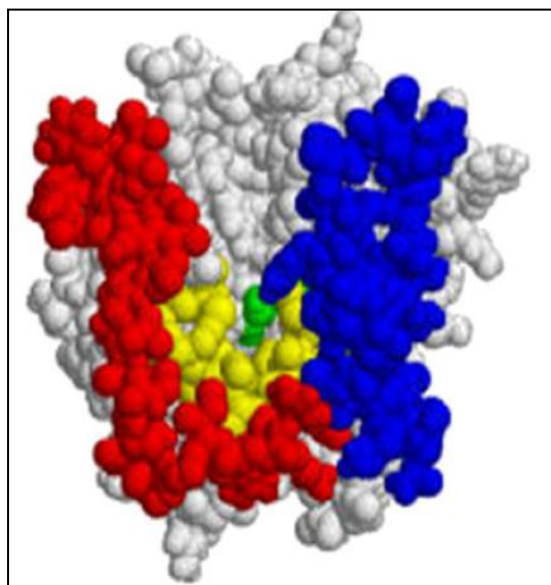
O modelo de Langmuir assume que forma-se uma monocamada sobre o adsorvente, a de Freundlich foi obtida experimentalmente e considera a adsorção em várias camadas sobre superfícies heterogêneas como carvões ativados e a equação de BET tem por objetivo relacionar valores obtidos a partir das isotermas de adsorção com a área específica de um sólido (COUTO, 2009; FERNANDES, 2005; SCHNEIDER, 2008).

Além da utilização de carvão ativado para adsorção de corantes, já citado anteriormente, esse material pode ser utilizado como suporte para catalisadores das mais diversas reações, como a carbonização do polipropileno (GONG *et al.*, 2012), a remediação de água para potabilização, degradando percloratos e bromatos (KIM; LEE; CHOI, 2013; RESTIVO *et al.*, 2015) e para reações orgânicas, como a oxidação de alcenos (MAVROGIORGOU *et al.*, 2014). Outra utilização muito vasta é a de imobilizar enzimas para melhorar seu desempenho e estabilidade nas reações a serem catalisadas, utilizando o carvão para imobilizar lipases para diversos fins (CHANDRA, 2015; KANDASAMY *et al.*, 2010) e de proteases (KUMAR *et al.*, 2009;), por exemplo.

#### 3.4 PRODUÇÃO E USO DE LIPASE

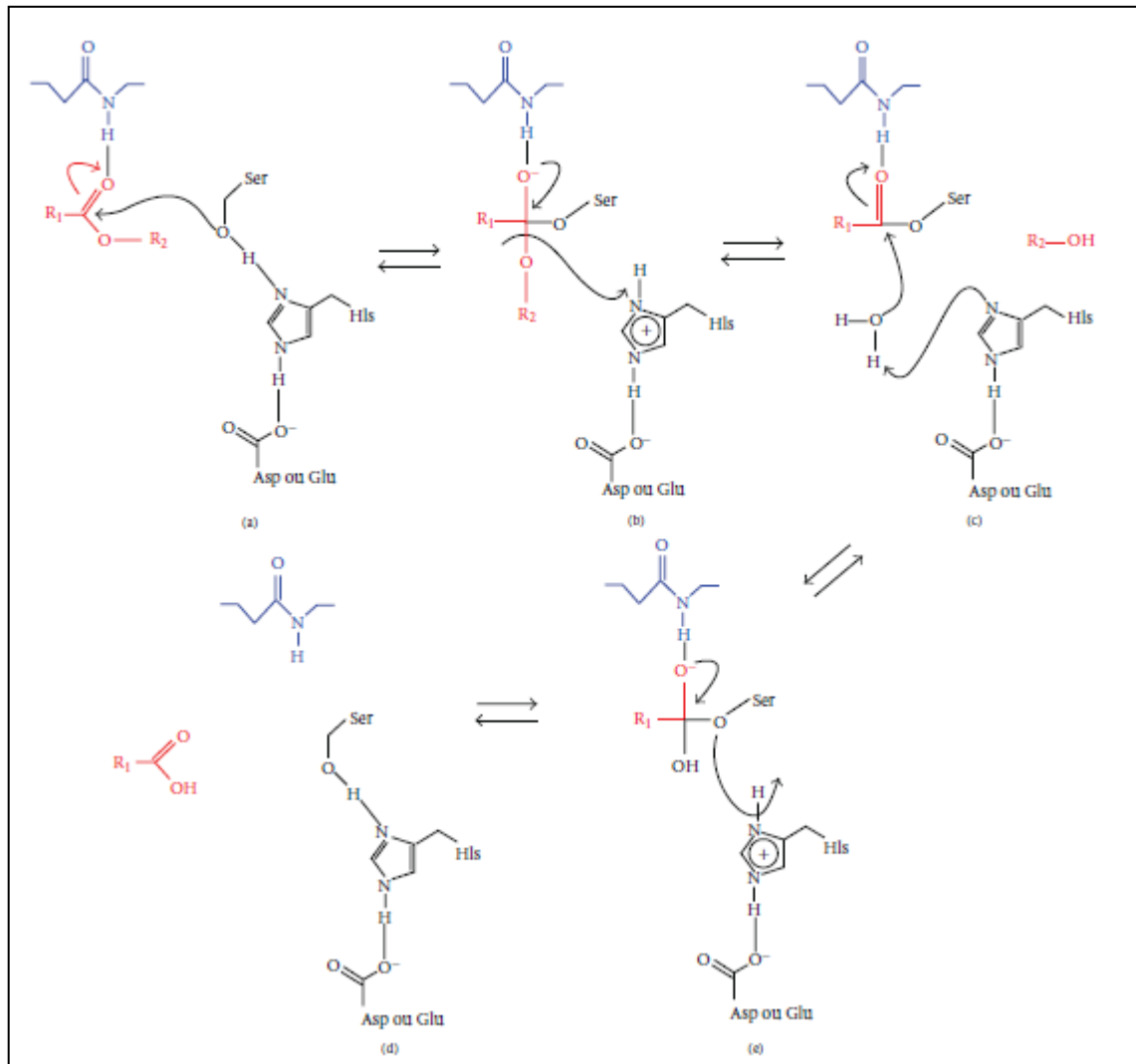
Genericamente, lipase (Figura 5) é o nome dado a um grupo de enzimas participante da classe das hidrolases (E.C.3.1) com atuação sobre ligações éster (E.C.3.1.1). As lipases são definidas como glicerol éster hidrolases (E.C.3.1.1.3) que catalisam a hidrólise (Figura 6) de acilgliceróis de cadeia longa, liberando diglicerídeos, monoglicerídeos, ácidos graxos livres e glicerol na interface óleo-água (JAEGER; REETZ, 1998)

**Figura 5** - Representação esquemática da lipase. As tampas estão representadas em azul e vermelho e o sítio ativo em amarelo



**Fonte:** NAGARAJAN, 2012

**Figura 6 – Mecanismo de hidrólise realizado por lipase**



**Fonte:** RIBEIRO et al., 2011

Microrganismos produtores de lipase têm sido encontrados em habitats muito diversos como resíduos industriais, fábricas de processamento de óleo vegetal, laticínios, solo contaminado com óleo, sementes oleaginosas, alimentos em decomposição, pilhas de compostagem, minas de carvão e fontes termais. Microrganismos produtores de lipases incluem bactérias, fungos, leveduras, e actinomicetos (SHARMA et al., 2001).

As lipases não catalisam somente a hidrólise de triacilglicerídeo, mas também realizam a reação reversa (síntese) a partir de ácidos graxos e glicerol,

formando os triacilgliceróis. Outras reações que catalisam incluem a esterificação, transesterificação, aminólise e lactonização. Devido as suas propriedades peculiares, atuam em uma variedade de segmentos: indústria de alimentos, de detergentes, farmacêutica, agroquímica (inseticidas e pesticidas) e oleoquímica (modificação de óleos e gorduras; síntese de biodiesel) (MAHADIK et al., 2002; JAEGER; EGGERT, 2002; SAXENA et al., 2003; PAQUES; MACEDO, 2006; GHANEM, 2007).

O uso de lipases em reações pseudo-homogêneas apresenta dificuldades técnicas como a contaminação do produto com atividade enzimática residual, e custo econômico. Para superar esse problema, a enzima é normalmente usada na forma imobilizada para que seja reutilizada mais vezes para reduzir o custo, e também aumentar a qualidade do produto.

Enzimas imobilizadas são definidas como “enzimas fisicamente confinadas ou localizadas em uma determinada região definida do espaço com retenção da sua atividade catalítica, e que pode ser utilizado repetidamente e de forma contínua.” (BALCÃO et al., 1996). Em geral, os métodos para a imobilização de enzimas pode ser classificadas em duas categorias, com base na retenção química podendo ser por adsorção, ligação iônica, ligação covalente: enzima-suporte e enzima-enzima (cross-linking) ou física, sendo retenção por encapsulamento e encarceramento (JEGANNATAN et al., 2008).

Como a maioria das enzimas estudadas na forma imobilizada, as lipases são suportadas em diversos materiais, buscando uma forma mais estável dependendo do meio reacional onde o substrato se encontra. Lipases têm sido imobilizadas em materiais como sílicas, organosílicas e zircônia (ŽIVKOVIĆ et al., 2015; ZHOU et al., 2015); em quitosana (ORREGO et al., 2010),  $\text{CaCO}_3$  (FUJIWARA et al., 2014) e Celite® (ANDRADE et al., 2013). Além do mais, alguns trabalhos trazem essas enzimas imobilizadas em carvão ativado para fins de tratamento de óleos residuais (KANDASAMY et al., 2010) e produção de biodiesel (NARANJO et al., 2010).

### 3.2.1 Produção de Lipases por *Botryosphaeria ribis*

Os ascomicetos da família *Botryosphaeriaceae* começaram a ser estudados em 1995, tendo sido isolado por Barbosa e colaboradores (1996) a partir de cancrios de eucalipto. Inicialmente, 9 isolados fúngicos foram estudados, visando a produção de botriosferana, lipases e lacases (BARBOSA et al., 1995; BARBOSA et al., 1996).

Para tanto se utilizaram de oito óleos vegetais como fonte de nutrientes, sendo eles soja, oliva, girassol, milho, canola, babaçu, gergelim e algodão, e também de glicerol como fonte única de carbono. Os resultados indicaram o *B. rhodina* como melhor produtor de lacase e *B. ribis* como melhor produtor de lipases nos meios contendo óleo de milho e soja, sendo o de soja com glicerol os que apresentaram maiores atividades específicas.

Andrade e colaboradores (2013) otimizaram a produção de lipase por *B. ribis*, utilizando-se de torta de soja e de mamona como nutrientes. O estudo apontou a torta de soja (2,4 % m/v) como nutriente que apresentou maiores valores de atividade enzimática da lipase (76,6 U/mL) junto com glicerol grau analítico (4,5 % v/v) (ANDRADE et al., 2013).

Em outro trabalho, Andrade e colaboradores avaliaram a estabilidade de lipase de *B. ribis* em diferentes pH, temperaturas, solventes, cátions metálicos e detergentes. A lipase de *B. ribis* apresentou-se estável na faixa de pH entre 3 e 10, sendo mais estável em pH 8, também manteve atividade residual de até 65 % na faixa de temperatura compreendida entre 30 e 55 °C, sendo a última a temperatura ótima de atividade da mesma. Os surfactantes testados foram Tween 80, Triton X100 e SDS, sendo que todos apresentaram resultados positivos, não havendo decaimento da atividade lipolítica na presença dos mesmos. Os cátions  $Mn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  e  $Ba^{2+}$  ativam a lipase, aumentando sua atividade lipolítica, enquanto  $Cu^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$  e  $Fe^{2+}$  inibem expressivamente a atividade da lipase em concentrações maiores do que 5 mM. A lipase também foi submetida a alguns solventes compatíveis com a água, já que esta é fator importante na reação envolvendo a enzima. Álcool isopropílico concentrado demonstrou menor inibição da atividade enzimática, assim como metanol, sendo a enzima estável nesse álcool até a concentração de 25 % (v/v). Já o etanol apenas mantém a estabilidade da enzima até a concentração de 10 % (v/v) (ANDRADE et al., 2014).

### 3.5 CATÁLISE ENZIMÁTICA PARA A PRODUÇÃO DE BIODIESEL

Apesar da produção de biodiesel por catálise homogênea ser a mais utilizada, pois apresenta uma maior taxa de conversão em um período mais curto de tempo, há algumas desvantagens na utilização da mesma, por exemplo, a alta demanda de energia, a dificuldade de se recuperar o glicerol do meio, a impossibilidade de recuperação do catalisador no meio, a interferência da presença de ácidos graxos livres e água na reação (FUKUDA, 2001; ZENG et al., 2009).

A especificidade das enzimas para as reações torna o processo de transesterificação enzimática melhor manuseável e mais limpo, já que há maior facilidade na recuperação do catalisador e separação do glicerol do meio. Além do mais, a utilização de lipases é mais indicada para processos de transesterificação em óleos com alto nível de ácidos graxos livres e água, como por exemplo, os chamados óleos de reuso (PARAWIRA, 2009; JEGANNATHAN et al., 2008).

As lipases mais utilizadas para a transesterificação são as lipases comerciais de *Mucor miehei* e *Candida antarctica* (DE; BHATTACHARYYA; BANDHU, 1999; SELMI; THOMAS, 1998), porém a utilização de lipases produzidas em laboratório com otimização para esse fim estão ganhando destaque, como lipases de *Candida rugosa*, *Candida antarctica* e *Pseudomonas fluorescens* (LINKO et al., 1998; BREIVIK; HARALDSSON; KRISTINSSON, 1997; MITTELBAACH, 1996).

A reação de transesterificação sofre interferência de alguns fatores que são muito estudados. Fatores como massa da enzima, concentração de água e álcool na reação, uso de solventes, estabilidade térmica e temperatura ótima de transesterificação devem ser investigadas (BAJAJ et al., 2010; GHALY et al., 2010).

Os alcoóis mais utilizados são o metanol e o etanol, tanto pela viabilidade econômica, quanto pela disponibilidade na produção. A concentração do álcool no meio afeta diretamente o rendimento da reação, pois afetam a estabilidade da enzima, podendo haver desativação das enzimas no meio. Daí a necessidade de se adicionar os alcoóis em quantidades fracionadas sob agitação (AL-ZUHAIR, 2007).

A temperatura ótima de reação para as enzimas gira em torno de 30 a 55 °C e depende da razão molar óleo:álcool adicionadas ao meio reacional (ANTCZAK et al., 2009; FJERBAEK et al., 2009). A presença de água é muito importante, pois aumenta a eficiência catalítica da enzima no meio reacional,

devendo ser adicionadas pequenas quantidades, otimizadas em um nível mínimo, de água (GHALY et al., 2010).

A utilização de enzimas imobilizadas, como citado anteriormente, torna o processo mais eficiente, menos enérgico e de fácil recuperação e reutilização do catalisador. Muitos são os suportes utilizados na aplicação da lipase na produção de biodiesel, como sílica e álcool polivinílico e resina macroporosa (SILVA et al., 2011), terra diatomácea Celite® (ANDRADE et al., 2013), carvão ativado (NARANJO et al., 2010; RAMANI et al., 2010), entre outros.

A utilização de substratos de baixo custo e suportes de origem residual pode viabilizar a utilização de enzimas na produção de biodiesel, já que podem contrabalancear a questão econômica do tempo excessivo de reação necessário para haver uma taxa de conversão satisfatória industrialmente falando. Essas questões econômicas e energéticas são o gargalo da produção de biodiesel por catálise enzimática na indústria.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 MATERIAIS

O biocarvão pirolítico foi obtido na Planta de Pirólise Rápida (PPR – 10) e fornecido pela empresa BLOWARE Tecnologia sediada em Campinas, SP a partir de resíduos agroindustriais: palha de cana-de-açúcar e das serragens de madeira de eucalipto e peroba.

### 4.2 MÉTODOS

#### 4.2.1 Caracterização Físico-Química do Biocarvão

Para a caracterização físico-química do tamanho das partículas utilizou-se da metodologia padrão da Associação Brasileira de Normas Técnicas NBR 7402/1982. Já para as análises imediatas, compostas pela umidade, material volátil, cinzas e carbono fixo, utilizou-se a norma ABNT NBR 8112/1986, estando os processos descritos abaixo.

##### 4.2.1.1 Tamanho de partícula

Dez gramas de carvão foram condicionados sobre o conjunto de 6 peneiras que estavam dispostas da maior para a menor espessura de malha. A agitação do conjunto de malhas foi feita manualmente durante o tempo necessário para que o carvão atingisse a peneira com menor espessura de malha.

##### 4.2.1.2 Umidade

Foi pesado 1 grama de biocarvão em cadinho de porcelana, o qual permaneceu na estufa numa temperatura entre  $100\pm 10^{\circ}\text{C}$  durante uma hora e meia. Retirado da estufa, o biocarvão foi resfriado em dessecador até a temperatura

ambiente. Após a secagem foi registrada novamente a massa do biocarvão e a umidade relativa foi expressa em porcentagem.

#### 4.2.1.3 Material volátil

A determinação foi realizada pelo aquecimento do biocarvão em forno mufla a 900°C por 7 minutos. Terminado o aquecimento, o material foi retirado da mufla e colocado num dessecador por 20 min. Após resfriado, a massa foi medida e a matéria volátil foi calculada pela diferença entre as massas antes e depois do aquecimento.

#### 4.2.1.4 Teor de cinzas

A porcentagem de cinzas foi determinada a partir do carvão previamente calcinado pelo método dos voláteis. O teor de cinzas foi determinado pela combustão do resíduo a 700°C por 6 horas na mufla. Terminada a incineração, o material foi retirado da mufla e colocado em dessecador por 20 min. Após resfriado, a massa foi medida e o teor de cinzas calculado pela diferença entre a massa anterior e posterior à incineração.

#### 4.2.1.5 Carbono fixo

A determinação do carbono fixo foi realizada pela diferença entre as porcentagens de umidade, matéria volátil e de cinzas. A diferença entre 100 e a soma dessas três porcentagens forneceu a porcentagem de carbono fixo.

#### 4.2.2 Obtenção e Caracterização da Lipase

A lipase produzida pelo ascomiceto *Botryosphaeria ribis* EC-01 foi obtida de acordo com Messias e colaboradores (2011) pelo processo de fermentação submersa, otimizado por Andrade e colaboradores em 2013. O processo consiste em cultivar o ascomiceto em meio VGA por 5 dias a 28 °C e então, adicionar pequenas esferas do conjunto fungo e meio em 25 mL de água destilada, torta de soja e glicerol por 5 dias a 180 rpm e 28 °C. Ao término do período de agitação centrifuga-se o meio reacional para separação do sobrenadante e corpo de fundo. A atividade da lipase é então medida pelo método espectrofotométrico descrito no item 4.2.2.2.

##### 4.2.2.1 Determinação do teor de proteínas

O método de Bradford (1976) foi utilizado para a determinação de proteínas totais utilizando o corante de *Cromassie brilliant blue* BG-250.

A amostra consistiu de 100 µL do extrato aquoso de lipase diluído ou não, em 1 mL de reagente de Bradford e deixado em repouso à temperatura ambiente durante 5 minutos; as leituras foram realizadas a 595 nm espectrofotômetro Shimadzu, modelo UV-1240. A concentração de proteínas é calculada a partir de uma curva de calibração com o padrão soro-albumina bovina (BSA), na faixa de 25 a 250 µg/mL.

