



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

MYLENA JUNQUEIRA PINTO BRITO

**SÍNTESE DE CARVÕES ATIVADOS A PARTIR DE RESÍDUOS DA  
AGROINDÚSTRIA E SUA APLICAÇÃO NA IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE**

ITAPETINGA – BAHIA

MARÇO/2020

MYLENA JUNQUEIRA PINTO BRITO

**SÍNTESE DE CARVÕES ATIVADOS A PARTIR DE RESÍDUOS DA  
AGROINDÚSTRIA E SUA APLICAÇÃO NA IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE**

Tese de doutorado apresentada como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor junto ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB, Campus Juvino Oliveira.

**Orientadora:** DSc. Cristiane Martins Veloso

**Co-orientadores:** DSc. Renata Cristina Ferreira Bonomo

DSc. Lizzy Ayra Alcântara Veríssimo

DSc. Leandro Soares Santos

ITAPETINGA – BAHIA

MARÇO/2020

662.93 Brito, Mylena Junqueira Pinto.

B876s Síntese de carvões ativados a partir de resíduos da agroindústria e sua aplicação na imobilização de lipase. / Mylena Junqueira Pinto Brito. – Itapetinga-BA: UESB, 2020.

138 f.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Engenharia e Ciência de Alimentos. Sob a orientação da Prof. D. Sc. Cristiane Martins Veloso e coorientação da Prof. D. Sc. Renata Cristina Ferreira Bonomo; Prof<sup>a</sup>. D. Sc. Lizzy Ayra Alcântara Veríssimo e Prof. D. Sc. Leandro Soares Santos.

1. Carvão ativado – Produção – Resíduos da agroindústria. 2. Carvão ativado – Aplicação – Imobilização de lipase. 3. **Biocatalisadores – Aplicação – Acetato de isoamila**. I. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - Programa de Pós-Graduação de Doutorado em Engenharia e Ciências de Alimentos, *Campus* de Itapetinga. II. Veloso, Cristiane Martins. III. Bonomo, Renata Cristina Ferreira. IV. Veríssimo, Lizzy Ayra Alcântara. V. Santos, Leandro Soares. VI. Título.

**CDD(21): 662.93**

Catálogo na Fonte:

Cláudia Aparecida de Souza – CRB 1014-5<sup>a</sup> Região

Bibliotecária – UESB – Campus de Itapetinga-BA

Índice Sistemático para desdobramentos por Assunto:

1. Carvão ativado: Produção
2. Resíduos da agroindústria
3. Carvão ativado: Aplicação
4. Imobilização de lipase
5. Biocatalisadores
6. Acetato de isoamila
- 7.



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SÃO PAULO

Universidade Estadual de São Paulo - UNESP  
Instituto de Física, Química e Engenharia - IFQE  
R. Silva Mariz, 110 - Ilhópolis, SP - 13110-000



UESB



Governo do  
Estado de Bahia

## DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO

**Título:** SÍNTESE DE CARVÕES ATIVADOS A PARTIR DE RESÍDUOS DA AGROINDÚSTRIA E SUA APLICAÇÃO NA IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE

**Autor (a):** MYLENA JUNQUEIRA PINTO BRITO

**Orientador (a):** Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cristiane Martins Veloso

**Coorientador (a):** Prof. Dr. Leandro Soares Santos

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Renata Cristina Ferreira Bonomo

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Lizzy Ayra Alcantara Veríssimo

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

  
Prof. Dr. Leandro Soares Santos  
UESB

  
Prof. Dr. Nívio Batista Santana  
UESB

  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Alexilda Oliveira de Souza  
UESB

  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Elizama Aguiar de Oliveira  
Membro Externo - UESC

  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cristiane Martins Veloso  
Orientador - UESB  
Presidente da Banca

Itapetinga-BA, 04 de março de 2020.

*O coração do homem planeja o seu caminho, mas o Senhor  
lhe dirige os passos (Provérbios 16:9).*

*Consagre ao Senhor tudo que faz e seus planos serão bem  
sucedidos (Provérbios 16:3).*

*Dedico esta conquista ao meu pai Antônio  
e a minha mãe Tiana. Nós conseguimos  
juntos!*

## AGRADECIMENTOS

À Deus pelo dom da vida e por se fazer presente em todos os momentos firmes ou incertos, pois ao longo do caminho dessa jornada pude sentir a tua mão na minha, transmitindo-me a segurança necessária para chegar até aqui. Obrigada meu Deus, por abençoar minha vida, permitido que pessoas tão especiais estivessem ao meu redor durante essa caminhada. A Ti Senhor toda honra, toda glória e todo louvor!

À minha mãe Tiana e ao meu pai Antônio, pelo amor incondicional, pelo exemplo maior de dignidade, perseverança e fé. Vocês sempre foram os meus maiores incentivadores e são a razão dessa conquista!

Ao meu noivo Wesley por seu amor, apoio, compreensão e incentivo em todos os momentos. Obrigada por me acalmar nos dias difíceis me fazendo acreditar que eu iria conseguir. Te amo meu amor! Agradeço também a minha sogra Josenaide por cuidar tão bem de mim em Itapetinga.

À minha família, pelo carinho, atenção, e por sempre torcerem e vibrarem comigo em todas as conquistas, em especial a minha avó Moralina (*in memoria*) e minha tia Lindalva (*in memoria*).

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

Ao professor DSc. Leandro Soares Santos, por todo apoio, pelo incentivo de sempre, pelos conselhos e por dizer as palavras certas nos momentos oportunos.

À professora DSc. Renata Bonomo e a Professora DSc. Lizzy Ayra Alcântara Veríssimo, pela Co-orientação, e sugestões no desenvolvimento do trabalho.

A todos os professores do Laboratório de Engenharia de Processos (LEP) pelas inúmeras oportunidades e por estarem sempre dispostos a contribuir com a desenvolvimento de toda pesquisa.

À “Turma do carvão”: Matheus, Jéssica, Thainá e Keivisson, por se tornar a melhor equipe de trabalho que eu poderia ter.

A todos os colegas do (LEP) pela companhia, ajuda e momentos de descontração.

Às minhas amigas Allana e Ianna, pela amizade incondicional e que mesmo à distância sempre se preocuparam e torceram por mim.

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

Aos meus colegas da Embasa, especialmente Joyce, Rogério, Edmar e Anderson, por não medirem esforços para me ajudar todas as vezes que eu precisei ausentar do trabalho.

À Luciana, Lenara e Marília pela ajuda na execução da cromatografia.

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

À todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos pelos ensinamentos durante esse curso.

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

A Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia por proporcionar ensino gratuito e de qualidade.

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



## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	12
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	15
<b>RESUMO</b> .....	16
<b>ABSTRACT</b> .....	17
<b>CAPÍTULO 1</b> .....	18
<b>1. INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	19
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	20
2.1. Carvão Ativado .....	20
<b>2.1.2. Materiais precursores utilizados na produção do carvão ativado</b> .....	22
<b>2.1.3 Produção do carvão ativado</b> .....	26
2.2. Aplicação do carvão ativado na imobilização de enzimas .....	29
<b>2.2.1 Imobilização de enzimas</b> .....	29
<b>2.2.2 Lipases</b> .....	31
<b>2.2.3. Tipos de suportes empregados na imobilização de enzimas</b> .....	38
<b>2.2.4 Aplicação do carvão ativado como suporte na imobilização da lipase</b> .....	39
<b>2.2.5. Aplicações biotecnológicas das lipases na indústria de alimentos</b> .....	40
<b>3. OBJETIVO GERAL</b> .....	43
3.1 Objetivos Específicos .....	43
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	57
<b>Manuscript 1. Development of activated carbon from pupunha palm heart sheaths: effect of synthesis conditions and its application in lipase immobilization</b> .....	57
<b>ABSTRACT</b> .....	59
<b>1. Introduction</b> .....	59
<b>2. Materials and methods</b> .....	61
2.1 Materials .....	61
<b>2.2 Experimental design of the carbon synthesis</b> .....	61
<b>2.2.1 The activated carbon characterization</b> .....	62
2.3 Lipase immobilization by adsorption on activated carbon .....	62
2.4 Hydrolytic activity determination by titration method .....	63
2.5 Statistical analysis .....	63
2.6 FTIR spectroscopy and Scanning Electron Microscopy (SEM) .....	64
3.1 Effect of the synthesis conditions on the textural properties of activated carbon .....	64
3.2 Effect of pH on the adsorptive process .....	68

3.3 Adsorption kinetics of the enzyme on the support .....	70
3.4 Adsorption isotherms .....	75
3.5 Thermodynamic study of the adsorption process.....	77
3.6 FTIR spectroscopy .....	79
<b>4. Conclusion</b> .....	<b>81</b>
<b>CAPÍTULO 3</b> .....	<b>87</b>
<b>Manuscript 2. Lipase immobilization on activated and functionalized carbon for the aroma ester synthesis</b> .....	<b>87</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>89</b>
<b>1. Introduction</b> .....	<b>89</b>
<b>2. Materials and methods</b> .....	<b>91</b>
2.1 Synthesis, functionalization, and characterization of activated carbons and biocatalysts.	91
2.2 Lipase immobilization tests and determination of the biocatalysts hydrolytic capacity ...	92
2.3 Ester Synthesis .....	92
2.4 Operational stability .....	93
<b>2.5 Statistical analysis</b> .....	<b>93</b>
<b>3. Results and discussion</b> .....	<b>93</b>
<b>3.1 Characterization of the activated carbon and the functionalized carbon</b> .....	<b>93</b>
3.2 Effect of pH on the immobilization process.....	98
3.3 Effect of temperature on the immobilization process.....	99
3.4 Ester Synthesis .....	101
3.5 Operational stability .....	102
3.7 FTIR spectroscopy .....	104
<b>4. Conclusion</b> .....	<b>105</b>
<b>References</b> .....	<b>106</b>
<b>CAPÍTULO 4</b> .....	<b>112</b>
<b>Síntese de carvões ativados utilizando o bagaço do malte: aplicação na imobilização de lipase por adsorção e ligação covalente para emprego em reação de esterificação</b> .....	<b>112</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>113</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>113</b>
<b>2. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>115</b>
<b>2.1 Materiais</b> .....	<b>115</b>
<b>2.2 Planejamento Experimental das condições de síntese dos carvões ativados</b> .....	<b>115</b>
<b>2.2.1 Síntese dos carvões ativados</b> .....	<b>116</b>
<b>2.3 Funcionalização do carvão ativado</b> .....	<b>117</b>
<b>2.4 Caracterização do material precursor e dos carvões ativados</b> .....	<b>117</b>

2.5 Ensaio de imobilização da lipase.....	118
2.6 Determinação da atividade hidrolítica.....	118
2.7 Reação de esterificação .....	118
<b>2.7.1 Quantificação do ácido acético .....</b>	<b>119</b>
2.8 Estabilidade operacional .....	119
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>119</b>
<b>3.1 Composição do material precursor.....</b>	<b>119</b>
<b>3.2 Efeito das condições de síntese nas propriedades texturais do carvão ativado .</b>	<b>121</b>
<b>3.3 Caracterizações do carvão ativado e do carvão funcionalizado obtidos a partir das melhores condições de síntese.....</b>	<b>125</b>
<b>3.4 Aplicação do CAO e do CAFO na imobilização da lipase .....</b>	<b>128</b>
<b>3.5 Reação de esterificação .....</b>	<b>130</b>
<b>4. Conclusão .....</b>	<b>131</b>
<b>5. Referências.....</b>	<b>132</b>
<b>CAPÍTULO 5.....</b>	<b>138</b>
<b>Considerações finais.....</b>	<b>138</b>

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1

<b>Figura 1.</b> Principais constituintes da biomassa lignocelulósica.....	23
<b>Figura 2.</b> Métodos de imobilização de enzimas.....	31
<b>Figura 3.</b> Reações catalisadas por lipases.....	33
<b>Figura 4.</b> Ativação interfacial da lipase frente a um suporte hidrofóbico.....	36
<b>Figura 5.</b> Representação da reação de esterificação para a obtenção do acetato de isoamila.....	42

### CAPÍTULO 2

<b>Figure 1.</b> Pareto chart of the effects of the variables carbonization temperature (Temp), carbonization time (Time) and impregnation ratio (IR) on the surface area (a) and mean pore diameter (b) of activated carbons ( $p = 0.05$ ).....	64
<b>Figure 2.</b> Response surface graph and contour curve graph of the adjusted model for surface area $m^2g^{-1}$ (a and b) and average pore diameter (nm) (c and d) of the activated carbon as a function of the carbonization temperature ( $^{\circ}C$ ) and impregnation ratio.....	66
<b>Figure 3.</b> TG (a) and DTA (b) curves of the impregnated material at different impregnation ratios: C1P: 0333: 1; C2P: 0.873: 1; C3P: 1.667: 1; C4P: 2.460: 1; and C5P: 3.000: 1.....	67
<b>Figure 4.</b> Effect of pH on the immobilization capacity ( $C_{Imo}$ ) of the enzyme on the support (a) and hydrolytic activity of the free enzyme (FE) and the immobilized enzyme on the activated carbon (AC) ( $C_o = 6000 \text{ mg L}^{-1}$ ; $T = 25 \text{ }^{\circ}C$ ; Time = 4 h). Means followed by the same letter for pH values not differ significantly between them at $P < 0.05$ by Tukey's honest significant difference test.....	69
<b>Figure 5.</b> Adjustment of pseudo-first order kinetic (—), pseudo-second order kinetic (---) and Elovich model (— —) models for lipase adsorption on the activated carbon: (●) experimental data ( $C_o = 6000 \text{ mg L}^{-1}$ ; pH: 4.0; $T = 25 \text{ }^{\circ}C$ ; Time = 0 – 300 min).....	71
<b>Figure 6.</b> Adjustment of Weber and Morris models (a) and Boyd intraparticle diffusion model (b) for lipase adsorption on activated carbon: (●) experimental data.....	74

<b>Figure 7.</b> Adsorption isotherms of lipase on activated carbon: (a) 10 °C; (b) 20 °C (c) 30 °C. (●) experimental data; (—) Langmuir model; (----) Freundlich model (Conditions: $C_0 = 3.000-10.000 \text{ mg L}^{-1}$ ; pH: 4.0; Time = 120 min).....	77
<b>Figure 8.</b> FTIR spectroscopy of free lipase, activated carbon (AC) and the biocatalyst (ACI).....	80
<b>Figure 9.</b> Microscopy of the activated carbon (a) and carbon after lipase immobilization (b).....	81

### CAPÍTULO 3

<b>Figura 1. Fig. 1.</b> Nitrogen adsorption isotherms of activated carbon (○) and functionalized carbon (●) (a) and pore volume distribution of PAC (b) and PFC (c).....	95
<b>Fig. 2.</b> Scanning Electron Microscopy (SEM) of activated carbon (a) and functionalized carbon (b).....	96
<b>Fig. 3.</b> FTIR of activated carbon (PAC) and functionalized carbon (PFC).....	97
<b>Fig. 4.</b> Effect of pH on the immobilization capacity of the supports (a) and the hydrolytic activity of lipase immobilized on activated carbon (LPAC) and functionalized carbon (LPFC). Equal lowercase letters represent no significant differences ( $p > 0.05$ ) between the pH values for LPAC; equal uppercase letters represent no significant difference ( $p > 0.05$ ) between the pH values for the LPFC.....	99
<b>Fig. 5.</b> Effect of temperature on the immobilization capacity of the supports (a) and the hydrolytic activity of lipase immobilized on activated carbon (LPAC) and functionalized carbon (LPFC). Means followed by the same letter for each time interval did not differ significantly between them at $p < 0.05$ by Tukey's test.....	100
<b>Fig. 6.</b> Esterification yield (%) as a function of time for isoamyl acetate synthesis catalyzed by lipase from porcine pancreas immobilized on activated carbon (LPAC) and	

functionalized carbon (LPFC). Means followed by the same letter for each time interval did not differ significantly between them at $p < 0.05$ by Tukey's test.....	102
<b>Fig. 7.</b> Esterification yield of isoamyl acetate catalyzed by lipase from porcine pancreas immobilized by activated carbon (LPCA) and functionalized carbon (LPFC) as a function of the number of reuse cycles Means followed by the same letter for each cycle did not differ significantly at $p < 0.05$ using the Tukey's test.....	103
<b>Fig. 8.</b> Scanning Electron Microscopy of the biocatalysts LPCA (a) and LPFC (b)....	104
<b>Fig. 9.</b> FTIR of lipase, supports, and the biocatalysts activated carbon (a) and functionalized carbon (b).....	105

#### CAPÍTULO 4

<b>Figura 1.</b> Curvas de TG e DTA do material precursor.....	120
<b>Figura 2.</b> Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados das variáveis Temperatura de carbonização ( $X_1$ ), Tempo de carbonização ( $X_2$ ) e Razão de impregnação ( $X_3$ ) sobre o desenvolvimento da área superficial dos carvões ativados ( $p=0,05$ ).....	121
<b>Figura 3.</b> Gráfico de superfície de resposta (a) e gráfico de curva de contorno do modelo ajustado para a área superficial dos carvões ativados ( $m^2 g^{-1}$ ) em função da temperatura ( $^{\circ}C$ ) e do tempo (min) de carbonização.....	122
<b>Figura 4.</b> Curvas de TG (a) e DTA (b) do material impregnado em diferentes razões de impregnação: RI1:0333:1; RI2:0,873:1; RI3: 1,667:1; RI4: 2,460:1 e RI5: 3,000:1.....	124
<b>Figura 5.</b> Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) do carvão ativado (CAO) (a) e do carvão funcionalizado (CAOF) (b).....	127
<b>Figura 6.</b> FTIR do carvão ativado (CAO) e do carvão funcionalizado (CAOF).....	128
<b>Figura 7.</b> Ciclo de reutilização da lipase imobilizada carvão ativado (CAOI) para conversão de ácido acético na reação de esterificação do acetato de isoamila. As reações foram realizadas em hexano com razão molar do substrato de ácido acético: álcool isoamílico de 1:1, temperatura de $40^{\circ}C$ e 240 min de reação.....	131

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

<b>Tabela 1.</b> Composição de resíduos lignocelulósicos empregados na síntese de carvão ativado.....	24
---	----

### CAPÍTULO 2

<b>Table 1.</b> Variables and levels of the rotational central composite design ( $2^3$ ).....	62
<b>Table 2.</b> Parameters and coefficients of determination of kinetic models for the lipase immobilization on activated carbon.....	72
<b>Table 3.</b> Adjusted models of adsorption isotherms of determination of lipase immobilization on activated carbon.....	76
<b>Table 4.</b> Thermodynamic parameters of the lipase adsorption on activated carbon.....	78

### CAPÍTULO 3

<b>Table 1.</b> Textural properties of the activated and functionalized carbon.....	95
---	----

### CAPÍTULO 4

<b>Tabela 1.</b> Variáveis e níveis do delineamento composto central rotacional ( $2^3$ ).....	116
<b>Tabela 2.</b> Propriedades texturais dos suportes.....	126
<b>Tabela 3.</b> Capacidade de imobilização ( $C_{Im}$ ), Atividade específica, Eficiência de imobilização ( $Efic_{Im}$ ) da lipase imobilizada carvão ativado (CAOI) e no carvão funcionalizado (CAOFI).....	129
<b>Tabela 4.</b> Conversão do ácido acético em acetato de isoamila (Y), catalisada pela lipase imobilizada em carvão ativado (CAOI) e carvão funcionalizado (CAOFI). As reações foram realizadas em hexano com razão molar do substrato de ácido acético: álcool isoamílico de 1:1, temperatura de 40 °C e 240 min de reação.....	130

## RESUMO

BRITO, M.J.P. **Síntese de carvões ativados a partir de resíduos da agroindústria e sua aplicação na imobilização de lipase.** Itapetinga – BA: UESB, 2020. p.138 (Tese – Doutorado em Engenharia de Alimentos – Engenharia de Alimentos).

Os carvões ativados (CA) são materiais porosos que têm grande versatilidade industrial. Quando produzidos a partir de resíduos lignocelulósicos, torna-se uma opção vantajosa, devido ao custo reduzido de produção, ao se comparar com outras matrizes porosas. Neste sentido, carvões produzidos a partir de resíduos da agroindústria estão sendo ativados de maneiras diferentes, de modo a modificar as características químicas e texturais, dos carvões obtidos, permitindo dessa forma que os mesmos sejam empregados em uma maior gama de processos. Com isso, este trabalho teve como objetivos avaliar a influência da natureza da biomassa e das condições de síntese nas características texturais dos carvões ativados, promover a modificação da superfície dos materiais pelo processo de funcionalização e empregar os materiais porosos como suporte para imobilização da lipase, utilizando os biocatalisadores obtidos na produção de ésteres de aroma. Os carvões ativados foram produzidos pelo método de ativação química, utilizando o ácido fosfórico como agente ativante, e resíduos agroindustriais com composição lignocelulósica distintas (bainhas do palmito de pupunha e do bagaço do malte) como precursor de carbono. O Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) foi empregado como ferramenta estatística para identificar as melhores condições de síntese, incluindo temperatura de carbonização, tempo de carbonização e razão de impregnação. Os resultados mostraram que o desenvolvimento da área superficial e porosidade do CA são influenciadas principalmente pela composição lignocelulósica do material precursor, uma vez que o carvão produzido a partir das bainhas do palmito da pupunha apresentou uma maior área superficial ( $1598 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ ) que o sintetizado a partir do bagaço do malte ( $900 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ ). Os CA produzidos nas melhores condições, para ambos os resíduos, foram funcionalizados pelo método do glutaraldeído. Com isso, a lipase de pâncreas de porco (LPP) foi imobilizada pelo método de adsorção, nos carvões ativados, e pelo método de ligação covalente nos suportes funcionalizados. Os experimentos de imobilização foram conduzidos em batelada sob diferentes condições de pH e temperatura. De maneira geral, observou-se que os suportes apresentam características químicas e texturais que favoreceram o processo de imobilização da lipase, sendo que tanto os carvões ativados quanto os funcionalizados apresentaram capacidade adsorptiva superior a  $100 \text{ mg.g}^{-1}$  e atividade de específica maior que  $0,126 \text{ U.mg}^{-1}$ , resultados esses, que possibilitaram o sucesso da aplicação dos biocatalisadores na síntese do acetato de isoamila (aroma da banana), empregando-se ácido acético e álcool isoamílico como substrato, sendo alcançadas conversões em torno de 89% a 95% para a enzima imobilizada por adsorção e ligação covalente respectivamente. A avaliação da estabilidade operacional mostrou que os biocatalisadores podem ser reutilizados por pelo menos cinco vezes consecutivas sem perdas significativas da atividade catalítica. Estes resultados indicam que os carvões ativados e os carvões funcionalizados, são suportes promissores para imobilização de lipase, uma vez que os biocatalisadores produzidos apresentaram elevada atividade e possibilidade de reutilização na síntese de éster.

**Palavras-Chave:** acetato de isoamila; biocatalisadores; funcionalização; suportes porosos.



## ABSTRACT

BRITO, M.J.P. **Synthesis of activated carbon from agro-industrial waste and its application in lipase immobilization.** Itapetinga – BA: UESB, 2020. p.138 (Tese – Doutorado em Engenharia de Alimentos – Engenharia de Alimentos).

Activated carbons (AC) are porous materials that have great industrial versatility. When produced from lignocellulosic residues, it is considered an advantageous option, due to the reduced cost of production, when compared with other porous matrices. In this sense, coals produced from agroindustrial residues are being activated in different ways, in order to modify the chemical and textural characteristics, thus allowing them to be used in a greater range of processes. Thus, this work aimed to evaluate the influence of several parameters (nature of biomass and conditions of synthesis) on the textural characteristics of activated carbon, to promote the modification of the surface of the materials by the functionalization process and to use porous materials as a support for immobilization of lipase, using biocatalysts in the production of aroma esters. Activated coals were produced by the chemical activation method, using phosphoric acid as an activating agent, and agro-industrial residues with distinct lignocellulosic composition (sheaths of pupunha palm and malt bagasse) as a carbon precursor. The Central Rotational Composite Design (DCCR) was used as a statistical tool to identify the best synthesis conditions, including carbonization temperature, carbonization time and impregnation ratio. The results showed that the development of the AC surface and porosity are influenced mainly by the lignocellulosic composition of the precursor carbon material, since the charcoal produced from the pupunha palm heart sheaths showed a higher SBET ( $1598 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ ) than synthesized from malt bagasse ( $900 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ ). The AC produced in the best conditions, for both residues, were also functionalized by the glutaraldehyde method. As a result, porcine pancreatic lipase (LPP) was immobilized by the adsorption method, on activated carbons, and by the covalent bond method on functionalized supports. The immobilization experiments were carried out in batches under different pH and temperature conditions. In general, it was observed that the supports have chemical and textural characteristics that favored the lipase immobilization process, with both activated and functionalized carbons having good adsorptive capacity ( $> 100 \text{ mg/g}$ ) and specific activity ( $> 0.126 \text{ U/mg}$ ), these results, which made possible the successful application of biocatalysts in the synthesis of isoamyl acetate (banana flavour), using acetic acid and isoamyl alcohol as a substrate, achieving conversions around 89% to 95% for the enzyme immobilized by adsorption and covalent bonding respectively. The evaluation of operational stability showed that biocatalysts can be reused for at least five consecutive times without significant losses of catalytic activity. These results indicate that activated carbons and functionalized carbons are promising supports for immobilizing lipase, since the biocatalysts produced showed high activity and the possibility of reuse in ester synthesis.

Keywords: isoamyl acetate; biocatalysts; functionalization; porous supports.

## **CAPÍTULO 1**

---

**Introdução Geral**

**Revisão de literatura**

**Objetivos**

---

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

O carvão ativado (CA) é um material carbonáceo, detentor de uma estrutura porosa desenvolvida, elevada área superficial específica, com presença de heteroátomos (O, N e H) em sua superfície, e que são obtidos basicamente por processos que contam com a carbonização do material precursor de carbono e sua ativação, que podem ocorrer simultaneamente ou em etapas distintas (ANDRADE et al., 2018; RANGABHASHIYAM e BALASUBRAMANIAN, 2019).

Os precursores utilizados na produção do CA são materiais que possuem alto teor de carbono e baixo teor de compostos inorgânicos, características essas presentes em vários resíduos agroindustriais, tais como cascas, sementes, madeiras e bagaços (GONZÁLEZ-GARCÍA, 2018). Quando produzidos a partir desses, tona-se uma opção vantajosa, devido ao custo reduzido de produção, ao se comparar com outras matrizes. Além disso, são matérias primas diversas, abundantes, renováveis e contribuem ainda com a diminuição dos custos da eliminação de resíduos e o impacto negativo do descarte inadequado ao meio ambiente (PEREIRA et al., 2014; NAN et al., 2017).

Carvões produzidos a partir de vários resíduos lignocelulósicos estão sendo ativados de maneiras diferentes, de modo a maximizar as suas áreas superficiais e aumentar sua porosidade, permitindo dessa forma que os mesmos sejam empregados em uma maior gama de processos. Processos esses, em que tais características são essenciais, como por exemplo, na utilização como suporte para imobilização de enzimas, com destaque em especial à lipase (BRITO et al., 2017; ALMEIDA et al., 2017; DHAWANE et al., 2018).

As lipases (triacilglicerol acilhidrolases, E.C.3.1.1.3), compreendem um grupo de enzimas hidrolíticas que atuam geralmente na interface orgânico-aquosa, catalisando a hidrólise e a síntese de ésteres formados por glicerol e ácidos graxos de cadeia longa (PAQUES e MACEDO, 2006; LIMA et al., 2019). O potencial biocatalítico das lipases é de interesse para diversos setores industriais, tais como a indústria farmacêutica, de detergentes, alimentícias, química fina, entre outras (JAWED et al., 2019; LIMA et al., 2019; MOAZENI et al., 2019).

Essas enzimas têm mostrado bons resultados como biocatalisadores na obtenção de aromas (SARNO et al., 2017). Sabe-se que os ésteres de aroma são formados pela reação de esterificação direta de um ácido carboxílico com um álcool na presença de catalisador, com a opção de ser realizada na presença (ou não) de solvente orgânico e

podem ser obtidos por via natural, química ou biotecnológica (SÁ et al., 2017; ASMAT et al., 2019). A síntese biotecnológica oferece um alto rendimento em comparação com a síntese química e acelera as reações em até  $10^8$ - $10^{15}$  vezes, requer condições moderadas para reação e o produto, assim gerado, pode ser caracterizado como natural ou idêntico ao natural, sendo, portanto, de grande interesse para a indústria de alimentos (GUMEL e ANNUAR, 2016; SÁ et al., 2017).

Vale ressaltar que apesar das inúmeras vantagens da aplicação da biotecnologia para produção de aromas, um fator importante a ser considerado é o custo da própria enzima, que é uma desvantagem para o processo biotecnológico comparado com a síntese química. Neste sentido a imobilização enzimática, destaca-se como uma das estratégias mais promissoras para superar tal inconveniente, uma vez que permite que a enzima seja reutilizada várias vezes, mantendo a sua atividade, e em alguns casos promovendo a melhoria da eficiência catalítica da enzima (SARNO et al., 2017; VERÍSSIMO et al., 2018).

Lipases podem ser imobilizadas por uma variedade de métodos, tais como encapsulamento (AWADALLAK et al., 2014), por ligação cruzada (KATO et al., 2011), ligação covalente (GAO et al., 2018) ou adsorção (DHAWANE et al., 2018). A imobilização de biomoléculas por adsorção e formação de ligação covalente, utilizando carvão ativado como suporte (RAMANI et al., 2012; BRITO et al., 2017), vem atraindo muita atenção devido as características físicas e químicas dessa matriz. Diante de tal contexto, neste trabalho foi avaliada a influência de diferentes parâmetros (temperatura, tempo de carbonização e razão de impregnação) na síntese de carvões ativados com elevada área superficial e grande volume de micro e mesoporos, utilizando como fontes precursoras de carbono bainhas do palmito de pupunha e do bagaço do malte. Os CA produzidos nas melhores condições, para ambos resíduos, foram funcionalizados pelo método do glutaraldeído. Com isso, a lipase de pâncreas de porco (LPP) foi imobilizada pelo método de adsorção, nos carvões ativados, e pelo método da ligação covalente nos suportes funcionalizados, sendo os biocatalisadores empregados na síntese do éster acetato de isoamila (aroma da banana).

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1. Carvão Ativado**

O carvão ativado (CA) é uma forma microcristalina, não grafítica de carbono. Apresenta-se como um sólido predominantemente amorfo, na forma de pó ou granulado,

que foi processado para desenvolver porosidade interna, aumentando a área superficial e o volume dos poros (MAHAMAD, ZAINI e ZAKARIA, 2015; DANISH et al., 2018). A capacidade de adsorção do CA é determinada pela sua porosidade interna, área superficial, distribuição de tamanho e volume de poro e pela presença de grupos funcionais em sua superfície, os quais são significativamente afetados pelas propriedades físicas e químicas do precursor, pelo método de preparação e as condições de ativação (HESASA et al., 2013; BRITO et al., 2018).

As propriedades físicas da superfície do carvão ativado são descritas pela área superficial específica e porosidade, enquanto que as propriedades químicas dependem da presença ou ausência de grupos ácidos ou básicos sobre sua superfície (YAHYA et al., 2015). A área superficial específica do carvão ativado geralmente se estende de  $80 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$  a  $1600 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ . Muitas vezes esse parâmetro é um indicador chave do poder adsorptivo do carvão ativado. Os poros, por sua vez, são classificados em três grupos, em função do diâmetro como microporos (menor que 2 nm), mesoporos (entre 2 nm e 50 nm) e macroporos (maior que 50 nm), segundo a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC, 1982). As determinações das propriedades físicas são fundamentais, uma vez que a estrutura dos poros limita as dimensões das moléculas que podem ser adsorvidas e a área superficial disponível limita a quantidade de substrato que pode ser adsorvido pela matriz (BRITO et al., 2017; ALMEIDA et al., 2017). Os carvões ativados preparados convencionalmente são predominantemente microporosos, implicando na necessidade de tratamentos específicos durante a síntese que favoreçam a formação de poros mais largos, acessíveis a moléculas maiores. Tais moléculas exigem não apenas elevada área superficial, mas também um maior volume de meso e macroporos na estrutura do carvão, visto que o diâmetro dos microporos permite o acesso exclusivo de adsorvatos pequenos, como o caso de moléculas gasosas (PEREIRA et al., 2014).

A química superficial dos materiais carbonosos, por sua vez, depende essencialmente, de seu conteúdo de heteroátomos, principalmente de seu conteúdo em complexos superficiais de oxigênio. A superfície do carvão apresenta características químicas ácidas e básicas; as ácidas associam-se às funções oxigenadas, como carboxilas, lactonas e fenóis. De outro lado, as funções como piranos, éter, hidroxilas e carbonilas são responsáveis pelas propriedades básicas na superfície do carvão. Esses grupos funcionais, podem afetar a capacidade de adsorção e podem ser modificados por tratamentos térmicos e químicos (RODRIGUEZ-REINOSO, 2006).

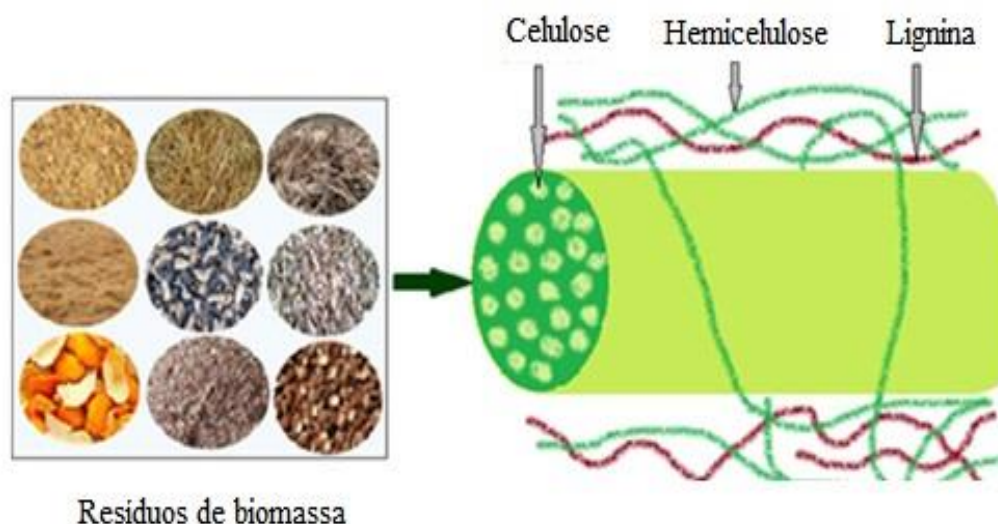
### **2.1.2. Materiais precursores utilizados na produção do carvão ativado**

Os precursores utilizados na produção do CA são materiais que possuem alto teor de carbono e baixo teor de compostos inorgânicos, características essas presentes em vários resíduos agroindustriais, tais como cascas, sementes, madeiras e bagaços (GONZÁLEZ-GARCÍA, 2018). Os resíduos de biomassa são considerados insumos importantes para a preparação de carvões ativados, pois além de apresentarem em sua composição um elevado teor de matérias voláteis, característica essa que permite a obtenção de um adsorvente com uma estrutura altamente porosa, são matérias primas diversas, abundantes e renováveis e contribuem ainda com a diminuição dos custos da eliminação de resíduos e o impacto negativo ao meio ambiente (OKMAN et al., 2014; (RANGABHASHIYAM e BALASUBRAMANIAN, 2019). Ademais, a produção de carvões ativados a partir desses materiais, vem atender as exigências atuais por processos sustentáveis que contemplem os princípios da química verde e sustentabilidade.

Os compostos lignocelulósicos são os materiais orgânicos mais abundantes da biosfera. Estes materiais são constituídos por três frações poliméricas principais (Figura 1), unidas entre si por uma rede complexa de ligações covalentes, composta principalmente por: celulose (20 % a 60 %), lignina (10 % a 40 %) e hemicelulose (10 % a 35 %), sendo a concentração de cada um desses elementos variável de acordo com o tipo de matéria-prima em questão, estágio vegetativo, condições de cultivo, entre outros (ABDOLALI et al., 2014; SONIL et al., 2014; YU et al., 2017).

A celulose é o principal constituinte da biomassa lignocelulósica, composto por unidades repetitivas de D-glucose em cada anel de piranose. Internamente, as fibrilas da fração celulósica, polissacarídeos compostos por glicose, encontram-se dispostas como espirais, de forma a conferir força e flexibilidade ao material (DEMIRBAS, 2009). Esta fração encontra-se envolvida pela lignina, polímero aromático heterogêneo formado por ligações éter biologicamente estáveis, que está presente principalmente na camada externa das fibras, sendo responsável pela rigidez estrutural, impermeabilidade, retenção das fibras de polissacáridos e resistência a ataques microbiológicos e mecânicos aos tecidos vegetais (JIBRIL et al., 2008; KAN et al., 2007). A terceira e última fração principal, a hemicelulose, atua como um elo químico entre a celulose e a lignina, apresentando natureza heteropolissacarídica ramificada, formada, principalmente, por blocos de construção de pentoses (xilose, raminose e arabinose), hexoses (glicose, manose e galactose), ácidos urônicos (ácidos 4-O-metilglucurônico e galacturônico) e radicais acetila (DHYANI e BHASKAR, 2017; DANISH et al., 2018).

**Figura 1.** Principais constituintes da biomassa lignocelulósica



Adaptada de Rangabhashiyam et al. (2019).

A composição do material lignocelulósico empregado como precursor de carbono, é um fator determinante nas características do carvão ativado, uma vez que esses componentes tendem a sofrer decomposição em diferentes etapas durante a ativação e processo de pirólise. No intervalo de temperatura entre 150-275 °C ocorre maior degradação da hemicelulose e menor degradação da celulose e lignina (YANG et al., 2007). As ramificações presentes na hemicelulose são facilmente removidas da cadeia principal do resíduo e degradam-se em compostos voláteis como CO, CO<sub>2</sub> e alguns hidrocarbonetos em baixas temperaturas (YANG et al., 2007). Posteriormente a celulose é degradada, de modo que sua quebra ocorre na faixa de temperatura de 260-350 °C, havendo elevada liberação de CO, CO<sub>2</sub> e CH<sub>4</sub>. Pôr fim, a lignina se degrada na faixa de 280-500 °C, caracterizando-se por ser o componente que apresenta maior resistência à degradação térmica, além disso, esta fração é a principal responsável pela massa de carbono fixa (MACEDO et al., 2008; JAIN e TRIPATHI, 2014; SILVA et al., 2016). Vale ressaltar que além da composição lignocelulósica do precursor e da temperatura de pirólise, as transformações térmicas de celulose, hemicelulose e lignina dependerão também das condições de síntese de carvão, tais como: tipo de ativação, natureza química do agente ativante, os gases atmosféricos presentes, entre outros (NAN et al., 2017). Na Tabela 1 estão apresentadas a composição química de resíduos lignocelulósicos que vem sendo utilizados na produção do carvão ativado.

De maneira geral estudos demonstram que materiais precursores que possuem teores de celulose e hemicelulose superiores aos de lignina podem ser mais facilmente ativados, levando, conseqüentemente, ao aumento da porosidade do carvão produzido. Isto ocorre, pois a celulose e a hemicelulose são as frações voláteis removidas durante os processos de pirólise e ativação, causando o desenvolvimento de poros, enquanto que a lignina, que confere rigidez à matriz de biomassa, é o constituinte de mais difícil volatilização. Vale ressaltar ainda, que a lignina é a principal responsável pela formação da massa de carbono fixo do carvão, proporcionando maiores rendimentos do carvão durante sua síntese, devido ao fato da sua estrutura apresentar uma maior estabilidade durante a etapa de carbonização (MULEY et al., 2016; SELVARAJU e BAKAR, 2017).

**Tabela 1.** Composição de resíduos lignocelulósicos empregados na síntese de carvão ativado.

<b>Resíduo lignocelulósico</b>	<b>Celulose (%)</b>	<b>Hemicelulose (%)</b>	<b>Lignina (%)</b>	<b>Referência</b>
Casca da amêndoa	32,5	25,5	24,8	GONZALEZ et al., 2009
Casca de cacau	13,2	10,8	16,4	PEREIRA et al., 2014
Bagaço da cana de açúcar	42,2	36,0	19,3	CHEN et al., 2012
Casca do coco	15,0	35,0	50,0	CAGNON et al., 2009
Casca do coco	29,0	15,0	31,0	VAIBHAV e THALLADA, 2017
Bagaço do sorgo	45,0	25,0	18,0	ABDOLALI et al., 2014
Pinheiro	46,0	24,0	27,0	YU et al., 2017

### **2.1.2.1 Resíduo precursor para produção do carvão ativado – bainhas do palmito pupunha e bagaço do malte**

O descarte de resíduos agroindustriais, caracterizados por conterem uma grande quantidade de biomassa rica em celulose, hemicelulose e lignina, representa um crescente



problema devido ao aumento da produção. As indústrias produzem resíduos que aumentam o potencial poluidor no ambiente associado à disposição inadequada destes que, além da poluição dos solos e de corpos hídricos, acarretam problemas de saúde pública (ROSA et al., 2011).

O cultivo de palmeiras para a produção de palmito em conserva, por exemplo, é uma atividade comum no sul do Brasil. Porém, seu crescimento é preocupante, pois há uma grande geração de resíduos sólidos decorrentes do beneficiamento do palmito (SCHMITZ, 2015). O palmito comercializado é encontrado na parte superior das palmeiras, onde formam-se as folhas, sendo envolto por camadas de proteção ou bainhas. A camada externa, que envolve o palmito, é fibrosa e não é utilizada na industrialização do palmito, representando de 25 à 35% do seu peso seco, dependendo da espécie. A segunda camada, denominada bainha mediana ou semi-fibrosa, representa de 25 à 30% e descartada no processamento do palmito. Por fim, tem-se o miolo, denominado palmito, que contém menor teor de fibras, e corresponde à porção em que se produz o palmito em conserva (LIMA e MARCONDES, 2002). Estima-se que a cada corte de palmeira de pupunha, extrai-se cerca de 400 g de palmito comercial, gerando-se aproximadamente 13 kg de resíduos que incluem estipe, folhas e bainhas, e parte deste material permanece no local da colheita ou do processamento, sem nenhuma finalidade prática (FERMINO et al. 2014).

Outra indústria com grande potencial poluidor, são as cervejeiras. Este seguimento produz grandes quantidades de resíduos, durante o seu processamento, tais como levedura cervejeira, o bagaço de malte e o lodo da estação de tratamento de efluentes. Desses, o principal resíduo gerado é o bagaço de malte, em relação à quantidade ser maior comparado aos demais, pois gera cerca de 85% dos subprodutos do processamento. O bagaço de malte é o resíduo sólido, de composição lignocelulósica e rico em proteína e que contém entre 40-50% de polissacarídeos em base seca (MACHEINER et al., 2003). Além de fibra e proteína, o bagaço é composto por cinzas, lipídeos, minerais (menos de 0,5%), vitaminas e aminoácidos. O bagaço de malte ou resíduo úmido de cervejeira é caracterizado como agente de alta carga poluidora, quando descartados de maneira inadequada no meio ambiente (VIERA, 2006; BROCHIER, 2007). Segundo Aliyu e Bala (2011), ao final do processo da cerveja, cerca de 20% é bagaço, isto é, para cada 100 litros de cerveja, são obtidos 20 kg do resíduo. Devido a isso, se tem dado grande importância para minimizar ou reaproveitar os resíduos sólidos gerados neste processo.

### 2.1.3 Produção do carvão ativado

Uma vez determinado a fonte precursora de carbono, os carvões ativados são obtidos por processos que contam com a carbonização do material precursor e sua ativação, que podem ocorrer simultaneamente ou em etapas distintas. A carbonização consiste no tratamento térmico (pirólise) do material precursor em atmosfera inerte ou não, em temperaturas que variam entre 400 °C e 850 °C. Nesta etapa são removidos componentes voláteis e gases leves (CO, H<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> e CH<sub>4</sub>), produzindo uma massa de carbono fixo e uma estrutura porosa primária que favorece a ativação posterior (KETCH et al., 2012). A ativação consiste em submeter o material carbonizado a reações secundárias, objetivando o aumento da área superficial. Esta é uma etapa de fundamental importância, pois será promovido o aumento da porosidade do carvão. Deseja-se no processo de ativação o controle das características do material: distribuição de poros, área superficial específica, atividade química da superfície e resistência mecânica, de acordo com a configuração requerida para uma dada aplicação específica. A ativação pode ocorrer por processos físicos ou químicos (YAHYA et al., 2015; DANISH e AHMAD, 2018).

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

Já a ativação química consiste na impregnação do material lignocelulósico com agentes desidratantes, seguida de um tratamento térmico, com temperaturas entre 400 °C e 900 °C. Neste processo a carbonização e a ativação são realizadas simultaneamente. Em geral, a ação promovida pela impregnação de um agente de ativação químico, pode ser descrita pela promoção simultânea da hidrólise e aumento da estrutura porosa do carvão durante o tratamento térmico. Cloreto de zinco, ácido fosfórico, hidróxido de sódio, hidróxido de potássio, são exemplos de agentes químicos que vem sendo bastante empregados no processo de ativação de carvões produzidos a partir de materiais lignocelulósicos (GONZÁLEZ-GARCÍA, 2018; BRITO et al., 2018; SARTOVA et al., 2019).