##### 4.2.2.2 Determinação de atividade enzimática

Uma das maneiras de se verificar a atividade enzimática é a efetividade com que a enzima hidrolisa um substrato e o converte em um produto facilmente detectável por técnicas instrumentais. A verificação da atividade da lipase pode ser avaliada pela hidrólise de ésteres, sendo o palmitato de *p*-nitrofenila (*p*NPP) o mais utilizado, já que após hidrólise adquire cor amarela, podendo, por isso ser quantificado por técnica espectrofotométrica. No experimento em questão, a

análise foi realizada em pH 8, 55 °C em 2 min, seguindo procedimento otimizado por Messias (2008).

As soluções utilizadas foram classificadas como Solução A e Solução B, sendo elas:

- Solução A: palmitato de *p*-nitrofenila em isopropanol, em uma concentração de 3,0 mg/mL.
- Solução B: 2 g de Triton X-100 dissolvidos em 450 mL de tampão Fosfato 0,05 mol/L, pH 8,0.

Em um Béquer, sob agitação contínua, 1 mL da solução A e 10 mL da solução B a temperatura ótima da enzima, ou seja, 55 °C. Logo após, 0,9 mL da mistura foi adicionada em tubo de ensaio junto com 0,1 mL do extrato enzimático. Decorrido o tempo da reação (2 minutos), a leitura da atividade foi efetuada a 410 nm. Para a enzima imobilizada foi utilizado 1 mg seguido de incubação a 55 °C em agitação.

Para o cálculo da atividade enzimática livre e imobilizada nos suportes utilizou-se a mesma equação, dada por:

$$U/mL \text{ ou } U/g = \left[ \frac{Abs}{\varepsilon} \times \frac{1}{V_e \text{ ou } m_e} \times \frac{1}{t_r} \times DF \times 1000 \right] \quad (1)$$

onde:

U/mL = unidade de atividade enzimática da solução;

U/g = unidade de atividade enzimática da enzima imobilizada por grama de suporte;

Abs = absorvância a  $\lambda$  (nm);

$\varepsilon$  = coeficiente de extinção molar ( $M^{-1} \cdot cm^{-1}$ ) =  $1,5 \times 10^4 L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$

$V_e$  = volume de enzima utilizado no ensaio (mL);

$m_e$  = massa da enzima utilizada no ensaio (g)

$t_r$  = tempo de reação (minutos);

DF = fator de diluição e

1000 = fator de conversão de M para  $\mu mol/mL$ .

Uma unidade de atividade de lipase (1 U) é definida como 1  $\mu mol$  de *p*NP (*p*-nitrofenol), liberado por minuto por mL da solução da enzima, para o método de hidrólise *p*NPP. Por este método foi quantificado a enzima livre (U/mL) como também a imobilizada (U/g<sub>suporte</sub>) (WINKLER E STUCKMANN, 1979).

### 4.2.3 Ativação Química dos Biocarvões Pirolíticos

A ativação química foi realizada através da impregnação de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  na proporção de 1:2 (m/v) seguindo metodologia de Hadoun e colaboradores (2013) com modificações. O biocarvão foi impregnado com o ativador e a mistura colocada em estufa ( $105\text{ }^\circ\text{C} \pm 5\text{ }^\circ\text{C}$ ), até secagem do material. Este material então foi colocado em forno mufla a  $200\text{ }^\circ\text{C}$  por 30 min a uma taxa de  $10\text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  e então se aumentou a temperatura para  $550\text{ }^\circ\text{C}$  na mesma taxa de aquecimento por 1 h para ativação em atmosfera inerte ( $\text{N}_2$  com fluxo de  $100\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ). O material ativado foi, então, lavado com água destilada quente e fria alternadamente para retirada do excesso de ácido, até pH neutro e seco em estufa durante a noite a  $105\text{ }^\circ\text{C} (\pm 5\text{ }^\circ\text{C})$  e então armazenado sob vácuo.

### 4.2.4 Análise Espectroscópica dos Biocarvões

#### 4.2.4.1 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho

Os carvões pirolíticos, antes e após ativação, foram analisados por espectroscopia de absorção na região do infravermelho em equipamento da marca Shimadzu, modelo IR Prestige - 21, na faixa espectral de  $4000$  a  $400\text{ cm}^{-1}$ , resolução de  $2\text{ cm}^{-1}$  e 80 scans. As amostras de carvão foram preparadas no formato de pastilhas em mistura com KBr (1:100).

#### 4.2.4.2 Ressonância paramagnética eletrônica

A análise de RPE foi realizada em um espectrômetro JEOL, modelo JES-PE-3X, operando em banda X (9,5 GHz) à temperatura ambiente com varredura de 0 a 3500 e modulação de 20 Gauss. Utilizou-se como marcador de campo magnético óxido de magnésio dopado com cromo (III) ( $\text{MgO}:\text{Cr}^{3+}$ ) que possui Fator g de 1,9797 e contagem do número de spins de  $5,5 \times 10^{14}$  spins, como apresentaram Di Mauro, Guedes e Piccinato (2007).

## 4.2.5 Análise Morfológica da Superfície dos Biocarvões

### 4.2.5.1 Microscopia eletrônica de varredura

A MEV foi utilizada para caracterização estrutural dos carvões. As micrografias foram obtidas através de um microscópio eletrônico de varredura FEI Quanta 200 da Oxford Instruments. Para obtenção das imagens a amostra foi recoberta com um filme fino de ouro (Bal-Tec SCD 050 Sputter Caster) com aumento de 1600 vezes. Sendo realizadas no Laboratório Multiusuário da Universidade Estadual de Londrina.

### 4.2.5.2 Área específica e volume de poros

A área superficial e a distribuição de tamanho dos poros dos carvões foram obtidas por meio das isotermas de adsorção e dessorção de N<sub>2</sub> a 77 K (-196,15 °C) com pressões relativas de 0,01 a 0,2, em equipamento de adsorção de N<sub>2</sub> da marca Quantachrome Instruments, modelo NOVA 2000. As amostras foram previamente tratadas a 150 °C, por 6 horas. A área superficial específica foi calculada pelo método BET (BRUNAUER, EMMET; TELLER, 1938) e a distribuição de volume de poros foi calculada pelo método BJH (HADOUN et al., 2013). Essas análises foram realizadas no Laboratório de Catálise e Produção de Biocombustíveis da Universidade Federal do Paraná no Campus de Palotina.

Para obtenção das isotermas de adsorção e dessorção de N<sub>2</sub> segundo BET (Brunauer, Emmet e Teller), utilizou-se da equação apresentada por Greg; Sing, 1982:

$$Q_e = \frac{q_m \cdot b \cdot C_e}{(C_s - C_e) \cdot [1 + (b-1)C_e/C_s]} \quad (2)$$

Onde:

$Q_e$  = quantidade adsorvida para uma dada concentração de adsorvato ( $\text{mg.g}^{-1}$ );

$q_m$  = quantidade máxima adsorvida para uma dada concentração de adsorvato ( $\text{mg.g}^{-1}$ );

$b$  = constante relacionada à saturação em todas as camadas ;

$C_e$  = concentração de equilíbrio ( $\text{mg.L}^{-1}$ );

$C_s$  = concentração do soluto na saturação de todas as camadas ( $\text{mg.L}^{-1}$ ).

#### 4.2.6 Número de Iodo

As medidas de adsorção de iodo nos poros dos biocarvões seguiu a metodologia ABNT NBR 12073/1991. Trata-se da titulação de iodo contido no sobrenadante residual da adsorção de uma solução de iodo (100 mL a 0,1 N) em 10 g de carvão após tratamento utilizando HCl (20 % v/v) e 30 s de agitação.

#### 4.2.7 Imobilização de Lipase no Biocarvão

A utilização de ferramentas estatísticas na imobilização de enzimas elucida variáveis que interferem ou não no sucesso do procedimento e da matriz utilizada, para tanto, a metodologia de superfície de resposta é vantajoso por ser de fácil acesso e em nível de confiança aceitável.

A imobilização de lipase em carvão foi realizada por planejamentos estatísticos, do tipo fatorial  $2^k$ , com  $k$  fatores ou variáveis, todos com dois níveis. As análises de variância (ANOVA) e de regressão múltipla foram realizadas ao nível de 5 % de significância utilizando o programa STATISTICA Version 10.0<sup>®</sup>.

*Tratamento I:* um planejamento fatorial  $2^3$  (11 experimentos) foi desenvolvido avaliando-se a temperatura ( $X_1$ ), tempo ( $X_2$ ) e concentração de enzima ( $X_3$ ), de acordo com a Tabela 4, que indica os níveis inferiores (-1), centrais (0), superiores (+1). Neste tratamento a imobilização de lipase foi avaliada nos três carvões.

**Tabela 4** - Níveis de variação para os fatores do planejamento fatorial  $2^3$  com triplicata no ponto central para avaliação da imobilização de lipase nos biocarvões ativados.

Fatores	Níveis reais e codificados*		
	-1	0	+1
$X_1$ (temperatura, °C)	5	20	35
$X_2$ (tempo, min)	30	135	240
$X_3$ (enzima, % v/v)	20	60	100

*Tratamento II:* um planejamento composto central rotacional  $2^2$  ( $\pm\alpha$ , com  $\alpha = (2^k)^{1/4}$ ) totalizando 11 experimentos, baseado nos resultados obtidos com o Tratamento I foi desenvolvido, avaliando-se a concentração de enzima ( $X_1$ ) e temperatura ( $X_2$ ), de acordo com a Tabela 5, que indica os níveis inferiores (-1), centrais (0), superiores (+1) e também os axiais ( $\pm 1,41$ ). O tempo foi fixado em 120 min. Neste tratamento a lipase foi imobilizada nos carvões de eucalipto e peroba.

**Tabela 5** – Níveis de variação para os fatores do planejamento fatorial  $2^2$  adicionado de pontos axiais para avaliação da imobilização de lipase nos carvões ativados de eucalipto e peroba

Fatores	Níveis reais e codificados				
	-1,41	-1	0	1	1,41
$X_1$ (enzima, %v/v)	50	57	75	93	100
$X_2$ (temperatura, °C)	20	24	35	46	50

Em todos os tratamentos a imobilização foi desenvolvida pelo contato de 0,125 g do carvão, 5 mL de solução enzimática (20 a 100 %, de acordo com o planejamento fatorial, em tampão fosfato 0,05 M e pH 8,0). A mistura foi mantida em agitador orbital (200 rpm) a temperaturas estudadas pelo planejamento (5 a 50 °C). No tratamento I o tempo de contato foi avaliado (30 a 240 min), já no segundo planejamento foi fixado em 2 horas. Os frascos de erlenmeyers foram então retirados, o conteúdo filtrado a vácuo para recuperação do sobrenadante e do complexo imobilizado. O complexo imobilizado foi lavado com tampão fosfato 0,2 M pH 8 e *n*-hexano e seco à vácuo por aproximadamente 30 min.

A atividade enzimática foi determinada no derivado, no sobrenadante e na solução inicial de enzima, utilizando a mesma técnica para enzima livre, descrita anteriormente (Item 4.2.2.2 - Equação 1).

O teor de proteínas foi determinado na solução inicial e no sobrenadante, utilizando da metodologia de determinação do teor de proteínas de Bradford, 1976, descrita no item 4.2.2.1 e calculada a partir da equação:

$$\text{Proteína ligada} = \text{Prot. oferecida} - \text{Prot. sobrenadante} \quad (\text{após imobilização}) \quad (3)$$

Em relação à atividade específica que quantifica a lipase imobilizada em relação à quantidade de proteína ligada ao suporte (*U/mg – proteína*), a seguinte equação foi utilizada:

$$\textit{Atividade específica (U/mg – proteína)} = \frac{\textit{Atividade da enzima imobilizada}}{\textit{quantidade de proteína ligada}} \quad (4)$$

A atividade específica relativa que compara a atividade obtida com a imobilização e a atividade inicialmente oferecida, ou seja, da solução de enzima, a seguinte equação foi utilizada:

$$\textit{Atividade específica relativa} = \left( \frac{\textit{Atividade específica da enzima imobilizada}}{\textit{Atividade específica enzima livre}} \right) \times 100 \quad (5)$$

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 CARACTERÍSTICAS E PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DOS BIOCARVÕES PIROLÍTICOS

Os biocarvões de serragem de madeira e de palha de cana-de-açúcar foram analisados quanto ao tamanho das partículas. Comercialmente os carvões podem ser encontrados na forma granular ou pulverizada, considera-se pulverizado carvões menores que a malha de 180  $\mu\text{m}$ , e granulares, os maiores que essa malha (MUCCIACITO, 2006; NICOLINI; CASAGRANDE; JESUS, 2013).

A Tabela 6 mostra a distribuição percentual das partículas em relação ao tamanho dos biocarvões. Os biocarvões de madeira são semelhantes em relação ao tamanho de partícula, sendo maior o percentual de partículas de 180 a 355  $\mu\text{m}$ , se encaixando na classe dos carvões granulares. Já o carvão de palha de cana-de-açúcar possui distribuição mais homogênea, sendo mais abundantes na faixa de 355 a 90  $\mu\text{m}$ , caracterizando um carvão misto, explicado pela natureza menos rígida da palha de cana-de-açúcar quando comparada às madeiras em relação ao teor de lignina (KORNDÖRFER et al., 1998).

Empresas disponibilizam carvões desde 1700  $\mu\text{m}$  até 7,5  $\mu\text{m}$ , dependendo da necessidade da aplicação. Quanto maior o tamanho e a quantidade do adsorvato, mais interessante que se use um carvão com maior granulometria e área específica (SCHIMMEL, 2008, ZAMBRANA, 2013).

**Tabela 6** – Percentuais de tamanho de partículas dos biocarvões pirolíticos de resíduos agroindustriais

Intervalo de Tamanho	Serragem de eucalipto (%)	Serragem de peroba (%)	Palha de cana-de-açúcar (%)
>710 $\mu\text{m}$	0,2	5,2	0,9
710 – 500 $\mu\text{m}$	3,4	3,8	8,0
500 – 355 $\mu\text{m}$	5,9	1,9	13,6
355 – 180 $\mu\text{m}$	59,8	51,0	27,8
180 – 90 $\mu\text{m}$	25,6	28,4	23,3
< 90 $\mu\text{m}$	4,9	9,5	26,1

**Fonte:** Próprio Autor.

Os resultados das análises físico-químicas são mostrados na Tabela 7. Em relação ao material volátil foi possível observar que os carvões provenientes de madeira possuem um maior teor de voláteis, sendo 38,1 % para eucalipto e 32,4 % para peroba. Este valor alto de voláteis pode ser explicado pela degradação da lignina que ocorre em uma ampla faixa, deixando compostos ligados ao carvão por interações fracas, como interações de Van der Waals, e que sob um novo aquecimento são liberadas, fato esse que justifica a menor quantidade de voláteis presentes no biocarvão de cana-de-açúcar, que possui menor quantidade de lignina (BALCI; DOGU; YUCEL, 1993; BOURGOIS et al., 1989).

Quanto ao teor de carbono fixo, que fornece maiores informações acerca do rendimento de carvão ativado obtido, observou-se maior percentual para os biocarvões de madeira, 46 % para eucalipto e 51 % para peroba, resultados esses comparativos ao carvão comercial granular utilizado por Zambrana (2013), que apresentou 59,9 %. O menor valor de carbono fixo no carvão de palha de cana-de-açúcar (39 %) indica que esse material terá menor rendimento de matriz carbonácea em relação aos demais materiais analisados. No entanto esse resultado não o descaracteriza para o processo de ativação, uma vez que algumas matérias-primas citadas na literatura apresentaram menores valores de carbono fixo, mas, mostraram-se ótimos adsorventes.

O carvão de caule de tamareiras apresentado por Hadoun et al., 2013 apresentou 24 % de carbono fixo e mostrou uma grande área específica após ativação (1455 m<sup>2</sup>/g). Açıkyıldız, Gürses e Karaca (2014) produziram carvões de diferentes biomassas residuais (serragem de pinus, semente de rosas e sementes de corniso) com valores de carbono fixo das matérias-primas variando entre 21 e 27 %).

**Tabela 7** - Composição percentual dos biocarvões pirolíticos e carvão comercial

Análise Imediata	Serragem de Eucalipto	Serragem de Peroba	Palha de cana-de-açúcar	Carvão comercial <sup>1</sup>
Umidade (%)	6,30 ± 0,10	8,98 ± 0,01	5,27 ± 0,15	1,5 ± 0,3
Material Volátil (%)	38,1 ± 2,65	32,4 ± 0,10	28,3 ± 0,93	11,6
Carbono fixo (%)	51,5 ± 0,95	46,0 ± 1,00	38,9 ± 1,36	59,9
Cinzas (%)	7,40 ± 1,40	12,6 ± 0,90	27,3 ± 2,25	27 ± 4

<sup>1</sup>Carvão Crossfilter Filtrasorb 100 (ZAMBRANA,2013).

**Fonte:** Próprio Autor.

Quanto às cinzas, há um destaque para carvão de palha de cana-de-açúcar, que possui alto teor de cinzas, isso se deve ao alto teor de silício nas folhas, que segundo Korndörfer e colaboradores (1998) pode variar entre 0,14 % nas folhas jovens e 6,7 % nas folhas mais velhas. O alto número de teor de cinzas acarreta uma diminuição do número de carbono fixo, já que se trata de metais absorvidos pelos vegetais em questão, ocupando sítios que poderiam ser matéria orgânica, e que dariam lugar à matriz carbonácea. Os carvões de madeira (peroba e eucalipto) mostraram valores menores do que os encontrados em carvão comercial, demonstrando alto potencial para formação de poros.

Os valores de carbono fixo obtidos para estes materiais são suficientes para produção de carvão ativado, visto que quanto maior a quantidade de carbono fixo no material, maior será sua área disponível para adsorção e formação de poros. Badosz (2006) salienta que o material precursor para a preparação de carvão ativado deve conter alto teor de carbono (acima de 50%) e baixo teor de cinzas. O carvão de palha de cana-de-açúcar possui alto valor de cinzas, mas também, equivalente teor de carbono fixo, sendo viável para ser testado como adsorvente (OLIVEIRA et al., 2010).

Os resultados das análises físico-químicas mostraram que os materiais residuais em estudo podem ser aproveitados como biocarvões pois apresentam características semelhantes aos carvões comerciais (ZAMBRANA,2013; MUCCIACITO, 2006).

## 5.2 BIOCARVÕES ATIVADOS

Após a impregnação com ácido fosfórico ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) e submissão a altas temperaturas ( $550\text{ }^\circ\text{C}$ ), é esperado que houvesse desidratação do biocarvão, dando origem a funções orgânicas oxigenadas, além das que já estavam presentes, na superfície do carvão e desobstruindo alguns poros antes obstruídos por cinzas.

Pode-se então comparar os carvões antes e após a ativação quanto às mudanças em sua estrutura através de análises espectroscópicas, e das análises de superfície e capacidade adsortiva.