A ativação química tem vantagens e algumas desvantagens em relação à ativação física. Estas vantagens podem ser descritas sumariamente como: temperaturas mais baixas para pirólise, menores tempo de ativação, maior rendimento, permite obter

materiais com maior área superficial, possibilita o controle e manutenção de uma melhor distribuição das dimensões dos poros e incorporação de grupos funcionais. Algumas desvantagens da ativação química são: utilização de produtos altamente corrosivos e a necessidade de um passo extra de lavagem do produto final (KALUDJEROVIC et al., 2014; ZUBRIK et al., 2016; MAHMOOD et al., 2017).

Por ser um aditivo alimentício autorizado pela FDA (U.S. Food and Drug Administration) e amplamente empregado, o ácido fosfórico, é o agente ativante mais recomendado para o processo de ativação de carvões com aplicação em alimentos. Aliado a este fato, o emprego desse agente ativante, permite a eliminação de compostos de lixiviação por simples lavagens com água, requer temperaturas mais brandas de ativação (em torno de 400 °C a 500°C), o que gera um maior rendimento do produto final (JIANZHONG et al., 2014; LIM, SRINIVASAKANNAN e SHOAIBI, 2015).

Estudos demonstram que durante a ativação com o ácido fosfórico nos precursores lignocelulósicos, um aumento no volume estrutural global e o desenvolvimento concomitante de microporosidade são normalmente observados para temperaturas na faixa de 150 °C a 350 °C, e um novo incremento na temperatura resulta em desenvolvimento de mesoporos, principalmente através do alargamento dos microporos existentes (JAGTOYEN E DERBYSHIRE, 1998). A formação de ligações de éster de fosfato entre cadeias de celulose é considerada a principal contribuinte para o desenvolvimento da estrutura de carbono, uma vez que esses vínculos são baseados na inserção de moléculas de ácido fosfórico entre as cadeias de celulose, separando-as ainda mais. Essa expansão pode ser reforçada pela formação e inserção posterior de polifosfatos na estrutura através de ligações éster, com cadeias de celulose, que por sua vez é considerado um dos principais contribuintes para o desenvolvimento de mesoporos (NAHIL e WILLIAMS, 2012; YAKOUT e EL-DEEN, 2016).

Na ativação química, além na natureza do material precursor utilizado como fonte de carbono e do agente químico utilizada na impregnação, diferentes parâmetros irão influenciar nas características física e químicas dos carvões produzidos, tais como:

- (i) **Razão de impregnação:** no processo de ativação química, a razão de impregnação (proporção de massa do agente ativante em relação a massa do material precursor), é uma das variáveis que geralmente têm efeito significativo sobre as características finais dos carvões produzidos. Os agentes químicos utilizados são agentes desidratantes que penetram profundamente na estrutura do carbono promovendo o desenvolvimento

dos poros e conseqüentemente o aumento da área superficial. Assim, além de afetar o desenvolvimento dos poros, em particular o tamanho, afeta ainda a área de superfície, sendo que para maioria dos processos, o desenvolvimento de poros menores resultará em adsorventes com maiores áreas de superfície. A tendência geral para todos os precursores é que, o aumento da concentração do agente ativante promova um aumento da área de superfície, embora uma concentração ótima seja observada na maioria dos casos (GAO et al., 2015; YAKOUT e EL-DEEN, 2016).

- (ii) **Temperatura de carbonização:** a aplicação de calor a um material impregnado acelera a degradação térmica do material precursor e o processo de volatilização. Isto leva ao desenvolvimento de poros, aumento da área de superfície e a subsequente perda de massa. A seleção da temperatura de ativação é baseada em vários fatores que incluem o tipo de precursor e o agente químico utilizado. Temperaturas muito alta de ativação tendem a resultar no efeito “burn-off” (perda de massa durante a ativação) das estruturas do carvão e a ampliação dos microporos para meso e macroporos, além de interferir no rendimento do processo (HESASA et al., 2013; KUMAR e JENA, 2016).
- (iii) **Tempo de carbonização:** o tempo de carbonização deve ser apenas o suficiente para eliminar toda a umidade e a maior parte dos componentes voláteis do material precursor, fazendo com que a porosidade seja desenvolvida. Durações mais longas de carbonização podem promover o alargamento dos poros, à custa da área da superfície. Além disso, o controle do tempo de ativação é de interesse econômico sendo que tempos mais curtos, são geralmente desejados, uma vez que equivale a uma redução no consumo de energia (GRATUITO et al., 2008).

Como demonstrado, vários fatores irão influenciar nas propriedades químicas e texturais dos carvões ativados, despertando com isso a necessidade de se conduzir as pesquisas aplicando técnicas estatísticas de planejamento experimental, que permitam além de otimizar uma ou mais variáveis em estudo na produção dos carvões, proporcione a obtenção de um grande número de informações, utilizando um número reduzido de ensaios (MORALI et al., 2018; SULAIMAN et al., 2018).

Atualmente várias pesquisas vem realizadas visando a otimização da produção de carvões ativados. Morali et al. (2018) otimizaram o processo de produção de síntese de

carvões ativados partir da semente do girassol pelo método de ativação química utilizando cloreto de zinco e ácido fosfórico como agentes de ativação. A temperatura de carbonização e a razão de impregnação foram selecionadas como as variáveis resposta. Os resultados obtidos mostram a temperatura de 600 °C como ideal para preparação do carvão ativado com elevada área de superfície para ambos os agentes químicos. A razão de impregnação por sua vez, foi estabelecida como 3:1 e 2:1 para cloreto de zinco e ácido fosfórico, respectivamente. Os resultados deste estudo mostraram que a temperatura de ativação é o fator mais significativo para obter carvões ativados com maior área superficial específica (1534 m<sup>2</sup>/g). Fu et al. (2017) avaliaram o potencial do FeCl<sub>2</sub> como um novo agente ativante para preparar carvões ativados a partir de caules de tomate, sob diferentes condições de síntese. A maior superfície de BET (971 m<sup>2</sup>/g) foi obtida sob as seguintes condições: razão de impregnação de 2:5, temperatura de ativação de 700 °C e tempo de ativação de 1 hora. Koyuncu et al. (2018) utilizaram cascas de tangerina como material precursor de carbono na produção de carvões ativados pelo método de ativação química com ácido fosfórico. Os efeitos dos três importantes parâmetros (razão de impregnação, temperatura de carbonização e tempo de carbonização) foram avaliados. Os resultados mostram que ao usar razão de impregnação de 2:1 a 500 °C por 1 h, a área superficial específica atingiu o valor a máxima de 1021 m<sup>2</sup>/g. A razão de impregnação foi o parâmetro de maior influência na variável resposta.

## **2.2. Aplicação do carvão ativado na imobilização de enzimas**

### **2.2.1 Imobilização de enzimas**

Há grande interesse na aplicação industrial de enzimas por serem catalisadores biológicos naturais utilizados em diversos tipos de reações. Da mesma forma que catalisadores químicos, as enzimas promovem o aumento da velocidade das reações e são altamente específicas aos seus substratos, proporcionando a obtenção produtos seletivos que podem ser considerados como naturais (WANG et al., 2017; GONÇALVES et al., 2019).

Por outro lado, as aplicações de enzimas livres em processos industriais têm sido limitadas. Isto se deve a baixa estabilidade operacional e à dificuldade de separação do produto final, que são consideradas como barreiras para o seu uso em processos contínuos e aplicações em larga escala. Contudo, uma das formas de aproveitar as vantagens da catálise enzimática e superar as deficiências deste processo, tem sido a utilização da

enzima em sua forma imobilizada (HASAN, SHAH e HAMEED, 2006; CIPOLATTI et al., 2017; LI et al., 2018).

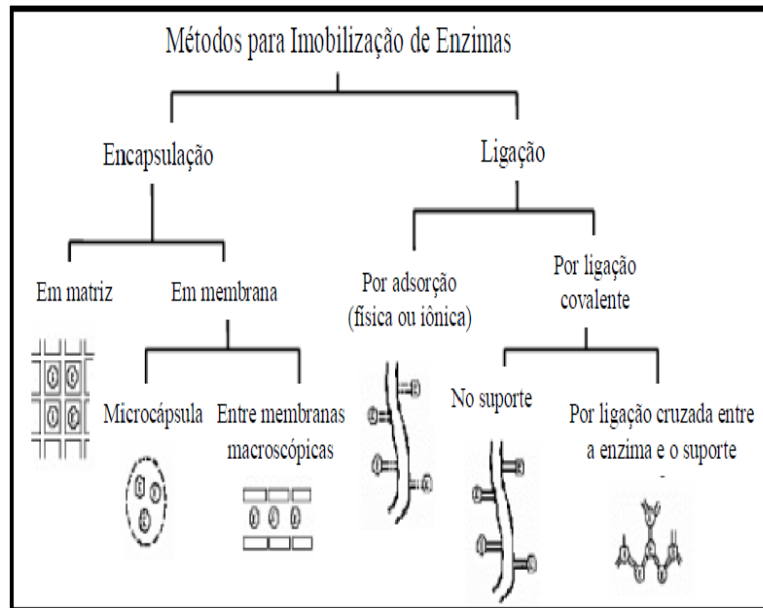
Enzimas imobilizadas estão fisicamente confinadas ou localizadas em uma região definida do espaço, com manutenção de suas atividades catalíticas e podem ser utilizadas repetidas vezes ou continuamente (GIRELLI e MATTEI, 2005). O principal interesse em imobilizar uma enzima é obter um biocatalisador com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

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

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

As enzimas podem ser imobilizadas por uma variedade de métodos, tais como encapsulamento (GUPTA, BHATTACHARYA e MURTHY, 2013; ZANETTE, AWADALLAK e FILHO, 2014) por ligação cruzada (KATO et al., 2011), interação covalente (URRUTIA et al., 2018; ZHONG et al., 2019) ou adsorção (MOTEEVALIZADEH et al., 2015; ALMEIDA et al., 2017; BRITO et al., 2017). Na Figura 2 são apresentados, esquematicamente, a classificação dos métodos utilizados para imobilização de enzimas.

**Figura 2.** Métodos de imobilização de enzimas



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

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

Ao longo dos últimos anos é crescente e notável o desenvolvimento de estudos relacionados a imobilização enzimática (CIPOLATTI et al., 2017; GONÇALVES et al., 2019). Destaque especial é dado á imobilização da lipase por ser uma enzima de grande interesse industrial (SÁ et al., 2017; ENAYATI et al., 2018; GAO et al., 2018; TORRES et al., 2018; KUMAR et al., 2019; JAMBULINGAM e SHALMA, 2019; LIMA et al., 2019; ZHONG et al., 2019).

### 2.2.2 Lipases

As lipases (triacilglicerol acilhidrolases E.C.3.1.1.3) constituem um importante grupo de enzimas com aplicações biotecnológicas (HASAN, SHAH e HAMEED, 2006; LIMA et al., 2019). Estas enzimas encontram-se largamente distribuídas na natureza, podendo ser obtidas a partir de fontes animais, vegetais e microbianas (VILLENEUVE et al., 2000), tendo suas propriedades variadas de acordo com sua procedência.

Dependendo da fonte, as lipases podem ter massa molar variando entre 20 kDa e 75 kDa com cerca de 150 a 650 resíduos de aminoácidos e atividade ótima em pH na faixa de 4 a 9 e em temperaturas variando desde a ambiente até 70 °C, sendo que, em sua maioria, apresentam atividade ótima próximo a 30 °C (CASTRO et al., 2004).

Possuem a capacidade de catalisar a hidrólise de triacilgliceróis de longa cadeia acila com a formação de diacilgliceróis, monoacilgliceróis, gliceróis e ácidos graxos, atuando na interface entre a fase orgânica e a fase aquosa. As lipases são também capazes de hidrolisar uma ampla variedade de ésteres (KAZLAUSKAS, 2005; ANGKAWIDJAJA e KANAYA, 2006) e, em condições adequadas, catalisam reações de esterificação e transesterificação (interesterificação, alcoólise e acidólise), levando à síntese de diferentes ésteres carboxílicos e amidas (KAZLAUSKAS, 2005; YADAV e JADHAV, 2005). Na Figura 3 são apresentadas algumas reações catalisadas por lipases.

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

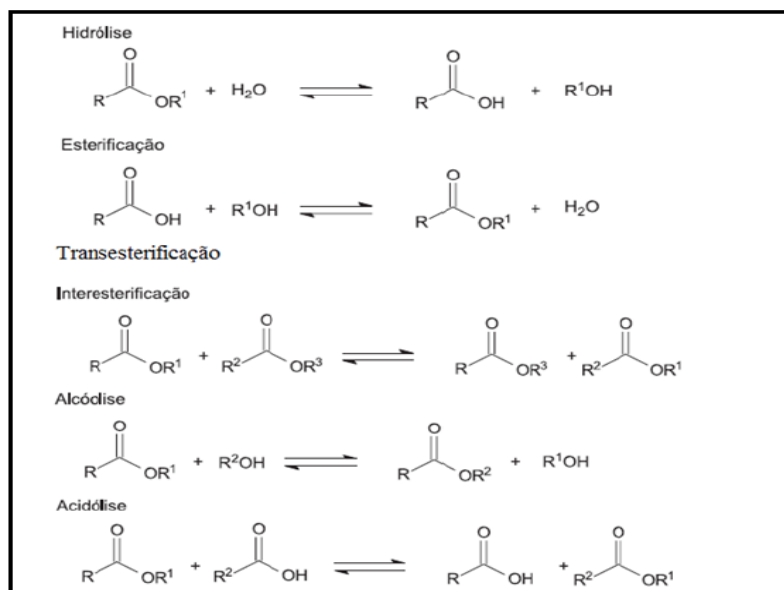
Todas as lipases, com exceção das lipases pancreáticas, possuem um único sítio ativo. Estas enzimas compartilham um padrão conformacional comum, denominado conformação alfa/beta hidrolase, cuja atividade enzimática resulta da tríade catalítica Serina-Histidina-Aspartato ou Glutamato (Ser-His-Asp/Glu)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

Os aspectos básicos sobre os mecanismos de catálise das lipases foram elucidados a partir do estudo das estruturas tridimensionais de várias destas enzimas, revelando duas diferentes conformações (SANDSTROM et al., 2012, ERICSSON et al., 2008). No qual o acesso ao sítio ativo da enzima está fechado através de um oligo-peptídeo hidrofóbico, chamado de tampa ou “lid”, que cobre a entrada do sítio ativo deixando-o completamente isolado do meio de reação (nesta conformação a lipase é considerada inativa) e a segunda conformação ocorre quando há ligação do substrato na superfície da enzima; esta tampa desloca-se, alterando a forma fechada da enzima para a forma aberta, deixando o sítio ativo acessível ao substrato. Ao mesmo tempo, a enzima expõe uma larga superfície de caráter hidrofóbico, o que facilita sua ligação à interface, nesta conformação a lipase é



considerada ativa. Este fenômeno é conhecido como “ativação interfacial” (PAIVA, BALCÃO e MALCATA, 2000). Logo, as lipases preferencialmente atuam em interfaces água-óleo, ou água-solvente orgânico, e a “ativação interfacial”, relaciona o aumento da atividade da lipase em função de substratos insolúveis, ou seja, as lipases atuam preferencialmente em substratos emulsionados (SHARMA et al., 2000).

**Figura 3.** Reações catalisadas por lipases



Adaptado de Paques e Macedo, 2006.

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

A especificidade das lipases em relação à estrutura do substrato é uma propriedade conhecida como regioseletividade, sendo as lipases subdivididas em lipases 1,3-específicas e lipases inespecíficas. As enzimas 1,3-específicas catalisam a liberação de ácidos graxos das posições 1 e 3 dos triacilgliceróis, já as inespecíficas atuam sobre todos os ácidos graxos, independentemente da posição que ocupam na molécula de glicerol, promovendo a hidrólise e produzindo tanto ácidos graxos livres, glicerol, monoacilgliceróis e diacilgliceróis como intermediários (CASTRO et al., 2004).

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

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

Dentre as inúmeras lipases comerciais disponíveis atualmente a lipase do pâncreas de porco (LPP) se destaca como a opção de menor custo sendo amplamente aplicada em reações de biotransformação, que inclui hidrólise de óleos para a produção de ácidos graxos, hidrólise enantioseletiva, tratamento de águas residuais ricas em lipídeos, síntese de aromas, fragrâncias, biodiesel, emulsificantes e cosméticos (MENDES; OLIVEIRA e CASTRO, 2012). A LPP possui alta estabilidade e atividade em meios anidros, como demonstrado nas reações de esterificação e transesterificação. Além disso, estudos recomendam a utilização dessa enzima para aplicações sintéticas nas quais a estereosseletividade e o custo são considerados fatores críticos (CABALLERO et al., 2011).

A LPP é uma proteína globular composta por uma cadeia de 449 aminoácidos, com peso molecular de 50-52 kDa (CARO et al., 1981). Sua estrutura é dividida em dois domínios, o domínio: (i) N-terminal que compreende os resíduos 1-336 e contém a tríade catalítica (Ser153, Asp177, His264) e (ii) o domínio C-terminal composto pelos aminoácidos 337-449 (HERMOSO et al., 1996). Essa enzima é estável na faixa de temperatura de 35 à 45°C e pH 7,5-9,0 (MENDES; OLIVEIRA e CASTRO, 2012).

Como biocatalisadores, essas lipases apresentam algumas vantagens importantes sobre os catalisadores clássicos industriais. Suas características de especificidade, regioseletividade e enantiosseletividade permitem a síntese de compostos de alta pureza, com um número reduzido de subprodutos e baixa geração de resíduos. Além disso, os processos enzimáticos requerem procedimentos mais simples e ainda evitam o uso de compostos químicos com alto potencial poluente (WANG et al., 2017).

#### **2.2.2.1 Imobilização da lipase por adsorção**

Um dos métodos mais empregados na imobilização de enzimas é o de adsorção. Esta técnica apresenta poucos efeitos deletérios para a atividade e seletividade da enzima, além de apresentar baixo custo e ser de fácil execução. Neste método ocorre a adesão da

enzima na superfície do suporte insolúvel, que se encontra em meio aquoso, através de interações de Van der Waals, interações hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e interações específicas (KHARRATA et al., 2011; ZHAO et al., 2015; REICHARDT et al., 2018).

Considerando as forças envolvidas no processo de adsorção, diferentes parâmetros vão influenciar na quantidade de enzima imobilizada e a intensidade das interações, tais como: pH, temperatura, força iônica do meio, natureza do solvente empregado, características do adsorvente, bem como a relação entre a concentração da enzima e do suporte (VILLENEUVE et al., 2000; DALLA-VECCHIA, NASCIMENTO e SOLDI, 2004).

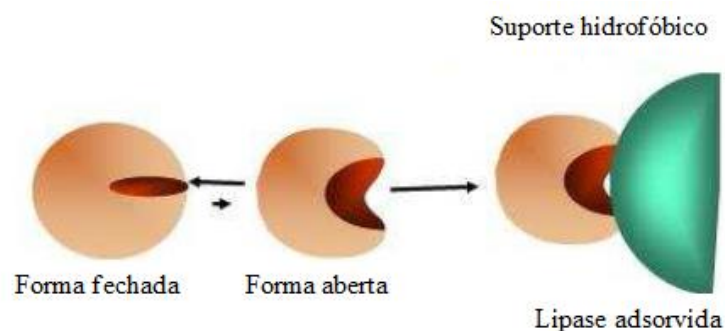
Com relação as condições do processo a imobilização de enzima depende do pH do meio, pois este determina o número e natureza das cargas na superfície do suporte, geralmente obtendo-se valores máximos de adsorção em valores próximos ao ponto isoelétrico da proteína. Isto ocorre devido ao fato de que, no valor de pH correspondente ao ponto isoelétrico da proteína, a repulsão eletrostática entre as moléculas de proteína é minimizada (VINU, MIYAHARA e ARIGA, 2005; SUN et al., 2010). A variação da temperatura durante o processo, também terá influência na eficiência do processo, uma vez que, com o aumento da temperatura, existe a possibilidade de aumentar o número de ligações hidrofóbicas. A quantidade de enzima adsorvida por quantidade do suporte aumenta com a concentração do biocatalisador até atingir um patamar de saturação, influenciando diretamente na eficiência da imobilização do suporte (ZHAO et al., 2013). Para tanto, é necessário conhecer o equilíbrio de adsorção da enzima de interesse. Usualmente, o equilíbrio é apresentado na forma de isotermas de adsorção que relacionam a concentração da enzima, em solução e na superfície de um sólido adsorvente (o suporte), ao longo de uma faixa de concentração de interesse. Esses estudos geralmente são realizados à temperatura e pressão ambiente e um dos modelos mais simples de isotermas de adsorção, o modelo de Langmuir, é ajustado aos dados experimentais (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO e SOLDI, 2004; RAMANI et al., 2012).

O suporte empregado na imobilização por adsorção exerce influência direta na eficiência do processo. Nesse sentido vários materiais podem ser utilizados como suportes para a imobilização de enzimas e a escolha de um deles depende de suas propriedades tais como: estabilidade física e química, porosidade e tamanho dos poros, área superficial, caráter hidrofílico/hidrofóbico e o custo. As lipases, especificamente, apresentam aumento de atividade quando adsorvidas em suportes hidrofóbicos, devido a mudanças conformacionais que tornam seu sítio ativo acessível aos substratos (MATEO et al.,

2007). Na presença de uma superfície hidrofóbica, a lipase sofre uma ativação interfacial e o equilíbrio de suas formas é deslocado para a conformação aberta. Neste caso, a região do sítio ativo da enzima interage com o suporte por adsorção hidrofóbica, uma vez que o reconhece como similar aos seus substratos naturais. Assim, a lipase é imobilizada em sua conformação ativa (Figura 4) (MATEO et al. 2007; HANEFELD, GARDOSI e MAGNER, 2009).

Como desvantagens desse método pode-se destacar a possibilidade de dessorção da enzima devido a variações de temperatura, pH e força iônica. Contudo, diversos estudos vêm sendo realizados com o intuito de reduzir a dessorção da enzima, como, por exemplo, a modificação química do suporte e a reticulação da enzima no interior dos poros (CIPOLATTI et al., 2017). Outros estudos sugerem também que a hidrofobização do suporte pode resultar na redução da lixiviação e melhoria da atividade enzimática (SERRA et al., 2008).

**Figura 4.** Ativação interfacial da lipase frente a um suporte hidrofóbico.



Adaptado de Mateo et al. (2007).

#### 2.2.2.2. Imobilização da lipase por ligação covalente

A imobilização covalente de enzimas é realizada de uma forma mais complexa que a adsorção. Este método baseia-se na retenção da enzima à superfície do suporte através de ligações covalentes entre grupos funcionais presentes na enzima e na superfície do suporte. Na maioria dos casos, o suporte necessita de alguma ativação prévia e algum tipo de bloqueio dos grupos reativos livres é recomendável após imobilização (GARCIA-GALAN et al., 2011; BARBOSA et al., 2013).

Os grupos amino da enzima são preferencialmente utilizados para a imobilização covalente com o suporte. Contudo, outros grupos funcionais presentes na superfície da

enzima também podem ser utilizados como por exemplo, hidroxilas (-OH), tiol (-SH), etc. dos resíduos de aminoácidos e os grupos reativos do suporte (DALLA-VECCHIA, NASCIMENTO e SOLDI, 2004). A ligação covalente de uma enzima a um suporte tem a vantagem de que a enzima é firmemente fixada, sua lixiviação para o meio é minimizada e, assim, não ocorre contaminação do produto. A formação de múltiplas ligações covalentes reduz a flexibilidade conformacional e as vibrações térmicas e evita o desdobramento e desnaturação da proteína (CAO, 2005).

Vários reagentes têm sido utilizados para promover a ativação de diversas matrizes tais como: epícloridrina, glicidol e glutaraldeído. No entanto o glutaraldeído é um dos mais conhecidos na ativação de suportes aminados e imobilização de enzimas, devido a simplicidade da técnica e a elevada estabilidade da ligação amino-glutaraldeído (LI et al., 2018; KUMAR et al., 2019). Nesse caso, o glutaraldeído se liga ao suporte e à enzima, e essas são imobilizadas covalentemente no suporte através de seus grupos aminos ( $\alpha$ -NH<sub>2</sub> da cadeia terminal,  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> da lisina e/ou NH<sub>2</sub> proveniente de aminação química), que se ligam aos grupos aldeídos do suporte, formando as bases de Schiff (BRADY e JORDAAN, 2009; BARBOSA et al., 2013). Ramani et al. (2012) imobilizaram lipase em carvão ativado funcionalizado pelo método do glutaraldeído. No procedimento de funcionalização, o grupo cetona presente na superfície do carvão ativado se ligou ao grupo amina, presente na etilenodiamina, formando o carvão ativado com superfície aminada. Em seguida o carvão aminado foi ativado com glutaraldeído para introdução dos grupos aldeído na superfície da matriz, sendo o responsável pela interação com os grupamentos amina das moléculas.

A atividade e estabilidade das enzimas imobilizadas em suportes ativadas com glutaraldeído dependem do protocolo de imobilização empregado. Diferentes concentrações de glutaraldeído e tempos de reação podem modificar os grupos amino dos suportes aminados com uma ou duas moléculas de glutaraldeído (monômeros ou dímeros), formando suportes heterofuncionais. Assim, o espaçador mais curto (monômero) pode dar uma maior rigidez, enquanto o mais longo (dímero) pode permitir a reação com mais grupos e, finalmente, a obtenção de melhores resultados (BETANCOR et al., 2006; BARBOSA et al., 2013).

O número de ligações covalentes entre a enzima e o suporte irá depender da densidade dos grupos reativos por unidade de área do suporte, da reatividade dos grupos funcionais, tanto da enzima quanto do suporte, e do estado de protonação dos mesmos, bem como da especificidade dos grupos ativos do suporte (BRADY e JORDAAN, 2009).

Como desvantagem deste método, tem-se uma maior dificuldade na seleção das condições de imobilização, o que demanda maiores estudos no desenvolvimento de um protocolo. Além disso, o uso de agentes funcionalizantes na etapa de ativação do suporte promove um maior custo na obtenção do biocatalisador insolúvel. Porém, a ligação formada, entre a enzima e o suporte, pela técnica de ligação covalente é forte, o que torna o material obtido mais estável frente à técnica de adsorção. Além disso, através deste método, em geral, obtêm-se alta atividade catalítica no material (CAO, 2005; CIPOLATTI et al., 2017).

### **2.2.3. Tipos de suportes empregados na imobilização de enzimas**

O suporte utilizado exercerá influência direta na eficiência do processo de imobilização. Em geral, as características desejáveis em um suporte para imobilização de enzimas incluem: estabilidade física e química, porosidade e tamanho dos poros, área superficial, caráter hidrofílico/hidrofóbico e o custo. Além disso, é necessário levar em consideração a natureza da enzima a ser imobilizada e do processo no qual o catalisador será aplicado (CONTESINIA et al., 2010; REICHARDT et al., 2018).

De acordo com sua composição os suportes podem ser classificados como orgânicos ou inorgânicos e de acordo com sua morfologia como porosos e não-porosos (DALLA-VECCHIA, NASCIMENTO e SOLDI, 2004). Suportes inorgânicos fornecem resistências químicas superiores, mas têm algumas limitações em termos de flexibilidade e de transferência de massa. Já os suportes orgânicos apresentam menor resistência ao escoamento, porém são mais baratos e proporcionam uma maior variedade de funcionalidades (GUPTA, BHATTACHARYA e MURTHY, 2013).

Os materiais porosos apresentam como principal vantagem sua elevada área superficial interna disponível para a imobilização de enzimas. Contudo, é importante atentar-se para o diâmetro dos poros do suporte, de modo que esses sejam suficientemente grandes para acomodar a enzima e permitir o acesso do substrato e difusão dos produtos (CARLSSON et al., 2014; BRITO et al., 2017; LI et al., 2018). Em contraponto, a vantagem dos materiais não porosos, apesar da baixa área superficial, é a ausência da resistência à transferência de massa interna, que em alguns casos pode tornar a velocidade do processo lenta. No entanto, estudos relatam uma imobilização mais eficiente de enzimas ao se utilizar suportes porosos em comparação com os não porosos, devido ao seu tamanho e volume dos poros, da elevada área superficial e estruturas abertas características desses materiais (ZHAO et al., 2013; DHAWANE et al., 2018).

Inúmeras pesquisas vêm sendo desenvolvida, visando o desenvolvimento de novos materiais para imobilização de enzimas, sendo uma das enzimas mais estudadas a lipase. Alguns suportes utilizados na imobilização de lipase foram: resíduos agrícolas (ITTRAT et al., 2014), sílica porosa (LI et al., 2018), carvão mesoporoso (KANDASAMYA et al., 2010), nanotubos de carbono (KUMAR et al., 2019; SZELWICKA et al., 2019), carvão ativado (BRITO et al., 2017; DHAWANE et al., 2018) entre outros. Quando se estuda novos materiais, busca-se principalmente suportes que aumentem a atividade específica após a imobilização, a faixa de pH ótimo para a atividade e a estabilidade térmica e que sejam de baixo custo (GUPTA, BHATTACHARYA e MURTHY, 2013; TACIAS-PASCACIO et al, 2016).

#### **2.2.4 Aplicação do carvão ativado como suporte na imobilização da lipase**

As características químicas e texturais do carvão ativado, aliada ao custo reduzido de produção, quanto sintetizados a partir de material lignocelulósicos, vem despertando o interesse da comunidade científica para estudos que abordam a utilização desse material como suporte pra imobilização da lipase. Naranjo et al. (2010) sintetizaram carvão utilizando o endocarpo do coco como material precursor de carbono. O precursor foi ativado com cloreto de zinco em uma atmosfera de nitrogênio (N<sub>2</sub>) por 5 h, a partir da temperatura ambiente até atingir 800 °C. Depois de atingida a temperatura máxima, a atmosfera passou a ser ativante, empregando-se o CO<sub>2</sub> durante 1 h. O material obtido foi utilizado como suporte para a imobilização de lipase, sendo o biocatalisador aplicado na síntese de biodiesel. Os resultados mostraram uma capacidade de imobilização de 95% da lipase sob o suporte. A utilização da lipase imobilizada em carvão ativado resultou em uma maior geração de biodiesel, a partir da transesterificação do óleo de palma, quando comparada com a enzima em sua forma solúvel.

Ramani et al. (2010) produziram carvão ativado a partir da casca de arroz em um processo de duas fases: pré-carbonização seguida pela ativação química. A pré-carbonização do material precursor foi realizada a 400 ° C sob fluxo de ar comprimido, seguido pela ativação química utilizando ácido fosfórico a 800 °C. O carvão foi então utilizado como suporte para a imobilização da lipase pelo método de adsorção e o biocatalisador foi aplicado na hidrólise do azeite de oliva. Os estudos demonstraram uma atividade máxima de imobilização da lipase no carvão de 3570 U/g sob condições ótimas de imobilização (tempo de contato de 180 min, pH 5,0 e temperatura de 30 °C) e que a

lipase imobilizada apresentou uma melhor estabilidade térmica e reutilização do que a lipase em sua forma solúvel.

Em estudos posteriores Ramani et al. (2012) também sintetizaram carvão ativado a partir da casca de arroz, seguindo a mesma metodologia descrita anteriormente, porém realizou a funcionalização do suporte com glutaraldeído, imobilizando a lipase pelo método de ligação covalente, empregando o biocatalisador na hidrólise de resíduos lipídicos presentes em efluente de matadouro. O derivado obtido mostrou-se bastante estável operacionalmente, tendo-se observado que após 21 ciclos reacionais este não perdeu sua atividade.

Almeida et al. (2017) imobilizaram lipase pelo método de adsorção, em diferentes carvões ativados sintetizado a partir das sementes da goiaba. Os carvões foram produzidos pela ativação convencional com carbonização em forno mulfla e por ativação não convencional (ultra-som e micro-ondas), empregando o ácido fosfórico, hidróxido de potássio e diclorometano como agentes de ativação. A eficiência do processo de imobilização da enzima no carvão foi avaliada na reação de hidrólise do azeite de oliva. Os resultados mostraram que o carvão ativado convencionalmente com KOH, apresentou uma superfície altamente porosa, condição essa que favoreceu a imobilização da lipase, obtendo-se uma atividade hidrolítica de  $317 \mu\text{mol g}^{-1} \text{min}^{-1}$ .

Dhawane et al. (2018) produziram carvão ativado utilizando como material precursor o Flamboyant e empregou o adsorvente sintetizado como suporte para imobilização da lipase, para ser empregado na síntese de biodiesel. O estudo enfatizou principalmente a determinação das condições ótimas para obtenção da máxima capacidade de adsorção e atividade catalítica de transesterificação. A análise estatística mostrou que a concentração inicial da enzima, o pH do meio e o tempo de contato afetaram significativamente a capacidade de adsorção da matriz. No entanto, a atividade catalítica na transesterificação foi influenciada pela temperatura, pH e concentração inicial da lipase. Com isso a condição otimizada obtida para a síntese de biodiesel foi: concentração inicial de enzima de  $400 \text{ mg L}^{-1}$ , temperatura de  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ , tempo de contato de 120 min e pH 6, obtendo um rendimento máximo de conversão na obtenção do biodiesel de 84,05% e capacidade de adsorção de  $35,21 \text{ mg g}^{-1}$ .

### **2.2.5. Aplicações biotecnológicas das lipases na indústria de alimentos**

O potencial biocatalítico das lipases é de interesse para diversos setores industriais, como a indústria de alimentos, farmacêutica e química fina, tratamento de



efluentes, na formulação de detergentes, síntese de biosurfactantes, indústria de papel, na síntese de aromas entre outros (SÁ et al., 2017; GAO et al., 2018; ENAYATI, GONG e GODDARD, 2018; JAMBULINGAM e SHALMA, 2019; JAWED et al., 2019).

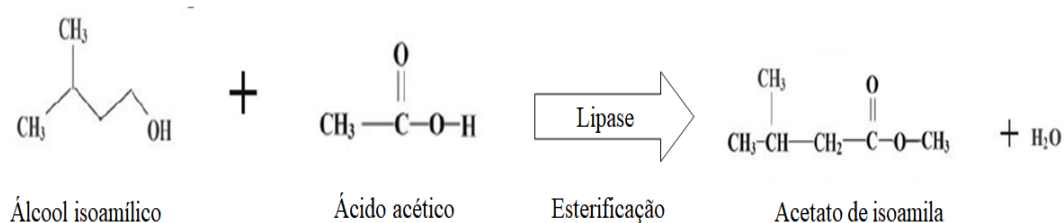
Na indústria de alimentos, lipases podem ser utilizadas como biocatalisadores na modificação de óleos e gorduras para obtenção de alimentos com propriedades nutricionais alteradas, por exemplo, na modificação de ácidos graxos polinsaturados, resultando na produção de alimentos com baixa caloria (RODRIGUES e FERNANDO-LAFUENTE, 2010; ZHANG et al., 2016). Em laticínios, a lipase é empregada na produção de queijos modificados enzimaticamente, que têm seu aroma intensificado, ou na produção de ésteres aromatizantes de queijo para produtos salgados e petiscos. Lipases também podem participar da aceleração do processo de maturação de queijos e na hidrólise da gordura do leite (HASAN et al., 2006; SÁ et al., 2017). Na indústria de panificação, a utilização de lipase proporciona aumento da elasticidade e fortalecimento da massa, um aumento na capacidade de retenção de ar da massa gerando um produto com melhor textura, além disso, há também aumento da capacidade de retenção de água na massa, o que retarda a sinérese (expulsão de água no interior do gel ou sistema), prolongando a vida de prateleira do pão (GANDRA et al., 2008; KOBLITZ, 2008).

Essas enzimas têm mostrado bons resultados também como biocatalisadores na obtenção de aromáticos, através da reação de esterificação. Esses ésteres são amplamente utilizados nas indústrias de alimentos, bebidas, cosméticos e farmacêutica, entre outras (JIN et al., 2012). Sabe-se que os ésteres de aroma são formados pela reação de esterificação direta de um ácido carboxílico com um álcool na presença de catalisador, com a opção de ser realizada na presença (ou não) de solvente orgânico. A reação de esterificação é direta, podendo ser catalisada ou até mesmo espontânea, dependendo das condições de temperatura, acidez do ácido envolvido e da miscibilidade dos reagentes (ROESLER et al., 2017; SÁ et al., 2017).

Tradicionalmente, esses compostos são isolados de fontes naturais ou produzidos por síntese química (SCHRADER et al., 2004; CVJETKO et al., 2012). Recentemente, uma maior atenção tem sido dada à produção enzimática de ésteres aromáticos devido à seletividade catalítica inerente às enzimas, produtos mais puros e condições de reação moderadas. Além disso, os produtos provenientes de reações catalisadas por enzimas, usando substratos naturais disponíveis são geralmente rotulados como produtos naturais (TORRES et al., 2009; AZUDIN et al., 2019).

Entre os ésteres, os de baixo peso molecular têm um potencial interesse para a indústria de alimentos, como compostos de aroma, devido a sua fragrância e sabor característicos (JIN et al., 2012; SARNO et al., 2017). Muitos deles são responsáveis por odores de frutas dos alimentos que são constituídos principalmente por ácidos e seus derivados de cadeia curta como acetatos, propionatos e butiratos (KRISHNA et al., 2000). O acetato de isoamila, por exemplo, é um dos compostos aromatizantes mais importante usado nas indústrias alimentícias devido ao aroma característico de banana. Este éster é empregado como composto aromatizante em vários alimentos e bebidas, como mel, caramelo, café artificial e bebidas alcoólicas (SAHA et al., 2018; AZUDIN et al., 2019). Na Figura 5 é apresentada a reação de esterificação utilizando lipase para a obtenção do acetato de isoamila.

**Figura 5.** Representação da reação de esterificação para a obtenção do acetato de isoamila.



Diversas pesquisas são apresentadas na literatura abordando a síntese enzimática de acetato de isoamila, e podem ser resumidas em alguns estudos citados a seguir:

Kumari *et al* (2009), estudou a produção de acetato de isoamila em meio livre de solvente, com lipase de *Rhizopus oryzae* utilizando álcool isoamílico e acetato de vinila como substrato. Uma taxa de conversão de 95% foi alcançada após horas de reação a uma temperatura de 40 °C.

Torres et al. (2009) investigaram a produção desse éster utilizando enzima obtida de *Bacillus licheniformis* ( $4.6 \times 10^{-5}$  mg.ml<sup>-1</sup>), a partir de álcool isoamílico e acetato de p-nitrofenilo em n-hexano. Nessas condições, foi obtida uma conversão 42,8%, após 24 horas de reação a 28 °C.

Cvjjetko et al. (2012) alcançaram até 92% de rendimento de acetato de isoamila em 15 minutos de reação, utilizando anidrido acético e álcool isoamílico (1:3) como substrato, utilizando lipase de *Candida antactica* em líquido iônico em micro-reator de fluxo contínuo a 55°C; Sarno et al. (2017) imobilizou lipase de *Thermomyces lanuginosus*

em nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  funcionalizada com ácido cítrico, e empregou o biocatalisador na síntese em reações de esterificação para obtenção de aroma de banana. Com um tempo de reação de 7 horas foi obtido o rendimento máximo de conversão do éster de 61%.

Entretanto, apesar das vantagens descritas, a aplicação industrial de lipases na forma livre em reações de síntese de ésteres não é atrativa devido ao custo, principalmente em função da impossibilidade de reutilização e da baixa estabilidade térmica e química. Neste sentido a imobilização enzimática, destaca-se como uma das estratégias mais promissoras para superar tal inconveniente, uma vez que permite que a enzima seja reutilizada várias vezes, mantendo a sua atividade tanto tempo quanto possível, e em alguns casos promovendo a melhoria da eficiência catalítica da enzima (SARNO et al., 2017; ASMAT et al., 2019).

### **3. OBJETIVO GERAL**

Determinar as melhores condições do processo de produção de carvões ativados, utilizando como fontes precursoras de carbono a bainha do palmito de pupunha e bagaço de malte, e avaliar a eficiência dos materiais sintetizados na imobilização da lipase para aplicação dos biocatalisadores na síntese de éster.

#### **3.1 Objetivos Específicos**

- Preparar carvões ativados pelo método de ativação química utilizando como precursores de carbono resíduos agroindustriais;
- Identificar as melhores condições de síntese para produção de materiais com elevada área superficial e elevados volume de microporos e mesoporos, variando os fatores temperatura, tempo de carbonização e razão de impregnação, utilizando o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) como ferramenta estatística;
- Caracterizar os carvões ativados produzidos;
- Funcionalizar a superfície dos carvões utilizando o método do glutaraldeído;
- Utilizar os carvões produzidos a partir das melhores condições de síntese como suporte para imobilização de lipase pelos métodos de adsorção e ligação covalente;
- Avaliar o efeito do pH do meio e temperatura no processo de imobilização da lipase;

• Utilizar os biocatalisadores obtidos nas melhores condições de imobilização, na reação de esterificação para síntese do éster acetato de isoamila (aroma da banana).

#### 4. REFERÊNCIAS

- ABDOLALI, A.; GUO, W.S.; NGO, H.H.; CHEN, S.S.; NGUYEN, N.C.; TUNG, K.L. Typical lignocellulosic wastes and by-products for biosorption process in water and wastewater treatment: a critical review. **Bioresour Technology**. v.160, p.57-66, 2014.
- ALIYU, S.; BALA, M. Brewer's spent grain: A review of its potentials and applications. **African Journal of Biotechnology**. v.103, p.324-331, 2011.
- ALMEIDA, L.C.; BARBOSA, A.S.; FRICKS, A.T.; FREITAS, L.S.; LIMA, Á.S.; SOARES, C.M.F. Use of conventional or non-conventional treatments of biochar for lipase immobilization. **Process Biochemistry**. v.61, p.124-129, 2017.
- ANDRADE, S.N.; VELOSO, C.M.; FONTAN, R.C.I.; BONOMO, R.C.F.; SANTOS, L.S.; BRITO, M.J.P.; DINIZ, G.A. Chemical-activated carbon from coconut (*Cocos nucifera*) endocarp waste and its application in the adsorption of  $\beta$ -lactoglobulin protein. **Revista Mexicana de Ingeniería Química**. v.17, p.441-453, 2018.
- ANGKAWIDJAJA, C.; KANAYA, S. Family I.3 lipase: bacterial lipases secreted by the type I secretion system. **Cell. Mol. Life Sci**. v. 63, p. 2804–2817. 2006.
- ASMAT, S.; ANWER, A.H.; HUSAIN, Q. Immobilization of lipase onto novel constructed polydopamine grafted multiwalled carbon nanotube impregnated with magnetic cobalt and its application in synthesis of fruit flavours. **International Journal of Biological Macromolecules**. v.140, p.484-495, 2019.
- AZUDIN, N.Y.; SANGARAN, S.; SHUKOR, S.R.A. Non-enzymatic synthesis route for production of isoamyl acetate in a solvent-free system using miniaturized intensified. **Journal of Environmental Chemical Engineering**. 103-186, 2019.
- BARBOSA, O.; TORRES, R.; ORTIZ, C.; BERENGUER-MURCIA, Á.; RODRIGUES, R.C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Heterofunctional Supports in Enzyme Immobilization: From Traditional Immobilization Protocols to Opportunities in Tuning Enzyme Properties. **Biomacromolecules**. v.14, p.2433-2462, 2013.
- BERNAL, C.; ILLANES, A.; WILSON, L. Heterofunctional hydrophilic–hydrophobic porous silica as support for multipoint covalent immobilization of lipases: Application to lactulose palmitate synthesis. **Langmuir** v.30, p.3557-3566, 2014.

BETANCOR, L.; LÓPEZ-GALLEGO, F.; HIDALGO, A.; ALONSO-MORALES, N.; DELLAMORA-ORTIZ, G.; MATEO, C.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GUISÁN, J.M. Different mechanisms of protein immobilization on glutaraldehyde activated supports: Effect of support activation and immobilization conditions. **Enzyme Microbial Technology**. v.39, p.877-882, 2006.

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

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

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

CABALLERO, V.; BAUTISTA, F.M.; CAMPELO, J.M.; LUNA, D.; MARINAS, J.M.; ROMERO, A.A.; HIDALGO, J.M.; LUQUE, R.; MACARIO, A.; GIORDANO, G. Sustainable preparation of a novel glycerol-free biofuel by using pig pancreatic lipase: Partial 1,3-regiospecific alcoholysis of sunflower oil. **Process Biochemistry**. v.44, p.334-342, 2009.

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

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

CARLSSON, N.; GUSTAFSSON, H.; THÖRN, C.; OLSSON, L.; HOLMBERG, K.; ÅKERMAN, B. Enzymes immobilized in mesoporous silica: A physical-chemical perspective. **Advances in Colloid and Interface Science**. v.205, p.339-360, 2014.

CARO, J. et al. Porcine pancreatic lipase. Completion of the primary structure. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure**. v. 671, p. 129-138, 1981.