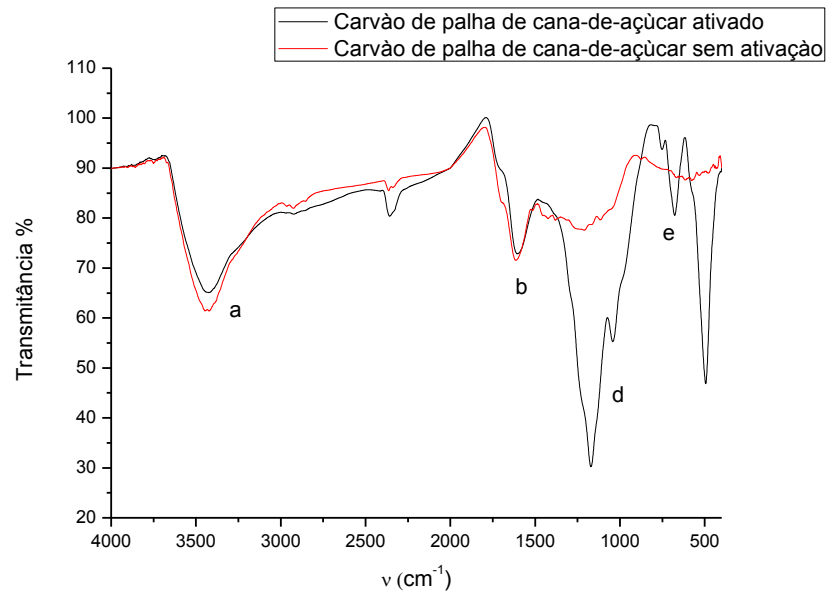
### 5.2.1 Análise Espectroscópica para Identificação de Grupos Funcionais e Espécies Químicas Paramagnéticas

#### 5.2.1.1 Espectroscopia de infravermelho – FT-IR

As análises de absorção na região do infravermelho (Figuras 7, 8 e 9 a e b) mostraram bandas características de material derivado da celulose, hemicelulose e lignina, como lactonas, éteres cíclicos, cetonas cíclicas, entre outros. Bandas entre  $3700 - 3100\text{ cm}^{-1}$ , representadas pela letra “a” nas Figuras 4, 5 e 6, são de estiramento O—H, demonstrando tanto a presença de alcoóis quanto de água adsorvida do ambiente. As bandas entre  $1620 - 1600\text{ cm}^{-1}$  (letra “b”) que são características de estiramento de anéis aromáticos condensados ou simples (SILVERSTEIN; WEBSTER, 2000).

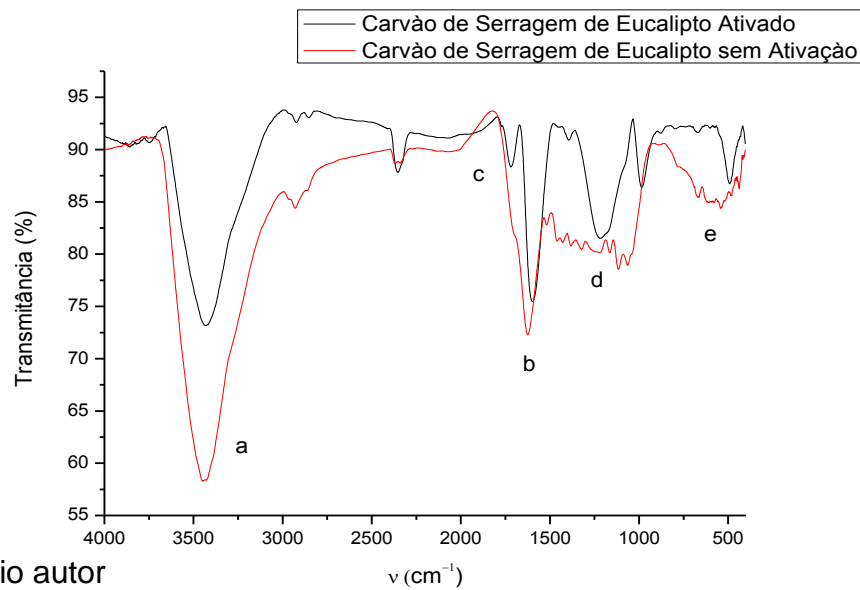
As bandas entre  $1710 - 1695\text{ cm}^{-1}$  (letra “c”) são características de estiramento  $\text{C} = \text{O}$ , podendo estar em menores comprimentos de onda devido à origem da carbonila, que dependendo da função a que está, apresenta menor frequência.

**Figura 7** – Espectro de absorção na região do infravermelho do biocarvão pirolítico de palha de cana-de-açúcar sem ativação e após ativação



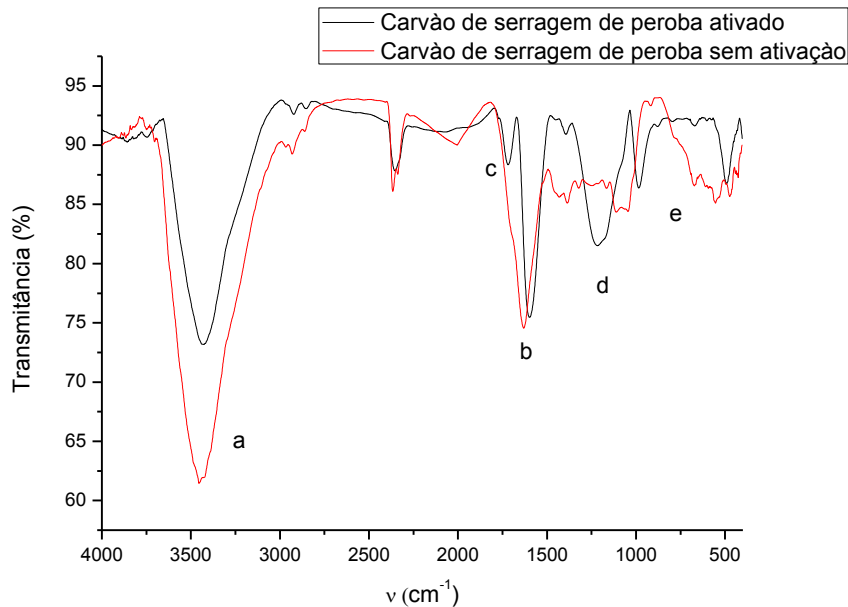
Fonte: Próprio autor

**Figura 8** - Espectro de absorção na região do infravermelho do biocarvão pirolítico de serragem de madeira de eucalipto sem ativação e após ativação



Fonte: Próprio autor

**Figura 9** - Espectro de absorção na região do infravermelho do biocarvão pirolítico de serragem de madeira de peroba sem ativação e após ativação



**Fonte:** Próprio autor

As bandas em  $1270 - 1220 \text{ cm}^{-1}$  (letra “d”) indicam a presença de estiramento  $\text{P} = \text{O}$ ,  $\text{P} - \text{O} - \text{C}$  (aromático) e ainda  $\text{P} = \text{OOH}$ . Bandas de baixa intensidade entre  $1090$  a  $1070 \text{ cm}^{-1}$  mostram também a presença de cargas como a espécie  $\text{P}^+ - \text{O}^-$ , equivalente à presença de resíduos de ácido fosfórico pós-lavagem (SYCH et al., 2012; LIOU, 2010; PATNUKAO; PAVASANT, 2008).

A região representada pela letra “e”, que aparece entre  $1300 - 900 \text{ cm}^{-1}$  indicam a presença de estiramento  $\text{C}-\text{O}$  para as principais funções orgânicas oxigenadas (ZHANG et al., 2014; SINGHA et al., 2013).

A espectroscopia de infravermelho para carvões comerciais, ou seja, provenientes de ativação física, é muito difícil, já que há poucas funções oxigenadas na superfície, obtendo apenas bandas de estiramento  $\text{H} - \text{C}$  em aproximadamente  $2912 \text{ cm}^{-1}$  e  $\text{O} - \text{H}$  com bandas de estiramento em  $1492 \text{ cm}^{-1}$  (SOMDUTTA; SARKAR; LUHARUKA, 2013).

A análise de espectroscopia de infravermelho mostrou então que grupos oxigenados de quinonas, lactonas, éteres cíclicos, cetonas cíclicas, aldeídos, entre outros, permanecem na superfície do carvão, corroborando com o modelo desenvolvido por Rodríguez-Reinoso (1997) que destaca a presença de grupos

oxigenados na superfície do carvão. Esses compostos oxigenados são responsáveis por diversas interações que ocorrem entre adsorvato e adsorvente, facilitando a adsorção de um amplo espectro de substâncias contaminantes para remediação, como também na imobilização de enzimas para realização de reações (REINOSO E SÁBIO, 1998).

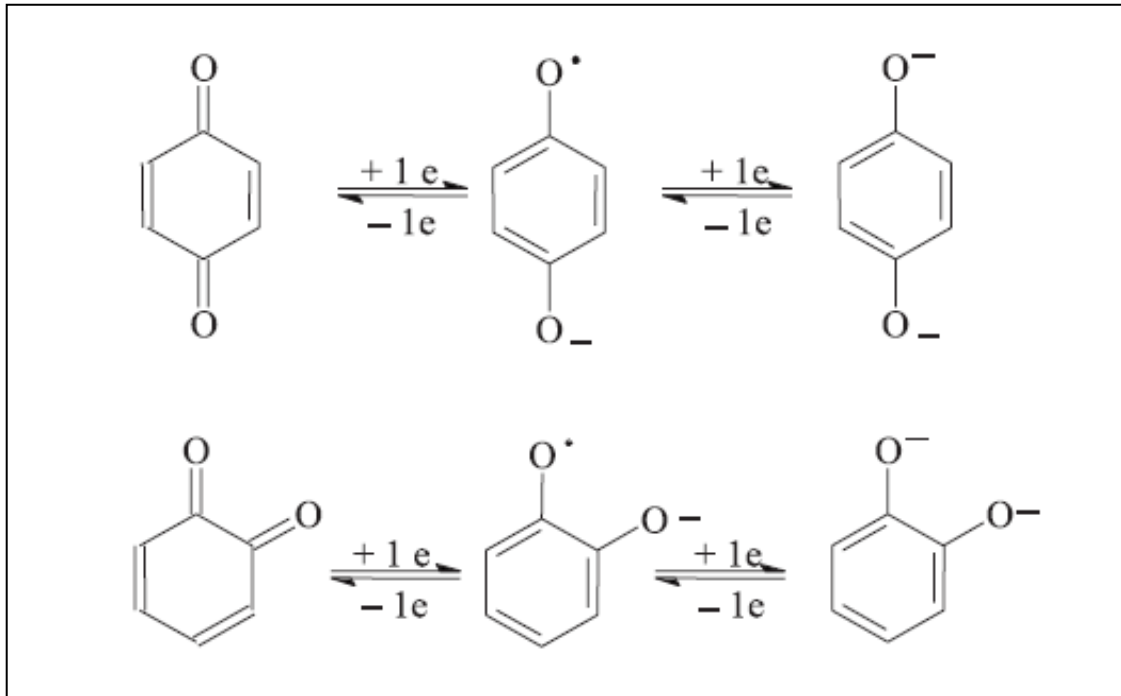
#### 5.2.1.2 Ressonância paramagnética eletrônica

A análise de Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE) foi utilizada para identificação e avaliação da presença de espécies que possam vir a prejudicar a adsorção ou imobilização enzimática no carvão. Os espectros das amostras analisadas encontram-se no ANEXO A. Como demonstra Andrade et al. (2014) espécies como  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{+2}$  e  $\text{Hg}^{+2}$  podem inibir parcialmente a atividade enzimática da lipase de *Botryosphaeria ribis*. Os carvões possuem em comum uma banda característica de radicais livres ( $\sim 2,0033$ ). A partir do sinal, pode-se então calcular o fator g, que se trata do fator de desdobramento espectroscópico do elétron. Esse fator é calculado a partir dos parâmetros utilizados na medição do sinal de RPE. Os valores de fator g são encontrados na Tabela 8, sabendo que esses valores de  $2,0032 \pm 0,0002$  são característicos de radicais livres orgânicos aromáticos de funções *orto* – e/ou *para*-semiquinonas e semelhantes (Figura 10) (BUDZIAK; MAIA; MANGRICH, 2004).

As funções orgânicas presentes na superfície do carvão permitem observar a presença de quinonas e fenóis, o que explica a presença dessa classe de radicais livres orgânicos, como indica o mecanismo de formação de radicais na Figura 10. Esses sinais de radicais são provenientes das cadeias carbônicas que permaneceram no carvão após a ativação.

Os resultados espectroscópicos de RPE mostraram que houve um aumento no número de spins (Tabela 8), indicando a incidência das espécies paramagnéticas. Pode-se observar que houve maior liberação dos radicais após ativação. O carvão de peroba demonstrou um aumento no número de spins, partindo de 3,9 para  $12,2 \times 10^{18}$  spins.g<sup>-1</sup>. A única exceção é o carvão de eucalipto que demonstrou uma leve diminuição nos spins apresentados após a ativação, decaindo de 9,6 para  $8,7 \times 10^{18}$  spins.g<sup>-1</sup>.

**Figura 10** - Exemplos de semiquinonas a partir de orto- e/ou para- difenóis ou quinonas



**Fonte:** Budziak; Maia; Mangrich (2004).

**Tabela 8** - Parâmetros de RPE para os sinais de radicais orgânicos nos carvões de pirólise antes e após ativação

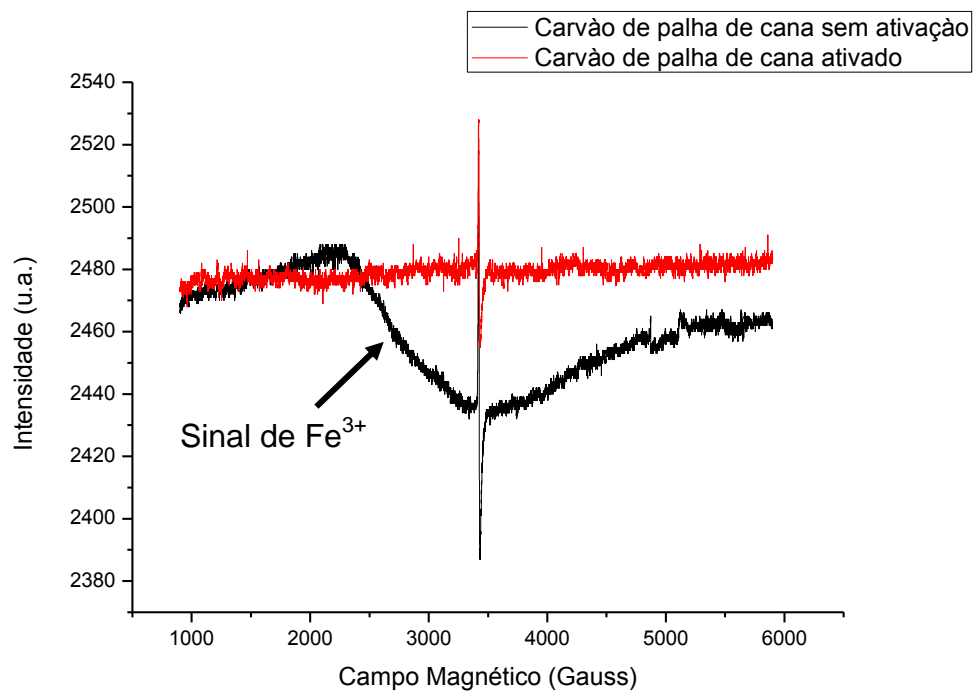
Amostra	Fator g	Spin.g <sup>-1</sup> [x10 <sup>18</sup> ]
Carvão de palha de cana-de-açúcar sem ativação	2,0031±0,0001	2,4
Carvão de serragem de eucalipto sem ativação	2,0034±0,0001	9,6
Carvão de serragem de peroba sem ativação	2,0030±0,0001	3,9
Carvão de palha de cana-de-açúcar ativado	2,0031±0,0001	2,8
Carvão de serragem de eucalipto ativado	2,0032±0,0001	8,7
Carvão de serragem de peroba ativado	2,0034±0,0001	12,2

**Fonte:** Próprio Autor.

A amostra de carvão de palha de cana-de-açúcar sem ativação registrou sinal característico do íon Fe<sup>3+</sup> (GUEDES et al., 2003), como mostra a Figura 11. Observa-se que houve um desaparecimento da curvatura no sinal de RPE, o que indica que a ativação utilizando H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> removeu os íons de Fe<sup>3+</sup> do biocarvão, provavelmente na forma de FePO<sub>4</sub> e derivados, sendo utilizado carvão e

ácido fosfórico, inclusive, para retirar espécies metálicas como  $\text{Fe}^{3+}$  de efluentes aquosos (THAJEEL, 2013).

**Figura 11.** Espectro de RPE dos biocarvões de palha de cana-de-açúcar sem ativação e ativado



**Fonte:** Próprio autor

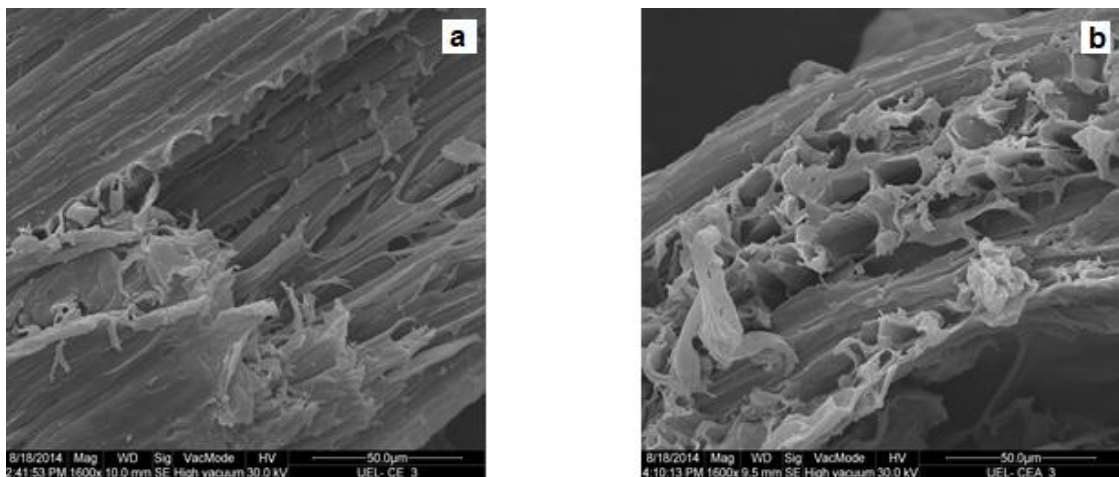
## 5.2.2 Análise Morfológica e Caracterização Microestrutural

### 5.2.2.1 Microscopia eletrônica de varredura

A microscopia eletrônica de varredura foi realizada para analisar o perfil da superfície dos carvões antes e após ativação química. As Figuras 12, 13 e 14 mostram que o processo de pirólise em si já fornece uma característica porosa ao material. A ativação utilizando ácido fosfórico aumenta as cavidades aparentes, pois os grupamentos fosfato se ligam às formas aromáticas e alifáticas de carbono do carvão, clivando-as, após esse processo os carbonos com ligações clivadas se ligam em outros carbonos vizinhos formando cavidades que serão os poros ao fim da

ativação (NAHIL; WILLIAMS, 2012; SABIO; ALMANSA; RODRIGUÉZ-REINOSO, 2003).