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

CHEN, C.X.; HUANG, B.; LI, T.; WU, G.F. Preparation of phosphoric acid activated carbon from sugarcane bagasse by mechanochemical processing. **BioResources**. v.7, p.5109-5116, 2012.

CIPOLATTI, E.P.; MANOEL, E.A.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; FREIRE, D.M.G. Support engineering: relation between development of new supports for immobilization of lipases and their applications. **Biotechnology Research and Innovation**. v.1, p.26-34, 2017.

CONTESINIA, F.J.; LOPESA, D.B.; MACEDO, G.A.; NASCIMENTO, M.G.; CARVALHO, P.O. *Aspergillus* sp. lipase: Potential biocatalyst for industrial use. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v.67, p.163-171, 2010.

CVJETKO, M.; VORKAPIC-FURAC, J.; ZNIDARSIC-PLAZL, P. Isoamyl acetate synthesis in imidazolium-based ionic liquids using packed bed enzyme microreactor. **Process Biochemistry**. v.47, p.344-350, 2012.

DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. G.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**. v.27, p.623-630, 2004.

DANISH, M.; AHMAD, T. A review on utilization of wood biomass as a sustainable precursor for activated carbon production and application. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. v.87, p.1-21, 2018.

DEMIRBAS, A. Agricultural based activated carbons for the removal of dyes from aqueous solutions: A review. **Journal of Hazardous Materials**. v.167, p.1-9, 2009.

DHAWANE, S.H.; KUMAR, T.; HALDER, G. Process optimisation and parametric effects on synthesis of lipase immobilised carbonaceous catalyst for conversion of rubber seed oil to biodiesel. **Energy Conversion and Management**. v.176, p.55-68, 2018.

DHYANI, V.; BHASKAR, T. A comprehensive review on the pyrolysis of lignocellulosic biomass. **Renewable Energy**. v.129, p.695-716, 2017.

ENAYATI, M.; GONG, Y.; GODDARD, J.M.; ABBASPOURRAD, A. Synthesis and characterization of lactose fatty acid ester biosurfactants using free and immobilized lipases in organic solvents. **Food Chemistry**. v.266 p.508-513, 2018.

ERICSSON, D.J.; KASRAYAN, A; JOHANSSON, P. X-ray structure of *Candida Antarctica* lipase A shows a novel lid structure and a likely mode of interfacial activation. **Journal of Molecular Biology**. v.376, p.109-119, 2008.

FERMINO, M.H., GONÇALVES, R. S., BATTISTIN, A., SILVEIRA, J. R. P., BUSNELLO, A.C., TREVISAM, M. Palm fiber as substrate for vegetables. **Horticultura Brasileira**. v.32, p.404-408, 2014.

FU, K., YUE, Q.; GAO, B.; WANG, Y.; LI, Q. Activated carbon from tomato stem by chemical activation with FeCl<sub>2</sub>. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**. v.529, p.842-849, 2017.

GANDRA, K. M.; DEL BIANCHI, M.; GODOY, V. P.; QUEIROZ, F. P. C.; STEEL, C. J. Aplicação de lipase e monoglicerídeo em pão de forma enriquecido com fibras. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v.28, p.182-192, 2008.

GAO, Y.; YUE, Q.; SUN, Y.Y.; XIAO, J.; GAO, B.; ZHAO, P.; YU, H. Optimization of high surface area activated carbon production from *Enteromorpha prolifera* with low-dose activating agent. **Fuel Processing Technology**. v.132, p.180-187, 2015.

GAO, Z.; CHU, J.; JIANG, T.; XU, T.; WU, B.; HE, B. Lipase immobilization on functionalized mesoporous TiO<sub>2</sub>: Specific adsorption, hyperactivation and application in cinnamyl acetate synthesis. **Process Biochemistry**. v.64, p.152-159, 2018.

GARCIA-GALAN, C.; BERENQUER-MURCIA, A.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; RODRIGUES, R. C. Potential of different enzyme immobilization strategies to improve enzyme performance. **Advanced Synthesis & Catalysis**. v.353, p.2885-2904, 2011.

GIRELLI, A.M.; MATTEI, E. Application of immobilized enzyme reactor in on-line high performance liquid chromatography: A review. **Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**. v.819, p.3-16, 2005.

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

GONZALEZ, J.F.; ROMAN, S.; ENCINAR, J.M.; MARTINEZ, G. Pyrolysis of various biomass residues and char utilization for the production of activated carbons. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**. v.85, p.134-41, 2009.

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

GRATUITO, M.K.B.; PANYATHANMAPORN, T.; CHUMNANKLANG, R.A.; SIRINUNTAWITTAYA, N.; DUTTA, A. Production of activated carbon from coconut shell: Optimization using response surface methodology. **Bioresource Technology**. v.99, p.4887-4895, 2008.

GUMEL, A.M.; ANNUAR, M.S.M. *Thermomyces lanuginosus* lipase-catalyzed synthesis of natural flavor esters in a continuous flow microreactor. **Biotech**. v.6, p.1-24, 2016.

GUPTA, S.; BHATTACHARYA, A.; MURTHY, C.N. Tune to immobilize lipases on polymer membranes: Techniques, factors and prospects. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**. v.2, p.171-190, 2013.

HANEFELD, U.; GARDOSI, L.; MAGNER, E. Understanding enzyme immobilization. **Chemical Society Reviews**. v.38, p.453-468, 2009.

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

HERMOSO, J., PIGNOL, D.; KERFELEC, B., CRENON, I.; CHAPUS, C.; FONTECILLA-CAMPS, J.C. Lipase Activation by Nonionic Detergents. **Journal of Biological Chemistry**. v. 271, n. 30, p.18007–18016, 1996.

HESASA, R.H.; ARAMI-NIYAA, A.; DAUDA, W.M.A.; WAN.; SAHU, J.N. Preparation of granular activated carbon from oil palm shell by microwave-induced chemical activation: Optimisation using surface response methodology. **Chemical Engineering Research and Design**. v. 91, p. 2447-2456, 2013.

HORIKAWA, T.; KITAKAZE, Y.; SEKIDA, T.; HAYASHI, J.; KATOH, M. Characteristics and humidity control capacity of activated carbon from bamboo. **Bioresource Technology**. v.101, p.3964-3969, 2010.

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

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

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

JAGTOYEN, M.; DERBYSHIRE, F. Activated carbons from yellow poplar and white oak by H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> activation. **Carbon**. v.36, p.1085-1097, 1998.

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

JAMBULINGAM, R.; SHALMA, M.; Shankar, V. Biodiesel production using Lipase Immobilized Functionalized Magnetic Nanocatalyst from Oleaginous Fungal Lipid. **Journal of Cleaner Production**. v.215, p.245-258, 2019.

JAWED, A.; SINGH, G.; KOHLI, S.; SUMERA, A.; HAQUE, S.; PRASAD, R.; PAULA, D. Therapeutic role of lipases and lipase inhibitors derived from natural



resources for remedies against metabolic disorders and lifestyle diseases. **South African Journal of Botany**. v.20, p.25-32, 2019.

JIANZHONG, X.; LINGZHI, C.; HONGQIANG, Q.; YUNHONG, J.; JIXING, X.; GUANGEN, X. Preparation and characterization of activated carbon from reedy grassleaves by chemical activation with H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. **Applied Surface Science**. v.320, p.674-680, 2014.

JIBRIL, B.; HOUACHE, O.; AL-MAAMARI R, AL-RASHIDI, B. Effects of H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> and KOH in carbonization of lignocellulosic material. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**. v.83, p.151-6, 2008.

JIN, Z.; NTWALI, J.; HAN, S.Y.; ZHENG, S.P.; LIN, Y. Production of flavor esters catalyzed by CALB-displaying *Pichia pastoris* whole-cells in a batch reactor. **Journal of Biotechnology**. v.159, p.108-114, 2012.

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

KAN, Y.; YUE, Q.; LI, D.; WU, Y.; GAO, B. Preparation and characterization of activated carbons from waste tea by H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> activation in different atmospheres for oxytetracycline removal. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**. v. 71, p. 494-500, 2017.

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

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

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

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

KAZLAUSKAS, R.J. Enhancing catalytic promiscuity for biocatalysis. **Current Opinion in Chemical Biology**. v.9, 195-201, 2005.

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

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

KOBLITZ, M.G.B. **Bioquímica de alimentos: teoria e aplicações práticas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

KOYUNCU, GUZEL, F., SAYGILI, H. Role of optimization parameters in the production of nanoporous carbon from mandarin shells by microwave-assisted chemical activation and utilization as dye adsorbent. **Advanced Powder Technology**. v.29, p.2108-2118, 2018.

KRISHNA, M.B.; DIVAKAR S.; PRAPULLA S.G.; KARANTH N.G. Optimization of isoamyl acetate production by using immobilized lipase from *Mucor miehei* by response surface methodology. **Enzyme and Microbial Technology**. v.26, p.131-136, 2000.

KUMAR, A.; PARK, G.D.; PATEL, S.K.S.; KONDAVEETI, S.; OTARI, S.; ANWAR, M.Z.; KALIA, V.C.; SINGH, Y.; KIM, S.C.; CHO, B.K.; SOHN, J.H.; KIM, D.R.; KANG, Y.C.; LEE, J. Unique structured SiO<sub>2</sub> microparticles with carbon nanotube-derived mesopores as an efficient support for enzyme immobilization. **Chemical Engineering Journal**. v.359, p.1252-1264, 2019.

KUMAR, A.; JENA, H.M. Preparation and characterization of high surface area activated carbon from Fox nut (*Euryale ferox*) shell by chemical activation with H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. **Results in Physics**. v.6, p.651-658, 2016.

KUMARI, A.; MAHAPATRA, P.; GARLAPATI, V. K.; BANERJEE, R.; DASGUPTA, S. Lipase Mediated Isoamyl Acetate Synthesis in Solvent-Free System Using Vinyl Acetate as Acyl Donor. **Food Technology and Biotechnology**. v.47, p.13-18, 2009.

LI, K.; WANG, J.; HE, Y.; CUI, G.; ABDULRAZAQ, M.A.; YAN, Y. Enhancing enzyme activity and enantioselectivity of *Burkholderia cepacia* lipase via immobilization on melamine-glutaraldehyde dendrimer modified magnetic nanoparticles. **Chemical Engineering Journal**. v.351 p.258-268, 2018.

lignocellulosic biomass and its applications in air pollution control- a review. **Journal of Environmental Chemical Engineering**. v.1, p.658-66, 2013.

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

LIMA, R.N.; ANJOS, C.S.; OROZCO, E.V.M.; PORTO, A.L.M. Versatility of *Candida antarctica* lipase in the amide bond formation applied in organic synthesis and biotechnological processes. **Molecular Catalysis**. v.466, p.75-105, 2019.

MACEDO, J.S.; OTUBO, L.; FERREIRA, O.P.; GIMENEZ, I.D.F.; MAZALI, I.O.; BARRETO, L.S. Biomorphic activated porous carbons with complex microstructures from lignocellulosic residues. **Microporous and Mesoporous Materials**. v.107, 276-85, 2008.

MAHMOOD, T.; ALI, R.; NAEEM, A.; HAMAYUN, M.; ASLAM, M. Potential of used *Camellia sinensis* leaves as precursor for activated carbon preparation by chemical activation with H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. Optimization using response surface methodology. **Process Safety and Environmental Protection**. v.109, p.548-563, 2017.

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

MENDES, A.A.; OLIVEIRA, P.C.; DE CASTRO, H.F. Properties and biotechnological applications of porcine pancreatic lipase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v.78, 1p.19-134, 2012.

MORALI, U., DEMIRAL, H.; ŞENSÖZ, S. Optimization of activated carbon production from sunflower seed extracted meal: Taguchi design of experiment approach and analysis of variance. **Journal of Cleaner Production**. v.189, p.602-611, 2018.

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

MOAZENI, F.; CHEN, Y.C.; ZHANG G. Enzymatic transesterification for biodiesel production from used cooking oil, a review. **Journal of Cleaner Production**. v.216, p.117-128, 2019.

MULEY, P.D.; HENKEL, C.; ABDOLLAHI, K.K.; MARCULESCU, C.; BOLDOR, D. A critical comparison of pyrolysis of cellulose, lignin, and pine sawdust using an induction heating reactor. **Energy Conversion and Management**. v.117, p.273-280, 2016.

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.

NAN, Z.; HONGGANG, C.; JUNTING, X.; DENGHUI, Y.; ZHI, Z.; YUN, T.; XIANGYANG, L. Biochars with excellent Pb(II) adsorption property produced from fresh and dehydrated banana peels via hydrothermal carbonization. **Bioresource Technology**. v.232, p.204-210, 2017.

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.

Nor, N.M.; Chung, L.L.; Teong, L.K.; Mohamed, A.R. Synthesis of activated carbon from OKMAN, I.; KARAGÖZ, S.; TAY, T.; ERDEM, M. Activated Carbons From Grape Seeds By Chemical Activation With Potassium Carbonate And Potassium Hydroxide. **Applied Surface Science**. v.293, p.138-142, 2014.

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

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

PEREIRA, R.G.; VELOSO, C.M.; DA SILVA, N.M.; DE SOUSA, L.F.; BONOMO, R.C.F.; DE SOUZA, A.O.; DA GUARDA, M.O.; FONTAN, R.D.C.I. Preparation of activated carbons from cocoa shells and siriguela seeds using H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> and ZnCL as activating agents for BSA and  $\alpha$ -lactalbumin adsorption. **Fuel Processing Technology**. v.126, p.476-486, 2014.

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

RAMANI, K.; LOURDUSAMY, J.K.; VIDYA, C.; BOOPATHY, R.; SEKARAN, G. Immobilization of acidic lipase derived from *Pseudomonas gessardii* onto mesoporous

activated carbon for the hydrolysis of olive oil. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzimática**, v. 62, p. 58-65, 2010.

RANGABHASHIYAM, S.; BALASUBRAMANIAN, P. The potential of lignocellulosic biomass precursors for biochar production: Performance, mechanism and wastewater application - A review. **Industrial Crops & Products**. v.128, p.405-423, 2019.

REICHARDT, C.; UTGENANNT, S.; STAHMANN, K.P.; KLEPE, O.; BARIG, S. Highly stable adsorptive and covalent immobilization of *Thermomyces lanuginosus* lipase on tailor-made porous carbon material. **Biochemical Engineering Journal**. v.138, p.63-67, 2018.

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

ROESLER, B.C.S.; VANZIN, D.C.C.; BURKERT, A.V. Síntese de ésteres de isoamila por diferentes lipases microbianas comerciais. **Revista Ciência e Tecnologia**. v.20, p.25-30, 2017.

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

SAHA, B.; BUCKNALL, M.P.; ARCOTA, J.; DRISCOLL, R. Profile changes in banana flavour volatiles during low temperature drying. **Food Research International**. v.106, p.992-998, 2018.

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

SARNO, M.; IULIANO, M.; IULIANO, M.; CIAMBELLI, P. High activity and selectivity immobilized lipase on Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles for banana flavor synthesis. **Process Biochemistry**. v.56, p.98-108, 2017.

SARTOVA, K. OMURZAK, E.; KAMBAROVA, G.; DZHUMAIEV, I.; BORKOEV, B.; ABDULLAEVA, V. Activated carbon obtained from the cotton processing wastes, **Diamond and Related Materials**. v.91, p.90-97, 2019.

SCHRADER, J.; ETSCHMANN, M.M.W.; SELL, D.; HILMER, J. M.; RABENHORST, J. Applied biocatalysis for the synthesis of natural flavor compounds – current industrial processes and future prospects. **Biotechnology Letters**. v.26, p.463-472, 2004.

SELVARAJU, G.; KARTINI, N.; BAKAR, A. Production of a new industrially viable green-activated carbon from Artocarpus integer fruit processing waste and evaluation of its chemical, morphological and adsorption properties. **Journal of Cleaner Production**. v.141, p.989-999, 2017.

SERRA, E.; MAYORAL, Á.; SAKAMOTO, Y.; BLANCO, R. M.; DÍAZ, I. Immobilization of lipase in ordered mesoporous materials: Effect of textural and structural parameters. **Microporous and Mesoporous Materials**. v. 114, p.201-213, 2008.

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

SILVA, T.L.; RONIX, A.; PEZOTI, O.; SOUZA, L.S.; LEANDRO, P.K.T.; BEDIN, K.C.; BELTRAME, K.K.; CAZETTA, A.L.; ALMEIDA, V.C. Mesoporous activated carbon from industrial laundry sewage sludge: Adsorption studies of reactive dye Remazol Brilliant Blue R. **Chemical Engineering Journal**. v.303, p.467-476, 2016.

SONIL, N.; JAVEED, M.; SIVAMOCHAN, N.R.; JANUSZ, A.K.; AJAY, K.D. Pathways of lignocellulosic biomass conversion to renewable fuels. **Biomass Conversion and Biorefinery**. v.4, p.157-191, 2014.

SULAIMAN, N.S.; HASHIM, R.; AMINI, M.H.M.; DANISH, M.; SULAIMAN, O. Optimization of activated carbon preparation from cassava stem using response surface methodology on surface area and yield. **Journal of Cleaner Production**. v.198, 1422-1430, 2018.

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

SZELWICKA, A.; BONCEL, S.; JURCZYK, S.; CHROBOK, A. Exceptionally active and reusable nanobiocatalyst comprising lipase noncovalently immobilized on multi-wall carbon nanotubes for the synthesis of diester plasticizers. **Applied Catalysis A**. v.574, p.41-47, 2019.

TACIAS-PASCACIO V.G.; PEIRCE, S.; TORRESTIANA-SANCHEZ, B.; M.; YATES, A.; ROSALES-QUINTERO, A.; VIRGEN-ORTÍZ, J.J.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Evaluation of different commercial hydrophobic supports for the immobilization of

lipases: Tuning their stability, activity and specificity. **RSC Advances**. v.6, 100281-100294, 2016.

TORRES, J.A.; SILVA, M.C.; LOPES, J.H.; NOGUEIRA, A.E.; NOGUEIRA, F.G.E.; CORRÊA, A.D. Development of a reusable and sustainable biocatalyst by immobilization of soybean peroxidase onto magnetic adsorbent. **International Journal of Biological Macromolecules**. v.114, p.1279-1287, 2018.

TORRES, S.; BAIGORÍ, M.D.; SWATHY, S.L.; PANDEY, A.; CASTRO, G.R. Enzymatic synthesis of banana flavour (isoamyl acetate) by *Bacillus licheniformis* S-86 esterase. **Food Research International**. v.42, p.454-460, 2009.

URRUTIA, P.; ARRIETA, R.; ALVAREZ, L.; CARDENAS, C.; MESA, M.; WILSON, L. Immobilization of lipases in hydrophobic chitosan for selective hydrolysis of fish oil: The impact of support functionalization on lipase activity, selectivity and stability. **International Journal of Biological Macromolecules**. v.108, p.674-686, 2018.

VAIBHAV, D.; THALLADA, B.A. Comprehensive review on the pyrolysis of lignocellulosic biomass. **Renewable Energy**. v.129, p.695-716, 2017.

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

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

WANG, S.; ZHENG, D.; YIN, L.; WANG, F. Preparation, activity and structure of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) with nanoparticle. **Enzyme Microbial Technology**. v.107, p.22-31, 2017.

YADAV G.D.; JADHAV, S.R. Synthesis of reusable lipases by immobilization on hexagonal mesoporous silica and encapsulation in calcium alginate: Transesterification in non-aqueous medium. **Microporous and Mesoporous Materials**. v.86, p.215-222, 2005.

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

YAKOUT, S.M.; EL-DEEN, G.S.; Characterization of activated carbon prepared by phosphoric acid activation of olive stones. **Arabian Journal of Chemistry**. v.9, p.1155-1162, 2016.

YU, J.; PATERSON, N.; BLAMEY, J.; MILLAN, M. Cellulose, xylan and lignin interactions during pyrolysis of lignocellulosic biomass. **Fuel**. v.191, p.140-149, 2017.

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

ZHANG, X.M.; AI, N.S.; WANG, J.; TONG, L.J.; ZHENG, F.P.; SUN, B.G. Lipase-catalyzed modification of the flavor profiles in recombined skim milk products by enriching the volatile components. **Journal of Dairy Science**. v.99, 1-15, 2016.

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

ZHONG, N.; CHEN, W.; LIU, L.; CHEN, H. Immobilization of Rhizomucor miehei lipase onto the organic functionalized SBA-15: Their enzymatic properties and glycerolysis efficiencies for diacylglycerols production. **Food Chemistry**. v.271, p.739-746, 2019.

ZUBRIK, A.; MATIK, M.; HREDZÁK, S.; LOVÁS, M.; DANKOVÁ, Z.; KOVÁČOVÁ, M.; BRIANČIN, J. Preparation of chemically activated carbon from waste biomass by single-stage and two-stage pyrolysis. **Journal of Cleaner Production**. v. 143, p. 643-653, 2016.



## **CAPÍTULO 2**

---

**Manuscript 1. Development of activated carbon from pupunha palm heart sheaths: effect of synthesis conditions and its application in lipase immobilization**

---

\*Este artigo foi submetido (12/02/2020) à revista Journal of Environmental Chemical Engineering (INSS:2213-3437), classificação Qualis-Capes: A3.

**Development of activated carbon from pupunha palm heart sheaths: effect of synthesis conditions and its application in lipase immobilization**

Mylena Junqueira Pinto Brito<sup>a</sup>, Mateus Pereira Flores Santos<sup>a</sup>, Evaldo Cardozo de Souza Júnior<sup>a</sup>, Leandro Soares Santos<sup>a</sup>, Renata Cristina Ferreira Bonomo<sup>a</sup>, Rafael da Costa Ilhéu Fontan<sup>a</sup>, Cristiane Martins Veloso<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>State University of Southwest Bahia, CEP 45700-000, Itapetinga, BA, Brazil

\*Corresponding author: e-mail address: [crismveloso@yahoo.com.br](mailto:crismveloso@yahoo.com.br) (C.M. Veloso)  
Tel.: +55 77 32618659.

## ABSTRACT

Activated carbon obtained from pupunha palm heart sheaths was used as a support for lipase immobilization. The effect of temperature, carbonization time, and impregnation ratio on the specific surface area ( $S_{\text{BET}}$ ) and the average pore diameter ( $D_p$ ) of the carbon was evaluated. In addition, a detailed analysis of the lipase immobilization on activated carbon by the adsorption method was performed. The impregnation ratio and the carbonization temperature had a significant effect on all the response variables. The carbon from the best synthesis conditions presented a high  $S_{\text{BET}}$  ( $1598 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ ) and  $D_p$  (5.39 nm), which favored the lipase immobilization. The support produced showed a high immobilization capacity ( $664.514 \text{ mg g}^{-1}$ ) of lipase with maximum hydrolytic activity at pH 4 (5.027 U/mg). The adjustments of the kinetic models suggest that the enzyme immobilization on carbon occurs predominantly by chemisorption. Based on the thermodynamic parameters indicated that lipase adsorption on the matrix is a spontaneous and endothermic process.

**Keywords:** activated carbon; waste reuse; biocatalysts; lipase immobilization; adsorption mechanism

## 1. Introduction

Lipases (triacylglycerol acylhydrolases, EC3.1.1.3) comprise a group of hydrolytic enzymes that generally act at the organic-aqueous interface, catalyzing the hydrolysis and synthesis of esters formed by glycerol and long-chain fatty acids (Gupta et al., 2013; Zhong et al., 2019). These enzymes stand out among hydrolases due to their multiple application areas, including detergent, medicine, food (bakery, cheese, teas), and cosmetics industries, as biosensors for biodiesel production, biosurfactants, flavorings, among others (Sá et al., 2017; Rios et al., 2018; Gama et al., 2019).

Despite the high catalytic efficiency of lipase, there are some barriers to use this enzyme in continuous processes and largescale applications, including the low operational stability and difficulty in separating the final product (Li et al., 2018). Thus, the use of the enzyme in its immobilized form may be an effective alternative to solve these problems (Dhawane et al., 2018; Joshi et al., 2019).

Different methods have been used for lipase immobilization, such as encapsulation, crosslinking, covalent interaction, and adsorption (Brito et al., 2017; Rios et al., 2018). Adsorption is one of the most used immobilization methods, once this

technique has few deleterious effects on enzyme activity and selectivity, besides being low cost and easy to perform. In this method, the enzyme adheres to insoluble support surface, which is found in an aqueous medium, through van der Waals forces, hydrophobic interactions, hydrogen bonds, and specific interactions (Jesionowski et al., 2014; Reichardt et al., 2018). Due to the types of forces involved, some parameters such as pH, ionic strength, and temperature should be controlled, once changes in these parameters can affect the adsorptive efficiency of the materials (Gupta et al., 2013). In addition, the characteristics of the support directly affect the immobilization efficiency, thus the selection of a support depends mainly on the morphological aspects and surface chemistry, such as surface area, shape, pore size distribution, hydrophilicity-hydrophobicity characteristics of the surface, surface charges, chemical stability, and cost (Tacias-Pascacio et al., 2016).

In recent years, mesoporous materials have stood out as excellent supports for enzyme adsorption due to their desirable characteristics such as uniform pore size, high surface area, and ease of functionalization. The use of porous materials is also advantageous as the enzyme can be adsorbed to both the outer surface and inside the support pores. In this context, hexagonal mesoporous silica, mesoporous carbon, activated carbon, among others, are some examples of matrices used for this purpose (Almeida et al., 2017; Cea et al., 2019; Kumar et al., 2019).

Activated carbon (AC) has been considered a support with potential for enzyme immobilization, due to its chemical and textural characteristics (Brito et al., 2017; Almeida et al., 2017; Dhawane et al., 2018). This material is obtained by chemical or physical activation method. The carbon precursor used in the synthesis are compounds with high carbon value and low inorganic content, as well as solid residues from agriculture (bark and seeds, wood, and bagasse), which can yield activated carbon with properties suitable for various applications. The type of precursor material and the activation method used influence the activated carbon characteristics (Nowicki et al., 2015; Andrade et al., 2018; Rangabhashiyam and Balasubramanian, 2019).

It is noteworthy that conventional activated carbons made from lignocellulosic residues are predominantly microporous, which impairs the immobilization of larger molecules, such as lipase, thus requiring specific treatments that favor the development of a high surface area and large pore formation to accommodate the enzyme and allow substrate access and product diffusion (Brito et al., 2017; Zhou and Hartmann, 2019; Pandey et al., 2020).

Therefore, this study aimed to optimize the best conditions for the synthesis of activated carbon with high surface area and average pore diameter accessible to the enzyme, by changing the temperature, carbonization time, and impregnation ratio. Pupunha palm heart sheaths were used as a carbon precursor for the production of the supports, once these residues are generated in large quantities in Brazil, mainly coming from the palm heart canning industries. Furthermore, this study performed a detailed analysis of the lipase immobilization by adsorption on activated carbon, including a kinetic study, evaluation of adsorption equilibrium, and determination of thermodynamic parameters of the process.

## **2. Materials and methods**

### **2.1 Materials**

Residues from pupunha palm (*Bactris gasipaes*) production were donated by an agro-industry located in the state of Bahia, Brazil. The precursor material consisted of 4.49% ash, 12.72% lignin, 47.29% cellulose, and 12.29% hemicellulose, on a dry base Santos et al. (2019). Phosphoric acid (85% P.A.-CAS7664-38-2) was used as an activating agent. Lipase (Lipase from porcine pancreas type II, Sigma-Aldrich; CAS number: 9001-62-1) was used in the immobilization tests. The other reagents used in the experiment were of analytical grade and are described throughout the methodology.

### **2.2 Experimental design of the carbon synthesis**

The central rotational composite design was used as a statistical tool to assess the influence of carbonization temperature (°C), carbonization time (min), and impregnation ratio (activated agent mass/precursor mass) in development da specific surface area (SBET) and the average pore diameter (Dp) of the carbons. The experimental design is presented in Table 1. The activated carbons were synthesized according to the methodology proposed by Brito et al., 2018.

The significant effects were studied at 3 levels, with a total of 19 trials and 15 treatments, with 5 repetitions at the central point. The results were submitted to multiple linear regression analysis, using a second-order polynomial model, to identify the variables with a significant effect in the response variables, which was defined based on the significance of the model ( $p < 0.05$ ), lack of fit ( $p > 0.05$ ) and coefficient of

determination. The Statistical Package Analysis System® student edition was used to perform all statistical analysis.

**Table 1** Variables and levels of the rotational central composite design ( $2^3$ )

Actual variables	Coded variable	Level				
		-1.68	-1	0	1	1.68
Carbonization temperature (°C)	X <sub>1</sub>	300	380	500	620	700
Carbonization time (min)	X <sub>2</sub>	30	48	75	102	120
Impregnation ratio (activated agent mass/precursor mass)	X <sub>3</sub>	0.333	0.873	1.667	2.460	3.000

### 2.2.1 The activated carbon characterization

The samples impregnated at different impregnation ratios were subjected to differential thermal analysis (DTA) and thermogravimetry (TG) on a Shimadzu DTG-60 TGA / DTG thermal analyzer in the temperature range of 50 ° C to 750 ° C (heating rate of 10 °C min<sup>-1</sup>) under nitrogen flow (10 mL.min<sup>-1</sup>), using 0.005 g of sample. The surface area and pore size distribution were obtained from the N<sub>2</sub> adsorption-desorption isotherms at 77 K (Micrometrics ASAP 2420, Norcross, GA, USA). The zero charge point of the carbon produced under the best synthesis conditions established by the statistical analysis was determined according to the methodology proposed by Regalbuto and Robles (2004).

### 2.3 Lipase immobilization by adsorption on activated carbon

The activated carbon produced according in the best synthesis conditions determined by RCCD was used as support for lipase immobilization by adsorption. The carbon adsorptive capacity and the hydrolytic activity of the biocatalysts were evaluated at different pH values. Furthermore, a kinetic study was performed and the adsorption isotherms were determined. For that, 5.0 mL aliquots of the enzyme solution were added to tubes containing 0.100 mg of activated carbon and stirred (20 rpm) in an orbital shaker over a predetermined time, pH, and temperature. The pH was adjusted by the addition of sodium acetate buffer (0.1 mol.L<sup>-1</sup>) and acetic acid (0.1 mol. L<sup>-1</sup>). After each assay, the tubes were centrifuged (3500 rpm/10 min) and the supernatant was collected for

quantification of non-adsorbed proteins by the Bradford method (Bradford 1976) at 595 nm using a standard BSA calibration curve. The support immobilization capacity ( $CI_{mo}$ ) was calculated by the difference between the initial and final protein concentrations, using Equation 1.

$$q_e = \frac{VC_{in} - VC}{m_{ads}} \quad (1)$$

where  $q_e$  is the adsorptive capacity or immobilization capacity ( $CI_{mo}$ ) ( $mg \cdot g^{-1}$ ),  $V$  is the solution volume (mL),  $C_{in}$  is the initial solution concentration ( $mgL^{-1}$ ),  $C$  is the concentration of the solution ( $mgL^{-1}$ ) at equilibrium; and  $m_{ads}$  is the mass of the carbon (g).

#### 2.4 Hydrolytic activity determination by titration method

The hydrolytic activity of the soluble and immobilized enzymes was determined by the enzymatic hydrolysis of olive oil emulsion, according to the methodology of Soares et al. 1999. One unit of activity was defined as the amount of enzyme that releases  $1 \mu mol$  of fatty acid per minute of reaction under the assay conditions.

#### 2.5 Statistical analysis

The results of the pH effect on the hydrolytic activity of the soluble and immobilized enzymes were expressed as mean  $\pm$  standard deviation (SD), in triplicate. Means were compared by ANOVA and Tukey's honest significant difference test ( $P < 0.05$ ). Nonlinear models were adjusted to the experimental data obtained in the kinetic experiments and the adsorption isotherms. The graphics were plotted on SAS Studio and Sigma Plot 11.0 software. The models were evaluated according to the coefficient of determination ( $R^2$ ) and the root mean square error (RMSE), according to Equation (2). All immobilization tests were performed in triplicate.

$$RQEM = \sqrt{\frac{\sum(\bar{Y} - Y)^2}{N}} \quad (2)$$

where,  $\bar{Y}$  is the variable estimated by the model;  $Y$  is the variable obtained experimentally; and  $N$  is the number of observations.

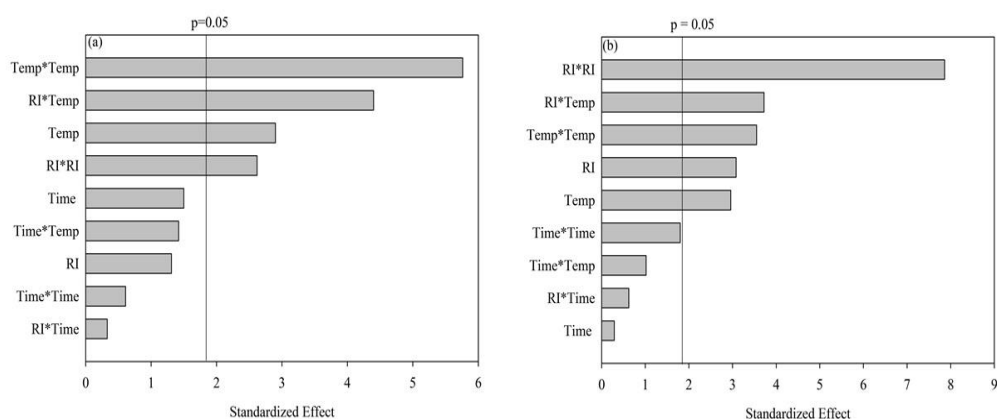
## 2.6 FTIR spectroscopy and Scanning Electron Microscopy (SEM)

The functional groups of free enzyme, activated carbon, and biocatalyst were evaluated by Fourier transform infrared attenuated total reflectance spectrometry (FTIR-ATR) (Cary 630 FTIR, Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA). The morphology of activated carbon before and after the immobilization process was determined by Scanning Electron Microscopy (SEM) (Carl Zeiss, Model DSM940, Oberkochen, Germany).

## 3. Results and Discussion

### 3.1 Effect of the synthesis conditions on the textural properties of activated carbon

The Pareto charts, that represent the ANOVA of the effect of different synthesis conditions on the specific surface area and pore diameter of the activated carbons, respectively, are shown in Figs. 1a and 1b. The absolute values of the amplitude and the standardized estimate effect (estimate effect divided by standard error) of each factor were plotted in decreasing order of importance with 95% confidence ( $p = 0.05$ ), represented by the vertical line.



**Fig. 1.** Pareto chart of the effects of the variables carbonization temperature (Temp), carbonization time (Time) and impregnation ratio (IR) on the surface area (a) and mean pore diameter (b) of activated carbons ( $p = 0.05$ ).

The carbonization temperature ( $X_1$ ) had a significant effect on the surface area and the average pore diameter of the activated carbon, as well as the interaction between this parameter and the impregnation ratio and its quadratic effects (Fig. 1a). When evaluating the impregnation ratio, a significant linear effect was observed for  $D_{po}$ , with no significant effects for  $S_{BET}$  ( $p > 0.05$ ). However, the variable remained in the model as



the quadratic and the interaction effects of this variable were significant. The carbonization time had no significant effect on both variables, thus the shortest time studied (30 minutes) can be used for the production of activated carbon, which is an advantageous result from the economic point of view, due to the reduction of energy consumption. The mathematical models obtained for  $S_{BET}$  ( $R^2 = 0.87$ ) and  $D_p$  ( $R^2 = 0.91$ ), with the uncoded variables, are described by Equation (3) and Equation (4), respectively.

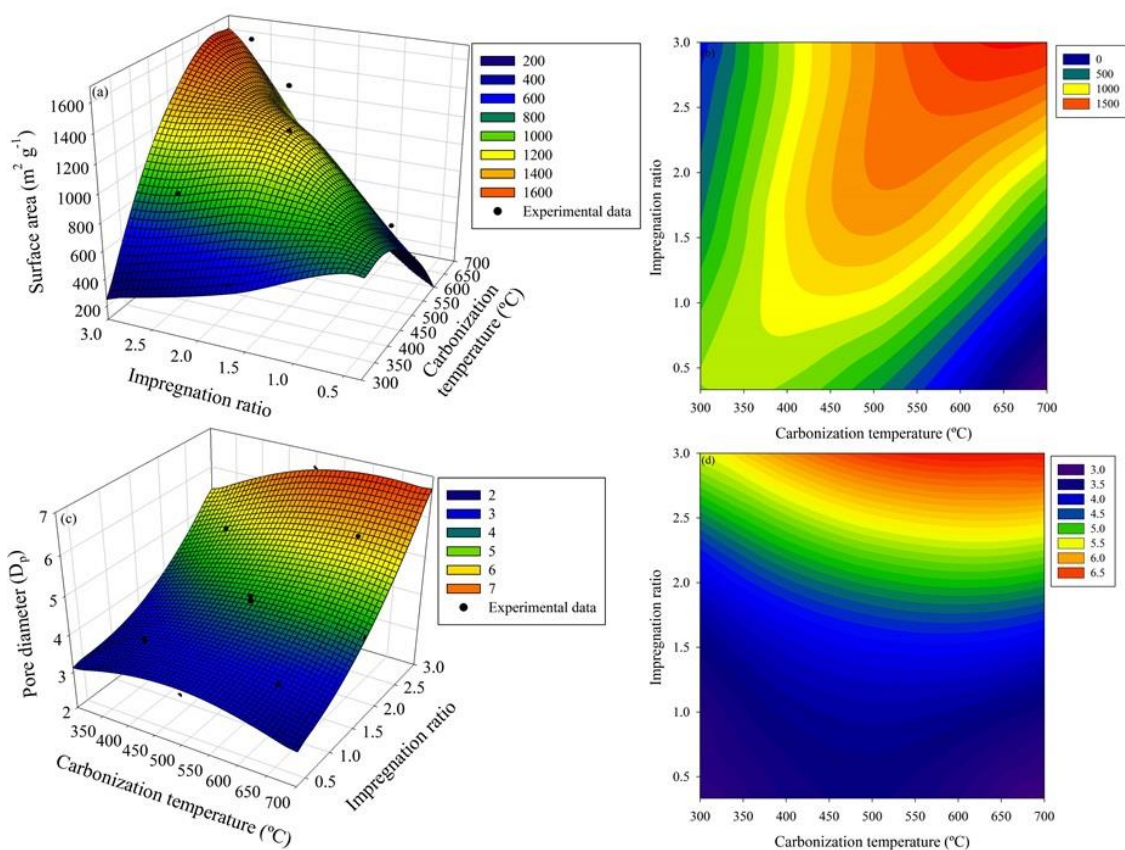
$$S_{BET} = -1926.772 + 13.649Temp - 0.0187Temp^2 - 595.253RI - 193.335RI^2 + 3.061Temp*RI \quad (3)$$

$$D_p = 2.022 + 0.008Temp - 0.001Temp^2 - 1.071RI + 0.405RI^2 + 0.002Temp * RI \quad (4)$$

where:  $S_{BET}$  is the surface area ( $m^2/g$ ) of activated carbon,  $D_p$  is the average pore diameter (nm), Temp is carbonization temperature ( $^{\circ}C$ ) and RI is the impregnation ratio. Both models were significant ( $p = 0.0001$ ) and lack of fit was not significant ( $p > 0.05$ ).

The response surface methodology (RSM) better explains the relationship between factors and responses (Fig. 2), showing the effect of the carbonization temperature and the impregnation ratio on the surface area and average pore diameter of carbons. Changes in the synthesis conditions led to the production of activated carbon with surface area ranging from  $219 m^2g^{-1}$  to  $1662 m^2g^{-1}$  and average pore diameter from 3.36 nm to 6.61 nm, thus highlighting the importance to use the experimental design in the study of the synthesis of activated carbon.

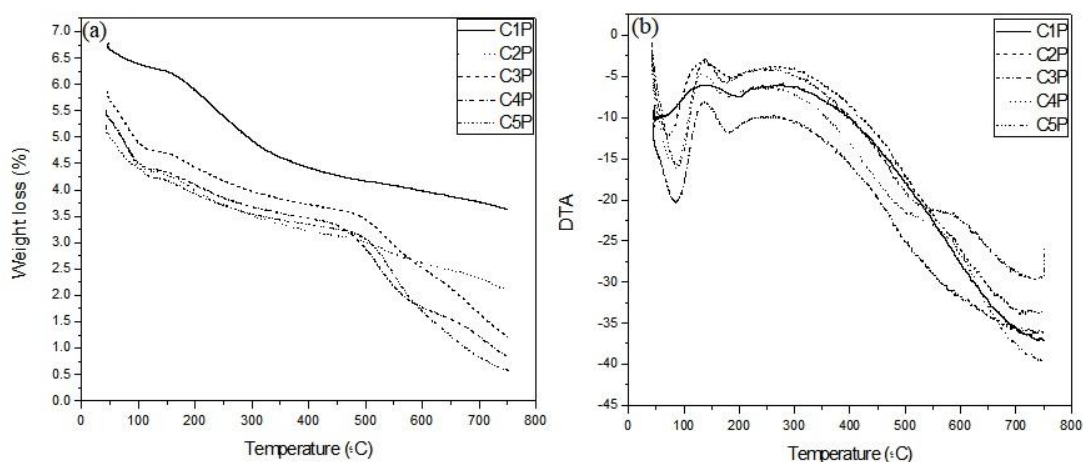
As shown in Fig. 2, the increase in phosphoric acid concentration increased the surface area of the carbons. In contrast, concerning the effect of carbonization temperature, a marked reduction in  $S_{BET}$  was observed in the region around approximately  $660^{\circ}C$ . Regarding the average pore diameter, the increase in both carbonization temperature and impregnation ratio led to higher  $D_p$ .



**Fig. 2.** Response surface graph and contour curve graph of the adjusted model for surface area  $m^2g^{-1}$  (a and b) and average pore diameter (nm) (c and d) of the activated carbon as a function of the carbonization temperature (°C) and impregnation ratio.

To better understand the effect of these parameters on the response variables, the thermogravimetric (TG) and differential thermal analysis (DTA) of the impregnated material was performed at the five impregnation ratios, in a temperature range from 50 °C to 750 °C (Fig. 3). The thermal decomposition of the materials occurred in four distinct steps, which was affected by the phosphoric acid ratio. In the first step (I) there was an initial mass loss for all samples, as well as an endothermic peak at 100 °C, probably due to water evaporation (Mahmood et al., 2017). In the next step (II) there was a mass loss from 150 °C to 450 °C, due to the thermal degradation via pyrolysis of the organic material from the precursor material promoted by acid hydrolysis. At this step, most volatile compounds were removed, with concomitant development of microporosity. The mass loss increased with increasing the impregnation ratio, due to more effective hydrolysis promoted by higher acid concentration. This step was further characterized by the transformation of phosphoric acid into pyrophosphoric acid at 213 °C and metaphosphoric acid around 300 °C. In the third step (III), from 450 °C to 600 °C, a slight

loss of mass was observed. At temperatures above 450 °C, it is known to have a secondary contraction when phosphate bonds become thermally unstable. The reduction in cross-linked density allows the growth and alignment of polyaromatic groups, producing a denser structure with some reduction in porosity. Significant mass loss was observed in the final activation step (IV) at temperatures above 600 °C, probably due to the volatilization of phosphorus compounds such as  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ,  $\text{H}_2\text{PO}_4^{-1}$  or  $\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7^{-2}$  and carbon (Nahil and Williams, 2012; Xu et al., 2014).



**Fig. 3.** TG (a) and DTA (b) curves of the impregnated material at different impregnation ratios: C1P: 0.333: 1; C2P: 0.873: 1; C3P: 1.667: 1; C4P: 2.460: 1; and C5P: 3.000: 1.

The effect of the carbonization temperature and the impregnation ratio on pore development is directly related to the mechanism of action of phosphoric acid, which is affected by the nature of the precursor material. Phosphoric acid is known to first attack hemicellulose and lignin, both amorphous polymers, which are more accessible to acid hydrolysis than cellulose (the main lignocellulosic component of the residue). The activation of amorphous polymers mainly produces micropores, while the activation of crystalline cellulose produces a wider range of pore sizes. The crystalline cellulose has a much greater swelling power when compared to its amorphous polymer counterparts, mainly because it is more prone to a high esterification with phosphates and polyphosphates. Moreover, it can also be inferred that cellulose is the most difficult fraction to undergo hydrolysis, due to its innermost location within the fiber structure (Rangabhashiyam and Balasubramanian, 2019). These reactions are accompanied by

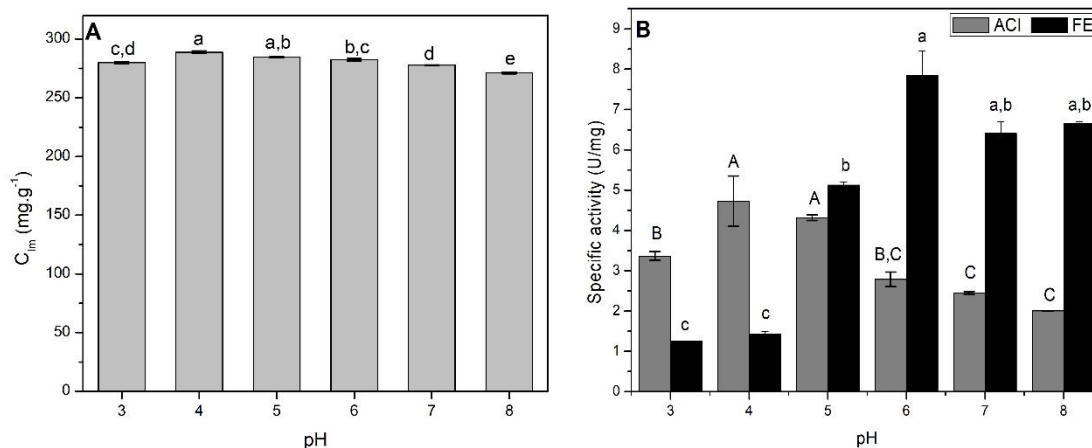
other transformations such as cyclic cross-linking and condensation reactions. The addition (or insertion) of phosphate groups initiates an expansion process that leaves the matrix in an expanded state with an accessible pore structure. The chemical reactions begin to occur at milder activation temperatures, and a concomitant development of micropores is usually observed at temperatures in the range of 150 °C to 350 °C. A further increase in temperature results in mesopore development, mainly through enlargement of existing micropores, leading to a decrease in surface area, as observed in the present study (Jagtoyen and Derbyshire, 1998; Nahil and Williams, 2012; Yakout and El-Deen, 2016).