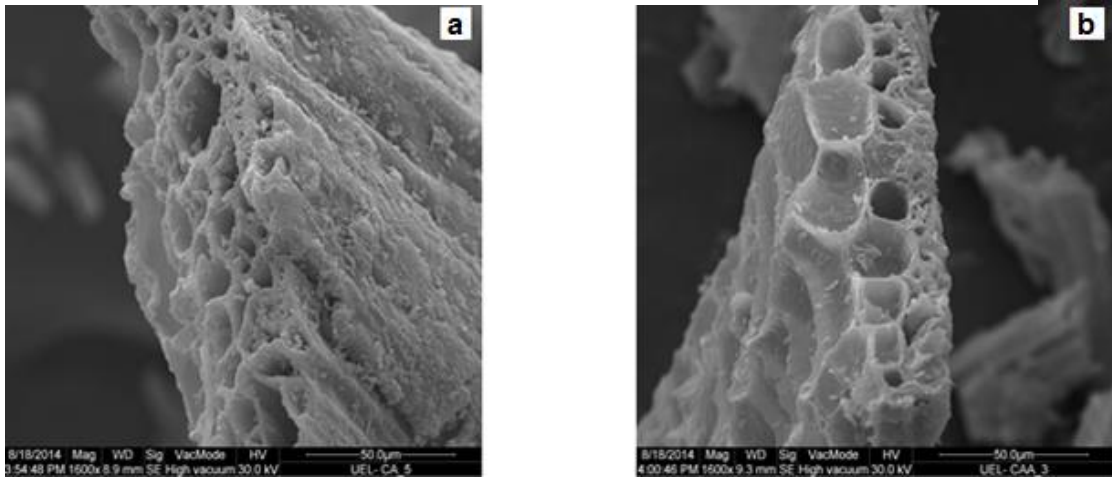
**Figura 12** - Micrografias dos carvões de serragem de madeira de eucalipto (a) sem ativação e (b) ativado



**Fonte:** Próprio autor

As imagens antes da ativação dos biocarvões (12, 13 e 14 a) mostram que o material é fibroso, enquanto as imagens após ativação (12, 13 e 14 b) mostram que houve um rompimento dessas fibras e uma reestruturação, abrindo cavidades na superfície externa do biocarvão. O biocarvão de palha de cana-de-açúcar sem ativação (Figura 13 a) apresenta cavidades expressivas na sua morfologia. Após o processo de ativação a imagem de microscopia não mostrou diferenças quanto à porosidade quando comparada a imagem sem ativação (Figura 13 b).

**Figura 13** - Micrografias dos carvões de palha de cana-de-açúcar (a) sem ativação e (b) ativado

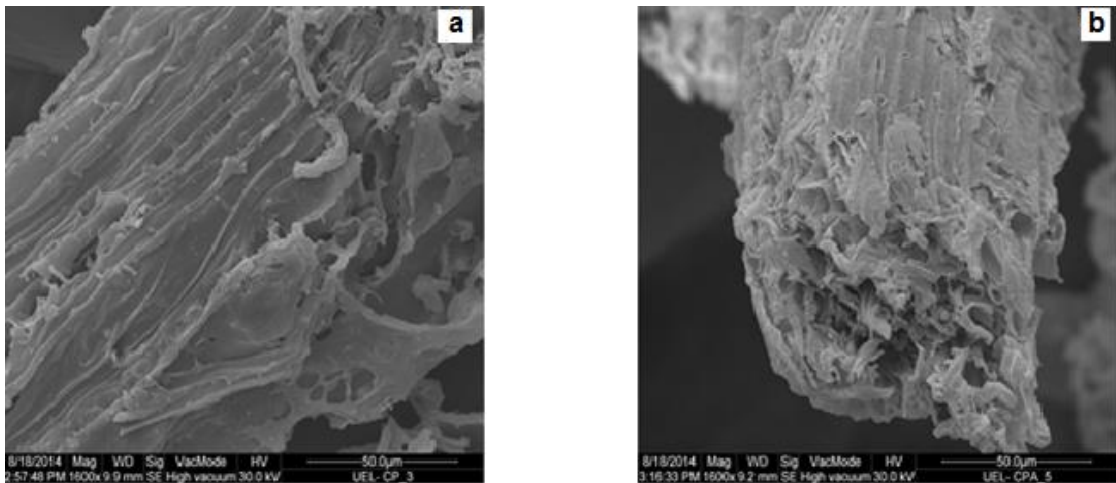


**Fonte:** Próprio Autor.

Sun e colaboradores (2012) compararam a ativação de carvão da planta “sombrinha-chinesa” (*Cyperus alternifolius*), utilizando  $H_3PO_4$  e  $H_4P_2O_7$  e perceberam através das análises de microscopia eletrônica de varredura que o carvão ativado com  $H_3PO_4$  apresentou poros mais alternados no quesito tamanho e menos ordenados na superfície do carvão, sendo mais aleatórios do que os produzidos pela ativação com  $H_4P_2O_7$ .

O biocarvão de eucalipto (Figura 12 a) e o de peroba (Figura 14 a) sem ativação mostraram a presença de fibras longitudinais, que parecem ser rompidas após a ativação, formando cavidades (Figuras 12 e 14 b). As cavidades apresentadas pelos carvões podem ser promissoras para a utilização na adsorção de moléculas grandes como enzimas e proteínas (SYCH et al., 2012).

**Figura 14** - Micrografias dos carvões de serragem de madeira de peroba (a) sem ativação e (b) ativado



**Fonte:** Próprio autor

#### 5.2.2.2 Área específica e volume de poros dos biocarvões

A análise da área específica foi realizada no intuito de monitorar quantitativamente as alterações na área específica e volume de poros nas amostras de carvão após ativação. A área específica é dependente das condições com que a ativação é realizada. Variáveis como temperatura, tempo de ativação, atmosfera de ativação são cruciais para o desenvolvimento dos poros e da superfície (LIOU, 2010).

Como pode ser observado na Tabela 10 o carvão de palha de cana-de-açúcar sem ativação possui área específica extremamente baixa ( $4 \text{ m}^2/\text{g}$ ), porém apresenta aumento da área após ativação, atingindo  $11 \text{ m}^2/\text{g}$ , demonstrando a ativação do carvão. O carvão de eucalipto mostrou um aumento de área expressivo e condizente com as áreas específicas de carvões ativados quimicamente à temperatura de  $500 - 550 \text{ }^\circ\text{C}$  (DIAO; WALAWENDER; FAN, 2002), apresentando antes da ativação  $12 \text{ m}^2/\text{g}$  e após ativação  $649 \text{ m}^2/\text{g}$ , demonstrando ativação eficaz do mesmo.

Carvões comerciais possuem variados valores de área específica, de acordo com sua matéria-prima, o carvão comercial de origem betuminosa (utilizado por Zambrana (2006) possui área superficial de  $700 \text{ m}^2/\text{g}$ . Já o carvão

comercial de *Pinus sp.* (Alphacarbo Industrial S.A.) estudado por Schimmel (2008) apresentou área específica de 618,7 m<sup>2</sup>/g. Claudino (2013) usou carvão comercial de origem vegetal (Norit® PK-3-5) e encontrou área específica de 660 m<sup>2</sup>/g. Esses dados mostram que os carvões madeirosos apresentaram área específica, após ativação, comparativa às de carvões ativados comerciais.

Quanto ao volume de poros (Tabela 9), podemos observar que para todas as amostras houve um aumento significativo no volume de poros. O carvão de cana-de-açúcar, apesar de não apresentar grande área específica, apresenta um volume de poros alto, característica esta atribuída a materiais com elevado índice de macroporos. Os carvões madeirosos (peroba e eucalipto) apresentaram volume de poros maiores dos que os comerciais encontrados na literatura (Tabela 9), se mostrando mais receptivos para adsorvatos.

**Tabela 9** - Parâmetros da estrutura porosa dos biocarvões de pirólise

Amostra	Área Específica (m <sup>2</sup> /g)	Volume Total de Poros (cm <sup>3</sup> /g) <sup>1</sup>	Raio Médio dos Poros (Å)
Palha de cana-de-açúcar	4	0,014	22
Palha de cana-de-açúcar ativado	11	0,129	84
Serragem de Eucalipto	12	0,013	30
Serragem de eucalipto ativado	649	0,591	84
Serragem de peroba	5	0,009	16
Serragem de peroba ativado	466	0,225	11
Carvão comercial <sup>2</sup>	618,7	0,259	22,31
Carvão comercial <sup>3</sup>	660	0,297	-

<sup>1</sup> Volume de poros obtidos pelo método BJH <sup>2</sup>Alphacarbo Industrial S.A (SCHIMMEL, 2008) <sup>3</sup>Norit® PK 3-5 (CLAUDINO, 2003).

**Fonte:** Próprio Autor.

Quanto ao raio médio dos poros, também houve um aumento na média, aumentando em aproximadamente três vezes dois dos biocarvões testados (cana e eucalipto), com exceção do carvão de peroba que demonstrou uma diminuição da média do raio dos poros. Schimmel (2008) realizou experimento de raio médio dos poros para carvão comercial de *Pinus sp.* (Alphacarbo Industrial S.A.) e encontrou valores comparativos aos de microporos.

A Tabela 10 apresenta a relação de área específica com diferentes carvões de origem residual ativados com diferentes agentes ativadores. É possível observar que há uma gama de áreas específicas que pode ser apresentada dependendo da matéria-prima que se usa, porém os resultados para os carvões de eucalipto e peroba se assemelham muito aos apresentados na literatura (Tabela 10).

Comparando os carvões apresentados com os da literatura (Tabela 10) observamos que o carvão de serragem de eucalipto apresentado por Martins e colaboradores (2007) apresentou valor inferior ( $370 \text{ m}^2/\text{g}$ ) ao ativado quimicamente neste trabalho ( $649 \text{ m}^2/\text{g}$ ), sendo este um melhor adsorvente. O carvão de palha de cana-de-açúcar apresentou valor muito inferior ( $11 \text{ m}^2/\text{g}$ ) de área específica quando comparado ao carvão de bagaço de cana-de-açúcar ( $1068 \text{ m}^2/\text{g}$ ) apresentado por Liou (2010), essa discrepância se deve à estrutura da matéria-prima, sendo o bagaço mais rico em material carbonáceo que a palha e com menor teor de silício (consequentemente, de cinzas).

**Tabela 10** - Relação do tipo de biocarvão ativado, área específica e agente ativador para diferentes tipos de carvão de origem residual

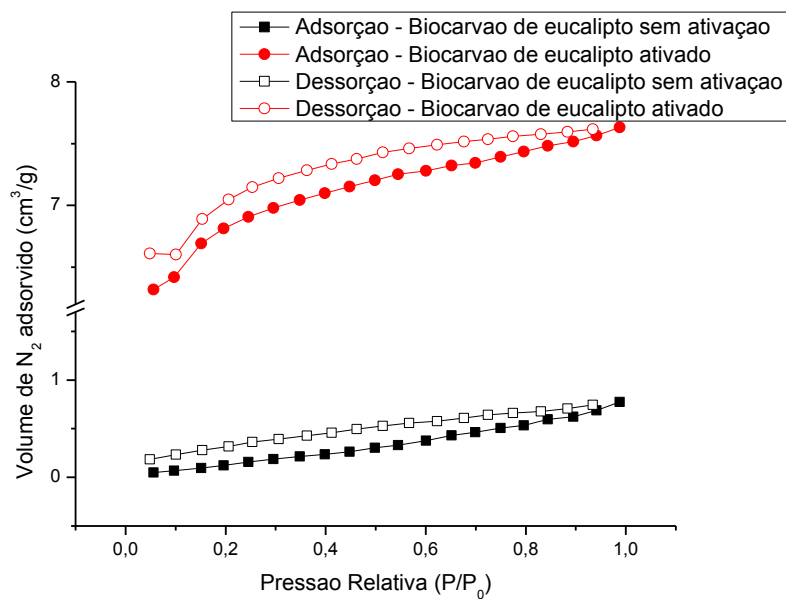
Referência	Tipo de Carvão	Área Específica ( $\text{m}^2/\text{g}$ )	Agente Ativador
Yuso, Rubio e Izquierdo (2014)	Casca de amêndoas	980	$\text{H}_3\text{PO}_4$
Hadoun et al. (2013)	Caules de tamareira	682	$\text{H}_3\text{PO}_4$
Martins et al. (2007)	Serragem de eucalipto	370	$\text{CO}_2$
Liou (2010)	Bagaço de cana-de-açúcar	1068	$\text{H}_3\text{PO}_4$
Liou (2010)	Casca de semente de girassol	975	$\text{H}_3\text{PO}_4$

**Fonte:** Próprio Autor.

As Figuras 15 a 17 apresentam as isotermas para adsorção de  $\text{N}_2$  nos três biocarvões antes e após ativação. É possível observar que as isotermas dos biocarvões de eucalipto e peroba (Figuras 15 e 17), possuem perfil da isoterma I do modelo descrito por Brunauer, Emmet e Teller (1938), que é relacionada à adsorção em microporos, comprovado pelo alto volume de microporos dos biocarvões apresentados. As histereses de ambos também são muito semelhantes, sendo estas do tipo D, que mostra a presença de mesoporos com forma cilíndrica e cônica.

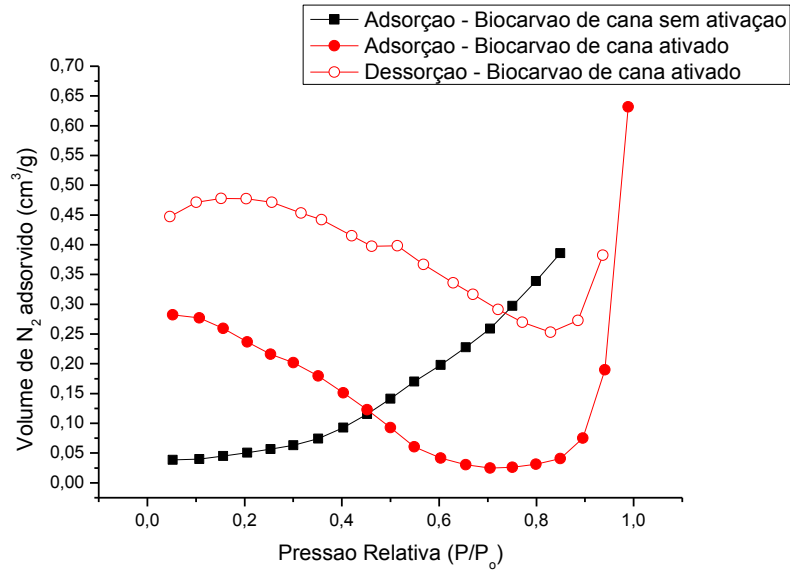
Enquanto isso, as isotermas de adsorção e dessorção no biocarvão de cana-de-açúcar (Figura 16) apresentaram-se de maneiras muito discrepantes para o carvão antes e após ativação, sendo que o biocarvão antes da ativação apresentou apenas isoterma de adsorção, sendo essa do tipo III, que indica interações muito fracas em sistemas contendo meso e macroporos. Quanto às isotermas do biocarvão ativado observa-se que não é possível distinguir com clareza o tipo da mesma, porém o perfil é de isotermas do tipo III, características de sistemas microporosos, com histerese do tipo D também, demonstrando a presença de mesoporos cônicos ou cilíndricos.

**Figura 15** - Isotermas de adsorção de  $N_2$  para os biocarvões de eucalipto sem ativação e ativado



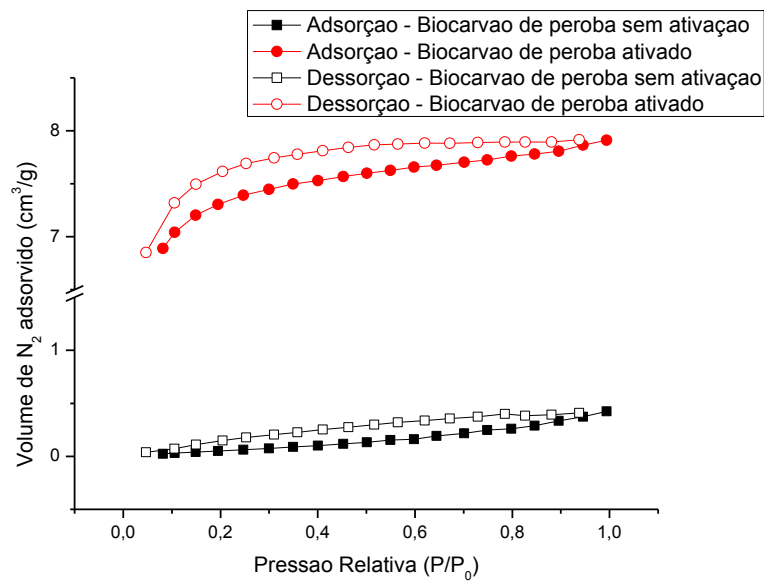
Fonte: Próprio Autor.

**Figura 16** - Isotermas de adsorção de  $N_2$  para os biocarvões de cana-de-açúcar sem ativação e ativado



Fonte: Próprio Autor.

**Figura 17** - Isotermas de adsorção de  $N_2$  para os biocarvões de peroba sem ativação e ativado



Fonte: Próprio Autor.

### 5.3 NÚMERO DE IODO

O número de iodo indica a possível presença de microporos, a análise se dá pela quantidade em  $\text{mg}_{\text{iodo}}$  adsorvido por massa de carvão ativado Tabela 11.

Por ser um indicativo de microporos, o índice de iodo mais apropriado é dependente da aplicação a que o carvão será submetido. O número de iodo típico de carvão ativado é 900, com valores maiores que 1000 para melhores classificações de carvão. É considerado aproximadamente igual ao volume total de poros (PEREIRA, 2011).

Pelo número de iodo percebemos que os índices são bem parecidos para os carvões madeirosos de eucalipto e peroba, sendo  $646,6 \text{ mg}_{\text{iodo}} \cdot \text{g}^{-1}$  e  $605,9 \text{ mg}_{\text{iodo}} \cdot \text{g}^{-1}$ , respectivamente. Já o carvão de palha de cana-de-açúcar não possui uma estrutura propensa à formação de poros apresentando menor índice de iodo ( $378,2 \text{ mg}_{\text{iodo}} \cdot \text{g}^{-1}$ ), que também obteve o menor volume de microporos na análise de área superficial (Tabela 9). O número de iodo para um carvão comercial, ativado fisicamente, apresentado por Martins et al (2007) é de  $409 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ , indicando que o carvão ativado quimicamente e oriundo de resíduos agroindustriais, neste trabalho apresentam maiores índices de microporos espalhados pela superfície e interiores.

Pereira (2011) testou carvões comerciais, sendo um granular e um pulverizado e mostrou que o granular possui menor índice de iodo do que o pulverizado, pois uma maior granulometria favorece a quantidade de poros maiores, enquanto o inverso é verdadeiro. O carvão granular (FILTRON-A, Empresa FBC) apresentou  $801 \text{ mg}_{\text{iodo}} \cdot \text{g}^{-1}$ , já o carvão pulverizado (SORBIUS 400, Empresa FBC) apresentou  $1003 \text{ mg}_{\text{iodo}} \cdot \text{g}^{-1}$ .

**Tabela 11** - Número de iodo para os carvões pirolíticos ativados

Número de Iodo ( $\text{mg}_{\text{iodo}} \cdot \text{g}^{-1}$ )	Carvões ativados		
	Carvão de Eucalipto 646,6	Carvão de Cana 378,2	Carvão de Peroba 605,9

**Fonte:** Próprio Autor.

#### 5.4 IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE NOS BIOCARVÕES

As lipases são enzimas que atuam sobre as ligações éster, hidrolisando-as. Sua atividade depende da quantidade de substrato que é liberado em certo tempo de reação (BALCÃO et al., 1996).

A atividade da enzima imobilizada nestes suportes foi avaliada em termos de atividades lipolíticas ( $U/g_{\text{suporte}}$ ), que é a quantificação de produto liberado por grama de carvão utilizado, e atividades específicas ( $U/mg_{\text{proteína}}$ ), que consiste na razão da atividade lipolítica pela quantidade de proteína ligada ao carvão ( $(mg/g_{\text{suporte}})$ ), já que nem toda proteína ligada ao carvão é lipase. Para efeito de análise estatística somente os valores de  $U/g_{\text{suporte}}$  foram avaliados, mas para todos os experimentos também foi calculado os valores de  $U/mg_{\text{proteína}}$ .

Para a realização do planejamento fatorial, foram preparadas soluções de lipase, nas concentrações de 20, 60 %, bem como a utilização da enzima concentrada (100 %). Os dados de atividade lipolítica ( $U/g_{\text{suporte}}$ ), concentração de proteínas (mg/mL) e atividade específica (U/mg) da lipase nas soluções e concentrada encontram-se na Tabela 12.

A imobilização da lipase de *B. ribis* EC-01 nos carvões ativados foi desenvolvida por meio de planejamentos fatoriais. Uma triagem com os três materiais foi desenvolvida primeiramente por planejamentos exploratórios avaliando-se a capacidade de adsorção da lipase pelo controle da temperatura, tempo e concentração de enzima (*Tratamento I*). De acordo com os resultados obtidos neste tratamento novos parâmetros de imobilização de lipase foram estabelecidos utilizando os carvões de eucalipto e peroba (*Tratamento II*).

*Tratamento I*: O objetivo do planejamento  $2^3$  foi avaliar a capacidade adsorptiva de lipase nos carvões de cana-de-acúcar, eucalipto e peroba em função das variáveis temperatura ( $X_1$ ), tempo ( $X_2$ ) e concentração de enzima ( $X_3$ ) e análise das respostas atividade lipolítica ( $U/g_{\text{suporte}}$ ) e atividade específica ( $U/mg_{\text{proteína}}$ ). Os valores de atividades das soluções iniciais utilizadas no *Tratamento I* são mostrados na Tabela 12.

**Tabela 12** - Valores de atividade enzimática e teores de proteína para diferentes concentrações do extrato de lipase utilizadas no *Tratamento I*

Solução (%)	U/mL	[Prot.] mg / mL	U/mg
20	1,80 ± 0,07	0,128 ± 0,015	14,1 ± 0,37
60	5,16 ± 0,00	0,194 ± 0,010	26,6 ± 0,03
100*	8,96 ± 0,62	0,307 ± 0,066	29,2 ± 0,70

\*100 % corresponde ao extrato bruto obtido originalmente no cultivo

**Fonte:** Próprio Autor.

As respostas obtidas com a imobilização de lipase nos três carvões avaliadas no *Tratamento I* podem ser observadas nas Tabelas 13 a 15. A atividade lipolítica variou de 10 a 306 U/g<sub>suporte</sub>, obtidos com a imobilização de lipase em carvão ativado de eucalipto.

**Tabela 13** – Planejamento fatorial para avaliar os efeitos da temperatura, tempo e concentração de enzima na imobilização da lipase em carvão ativado de cana-de-açúcar e as respostas obtidas (atividades de lipase) – *Tratamento I*

Exp.	Variáveis codificadas			Respostas		
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	U/g <sub>sup</sub>	mg/g <sub>sup</sub>	U/mg <sub>prot</sub>
1	-1	-1	-1	15,3	1,93	7,93
2	-1	-1	1	18,7	2,47	7,57
3	-1	1	-1	19,0	2,21	8,60
4	-1	1	1	35,6	3,32	10,7
5	1	-1	-1	28,6	1,08	26,5
6	1	-1	1	65,6	3,23	20,3
7	1	1	-1	72,3	1,84	39,3
8	1	1	1	64,6	4,87	13,3
9	0	0	0	74,3	2,45	30,3
10	0	0	0	86,9	2,52	34,5
11	0	0	0	90,2	2,18	41,4
Fatores				Níveis reais		
				-1	0	+1
X <sub>1</sub> (temperatura, °C)				5	20	35
X <sub>2</sub> (tempo, min)				30	135	240
X <sub>3</sub> (enzima, % v/v)				20	60	100

**Fonte:** Próprio Autor.

A metodologia de superfície de resposta (MSR) é uma técnica baseada em planejamentos fatoriais e tem sido utilizada com grande sucesso na modelagem de diversos processos industriais. A MSR apresenta duas etapas distintas: modelagem e deslocamento. A primeira etapa é realizada através do ajuste de modelos simples

(lineares ou quadráticos) em razão das respostas obtidas com planejamentos fatoriais. Barros Neto e colaboradores (2007) destacam que o deslocamento se dá sempre ao longo do caminho de máxima inclinação de um modelo, ou seja, onde a resposta de interesse varia de forma mais pronunciada.

**Tabela 14** – Planejamento fatorial para avaliar os efeitos da temperatura, tempo e concentração de enzima na imobilização da lipase em carvão ativado de eucalipto e as respostas obtidas (atividades de lipase) – *Tratamento I*

Exp.	Variáveis codificadas			Respostas		
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	U/g <sub>sup</sub>	mg/g <sub>sup</sub>	U/mg <sub>prot</sub>
1	-1	-1	-1	10,0	1,51	6,62
2	-1	-1	1	35,3	3,69	9,57
3	-1	1	-1	23,7	2,25	10,5
4	-1	1	1	35,3	4,75	7,43
5	1	-1	-1	48,8	2,34	20,9
6	1	-1	1	58,7	4,62	12,7
7	1	1	-1	76,7	2,07	37,0
8	1	1	1	120	5,11	23,5
9	0	0	0	123	2,86	43,0
10	0	0	0	306	2,74	111
11	0	0	0	221	3,05	72,5
Fatores	Níveis reais					
				-1	0	+1
X <sub>1</sub> (temperatura, °C)				5	20	35
X <sub>2</sub> (tempo, min)				30	135	240
X <sub>3</sub> (enzima, % v/v)				20	60	100

**Fonte:** Próprio Autor.

A análise dos três planejamentos apontou que no modelo linear as estimativas de efeito das variáveis e de suas interações não foram significativas ( $p \leq 0,05$ ) para a imobilização da lipase nestes suportes. Entretanto, quando se faz a checagem de curvatura para cada modelo, ou seja, se um futuro modelo de 2ª ordem seria o mais adequado, observa-se que seu efeito é significativo tanto para o suporte carvão ativado de eucalipto e carvão ativado de peroba e, o valor de R<sup>2</sup> também melhora consideravelmente para ambos.

**Tabela 15**– Planejamento fatorial para avaliar os efeitos da temperatura, tempo e concentração de enzima na imobilização da lipase em carvão ativado de peroba e as respostas obtidas (atividades de lipase) – *Tratamento I*

Exp.	Variáveis codificadas			Respostas		
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	U/g <sub>sup</sub>	mg/g <sub>sup</sub>	U/mg <sub>prot</sub>
1	-1	-1	-1	26,3	2,54	10,4
2	-1	-1	1	37,5	4,99	7,52
3	-1	1	-1	42,3	2,51	16,9
4	-1	1	1	41,2	4,94	8,34
5	1	-1	-1	32,0	2,34	13,7
6	1	-1	1	115	5,69	20,2
7	1	1	-1	69,0	2,43	28,4
8	1	1	1	147	5,78	25,4
9	0	0	0	126	3,61	35,0
10	0	0	0	108	3,82	28,3
11	0	0	0	137	3,77	36,3
Fatores	Níveis reais					
				-1	0	+1
X <sub>1</sub> (temperatura, °C)				5	20	35
X <sub>2</sub> (tempo, min)				30	135	240
X <sub>3</sub> (enzima, % v/v)				20	60	100

**Fonte:** Próprio Autor.

A estimativa dos efeitos das variáveis temperatura (X<sub>1</sub>), tempo (X<sub>2</sub>) e concentração de enzima (X<sub>3</sub>) na imobilização da lipase nos carvões ativados de eucalipto e peroba é apresentada na Tabela 16 e 17, respectivamente

Como pode ser observado para a enzima imobilizada em carvão ativado de eucalipto (Tabela 16), o efeito da curvatura é significativo e sugere que um modelo quadrático seria adequado na imobilização da lipase (valores em negrito na tabela 16).

De acordo com a Tabela 17 para a enzima imobilizada em carvão ativado de peroba, o efeito da curvatura no modelo é significativo, como também o efeito da média e das variáveis, temperatura (X<sub>1</sub>) e enzima (X<sub>3</sub>), além da interação entre elas (valores em negrito na tabela 17).

**Tabela 16** – Estimativa dos efeitos para a imobilização da lipase em carvão ativado de eucalipto - *Tratamento I*

Fatores	Efeito (%)	Erro Padrão	T <sub>calc</sub> (3)	p-valor	Estimativa por intervalo (95%)	
					Limite inferior	Limite superior
Média.	51,02	26,65	1,914	0,151	-33,80	135,8
<b>Curvatura</b>	<b>165,4</b>	<b>51,03</b>	<b>3,241</b>	<b>0,047</b>	<b>2,999</b>	<b>327,8</b>
X <sub>1</sub> T (°C)	24,93	26,65	0,935	0,418	-59,88	109,7
X <sub>2</sub> Tempo (min)	12,81	26,65	0,480	0,663	-72,01	97,63
X <sub>3</sub> Enzima (% v/v)	11,22	26,65	0,421	0,701	-73,59	96,05
X <sub>1</sub> x X <sub>2</sub>	9,395	26,65	0,352	0,747	-75,42	94,21
X <sub>1</sub> x X <sub>3</sub>	1,979	26,65	0,074	0,945	-82,84	86,80
X <sub>2</sub> x X <sub>3</sub>	2,437	26,65	0,091	0,932	-82,38	87,26

$R^2 = 0,80$ ;  $t_{Tab} = t_{(3;5\%/2)} = 3,18$

**Tabela 17** – Estimativa dos efeitos para a imobilização da lipase em carvão ativado de peroba - *Tratamento I*

Fatores	Efeito (%)	Erro Padrão	T <sub>calc</sub> (3)	p-valor	Estimativa por intervalo (95%)	
					Limite inferior	Limite superior
Média.	<b>63,77</b>	<b>4,367</b>	<b>14,60</b>	<b>0,000</b>	<b>49,87</b>	<b>77,66</b>
<b>Curvatura</b>	<b>119,7</b>	<b>16,72</b>	<b>7,162</b>	<b>0,005</b>	<b>66,56</b>	<b>173,0</b>
X <sub>1</sub> T (°C)	<b>53,87</b>	<b>8,734</b>	<b>6,168</b>	<b>0,008</b>	<b>26,07</b>	<b>81,67</b>
X <sub>2</sub> Tempo (min)	22,20	8,734	2,542	0,084	-5,588	50,00
X <sub>3</sub> Enzima (% v/v)	<b>42,70</b>	<b>8,734</b>	<b>4,889</b>	<b>0,016</b>	<b>14,91</b>	<b>70,50</b>
X <sub>1</sub> x X <sub>2</sub>	12,37	8,734	1,416	0,251	-15,42	40,17
X <sub>1</sub> x X <sub>3</sub>	<b>37,70</b>	<b>8,734</b>	<b>4,317</b>	<b>0,022</b>	<b>9,911</b>	<b>65,50</b>
X <sub>2</sub> x X <sub>3</sub>	-4,291	8,734	-0,491	0,656	-32,08	23,50

$R^2 = 0,98$ ;  $t_{Tab} = t_{(3;5\%/2)} = 3,18$

Fonte: Próprio Autor.

Estes resultados sugerem um direcionamento confiável para novos experimentos utilizando somente as variáveis temperatura e concentração de enzima, já que o tempo não foi significativo e nem suas interações ( $p \leq 0,05$ ). Um planejamento fatorial completo  $2^2$  e com pontos axiais ( $2^a$  ordem) foi proposto visando alcançar a máxima imobilização de lipase nestes suportes.

*Tratamento II:* Baseado nos resultados obtidos no *Tratamento I*, um planejamento fatorial  $2^2$  adicionado de pontos axiais ( $2^a$  ordem) foi desenvolvido utilizando-se novos níveis de variação a fim de melhorar a curva da superfície de resposta em direção à máxima adsorção de lipase nos carvões de eucalipto e

peroba em termos de atividade lipolítica (U/g<sub>suporte</sub>) e atividade específica (U/mg proteína).

Os valores de atividade lipolítica e específica das soluções iniciais utilizadas neste tratamento são mostrados na Tabela 18.

**Tabela 18** - Valores de atividade enzimática e teores de proteína para diferentes concentrações utilizadas no *Tratamento II*.

Solução (%)	U/mL	[Prot.] mg / mL	U/mg
50	9,93 ± 0,88	0,209 ± 0,024	47,6 ± 2,56
57	11,5 ± 0,17	0,237 ± 0,024	48,5 ± 4,06
75	15,2 ± 0,83	0,312 ± 0,024	48,7 ± 2,66
93	18,5 ± 1,54	0,378 ± 0,034	48,9 ± 0,70
100	20,0 ± 1,05	0,412 ± 0,024	48,5 ± 4,52

**Fonte:** Próprio Autor.

Os resultados experimentais estão apresentados na Tabela 19 e 20 (experimentos 1–11), para a lipase imobilizada nos carvões ativados de eucalipto e peroba, respectivamente.

**Tabela 19** - Planejamento fatorial 2<sup>2</sup> para avaliar os efeitos da temperatura e concentração de enzima na imobilização de lipase em carvão ativado de eucalipto e as respostas obtidas (atividades de lipase) - *Tratamento II*

Experimento	Variáveis codificadas		Respostas				
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	U/g <sub>sup</sub>	mg <sub>prot/g</sub> <sub>sup</sub>	U/mg		
1	-1	-1	93,3	8,45	11,0		
2	-1	1	100	9,18	10,9		
3	1	-1	743	14,4	51,6		
4	1	1	510	14,1	36,2		
5	-1,41	0	301	8,25	36,5		
6	1,41	0	553	15,5	35,7		
7	0	-1,41	531	12,5	42,5		
8	0	1,41	301	11,8	25,5		
9 (C)	0	0	547	11,9	45,9		
10 (C)	0	0	361	12,0	30,1		
11 (C)	0	0	272	12,1	22,5		
Fatores	Níveis reais						
			-1,41	-1	0	1	1,41
X <sub>1</sub> (enzima, %v/v)			50	57	75	93	100
X <sub>2</sub> (temperatura, °C)			20	24	35	46	50

**Fonte:** Próprio Autor.

**Tabela 20** - Planejamento fatorial  $2^2$  para avaliar os efeitos da temperatura e concentração de enzima na imobilização da lipase em carvão ativado de peroba e as respostas obtidas (atividades de lipase) - *Tratamento II*

Experimento	Variáveis codificadas		Respostas				
	$X_1$	$X_2$	U/g sup	mg <sub>prot</sub> /g sup	U/mg		
1	-1	-1	115	7,96	14,4		
2	-1	1	61,8	8,61	7,17		
3	1	-1	149	14,6	10,2		
4	1	1	229	14,3	16,0		
5	-1,41	0	128	7,66	16,7		
6	1,41	0	817	15,9	51,4		
7	0	-1,41	693	12,0	57,7		
8	0	1,41	323	11,6	27,8		
9 (C)	0	0	128	11,8	10,8		
10 (C)	0	0	180	11,9	15,1		
11 (C)	0	0	132	11,8	11,2		
Fatores	Níveis reais						
			-1,41	-1	0	1	1,41
$X_1$ (enzima, %v/v)			50	57	75	93	100
$X_2$ (temperatura, °C)			20	24	35	46	50

**Fonte:** Próprio Autor.

Para este tratamento estatístico, os dados obtidos foram checados analisando-se não só o modelo quadrático ( $2^a$  ordem) proposto ( $2^2$  com os pontos centrais e axiais que incluem experimentos de 1-11), mas também foi verificado o modelo linear ou de  $1^a$  ordem ( $2^2$  acrescido dos pontos centrais que incluem os experimentos 1-4 e 9-11).

Os modelos quadráticos, para os dois carvões, apresentaram um valor de  $R^2 \leq 0,74$  e os lineares, um  $R^2 \geq 0,88$ . Em virtude da qualidade do ajuste da regressão, a Tabela 21 apresenta a análise de variância (ANOVA) dos modelos de  $1^a$  ordem. As equações polinomiais lineares relacionando os fatores e as respostas para a enzima imobilizada em carvão de eucalipto e em carvão de peroba, respectivamente, estão mostradas como equações **6** e **7**. A variável concentração de enzima ( $X_1$ ) foi significativa para a imobilização de lipase ( $p \leq 0,05$ ) nos dois suportes para a unidade de atividade enzimática estudada (U/g<sub>suporte</sub>). Os fatores significativos assim como os efeitos de interação estão em negrito nestas equações.

**Tabela 21** - Análise de variância (ANOVA) do planejamento fatorial  $2^2$  com pontos centrais ( $p < 0,05$ ) para o modelo linear na imobilização de lipase em carvão ativado de eucalipto e peroba - *Tratamento II*

Resposta	Fonte de variação	Soma Quadrados (SS)	Graus de Liberdade (DF)	Média Quadrados (MS)	F teste	
					$F_{calc}$	$F_{list}$
U/g carvão eucalipto <sup>a</sup>	Modelo	307715	1	307715	37,49	6,61 <sup>b</sup>
	Resíduo	41043	5	8208,6		
	Total	348758	6			
<i>Modelo linear</i>						
U/g carvão peroba <sup>c</sup>	Modelo	14804	1	14804	42,01	6,61 <sup>d</sup>
	Resíduo	1762	5	352,4		
	Total	16566	6			
<i>Modelo linear</i>						

<sup>a</sup> $R^2 = 0,88$ ; <sup>b</sup> $F_{95\%.1,5}$ ; <sup>c</sup> $R^2 = 0,89$ ; <sup>d</sup> $F_{95\%.1,5}$

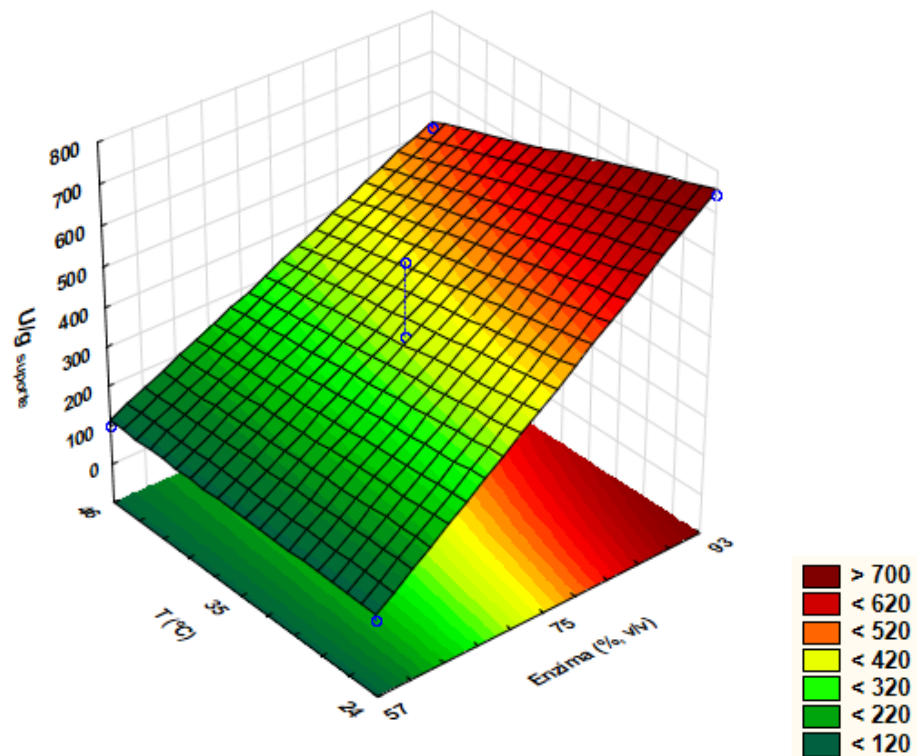
**Fonte:** Próprio Autor.