In the enzyme immobilization by adsorption, the larger the surface area of the adsorbent the larger will be the available area for protein binding to the matrix. However, the average pore diameter also needs to be considered as it can limit the size of the molecules to be immobilized by the support (Brito et al., 2017). It is worth noting that larger pore diameters is not as advantageous, once the enzymes can be confined to a large extent within the pores, enabling the formation of aggregates and inactive enzyme complexes. In these systems, the effect of the interfacial activation is reduced, with limitations on the substrate diffusion (Zhou and Hartmann, 2013). As can be seen in Fig. 2, favorable conditions for the synthesis of the support to be used in lipase immobilization can be identified in a wide region, since this enzyme has a dimension around 4 nm (Serra et al., 2010). Thus, the activated carbon (AC) was produced using a carbonization temperature of 620 °C and an impregnation ratio of 2.5. The theoretical and experimental values of  $S_{\text{BET}}$  and  $D_p$  of the porous material were 1407 m<sup>2</sup>g<sup>-1</sup> and 5,747 nm, and 1598 m<sup>2</sup>g<sup>-1</sup> and 5,398 nm, with a variation of 13.54% and 6.24%, respectively. Thus, the RSM and the experimental design of the present study was able to simultaneously analyze the effect of CA synthesis conditions, contributing to the improvement of further research aimed at increasing the surface area and average pore diameter compatible with lipase immobilization.

### **3.2 Effect of pH on the adsorptive process**

The effect of pH on the immobilization capacity and hydrolytic activity of the enzyme in both the soluble and immobilized forms are shown in Fig. 4. When evaluated the immobilization capacity in the support (Fig. 4(a)), it is observed that in all pH values studied there is a high enzyme adsorptive capacity, however at pH 4.0 and 6.0 the highest values were obtained. Acid lipase is known to have an isoelectric point between 4.0 and 5.0, that is, below these pH values the protein has positive charges and above negative

charges (Ferrer et al., 2000; Mayordomo et al., 2000). This pH value is close to the zero charge point of activated carbon ( $pH_{PCZ} = 4.3$ ), showing that the hydrophobic effect governs the immobilization process (Uygun et al., 2010; Alves et al., 2017; Cea et al., 2019).



**Fig. 4.** Effect of pH on the immobilization capacity ( $C_{Imo}$ ) of the enzyme on the support (A) and hydrolytic activity of the free enzyme (FE) and the immobilized enzyme on the activated carbon (AC) ( $C_o = 6000\ mg\ L^{-1}$ ;  $T = 25\ ^\circ C$ ; Time = 4 h) (b). Means followed by the same letter for pH values not differ significantly between them at  $P < 0.05$  by Tukey's honest significant difference test.

On the other hand, the pH of the reaction medium had a great influence on the hydrolytic activity of the enzyme in its soluble and immobilized form (Fig. 4b), since the maximum enzyme activity in the soluble form was obtained at pH 6.0, which was not observed in the immobilized biocatalyst, which showed higher activity at pH 3.0 and 4.0. This result can be due to the possible conformational changes in the lipase structure or the concentration between the charged species, substrate, product, hydrogen ions, hydroxyl ions, both in the immobilized enzyme and the reaction medium (Perez et al., 2007). In addition, the enzymes immobilized at pH 4.0 and 5.0 showed higher specific activity when compared to the enzyme in solution. This fact can be due to: (i) modifications of the conformational structure of lipase; (ii) enzymatic stabilization after immobilization in the support with high confinement capacity due to the high surface area and large mesopore volume, resulting in greater availability of the active sites; and (iii) greater interfacial activation, increasing the enzymatic activity (Jesionowski et al., 2014;

Sarno et al., 2017). Lipase is known to show increased activity when adsorbed on hydrophobic supports due to conformational changes, once it undergoes interfacial activation and the equilibrium is shifted towards the open conformation, which makes its active site accessible to substrates. The activation of the immobilized lipase on hydrophobic supports has also been reported by other researchers (Bastida et al., 1998; Mateo et al., 2007; Mendes et al., 2012)).

The other tests were performed at pH 4.0, once the highest hydrolytic activity of the biocatalyst was observed at this pH value. In this condition, a maximum hydrophobic interaction between lipase and the support surface is expected since this pH value is close to the enzyme isoelectric point and the point of zero charge of the activated carbon, thus favoring the interfacial activation.

### 3.3 Adsorption kinetics of the enzyme on the support

Another study of fundamental importance when evaluating a new support is the adsorption kinetics of the molecule of interest. The kinetic study considers the mass transfer phenomena and their parameters, besides helping to understand the adsorbent/adsorbate interaction, by determining various parameters such as reaction order, rate constant, activation energy, initial adsorption rate, and time required to achieve the equilibrium in a given experimental condition (Ramani et al., 2012). Fig. 5 presents the results of the kinetic study of lipase immobilization on the activated carbon. An average contact time of 60 min between the enzyme and the support is required to achieve equilibrium. The enzyme adsorption is faster in the early stages of the process and slower near equilibrium, due to a large amount of adsorption sites available on the carbon surface at the beginning of the process, which reduces over time. In addition, there is an increase in the repulsive forces between the adsorbed enzyme molecules, which hinders the adsorption process at the remaining sites (Brito et al., 2017).

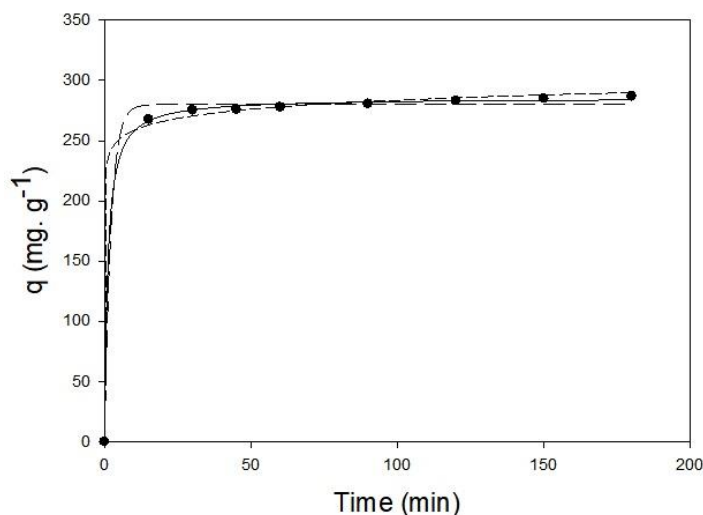
To define an appropriate kinetic model capable of representing the enzyme adsorption on activated carbon, the pseudo first order, pseudo second order and Elovich models (Equations (5), (6), and (7), respectively) were adjusted to the experimental data.

$$q_t = q_e [1 - e^{-k_1 t}] \quad (5)$$

$$q_t = \frac{k_2 q_e^2 t}{1 + k_2 q_e t} \quad (6)$$

$$q_t = \frac{1}{\beta} \ln (1 + \alpha \beta t) \quad (7)$$

where,  $q_e$  and  $q_t$  are the amount adsorbed ( $\text{mg g}^{-1}$ ) at equilibrium and time  $t$  (min), respectively;  $k_1$  is the pseudo-first order adsorption rate constant ( $\text{min}^{-1}$ );  $k_2$  is the pseudo-second order rate constant ( $\text{g mg}^{-1} \text{min}^{-1}$ );  $\alpha$  is the initial adsorption rate constant ( $\text{mg g}^{-1} \text{min}^{-1}$ ); and  $\beta$  is a constant desorption rate ( $\text{g mg}^{-1}$ ).



**Fig. 5.** Adjustment of pseudo-first order kinetic (—), pseudo-second order kinetic (---) and Elovich model (- -) models for lipase adsorption on the activated carbon: (●) experimental data ( $C_0= 6000 \text{ mg L}^{-1}$ ; pH: 4.0;  $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ ; Time = 0 – 300 min).

The kinetic parameters of the models, the coefficient of determination ( $R^2$ ) and the root mean square error (RMSE) are shown in Table 2. The models adjusted satisfactorily to the experimental data, and the pseudo second-order and Elovich models were used to describe the lipase immobilization on activated carbon, as they presented a higher  $R^2$  and lower RMSE. The pseudo-second order model assumes that the chemical adsorption occurs, forming chemical bonds between the surface functional groups of the adsorbent and the adsorbate, involving the transfer of electrons between them. For this case, adsorption preferably occurs on the surface of the adsorbent material, followed by a diffusion step and intraparticle adsorption. The  $h_0$  value ( $244.414 \text{ min}^{-1}$ ), which determines the initial adsorption rate, shows that lipase migrated rapidly from the solution to the carbon surface, which can penetrate the pores of the matrix due to its average diameter of 4 nm, reaching equilibrium with an adsorptive capacity ( $q_e$ ) around  $285.432 \text{ mg g}^{-1}$ . The satisfactory fit of the Elovich model confirms the chemical adsorption, with the coefficients  $\alpha$  and  $\beta$  representing the initial adsorption rate and the desorption

coefficient, respectively (Gupta et al., 2011). It was observed that the parameter  $\alpha$  was quite high, while  $\beta$  presented low values, indicating a low desorption rate due to the interactions between lipase and the activated carbon, thus evidencing a high affinity between them.

**Table 2** Parameters and coefficients of determination of kinetic models for the lipase immobilization on activated carbon.

<b>Kinetic Constants</b>	<b>ACI</b>
Pseudo-first order model	
$q_e$ (mg g <sup>-1</sup> )	279.941
$k_1$ (min <sup>-1</sup> )	0.450
R <sup>2</sup>	0.929
RMSE	5.465
Pseudo-second order model	
$q_e$	285.432
$k_2$ (mg g <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> )	0.003
$h_0$ (mg g <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> )	244.414
R <sup>2</sup>	0.996
RMSE	2.555
Elovich	
$\alpha$ (mg g <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> )	2.13x10 <sup>9</sup>
$\beta$ (g mg <sup>-1</sup> )	10.871
R <sup>2</sup>	0.998
RMSE	3.053
Morris–Weber model	
$K_{ad}$ (mg g <sup>-1</sup> min <sup>-0.5</sup> )	0.5269
C (mg g <sup>-1</sup> )	138.34
R <sup>2</sup>	0.953



To elucidate the mechanism of mass transfer during the adsorption process, it is necessary to use intraparticle diffusion models, such as the Weber and Morris (1963) intraparticle diffusion model and the Boyd (1947) kinetic model since the previously evaluated models describe only the controlling mechanism of the adsorption process.

The models that describe the mass transfer in the adsorption process are based on three consecutive steps: (1) transport of adsorbate through surface film of exterior of adsorbent (film diffusion); (2) diffusion of sorbate within the pores of sorbent and (3) adsorption of solute on interior surfaces of the adsorbent pores (Sarkar et al., 2003). The overall adsorption rate is controlled by the slowest step; the third step does not represent the limiting because it is very fast, thus, the film diffusion or particle diffusion should govern the overall process (Mohan et al., 2006). According to Weber and Morris (1963), when intraparticle diffusion is the rate-limiting step, the removal rate from the solution varies with the square root of time. Thus, the intraparticle diffusion coefficient ( $k_{ad}$ ) can be defined by Equation (8). In this case, it is considered that diffusion within the solid particle occurs slowly, thus limiting the process.

$$q_t = k_{ad}t^{1/2} + C \quad (8)$$

where  $q_t$  is the amount of adsorbate adsorbed ( $\text{mg g}^{-1}$ ) at a time  $t$  (min),  $k_{ad}$  is the intraparticle diffusion coefficient ( $\text{mg g}^{-1}\text{min}^{-0.5}$ ) and  $C$  is a constant factor related to diffusion resistance ( $\text{mg g}^{-1}$ ).

The Boyd's Model (1947) is used to examine in more detail whether the adsorption is controlled by diffusion in the film or pore. According to this model, the fraction of solute adsorbed at a certain time  $t$  can be determined by the Equations (9) and (10).

$$F = 1 + \left(\frac{6}{\pi^2}\right) \sum_{n=1}^{\infty} \left(\frac{1}{n^2}\right) \exp\left[-\frac{D_i t \pi^2 n^2}{r_0^2}\right] \quad (9)$$

$$F = 1 + \left(\frac{6}{\pi^2}\right) \sum_{n=1}^{\infty} \left(\frac{1}{n^2}\right) \exp[-n^2 Bt] \quad (10)$$

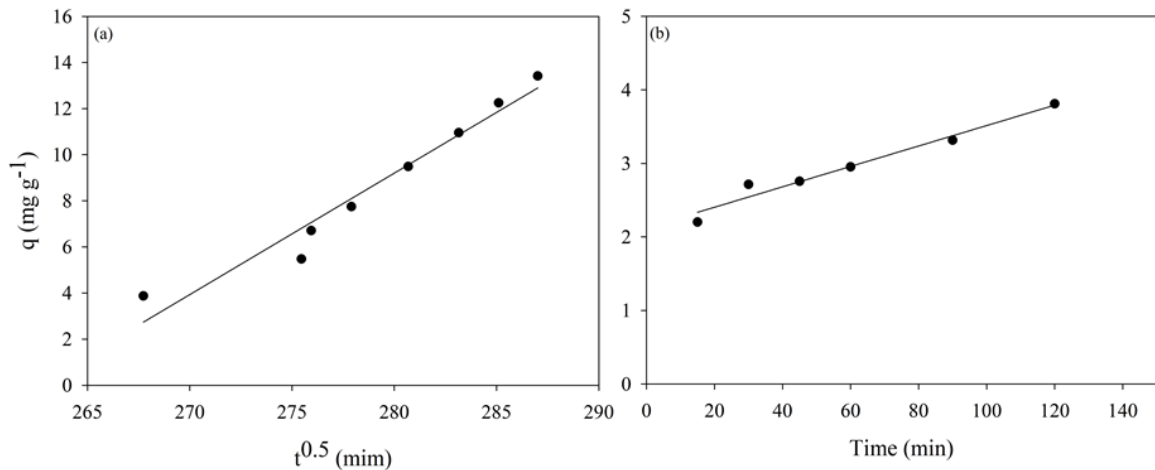
Where  $F$  is the fractional equilibrium at time  $t$  ( $F = q_t/q_e$ ),  $q_e$  is the amount of adsorbate adsorbed at an infinite time ( $\text{mg g}^{-1}$ ) and  $q_t$  is the amount of adsorbate adsorbed at a time  $t$ ;  $Bt$  is the time constant;  $D_i$  is the effective diffusion coefficient of the dye and  $r_0$  is the radius of solid particle, and  $n$  is the integers 1, 2, 3,..

The  $Bt$  value is determined according to Equation (11), as described by Reichenberg (1953).

$$Bt = -0.4977 - \ln(1 - F) \quad (11)$$

The term  $Bt$  is calculated for each  $F$  value, and the resulting  $Bt$  values are plotted against  $t$  (Boyd's graph). If the graph generates a line from the origin, the intraparticle diffusion process can be considered the limiting step of the adsorption process for the specified time range.

Fig. 6a shows the fit of experimental data to the diffusion model proposed by Weber and Morris, with a good agreement between the theoretical and experimental data, indicating that the model describes the adsorption mechanism well. The  $C$  value, which indicates the boundary layer thickness, is nonzero, thus indicating that the plot of  $qt$  versus  $t^{1/2}$  did not pass through the origin. Therefore, the intraparticle diffusion mechanism is not the rate-limiting step, and other mechanisms must act simultaneously in the mass transfer to control the adsorption process. When analyzing the Boyd's diffusion graph (Fig. 6 (b)), it is possible to confirm that the intraparticle diffusion is not a determining step in the adsorption over time, once the line does not pass through the origin.



**Fig. 6** Adjustment of Weber and Morris models (a) and Boyd intraparticle diffusion model (b) for lipase adsorption on activated carbon: (●) experimental data.

This result demonstrates the greater resistance to mass transfer of the film formed around the adsorbent rather than the pores (Maciel et al., 2013; Alves et al., 2017). Film

transport is usually the limiting step for systems with a high affinity between the adsorbent and adsorbate (Sarkar et al., 2003). In the system under study, this behavior can be due to the particularities of the enzyme, once lipase, specifically in the presence of hydrophobic support, undergoes interfacial activation, allowing the active site to interact with the support by hydrophobic adsorption, thus confirming the great affinity between the enzyme and the support (Reichardt et al., 2018).

### 3.4 Adsorption isotherms

Adsorption isotherms allow assessing the ability of activated carbon to adsorb a molecule of interest. In addition, it is also a powerful tool for theoretical evaluation and interpretation of thermodynamic parameters such as adsorption heat (Andrade et al., 2018). In this study, the lipase immobilization capacity by adsorption on activated carbon was evaluated, and the nonlinear Langmuir and Freundlich models were adjusted to the experimental data at different temperatures (10 °C, 20 °C, and 30 °C).

The Langmuir isotherm assumes that adsorption occurs at evenly distributed sites with equal surface energy, forming a monolayer covered surface, with no interaction between the adsorbed molecules, as shown in Equation (12). Freundlich's isotherm, in turn, is an empirical equation that can be used to describe heterogeneous systems. It does not manifest saturation of the adsorbent surface, and the adsorbed amount increases indefinitely with the solution concentration, as shown in Equation (13) (Wong et al., 2018).

$$q = q_s \frac{bC_{eq}}{1+bC_{eq}} \quad (12)$$

$$q = KC_{eq}^{1/n} \quad (13)$$

where  $q_s$  is the saturation capacity of the monolayer ( $\text{mg g}^{-1}$ ),  $C_{eq}$  is the adsorbate concentration in the liquid phase at equilibrium ( $\text{mg L}^{-1}$ );  $b$  is the adsorption equilibrium constant ( $\text{L mg}^{-1}$ );  $K$  is the Freundlich constant [ $(\text{mg g}^{-1}) (\text{L mg}^{-1})^{1/n}$ ] and  $n$  is a dimensionless constant related to the adsorption intensity.

The isotherm parameters, the coefficient of determination ( $R^2$ ) and the root mean square error (RMSE) are summarized in Table 3. Fig. 7 shows the adjustments of the nonlinear Langmuir and Freundlich models to the experimental data at different temperatures. It is observed that both models satisfactorily fit the experimental data, once

high  $R^2$  and low RMSE values were obtained, indicating that the proposed models can satisfactorily describe the adsorption phenomenon on the synthesized carbon.

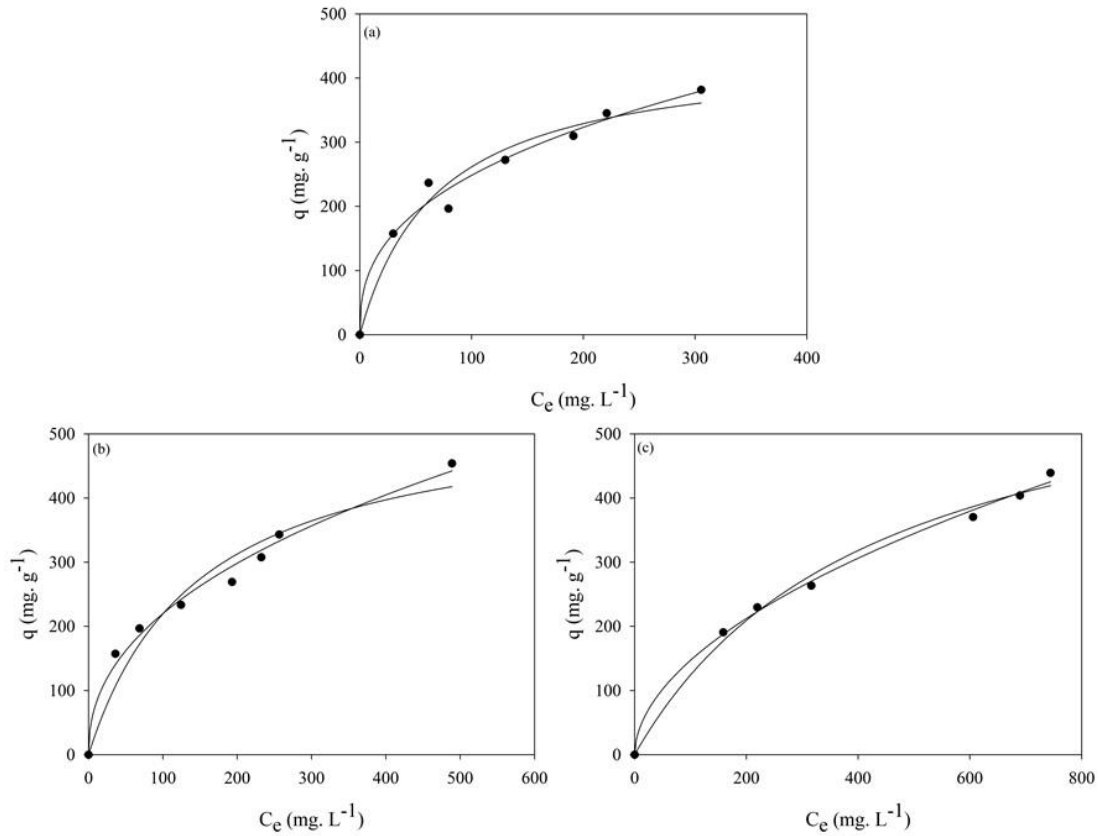
**Table 3** Adjusted models of adsorption isotherms of determination of lipase immobilization on activated carbon

Model	Temperature	Parameters					
		$q_s$	b	A	n	$R^2$	RMSE
Langmuir	10	443.269	0.0143	-----	-----	0.9905	13.258
	20	544.031	0.0068	-----	-----	0.9730	10.706
	30	664.514	0.0023	-----	-----	0.9916	12.841
Freundlich	10	-----	-----	43.0735	2.6289	0.9803	15.943
	20	-----	-----	28.9183	2.2704	0.9888	19.254
	30	-----	-----	12.8524	1.8897	0.9968	7.893

$q_s$  ( $\text{mg g}^{-1}$ ); b ( $\text{L mg}^{-1}$ ); and a [ $(\text{mg g}^{-1}) (\text{L mg}^{-1})^{1/n}$ ]

With respect to the parameters determined by the Langmuir model, it is observed that the enzyme immobilization capacity increased with increasing temperature, thus obtaining the maximum immobilization capacity at 30 °C. The increase in temperature is known to produce greater kinetic energy to lipase molecules, causing a greater number of collisions per unit of time, which is necessary to promote pore surface diffusion, leading to an increase in immobilization capacity with the increase in temperature (Brito et al., 2017; Reichardt et al., 2018). Furthermore, this behavior can be due to the contribution of hydrophobic interactions, once an increase in temperature induces a structural rearrangement of protein molecules, facilitating the adsorption by exposing the hydrophobic groups on the enzyme surface (Gupta et al., 2013). The higher adsorption with increasing temperature also suggests an endothermic and entropically-driven process. Concerning the constant b, which represents the inverse of the ratio of adsorption/desorption constants ( $1/kd$ ), values below 1 were obtained, which indicates a favorable adsorption phenomenon for all temperatures evaluated, as also observed for the

n value, determined by the Freundlich model, from 1 to 10, thus demonstrating the viability of the enzyme immobilization on activated carbon.