O modelo calculado para a imobilização de lipase em carvão ativado de eucalipto em U/g<sub>suporte</sub> descrito abaixo.

$$U/g_{suporte} = 375,21 + 264,83x_1 - 56,50x_2 - 60,00x_1x_2 \quad (6)$$

A superfície de resposta para a imobilização de lipase em carvão ativado de eucalipto em U/g<sub>suporte</sub> esta apresentada na Figura 18

**Figura 18** - Superfície de resposta para a imobilização de lipase em carvão ativado de eucalipto – *Tratamento II* (atividade em U/g suporte)

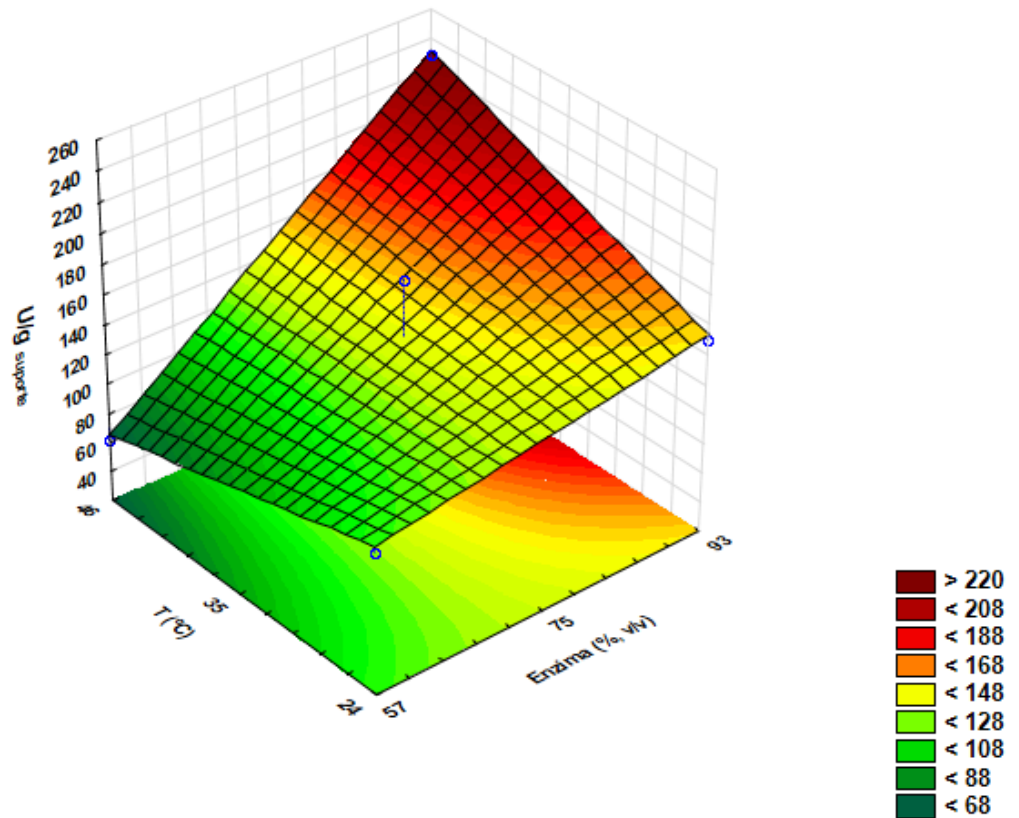


O modelo calculado para a imobilização de lipase em carvão ativado de peroba em U/ g suporte descrito abaixo.

$$U/g\ suporte = 142,36 + 50,56x_1 - 6,56x_2 - 33,19x_1x_2 \quad (7)$$

A superfície de resposta para a imobilização de lipase em carvão ativado de peroba em U/g suporte esta apresentada na Figura 19.

**Figura 19** - Superfície de resposta para a imobilização de lipase em carvão ativado de peroba – Tratamento II (atividade em U/g suporte)



*Validação do modelo.* A validação experimental do modelo foi avaliada somente para a enzima imobilizada em carvão ativado de eucalipto, visto que este suporte apresentou melhores condições para a imobilização de lipase que foi detectado pelas altas atividades lipolíticas (U/g<sub>suporte</sub>) na maioria dos ensaios. A condição de validação foi temperatura de 24 °C e 93 % (v/v) de enzima.

A Tabela 22 apresenta o resultado experimental obtido e o preditivo (intervalo de confiança de 95 %) pelo modelo de imobilização de lipase de *B. ribis* EC-01 em carvão ativado de eucalipto.

**Tabela 22** - Comparação do resultado experimental com o preditivo calculado pelo modelo matemático na imobilização de lipase em carvão ativado de eucalipto

Atividade	Observado <sup>a</sup>	Predito
U/g <sub>suporte</sub>	757 ± 70	756

<sup>a</sup> os experimentos foram conduzidos em triplicata a 200 rpm por 120 min.

**Fonte:** Próprio Autor.

Como pode ser observado o resultado obtido experimentalmente para a imobilização de lipase de *B. ribis* EC-01 em carvão ativado de eucalipto utilizando a condição definida acima está de acordo com o valor predito calculado pelo modelo. A validação para aumentar a atividade de lipase imobilizada em U/g<sub>suporte</sub> permitiu o uso de temperatura ambiente (24 °C) para o desenvolvimento dos experimentos.

Na Tabela 23 é apresentada a comparação da atividade hidrolítica e específica da lipase de *B. ribis* EC-01 imobilizada em carvão ativado de eucalipto em relação à enzima livre calculada pelas equações 3, 4 e 5. Como pode ser observado a imobilização desta enzima aumentou em quase 5 vezes a atividade específica em relação à enzima livre.

**Tabela 23** - Atividades da lipase imobilizada em carvão ativado de eucalipto na condição otimizada

Enzima (livre ou imobilizada)	Atividade (U/g-suporte ou U/mL sol. enzima)	Proteína ligada (mg/g-suporte ou mg/mL sol. enzima)	Atividade específica (U/mg-proteína)	Atividade Relativa Específica (%)
Li+CA <sup>1</sup>	757	3,97	191	497
Livre <sup>2</sup>	18,6	0,485	38,4	100
CAC <sup>3</sup>	42,9	3,73	11,5	21,9

<sup>1</sup> Lipase imobilizada no carvão ativado; <sup>2</sup> Solução de enzima livre utilizada na validação; <sup>3</sup> Lipase imobilizada em carvão comercial (ANDRADE, 2013).

**Fonte:** Próprio Autor.

A Tabela 24 apresenta exemplos da literatura de lipases imobilizadas em carvão e utilizadas para a hidrólise de óleo e produção de ésteres em alguns casos. Além dos dados contidos na Tabela 25, sabe-se que Ramani e colaboradores (2010) otimizaram as condições de imobilização de lipase em carvões mesoporosos e obteve tempo ótimo de 180 minutos e temperatura ótima de 30 °C. Moreno-Pirajàn e Giraldo (2011) concluíram em seu estudo que o processo de produção de biocombustíveis utilizando lipase depende do sucesso com que se imobiliza a enzima, permitindo o reuso da mesma para diminuir o valor econômico do processo. Quirós, García e Montes-Morán (2011) modificaram carvões ativados e conseguiram até 10 ciclos de reuso após otimizar a imobilização de lipase.

**Tabela 24** - Utilização de lipases imobilizadas em biocarvões ativados utilizados para hidrólise de óleos e produção de ésteres

Referência	Atividade Enzimática (U/g <sub>suporte</sub> )	Tipo de carvão	Área específica (m <sup>2</sup> /g)	Hidrólise de óleos
Ramani et al. (2010)	3570	Palha de arroz	412	50 %
Quirós, García e Montes-Morán (2011)	-	Comercial	1294	82 %
Moreno-Pirajàn e Giraldo (2011)	-	Comercial	-	85 %
Naranjo et al. (2010)	-	Casca de coco	1562	100 %
Andrade (2013)	42,9	Casca de coco	900	traços
Presente trabalho	757	Carvão de eucalipto	649	-

**Fonte:** Próprio Autor.

## 6 CONCLUSÃO

- As análises químicas e físico-químicas mostraram que o biocarvão produzido a partir dos resíduos agroindustriais avaliados no trabalho podem ser utilizados como imobilizadores enzimáticos ou material adsorvente. Esse resultado é de grande importância para o meio ambiente uma vez que esses materiais seriam descartados como resíduos.
- Os resultados de granulometria mostraram um carvão granular, com diâmetros de 180 a 355  $\mu\text{m}$ , comparativos com carvões comerciais fornecidos com granulometria de 7,5  $\mu\text{m}$  até 1700  $\mu\text{m}$ . Dados de carbono fixo foram superiores a 50% para os carvões de madeira (eucalipto e peroba), semelhantes ao do carvão comercial. O carvão de palha de cana apresenta menor valor, porém foi qualificado para ativação.
- As análises de espectroscopia de infravermelho indicaram a presença de diferenciadas funções orgânicas na superfície dos carvões, com destaque para funções oxigenadas de hidroxilas, carbonilas e carboxilas, indicando a possibilidade de interações quimissorptivas além das fisicamente adsorptivas.
- Os espectros de RPE indicaram a presença de radicais livres orgânicos em todos os carvões pirolíticos, sendo esses derivados de semiquinonas e difenóis com origem na lignina, indicando que as funções oxigenadas estão presentes e possuem capacidade de interação com adsorventes.
- As imagens de MEV mostraram qualitativamente a presença de cavidades na superfície do carvão. Essa característica é comum para carvões ativados quimicamente e fisicamente (comerciais), variando apenas o tamanho e o volume dos poros na superfície dos mesmos.
- As análises de adsorção de  $\text{N}_2$ , para avaliação de área específica indicaram que houve aumento na área superficial. Houve um destaque para os carvões de madeira, onde o carvão de eucalipto partiu de 12  $\text{m}^2/\text{g}$  para 649  $\text{m}^2/\text{g}$  após a ativação e o de peroba partiu de 5  $\text{m}^2/\text{g}$  para 466  $\text{m}^2/\text{g}$ , ambos semelhantes aos carvões comerciais, que obtiveram entre 618,7 e 700  $\text{m}^2/\text{g}$ .
- Os biocarvões mostraram aumento no volume total de poros, sendo o aumento para o de eucalipto e peroba 0,013 para 0,591  $\text{cm}^3/\text{g}$  e de 0,009 para 0,225  $\text{cm}^3/\text{g}$ ,

respectivamente, indicando que a ativação aumentou o volume de poros, tornando-os comparativos aos dos carvões comerciais (0,259 e 0,297 cm<sup>3</sup>/g).

- As isotermas de adsorção de N<sub>2</sub> são do tipo I para os carvões de madeira, indicando adsorção em microporos e tipo II (ativado) e III (sem ativação) para o carvão de cana-de-açúcar, indicando adsorção em sistemas não porosos e interações muito fracas em sistemas contendo macro e mesoporos. As histereses foram todas do tipo D, indicando poros do tipo cônico ou cilíndrico.
- O número de iodo foi satisfatório para os carvões de eucalipto (646,6 mg.g<sup>-1</sup>) e peroba (605,9 mg.g<sup>-1</sup>), enquanto o de cana-de-açúcar apresentou baixo valor do número de iodo, sendo de 378,2 mg.g<sup>-1</sup>. Os madeirosos se mostraram comparativos ao carvão comercial granular, que apresentou 801 mg.g<sup>-1</sup>.
- A otimização da imobilização de lipase nos carvões foi realizada pelo Método de Superfície de Resposta (MSR) e demonstrou que os carvões de madeira estão mais aptos a suportar a lipase, pois apresentaram melhores resultados de imobilização e atividade. O carvão ativado de eucalipto foi o que apresentou melhores valores de atividade lipolítica e após validação do método observou-se que este apresentou atividade semelhante ( $757 \pm 70$  U/g<sub>suporte</sub>) ao predito (756 U/g<sub>suporte</sub>) pelo método e maior com relação ao carvão ativado comercial (42,9 U/g<sub>suporte</sub>).
- Trabalhos futuros objetivam utilizar o biocarvão com a lipase imobilizada na aplicação de hidrólise e produção de biodiesel enzimático, inclusive analisando quantos ciclos de reuso os mesmos podem ser aplicados.

## REFERÊNCIAS

ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR 7402/82 - Carvão vegetal – Determinação granulométrica**. Rio de Janeiro, RJ, 1982.

ABNT. Associação brasileira de normas técnicas. **NBR 8112/86 - Carvão vegetal – Análise imediata**. Rio de Janeiro, RJ, 1986.

ABNT . Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR 12073:1991 - Carvão ativado pulverizado - Determinação do número de iodo - método de ensaio**. Rio de Janeiro, RJ, 1991.

AÇIKYILDIZ, Metin; GÜRSES, Ahmet; KARACA, Semra. Preparation and characterization of activated carbon from plant wastes with chemical activation. **Microporous And Mesoporous Materials**. Turquia, p. 45-49. jul. 2014.

AHMAD, M. A.; PUAD, N. A. A.; BELLO, O. S.. Kinetic, equilibrium and thermodynamic studies of synthetic dye removal using pomegranate peel activated carbon prepared by microwave-induced KOH activation. **Water Resources And Industry**, Malaysia, v. 6, n. 1, p.18-35, ago. 2014.

AHMADPOUR, A.; DO, D.d.. The preparation of active carbons from coal by chemical and physical activation. **Carbon**, [s.l.], v. 34, n. 4, p.471-479, 1996.

AL-ZUHAIR, S. Production of biodiesel: possibilities and challenges. **Biofuels Bioproducts Biorefining**, v. 1, p. 57-66, 2007.

ANDRADE, M. M.; BARBOSA, A. M.; BOFINGER, M. R.; DEKKER, R. F. H.; MESSIAS, J. M.; GUEDES, C. L. B.; ZAMINELLI, T.; OLIVEIRA, B. H.; LIMA, V. M. G.; DALL'ANTONIA, L. H. Lipase production by *Botryosphaeria ribis* EC-01 on soybean and castorbean meal: optimization, immobilization, and application for biodiesel production. **Applied Biochemistry And Biotechnology**, Londrina, v. 170, n. 7, p.1792-1806, ago. 2013.

ANDRADE, Milena Martins. **Produção e imobilização da lipase de *Botryosphaeria ribis* EC-01 e aplicações**. 2013. 208p. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013.

ANDRADE, M. M. et al. Lipase production by *Botryosphaeria ribis* EC-01 on soybean meal supplemented with amino acids, and some physicochemical properties of the enzyme. **Orbital**, Londrina, v. 6, n. 3, p.169-177, jul. 2014.

ANTCZAK, M. S.; KUBIAK, A.; ANTCZAK, T.; BIELECKI, S. Enzymatic biodiesel synthesis – Key factors affecting efficiency of the process. **Renewable Energy**, v. 34, p. 1185-1194, 2009.

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

BALCÃO, V. M.; PAIVA, A. L.; MALCATA, X. Bioreactors with immobilized lipases: State of the art. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 18, p. 392-416, 1996.

BALCI, S.; DOGU, T.; YUCEL, H.. Pyrolysis kinetics of lignocellulosic materials. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, Turkey, v. 32, n. 11, p.2573-2579, nov. 1993.

BANDOSZ, T. J. **Activated carbon surfaces in environmental remediation**. New York: Elsevier, 2006. v. 7, p. 571.

BANSAL, R. C.; DONNET, J. B.; STOECKLI, F. **Active carbon**. New York: Marcel Decker, 1988.

BARBOSA, A.M., DEKKER, R.F.H.; HARDY, G.E. Veratryl alcohol as an inducer of laccase by an ascomycete, *Botryosphaeria* sp., when screened on the polymeric dye Poly R-478. **Letters in Applied Microbiology**, v. 23, p. 93-96, 1996.

BARBOSA, A.M., DEKKER, R.F.H., KURTBÖKE, I.; HARDY, G.E. *In-vivo* decolorisation of Poly R-478 as a method for screening ligninolytic microorganisms for use in bioremediation. **4th Pacific Rim Biotechnol. Conf.**, Melbourne, Australia, Feb 6-9, p. 88-90, 1995.

BARRETO, W. J. et al. Preparation, UV–vis, IR, EPR and resonance Raman study of Fe, Ni, Co and Zn dioxolene complexes. **Spectrochimica Acta Part A**, Londrina, v. 68, n. 1, p.612-618, jan. 2007.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 3.ed. Campinas: Editora da Unicamp, 2007. p.363-373.

BARTON, S. S.. The adsorption of methylene blue by active carbon. **Carbon**, Kingston, v. 25, n. 3, p.343-350, maio 1987.

BESTANI, B.; BENDERDOUCHE, N.; BENSTAALI, B.; BELHAKEM, M.; ADDOU, A. Methylene blue and iodine adsorption onto an activated desert plant. **Bioresource Technology**, Mostaganem, v. 99, n. 17, p.8441-8444, nov. 2008.

BOURGOIS, J.; BARTHOLIN, M. C.; GUYONNET, R. Thermal treatment of wood: analysis of the obtained product. **Wood Science and Technology**, New York, v. 23, n. 4, p. 303-310, Dec. 1989.

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.54-248, 1976.

- BREIVIK, H., HARALDSSON, G. G., KRISTINSSON, B.: Preparation of highly purified concentrates of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid. **Journal of American Oil Chemistry Society**, 74, 1425-1429 (1997).
- BRUNAUER, S.; EMMET, P. H.; TELLER, E.. Adsorption of Gases in Multimolecular Layers. **Journal Of The American Chemical Society**, Washington, v. 60, n. 2, p.309-319, fev. 1938.
- BUDZIAK, C. R.; MAIA, C. M. B. F.; MANGRICH, A. S.. Transformações químicas da matéria orgânica durante a compostagem de resíduos da indústria madeireira. **Química Nova**, Curitiba, v. 27, n. 3, p.399-403, jan. 2004.
- CHANDRA, R. **Advances in biodegradation and Bioremediation of Industrial Waste**. CRC Press: Boca Raton. 2015. 327 p.
- CHEN, Y.; ZHAI, S.; LIU, N.SONG, Y.; NA, Q.; SONG, X. Dye removal of activated carbons prepared from NaOH-pretreated rice husks by low-temperature solution-processed carbonization and H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> activation. **Bioresource Technology**, Dalian, v. 144, n. 1, p.401-409, set. 2013.
- CHERIFI, H.; FATIHA, B.; SALAH, H.. Kinetic studies on the adsorption of methylene blue onto vegetal fiber activated carbons. **Applied Surface Science**, Médéa, v. 282, n. 1, p.52-59, out. 2013.
- CHEUNG, C.w.; PORTER, J.f.; MCKAY, G.. Sorption kinetics for the removal of copper and zinc from effluents using bone char. **Separation And Purification Technology**, [s.l.], v. 19, n. 1-2, p.55-64, jun. 2000.
- CIOLA, R. **Fundamentos da catálise**. São Paulo: Moderna, 1981. 377 p.
- CLAUDINO, Andréia. **PREPARAÇÃO DE CARVÃO ATIVADO A PARTIR DE TURFA E SUA UTILIZAÇÃO NA REMOÇÃO DE POLUENTES**. 2003. 90 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.
- COUTO, Gabriela Martucci do. **Utilização da serragem de *Eucalyptus* sp. na preparação de carvões ativados**. 2009. 106 f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia da Madeira) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009
- DAUD, W. M. A. W.; ALI, W. S. W.. Comparison on pore development of activated carbon produced from palm shell and coconut shell. **Bioresource Technology**, Kuala Lumpur, v. 93, n. 1, p.63-69, maio 2004.
- DE, B. K., BHATTACHARYYA, D. K., BANDHU, C.: Enzymatic synthesis of fatty alcohol esters by alcoholysis. **Journal of American Oil Chemistry Society**, 76,45 I-453 (I 999).
- DENG, C. J.; LIU, R. H.; CAI, J. M.. State of art of biomass fast pyrolysis for bio-oil in China: A review. **Journal of the Energy Institute**, v. 81, n. 4, p. 211-217, dez. 2008.

DIMAURO, E. ; GUEDES, C. L. B.; PICCINATO, M. T.. EPR of Marine Diesel. **Applied Magnetic Resonance**, Londrina, v. 32, n. 1, p.303-309, out. 2007.

DINIZ, Juraci. **Conversão térmica de casca de arroz à baixa temperatura: produção de bioóleo e resíduo sílico-carbonoso adsorvente**. 2005. 185 f. Tese (Doutorado) - Curso de Química, Departamento de Química Analítica, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2005.

DURÁN-JIMÉNEZ, G.; HERNÁNDEZ-MONTOYA, V.; MONTES-MORÁN, M.A.; BONILHA-PETRICIOLET, A.; RANGEL-VÁZQUEZ, N. A. Adsorption of dyes with different molecular properties on activated carbons prepared from lignocellulosic wastes by Taguchi method. **Microporous And Mesoporous Materials**, Aguascalientes, v. 199, n. 1, p.99-107, nov. 2014.

DIAO, Y.; WALAWENDER, W. P.; FAN, L. T. Activated carbons prepared from phosphoric acid activation of grain sorghum. **Bioresource Technology**, Bera, v. 81, n. 1, p. 45-52, Jan. 2002.

EL-HENDAWY, A. A.; SAMRA, S. E.; GIRGIS, B. S.. Adsorption characteristics of activated carbons obtained from corncobs. **Colloids And Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, Cairo, v. 180, n. 3, p.209-221, maio 2001.

FAAIJ, A.; WALTER, A.; BAUVEN, A.; BEZZON, G.; ROCHA, J. D.; MAREIRA, J. R.; CRAIG, K. R.; OVENREND, R. P.; BAIN, R.L. Novas tecnologias para vetores modernos de energia de biomassa. In: ROSILLO-CALLE, F.; BAJAY, S. V.; ROTHMAN, H. (Org.). **Uso da biomassa para produção de energia na indústria brasileira**. Campinas: Unicamp, 2005. Cap. 9, p. 339-411.

FAN, M. Steam activation of chars produced from oat hulls and corn stover. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 93, n. 1, p.103-107, maio 2004.

FERNADES, R. **Adsorventes alternativos para remoção de fenol em Solução aquosa**. 2005. 78f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

FJERBAEK, L.; CHRISTENSEN, K. V.; NORDDAHL, B. A Review of the Current State of Biodiesel Production Using Enzymatic Transesterification. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 102, n. 5, p. 1297-1315, 2009.

FOUST, A. S.; WENZEL, L. A.; CLUMP, C. W.; MAUS, L.; ANDERSEN, L.B. **Principles of unit operations**. 2. ed. New York: J. Wiley, 1980.

FUJIWARA, M.; SHIOKAWA, K.; YOTSUYA, K.; MATSUMOTO, K. Immobilization of lipase from *Burkholderia cepacia* into calcium carbonate microcapsule and its use for enzymatic reactions in organic and aqueous media. **Journal Of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Tokyo, v. 109, n. 1, p.94-100, nov. 2014.

FUKUDA, H.; KONDO, A.; NODA, H., Review: Biodiesel Fuel Production By Transesterification Of Oils. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.92, n.5, p. 405-416, 2001.

GIANNAKOPOULOU, K.; LUKAS, M.; VASILIEV, A.; BRUNNER, C.; SCHNITZER, H.. Low pressure catalytic co-conversion of biogenic waste (rapeseed cake) and vegetable oil. **Bioresource Technology**, Carolina do Norte -EUA, v. 101, n. 9, p.3209-3219, maio 2010.

GHALY, A. E.; DAVE, D.; BROOKS, M. S.; BUDGE, S. Production of Biodiesel by Enzymatic Transesterification: Review. **American Journal of Biochemistry and Biotechnology** , v. 6, n.2, p. 54-76, 2010.

GHANEM, A. Trends in lipase-catalyzed asymmetric access to enantiomerically pure/enriched compounds. **Tetrahedron**, Oxford, v. 63, p. 1721-1754, 2007.

GHASEMI, J.; ASADPOUR, S. Thermodynamics' study of the adsorption process of methylene blue on activated carbon at different ionic strengths. **Journal of Chemical Thermodynamics**, London, v. 39, n. 6, p. 967-971, June 2007.

GONG, J.; LIU, J.; WAN, D.. Catalytic carbonization of polypropylene by the combined catalysis of activated carbon with Ni<sub>2</sub>O<sub>3</sub> into carbon nanotubes and its mechanism. **Applied Catalysis A: General**, Changchun, v. 449, n. 1, p.112-120, dez. 2012.

GUEDES, C. L. B.; DIMAURO, E.; ANTUNES, V. MANGRICH, A. S.. Photochemical weathering study of Brazilian petroleum by EPR spectroscopy. **Marine Chemistry**, Londrina, v. 84, n. 1, p.105-112, jul. 2003.

GUO, Yanping; ROCKSTRAW, David A.. Activated carbons prepared from rice hull by one-step phosphoric acid activation. **Microporous And Mesoporous Materials**, [s.l.], v. 100, n. 1-3, p.12-19, mar. 2007.

HADOUN, H.; SADAOU, Z.; SOUAMI, N.; SAHEL, D.; TOUMERT, I. Characterization of mesoporous carbon prepared from date stems by H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> chemical activation. **Applied Surface Science**, Algiers, v. 280, n. 1, p.1-7, set. 2013.

HEIDARI, A. et al. Adsorptive removal of CO<sub>2</sub> on highly microporous activated carbons prepared from Eucalyptus camaldulensis wood: Effect of chemical activation. **Journal Of The Taiwan Institute Of Chemical Engineers**, Noor, v. 45, n. 2, p.579-588, mar. 2014.

HESAS, Roozbeh Hoseinzadeh et al. Comparison of oil palm shell-based activated carbons produced by microwave and conventional heating methods using zinc chloride activation. **Journal Of Analytical And Applied Pyrolysis**, [s.l.], v. 104, p.176-184, nov. 2013.

HUANG, Yu-fong et al. Microwave pyrolysis of rice straw to produce biochar as an adsorbent for CO<sub>2</sub> capture. **Energy**, [s.l.], v. 84, p.75-82, maio 2015.

IOANNIDOU, O.; ZABANIOTOU, A.. Agricultural residues as precursors for activated carbon production—A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Thessaloniki, v. 11, n. 9, p.1966-2005, dez. 2007.

INTERNATIONAL UNION PURE APPLIED CHEMISTRY. **Handbook of chemistry and physics**. Oxford: Pergamum, 1982. v. 54, p. 2201.

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

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

JANKOWSKA, H.; ŚWIĄTKOWSKI, A.; CHOMA, J. *Active carbon*. Ellis Horwood Ltd, 1991.

JEGANNATHAN, Kenthorai Raman; ABANG, Sariah. Production of biodiesel using immobilized lipase: a critical review. **Critical Reviews In Biotechnology**, London, Uk, v. 28, n. , p.253-264, 27 fev. 2008.

JUHOLA, A. J.; WIIG, Edwin O.. Pore Structure in Activated Charcoal. II. Determination of Macro Pore Size Distribution. **J. Am. Chem. Soc.**, [s.l.], v. 71, n. 6, p.2078-2080, jun. 1949.

KIM, Y. N.; LEE, Y. C.; CHOI, M.. Complete degradation of perchlorate using Pd/N-doped activated carbon with adsorption/catalysis bifunctional roles. **Carbon**, Daejeon, v. 65, n. 1, p.315-323, dez. 2013.

KANDASAMY, R.; KENNEDY, L.; JOHN, V.; CHANDRAN, B.; RAMASAMY, S. 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, n. 1, , p. 58-65, jan. 2010.

KARAGÖZ, S.; TAY, T.; UCAR, S.; ERDEM, M. Activated carbons from waste biomass by sulfuric acid activation and their use on methylene blue adsorption. **Bioresource technology**, Bera, v. 99, n. 14, p. 6214-6222, Sept. 2008.

KLIJANIENKO, A.; LORENC-GRABOWSKA, E.; GRYGLEWICZ, G.. Development of mesoporosity during phosphoric acid activation of wood in steam atmosphere. **Bioresource Technology**, Wrocław, v. 99, n. 15, p.7208-7214, out. 2008.

KORNDÖRFER, G. H.; LEPSCH, I.. Chapter 7 Effect of silicon on plant growth and crop yield. **Studies In Plant Science**, Uberlândia, v. 8, n. 1, p.133-147, jun. 2007.

KUMAR, A. G.; SWARNALATHA, S.; KAMATCHI, P. SEKARAN, G. Immobilization of high catalytic acid protease on functionalized mesoporous activated carbon particles. **Biochemical Engineering Journal**, Tamilnadu, v. 43, n. 2, p.185-190, fev. 2009.

LAGERGREN, S., SVENSKA, B.K., Zur theorie der sogenannten adsorption geloester stoffe. *Vetenskapsakad. Handl.* 24, 1–39, 1898.

LANGMUIR, J. The adsorption of gases on planes of glassmica and platinum. **Journal of the American Chemical Society**, Easton, v. 40, n. 9, p. 1361, Sept. 1918.

LINKO, Y.-Y., LIIMSII, M., WU, X., UOSUKAINEN, W., SAPPILII, J., AND LINKO, P.: Biodegradable products by lipase biocatalysis. **Journal of Biotechnology**, 66,41-50 (1998).

LIOU, T. H.. Development of mesoporous structure and high adsorption capacity of biomass-based activated carbon by phosphoric acid and zinc chloride activation. **Biochemical Engineering Journal**, Taiwan, v. 158, n. 1, p.129-142, dez. 2008.

LIU, Yan et al. A sustainable route for the preparation of activated carbon and silica from rice husk ash. **Journal Of Hazardous Materials**, [s.l.], v. 186, n. 2-3, p.1314-1319, fev. 2011.

LUA, Aik Chong; YANG, Ting. Effect of activation temperature on the textural and chemical properties of potassium hydroxide activated carbon prepared from pistachio-nut shell. **Journal Of Colloid And Interface Science**, [s.l.], v. 274, n. 2, p.594-601, jun. 2004.

MAHADIK, N. D.; PUNTAMBEKAR, U. S.; BASTAWDE, K. B.; KHIRE, J. M.; GOKHALE, D. V. Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. **Process Biochemistry**, London, v. 38, p. 715-721, 2002.

MAHINPEY, N.; MURUGAN, P.; MANI, T.; RAINA, R. Analysis of Bio-Oil, Biogas, and Biochar from Pressurized Pyrolysis of Wheat Straw Using a Tubular Reactor. **Energy & Fuels**, Washington-EUA, v. 23, n. 5, p. 2736-2742. 2009.

MAHMOODI, N. M. et al. Dye removal from colored textile wastewater using chitosan in binary systems. **Desalination**, Tehran, v. 267, n. 1, p.64-72, fev. 2011.

MARTINS, A. F.; DINIZ, J.; STAHL, J. A.; CARDOSO, A. L. Caracterização dos produtos líquidos e do carvão da pirólise de serragem de eucalipto. **Química Nova. São Paulo**, v. 30, n. 4, p. 873-878, 2007.

MAVROGIORGOU, A. et al. Activated carbon functionalized with Mn(II) Schiff base complexes as efficient alkene oxidation catalysts: Solid support matters. **Journal Of Molecular Catalysis A: Chemical**, Ioannina, v. 393, n. 1, p.8-17, nov. 2014.

MCBRIDE, M. B. **Environmental Chemistry of Solids**. Oxford: Oxford University, 1994

MESSIAS, J. M. **Produção de lipases por *Botryosphaeria ribis* EC-01 em diferentes fontes de carbono**. 2008. 229 p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2008.

MITTELBAACH, M. Lipase catalyzed alcoholysis of sunflower oil. **Journal of American Oil Chemistry Society**, 67, 1688170 (1990).

MOENS, L.; BLACK, S. K.; MYERS, M. D.; CZERNIK, S.. Study of the Neutralization and Stabilization of a Mixed Hardwood Bio-Oil. **Energy & Fuels**, Washington-EUA, v. 23, n. 5, p.2695-2699, 30 mar. 2009.

MOHAN, D.; PITTMAN, C. U.; STEELE, P. H.. Pyrolysis of Wood/Biomass for Bio-Oil: A Critical Review. **Energy & Fuels**, Mississippi, v. 20, n. 1, p.848-889, out. 2006.

MORENO-PIRAJÁN, J. C.; GIRALDO, L.. Study of immobilized candida rugosa lipase for biodiesel fuel production from palm oil by flow microcalorimetry. **Arabian Journal Of Chemistry**, Bogotá, v. 4, n. 1, p.55-62, jan. 2011.

MUCCIACITO, J. C.. CONCEITOS E APLICAÇÕES DO CARVÃO ATIVADO. **Revista Meio Filtrante**, Santo André, v. 5, n. 22, p.1-1, set. 2006. Bimestral. Disponível em: <[http://www.meiofiltrante.com.br/materias\\_ver.asp?action=detalhe&id=254&revista=n22](http://www.meiofiltrante.com.br/materias_ver.asp?action=detalhe&id=254&revista=n22)>. Acesso em: 20 jan. 2015.

MUI, E. L. K. et al. Dye adsorption onto char from bamboo. **Journal Of Hazardous Materials**, Hong Kong, v. 177, n. 1-3, p.1001-1005, maio 2010.

MÜLLER-HAGEDORN, M. et al. A comparative kinetic study on the pyrolysis of three different wood species. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, Karlsruhe, v. 68-69, n. 1, p.231-249, ago. 2003.

MUÑOZ-GUILLENA, M. J. et al. Activated carbons from Spanish coals. 1. Two-stage carbon dioxide activation. **Energy & Fuels**, [s.l.], v. 6, n. 1, p.9-15, jan. 1992.

NAGARAJAN, S. New Tools for Exploring “Old Friends—Microbial Lipases”. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 168, p. 1163-1196, 2012.

NAHIL, M. A.; WILLIAMS, P. T. Pore Characteristics of Activated Carbons from the Phosphoric Acid Chemical Activation of Cotton Stalks. **Biomass and Bioenergy**, v. 37, p. 142-149, 2012.

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

NICOLINI, K. P. ; CASAGRANDE, M. ; JESUS, A.C. . **Pirólise de Biomassa em Baixas Temperaturas**. 1ª. ed. Campinas - SP: Átomo, 2013. 94p .

OMRI, Abdessalem; BENZINA, Mourad; AMMAR, Najwa. Preparation, modification and industrial application of activated carbon from almond shell. **Journal Of Industrial And Engineering Chemistry**, [s.l.], v. 19, n. 6, p.2092-2099, nov. 2013.

ORREGO, C. E. et al. Novel chitosan membranes as support for lipases immobilization: Characterization aspects. **Carbohydrate Polymers**, Manizales, v. 79, n. 1, p.9-16, jan. 2010.

QUIRÓS, M.; GARCÍA, A. B.; MONTES-MORÁN, M.a.. Influence of the support surface properties on the protein loading and activity of lipase/mesoporous carbon biocatalysts. **Carbon**, Oviedo, v. 49, n. 2, p.406-415, fev. 2011.

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

PARAWIRA, W.. Biotechnological production of biodiesel fuel using biocatalysed transesterification: A review. **Critical Reviews In Biotechnology**, Harare, v. 29, n. 2, p.82-93, jun. 2009.

PEREIRA, Fulvy Antonella Venturi. **IMPREGNAÇÃO DE CARVÃO ATIVADO PARA REMOÇÃO DE ENXOFRE DO ÓLEO DIESEL POR ADSORÇÃO**.2011. 164 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

PATNUKAO, P.; PAVASANT, P.. Activated carbon from Eucalyptus camaldulensis Dehn bark using phosphoric acid activation. **Bioresource Technology**, India, v. 99, n. 1, p.8540-8543, jan. 2008.

RAMANI, K.; BOOPATHY, R.; VIDYA, C.; KENNEDY, L. J.; VELAN, M. SEKARAN, G. Immobilisation of *Pseudomonas gessardii* acidic lipase derived from beef tallow onto mesoporous activated carbon and its application on hydrolysis of olive oil. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 986-992, 2010.

REINOSO, F. R.; SÁBIO, M. M. Textural and chemical characterization of microporous carbons. **Advances in Colloid and Interface Science**, Amsterdam, v. 76-77, p. 271-294, July 1998.

RESTIVO, J. et al. Metal assessment for the catalytic reduction of bromate in water under hydrogen. **Chemical Engineering Journal**, Porto, v. 263, n. 1, p.119-126, mar. 2015.

RIBEIRO, B. D.; CASTRO, A. M.; COELHO, M. A. Z.; FREIRE, D. M. G. Production and Use of Lipases in Bioenergy: A Review from the Feedstocks to Biodiesel Production. **Enzyme Research**, v. 2011, p. 1-16, 2011.

ROCHA J.D.; MESA PÉREZ J.M.; CORTEZ L.A.B.. Aspectos Teóricos e Práticos do Processo de Pirólise de Biomassa. In: **Curso “Energia na Indústria de Açúcar e Alcool”**. UNIFEI, Itajubá, julho de 2004.

RODRÍGUEZ-REINOSO, F. Activated carbon: structure, characterization, preparation and applications. **Introduction to carbon Technologies**. Alicante, v. 60, n. 1, p.119-126, 1997.

- RODRÍGUEZ-REINOSO, F. The role of carbon materials in heterogeneous catalysis. **Carbon**, Elmsford, v. 36, n. 3, p. 159-175, 1998.
- SABIO, M. M.; ALMANSA, C.; RODRIGUÉZ-REINOSO, F. Phosphoric Acid Activated Carbon Discs for Methane Adsorption. **Carbon**, v. 41, p. 2113-2119, 2003.
- SALIMA, A. et al. Application of *Ulva lactuca* and *Systoceira stricta* algae-based activated carbons to hazardous cationic dyes removal from industrial effluents. **Water Research**, Mostaganem, v. 47, n. 10, p.3375-3388, jun. 2013.
- SAXENA, R.K.; DAVIDSON, W. S.; SHEORAN, A.; GIRI, B. Purification and characterization of an alkaline thermostable lipase from *Aspergillus carneus*. **Process Biochemistry**, v.39, p.239-247, 2003.
- SCHIMMEL, Daiana. **ADSORÇÃO DOS CORANTES REATIVOS AZUL 5G E AZUL TURQUESA QG EM CARVÃO ATIVADO COMERCIAL**. 2008. 83 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Química, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo, 2008.
- SCHNEIDER, E. L. **Adsorção de compostos fenólicos sobre carvão ativado**. 2008. 79 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo.
- SELMI, B. AND THOMAS, D. Immobilized lipase-catalyzed ethanolysis of sunflower oil in solvent-free medium. **Journal of American Oil Chemistry Society**, 75,691-695 (1998).
- SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U.C. Production, purification, characterization, and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, v.19, p.627-662, 2001.
- SILVA, G. S.; INOUE, D. Y.; DORS G.; FURIGO-JUNIOR, A.; de CASTRO, H. F. Desempenho de diferentes lipases imobilizadas na síntese de biodiesel de óleo de palma. **Acta Scientiarum: Technology**, Lorena, v. 33, n. 2, p.197-203, jan. 2011.
- SINGHA, S.; SARKAR, U.; LUHARUKA, P.. Functionalized granular activated carbon and surface complexation with chromates and bi-chromates in wastewater. **Science Of The Total Environment**, West Bengal, v. 447, n. 1, p.472-487, mar. 2013.
- SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. Identificação Espectrofotométrica de Compostos Orgânicos. 6. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2000.
- SOMDUTTA, S.; SARKAR, U.; LUHARUKA, P.. Functionalized granular activated carbon and surface complexation with chromates and bi-chromates in wastewater. **Science Of The Total Environment**, West Bengal, v. 447, n. 1, p.472-487, fev. 2013.
- SONG, Min et al. The comparison of two activation techniques to prepare activated carbon from corn cob. **Biomass And Bioenergy**, [s.l.], v. 48, p.250-256, jan. 2013.

SUDARYANTO, Y. et al. High surface area activated carbon prepared from cassava peel by chemical activation. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 97, n. 5, p.734-739, mar. 2006.

SUN, Y. et al. Comparative study on characterization and adsorption properties of activated carbons with H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> and H<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> activation employing *Cyperus alternifolius* as precursor. **Chemical Engineering Journal**, Jinan, v. 1, n. 1, p.790-797, jan. 2011.

SYCH, N. V. et al. Porous structure and surface chemistry of phosphoric acid activated carbon from corncob. **Applied Surface Science**, Kyiv, v. 261, n. 1, p.75-82, nov. 2012.

THAJEEL, A. S.. Isotherm, Kinetic and Thermodynamic of Adsorption of Heavy Metal Ions onto Local Activated Carbon. **Aquatic Science And Technology**, Basrah, v. 1, n. 2, p.53-77, jul. 2013.

TENG, Hsisheng; YEH, Tien-sheng; HSU, Li-yeh. Preparation of activated carbon from bituminous coal with phosphoric acid activation. **Carbon**, [s.l.], v. 36, n. 9, p.1387-1395, set. 1998.

WINKLER, U.K.; STUCKMANN, M. Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. **Journal of Bacteriology**, v.138, p. 663-670, 1979.

XIONG, W.; ZHU, M.; DENG, L.; FU, Y.; GUO Q.. Esterification of Organic Acid in Bio-Oil using Acidic Ionic Liquid Catalysts. **Energy & Fuels**, Washington-EUA, v. 23, n. 4, p.2278-2283, 2009.

YANG, R. T. **Adsorbents: fundamentals and applications**. New Jersey: John Wiley, 2003. 130 p.

YASEMIN, B.; HALUK, A. A kinetics and thermodynamics study of methylene blue adsorption on wheat shells. **Desalination**, Amsterdam, v. 194, n. 2-3, p. 259-267, May 2006.

YUSO, A. M.; RUBIO, B.; IZQUIERDO, M. T.. Influence of activation atmosphere used in the chemical activation of almond shell on the characteristics and adsorption performance of activated carbons. **Fuel Processing Technology**, Zaragoza, v. 119, n. 1, p.74-80, 29 out. 2014.

ZABANIOTOU, A.; STAVROPOULOS, G.; SKOULOU, V.. Activated carbon from olive kernels in a two-stage process: Industrial improvement. **Bioresource Technology**, Thessaloniki, v. 99, n. 2, p.320-326, jan. 2008.

ZAMBRANA, Carolina Oliveira. **Regeneração de carvão ativado utilizado para adsorção de pesticida por meio de processos oxidativos avançados**. 2013. 99 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

ZENG, H; LIAO, K.; DENG, X. JIANG, H.; ZHANG, F. Characterization of the lipase immobilized on Mg–Al hydrotalcite for biodiesel. **Process Biochemistry**, Hunan, v. 44, n. 1, p.791-798, abr. 2009.

ZHANG, J. et al. Preparation and characterization of activated carbons from peanut shell and rice bran and a comparative study for Cr (IV) removal from aqueous solution. **Water Air Soil Pollut**, Jiangsu, v. 2032, n. 225, p.1-10, jun. 2014.

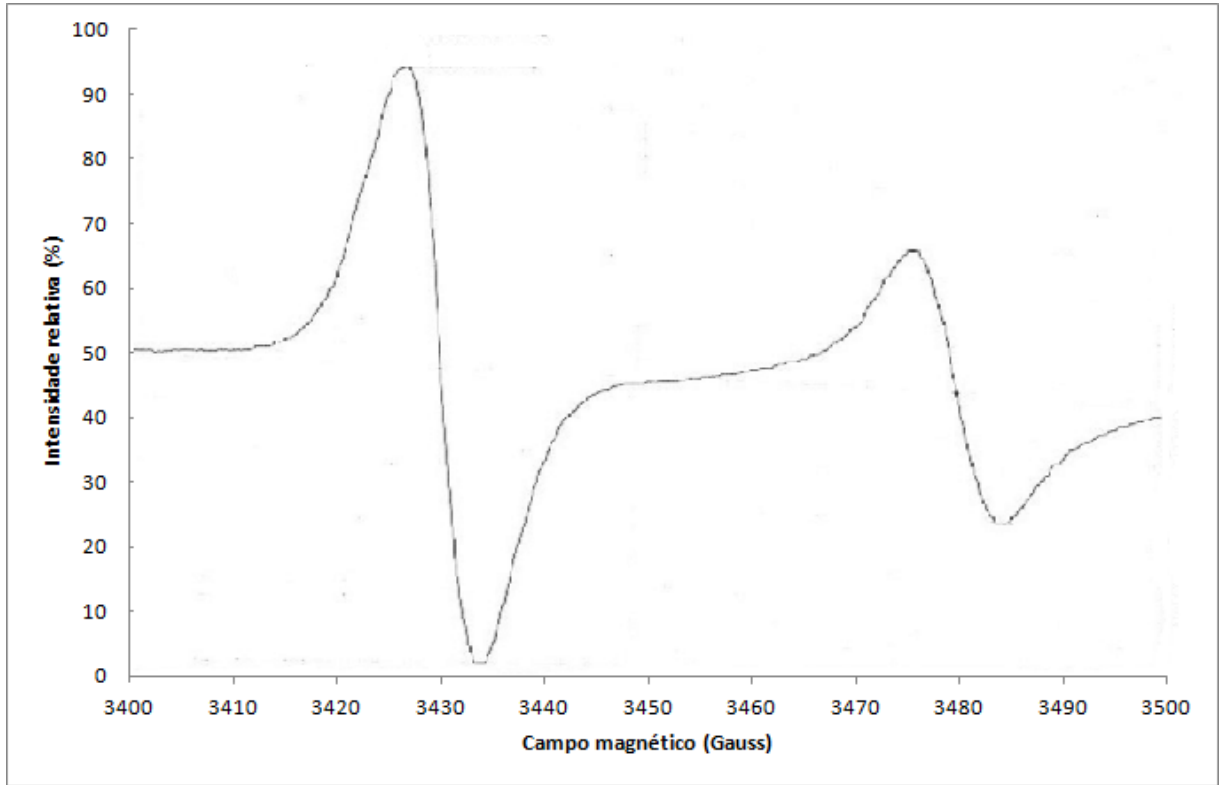
ZHOU, Z. et al. Immobilization of lipase in cage-type mesoporous organosilicas via covalent bonding and crosslinking. **Catalysis Today**, Erlangen, v. 243, n. 1, p.173-183, abr. 2015.

ZIVKOVIC, L. T. I. et al. Immobilization of *Candida rugosa* lipase by adsorption onto biosafe meso/macroporous silica and zirconia. **Biochemical Engineering Journal**, Belgrade, v. 93, n. 1, p.73-83, jan. 2015.

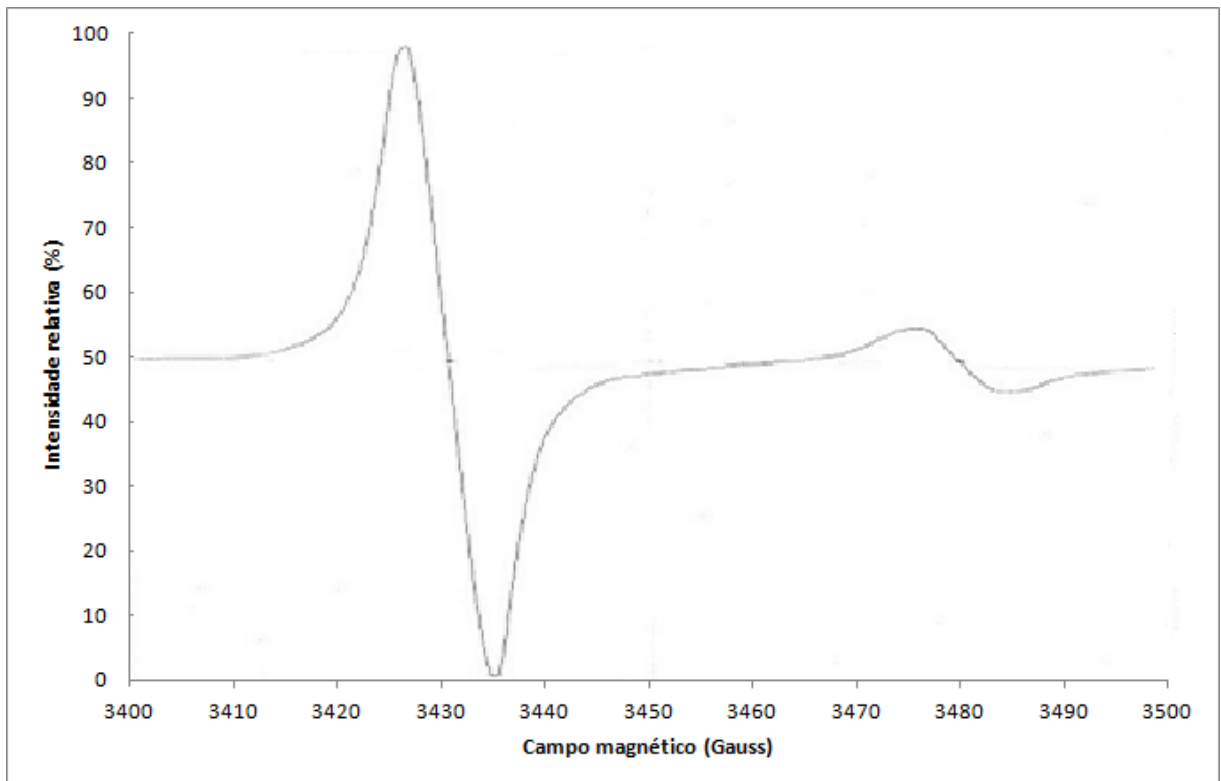
**ANEXOS**

**ANEXO A.** Espectros de Ressonância Paramagnética Eletrônica das amostras de biocarvões de pirólise com campo magnético  $3450 \pm 50$  Gauss.

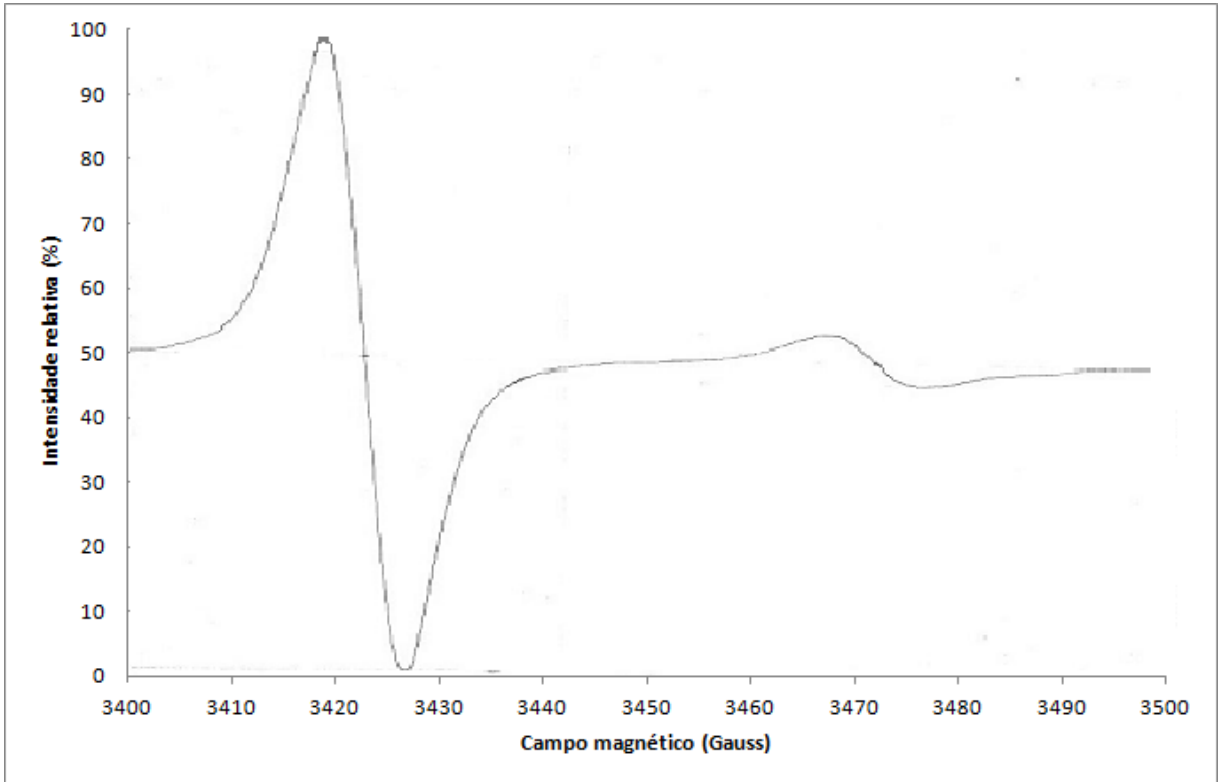
Carvão de palha de cana-de-açúcar sem ativação



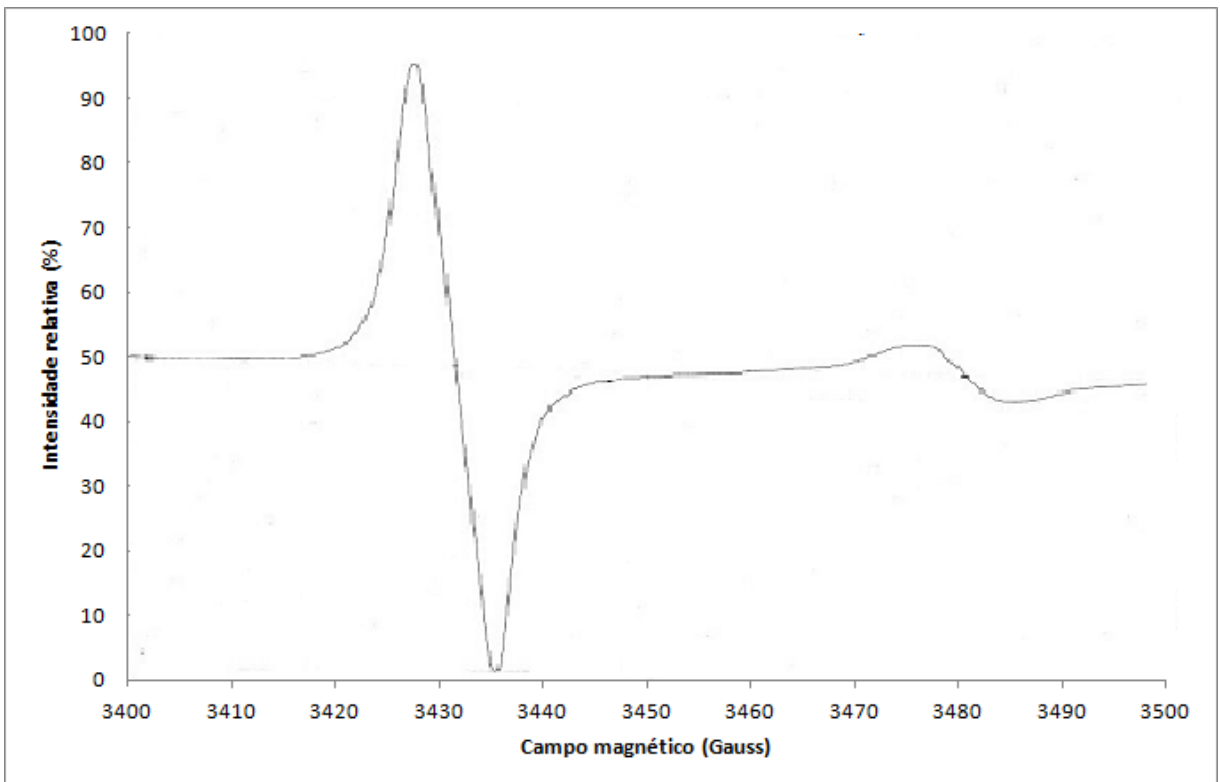
Carvão de palha de cana-de-açúcar ativado



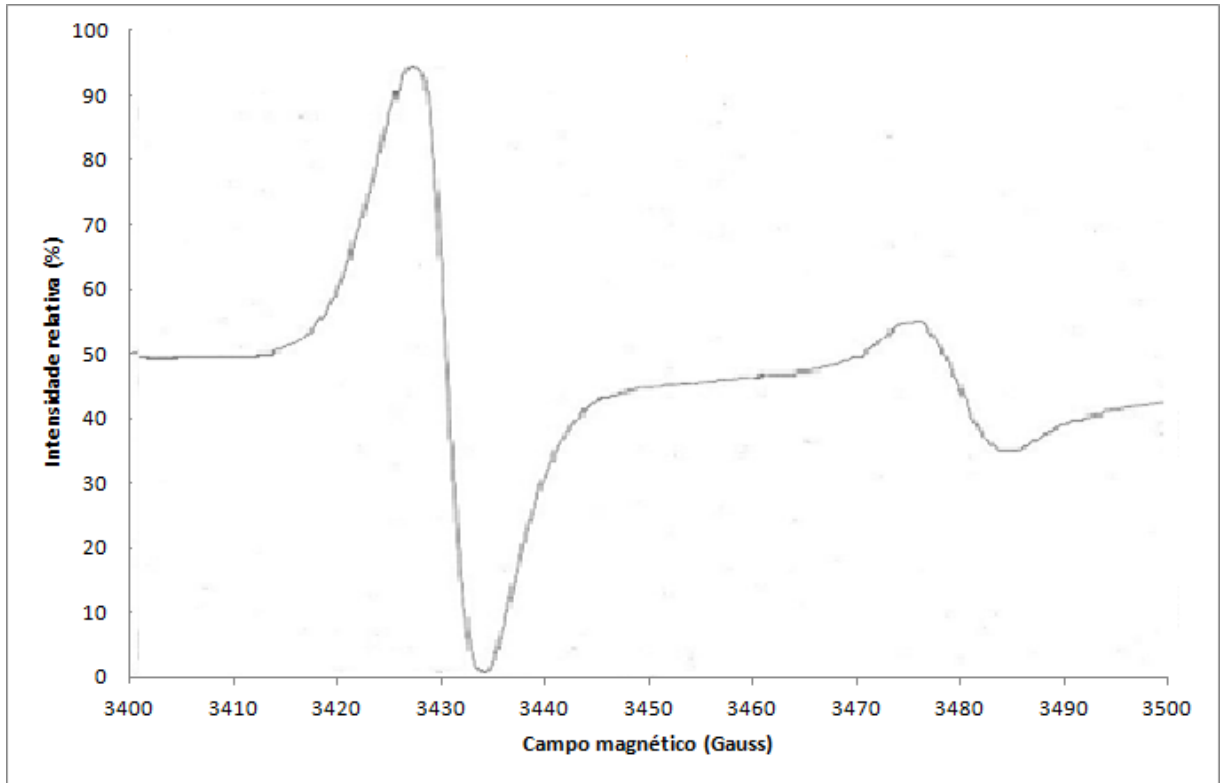
### Biocarvão de serragem de eucalipto sem ativação



### Biocarvão de serragem de eucalipto ativado



Biocarvão de serragem de peroba sem ativação



Biocarvão de serragem de peroba ativado