**Fig. 7.** Adsorption isotherms of lipase on activated carbon: (a) 10 °C; (b) 20 °C (c) 30 °C. (●) experimental data; (—) Langmuir model; (----) Freundlich model (Conditions:  $C_o=3.000-10.000\text{mg L}^{-1}$ ; pH: 4.0; Time = 120 min).

### 3.5 Thermodynamic study of the adsorption process

The thermodynamic parameters of the lipase immobilization by adsorption on activated carbon, including Gibbs energy ( $\Delta G^\circ$ ), enthalpy ( $\Delta H^\circ$ ) and adsorption entropy ( $\Delta S^\circ$ ) were determined by adjusting the Langmuir model at the three temperatures studied, to verify the possible adsorption mechanisms. The Gibbs free energy was determined using the Equation (14).

$$\Delta G^0 = -RT\ln k_d \quad (14)$$

where  $k_D$  is the thermodynamic equilibrium constant ( $L g^{-1}$ ),  $k_D$  is obtained by plotting  $q_e/C_e$  versus  $q_e$  and extrapolating the curve when  $q_e$  tends to zero.

When applying this concept in Equation (14), the thermodynamic parameters  $\Delta H^\circ$  and  $\Delta S^\circ$  can be determined according to Equation (15):

$$\ln k_d = -\frac{\Delta G^\circ}{RT} - \frac{\Delta H^\circ}{RT} + \frac{\Delta S^\circ}{R} \quad (15)$$

Where: R is the universal gas constant ( $8.314 J mol^{-1} K^{-1}$ ) and T is the temperature (K).

Table 4 shows the calculated thermodynamic parameters of the lipase immobilization by adsorption on activated carbon.

**Table 4.** Thermodynamic parameters of the lipase adsorption on activated carbon

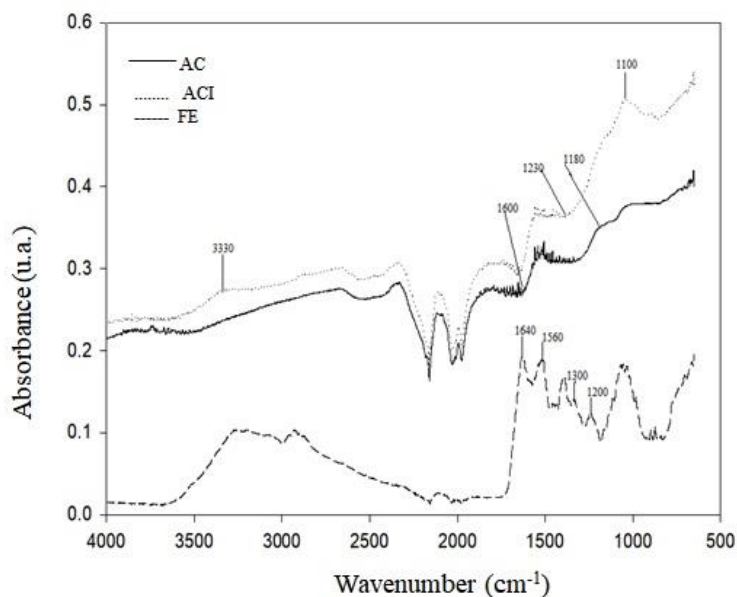
Temperature (K)	Parameters			
	$\Delta G^\circ$	$\Delta H^\circ$	$\Delta S^\circ$	$T\Delta S^\circ$
	(kJ mol <sup>-1</sup> )	(kJ mol <sup>-1</sup> )	(kJ K <sup>-1</sup> mol <sup>-1</sup> )	(kJ mol <sup>-1</sup> )
			0.366	107.238
293	-24.35	79.48		
303	-27.52			
313	-31.69			

The adsorption Gibbs free energy,  $\Delta G^\circ$ , was negative and decreased with increasing temperature, which indicates that the adsorptive process was spontaneous for the conditions studied, and tended to be more pronounced at higher temperatures (Alves et al., 2017; Wong et al., 2018). The positive  $\Delta H^\circ$  value shows the endothermic character of the adsorption process. When the adsorption process is endothermic, the adsorption capacity of the enzyme on the matrix increases with increasing temperature, as hydrophobic interactions become more significant, as observed in the adsorption isotherms, with a higher immobilization capacity at 30 °C. In addition, enthalpy values allow understanding the adsorption mechanism, indicating whether it occurs predominantly by physisorption or chemisorption.  $\Delta H^\circ$  values between 5 to 40 kJ. mol<sup>-1</sup>

are characteristic of physisorption, while higher energy [(40 to 800)  $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ] suggests chemisorption (Gonzalez-Olmos and Iglesias, 2008). In the present study, the  $\Delta H^\circ$  value was greater than  $40 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ , thus the chemisorption mechanism may have governed the process. In addition, it was found that the process was entropically-driven, once  $T\cdot\Delta S^\circ$  was higher than  $\Delta H^\circ$ , which ensures a greater contribution of the adsorption entropy rather than the adsorption enthalpy. Entropy changes ( $\Delta S$ ) are related to hydrophobic interactions, as they are involved with the relative degrees of freedom of the system and ligand-receptor complexes. Thus, the release of water molecules from the nonpolar surface of the adsorbent and protein (hydrophobic effect) increases the entropy of the system (Lin et al., 2001).

### 3.6 FTIR spectroscopy

The absorption spectra in the infrared region of free lipase, activated carbon (AC) and the immobilized enzyme on carbon (ACI) are shown in Fig. 8. When assessing the AC spectra, carbon skeleton vibrations at  $1600 \text{ cm}^{-1}$  are observed, which is associated with the symmetrical stretching of the C=C bond of aromatic rings, characteristic of carbonaceous materials (Andrade et al., 2018). Bands around  $1230\text{-}1180 \text{ cm}^{-1}$  may be due to hydrogen elongation bound to P=O in a phosphate ester, or OH bond in POC, or P=OOH bonds inserted to the surface of the material by the activation with  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (Pereira et al., 2014). The free enzyme spectrum, in turn, showed typical protein adsorption bands, including amino (R-NH) and carboxyl (R-CO-) groups identified in the range of  $1560\text{-}1640 \text{ cm}^{-1}$  and  $1200\text{-}1300 \text{ cm}^{-1}$ , respectively. When comparing the spectrum of AC and ACI, small changes in the carbon surface chemistry were observed, due to the complex interaction between the enzyme and the support. Such modifications show the presence of the enzyme in the support, as observed by the presence of a broad band from  $3400$  to  $3000 \text{ cm}^{-1}$ , corresponding to the overlapping of carbon OH elongation with the enzyme NH elongation, and a pronounced band at  $1100 \text{ cm}^{-1}$ , which is associated with characteristic CN-binding vibrations of the amino groups present in the lipase (Ramani et al., 2012; Almeida et al., 2017).

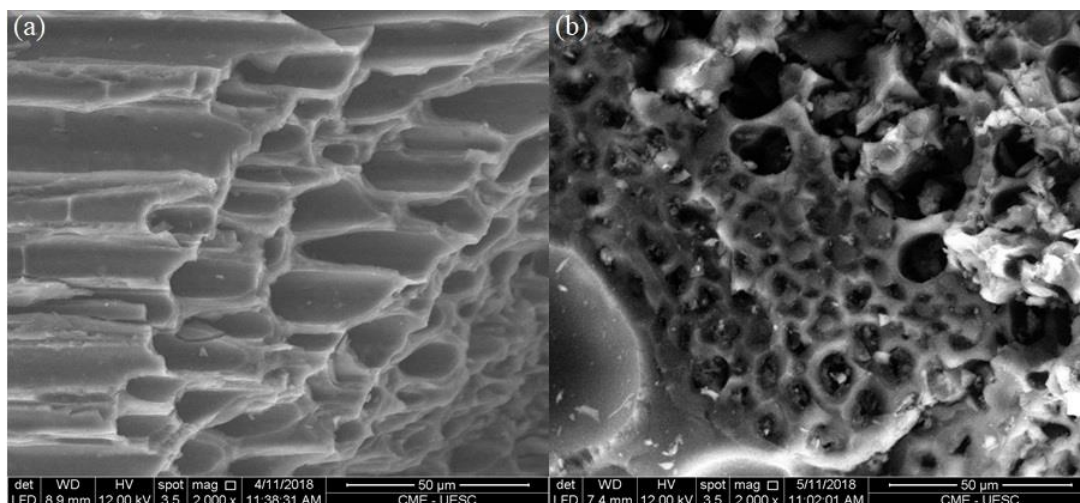


**Fig. 8.** FTIR spectroscopy of free lipase, activated carbon (AC) and the biocatalyst (ACI).

### 3.7 Scanning Electron Microscopy (SEM)

Fig. 9 shows the scanning electron microscopy images of the activated carbon before and after the lipase immobilization process. It is observed (Fig. 9a) that the carbon obtained under the synthesis conditions of this study has a highly porous structure, with a very uniform distribution, which favored the enzyme immobilization. The ACI morphology (Fig. 9b) shows that the surface of the adsorbent was significantly altered after the immobilization process, once the enzyme molecules were bonded to both the inner pore wall and the carbon matrix surface, as observed in the kinetic study, which demonstrated that the greatest resistance to mass transfer is due to the thin film formed around the adsorbent and later the enzymes that diffuse into the pores. It is worth mentioning that the adsorbent had larger pores when compared to the lipase molecular diameter, not impairing the diffusion of substrates and products, which is extremely desirable when developing a new support for enzyme immobilization (Dhawane et al., 2018).





**Fig. 9.** Microscopy of the activated carbon (a) and carbon after lipase immobilization (b).

#### 4. Conclusion

This study showed that it is possible to obtain activated carbons with different textural characteristics using the same lignocellulosic residue, by varying the synthesis conditions. In the experimental design, the variables impregnation ratio and carbonization temperature had a significant effect on the carbon surface area and average pore diameter. This effect was due to both the mechanism of action of phosphoric acid and the nature of the precursor material. The porous material obtained from the best synthesis conditions presented physicochemical characteristics that favored the lipase immobilization. The study of the immobilization parameters allowed to evaluate the forces involved in the binding of the enzyme to the support, showing a strong affinity between the functional groups of adsorbent and enzyme. The thermodynamic parameters indicated that the lipase adsorption onto the matrix was a spontaneous and endothermic process. Therefore, it can be concluded that the activated carbon produced from pupunha palm heart sheaths has proven to be a promising support for the preparation of immobilized biocatalysts, due to the low cost when compared to the traditional supports, and the favorable characteristics for immobilization, becoming an alternative for industrial-scale applications.

#### Acknowledgments

The authors acknowledge CETENE by analysis, the FAPESB, CNPq and CAPES-Brazil (Finance Code 001) for financial support.

#### References

- Almeida, L.C., Barbosa, A.S., Fricks, A.T., Freitas, L.S., Lima, Á.S., Soares, C.M.F.: Use of conventional or non-conventional treatments of biochar for lipase immobilization. *Process Biochem.* **61**, 124-129 (2017)
- Alves, M.D., Aracri, F.M., Cren, É.C., Mendes, A.A.: Isotherm, kinetic, mechanism and thermodynamic studies of adsorption of a microbial lipase on a mesoporous and hydrophobic resin. *Chem. Eng. J.* **3111**, 1-12 (2017)
- Andrade, S.N., Veloso, C.M., Fontan, R.C.I., Bonomo, R.C.F., Santos, L.S., Brito, M.J.P., Diniz, G.A.: Chemical-activated carbon from coconut (*Cocos nucifera*) endocarp waste and its application in the adsorption of  $\beta$ -lactoglobulin protein. *Rev. Mex. Ing. Quím.* **17**, 441-453 (2018)
- Bastida, A., Sabuquillo, P., Armisen, P., Fernández-Lafuente, R., Huguet, J., Guisán, J.M.: A Single Step Purification, Immobilization, and Hyperactivation of Lipases via Interfacial Adsorption on Strongly Hydrophobic Supports. *Biotechnol. Bioeng.* **58**, 486-493 (1998)
- Boyd, G.E., Adamson, A.W., Mayers, L.S.: The exchange adsorption of ions from aqueous solution by organic zeolites. II. Kinetics, *J. Am. Chem. Soc.* **69**, 2836 (1947)
- Bradford, M.M.A.: Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254 (1976)
- Brito, M.J.P., Veloso, C.M., Bonomo, R.C.F., Fontan, R.C.I., Santos, L.S., Monteiro, K.A.: Activated carbons preparation from yellow mombin fruit stones for lipase immobilization. *Fuel Process. Technol.* **156**, 421-428 (2017)
- Brito, M.J.P., Veloso, C.M., Santos, L.S., Bonomo, R.C.F., Fontan, R.C.I.: Adsorption of the textile dye Dianix® royal blue CC onto carbons obtained from yellow mombin fruit stones and activated with KOH and H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>: kinetics, adsorption equilibrium and thermodynamic studies. *Powder Technol.* **339**, 334-343 (2018)
- Cea, M., González, M.E., Abarzúa, M., Navi, R.: Enzymatic esterification of oleic acid by *Candida rugosa* lipase immobilized onto biochar. *J. Environ. Manag.* **242**, 171-177 (2019)
- Demirbas, A.: Agricultural based activated carbons for the removal of dyes from aqueous solutions: A review. *J. Hazard. Mater.* **167**, 1-9 (2009)

Dhawane, S.H., Kumar, T., Halder, G.: Process optimisation and parametric effects on synthesis of lipase immobilised carbonaceous catalyst for conversion of rubber seed oil to biodiesel. *Energy Convers. Manag.* **176**, 55-68 (2018)

Ferrer, M., Plou, F.J., Nuero, O.M., Reyes, F., Ballesteros, A.: Purification and properties of a lipase from *Penicillium chrysogenum* isolated from industrial wastes. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **75**, 569-576 (2000)

Gama, R.S., Bolina, I.C.A., Cren E.C., Mendes, A. A.: A novel functionalized SiO<sub>2</sub>-based support prepared from biomass waste for lipase adsorption. *Mater. Chem. Phys.* **234**, 146-150 (2019)

Gonzalez-Olmos, R., Iglesias, M.: Thermodynamics and Kinetics of Fuel Oxygenate Adsorption into Granular Activated Carbon. *J. Chem. Eng. Data* **53**, 2556-2561 (2008)

Gupta, S., Bhattacharya, A., Murthy, C.N.: Tune to immobilize lipases on polymer membranes: Techniques, factors and prospects. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* **2**, 171-190 (2013)

Gupta, S.S., Bhattacharyya, K.G. Kinetics of adsorption of metal ions on inorganic materials: a review. *Adv. Colloid Interface Sci.* **162**, 39-58 (2011)

Jagtoyen, M., Derbyshire, F., 1998. Activated carbons from yellow poplar and white oak by H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> activation. *Carbon* **36**, 1085-1097.

Jawed, A., Singh, G., Kohli, S., Sumera, A., Haque, S., Prasad, R., Paula, D.: Therapeutic role of lipases and lipase inhibitors derived from natural resources for remedies against metabolic disorders and lifestyle diseases. *S. Afr. J. Bot.* **120**, 25-32 (2019)

Jesionowski, T., Zdarta, J., Krajewska, B.: Enzyme immobilization by adsorption: a review. *Adsorpt.* **20**, 801-821 (2014)

Joshi, R., Sharma, R., Kuila, A.; Lipase production from *Fusarium incarnatum* KU377454 and its immobilization using Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> NPs for application in waste cooking oil degradation. *Bioresou. Technol. Reports* **5**, 134-140 (2019)

Kumar, A., Park, G.D., Patel, S.K.S., Kondaveeti, S., Otari, S., Anwar, M.Z., Kalia, V.C., Singh, Y., Kim, S.C., Cho, B.K., Sohn, J.H., Kim, D.R., Kang, Y.C., Lee, J.: Unique structured SiO<sub>2</sub> microparticles with carbon nanotube-derived mesopores as an efficient support for enzyme immobilization. *Chem. Eng. J.* **359**, 1252-1264 (2019)

Li, K., Wang, J., He, Y., Cui, G., Abdulrazaq, M.A., Yan, Y.: Enhancing enzyme activity and enantioselectivity of *Burkholderia cepacia* lipase via immobilization on melamine-

glutaraldehyde dendrimer modified magnetic nanoparticles. *Chem. Eng. J.* **351**, 258-268 (2018)

Lin, F.Y., Chen, C.S., Chen, W.Y., Yamamoto, S.: Microcalorimetric studies of the interaction mechanisms between proteins and Q-sepharose at pH near the isoelectric point (pI) effects of NaCl concentration, pH value, and temperature, *J. Chromatogr. A* **912**, 281-289 (2001)

Maciel, G.M., Souza, C.G.M., Araújo, C.A.V., Bona, E., Haminiuk, C.W.I., Castoldi, R., Bracht, A., Peralta, R.M.: Biosorption of herbicide picloram from aqueous solutions by live and heat-treated biomasses of *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst and *Trametes* sp. *Chem. Eng. J.* **215-216**, 331-338 (2013)

Mahmood, T., Ali, R., Naeem, A., Hamayun, M., Aslam, M.: Potential of used *Camellia sinensis* leaves as precursor for activated carbon preparation by chemical activation with  $H_3PO_4$ : optimization using response surface methodology. *Proc. Safety Environ. Prot.* **109**, 548-563 (2017)

Mateo, C., Palomo, J.M., Fernandez-Lorente, G., Guisan, J.M., Fernandez-Lafuente, R.: Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzym. Microb. Technol.* **40**, 1451-1463 (2007)

Mayordomo, I., Randez, G.F., Prieto, J.A.: Isolation, purification, and characterization of a cold-active lipase from *Aspergillus nidulans*. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 105-109 (2000)

Mendes, A.A., Oliveira, P.C., Castro, H.F.: Properties and biotechnological applications of porcine pancreatic lipase. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **78**, 119-134 (2012)

Mohan, D., Singh, K.P., Singh, V.K.: Trivalent chromium removal from wastewater using low cost activated carbon derived from agricultural waste material and activated carbon fabric cloth. *J. Hazard. Mater. B* **135**, 280-295 (2006)

Nahil, M.A., Williams, P.T.: Pore characteristics of activated carbons from the phosphoric acid chemical activation of cotton stalks. *Biomass Bioenergy* **37**, 142-149 (2012)

Nowicki, P., Kazmierczak-Razna, J., Skibiszewska, P., Wisniewska, M., Nosal-Wiercinska, A., Pietrzak, R.: Production of activated carbons from biodegradable waste materials as an alternative way of their utilization. *Adsorption* **22**, 4-6 (2015)

Pandey, D., Daverey, A., Arunachalam, K.: Biochar: Production, properties and emerging role as a support for enzyme immobilization. *J. Clean. Prod.* **255**, 120-267 (2020)

Pereira, R.G., Veloso, C.M., Da Silva, N.M., De Sousa, L.F., Bonomo, R.C.F., De Souza, A.O., Da Guarda, M.O., Fontan, R.D.I.: Preparation of activated carbons from cocoa

shells and siriguela seeds using  $H_3PO_4$  and  $ZnCl$  as activating agents for BSA and  $\alpha$ -lactalbumin adsorption. *Fuel Proc. Technol.* **126**, 476-486 (2014)

Perez, V.H., Da Silva, G.S., Gomes, F.M., De Castro, H.F.: Influence of the functional activating agent on the biochemical and kinetic properties of *Candida rugosa* lipase immobilized on chemically modified cellulignin. *Biochem. Eng. J.* **34**, 13-19 (2007)

Ramani, K., Karthikeyan, S., Boopathy, R., Kennedy, L., Mandal, A.B., Sekaran, G.: Mesoporous activated carbon surface functionalized for the immobilization of lipase and its application acidic hydrolysis waste oil prepared: Isotherm and kinetic studies. *Proc. Biochem.* **47**, 435-445 (2012)

Rangabhashiyam, S., Balasubramanian, P.: The potential of lignocellulosic biomass precursors for biochar production: Performance, mechanism and wastewater application - A review. *Ind. Crops Prod.* **128**, 405-423 (2019)

Regalbuto, J.R., Robles, J.: *The engineering of Pt/Carbon Catalyst Preparation*, University of Illionis, Chicago (2004)

Reichardt, C., Utgenannt, S., Stahmann, K.P., Klepe, O., Barig, S.: Highly stable adsorptive and covalent immobilization of *Thermomyces lanuginosus* lipase on tailor-made porous carbon material. *Biochem. Eng. J.* **138**, 63-67 (2018)

Reichenberg, D.: Properties of ion-exchange resin in relation to their structure. III. Kinetics of exchange. *J. Am. Chem. Soc.* **75**, 589 (1953)

Rios, N.S., Pinheiro, M.P., Lima, M.L.B., Freire, D.M.G., Silva Júnior, I.J., Rodríguez-Castellón, E., Sant'Ana, H.B., Macedo, A.C., Gonçalves, L.R.B.: Pore-expanded SBA-15 for the immobilization of a recombinant *Candida antarctica* lipase B: Application in esterification and hydrolysis as model reactions. *Chem. Eng. Res. Des.* **129**, 12-24 (2018)

Sá, A.G.A., Meneses, A.C., Araújo, P.H.H., Oliveira, D.: A review on enzymatic synthesis of aromatic esters used as flavor ingredients for food, cosmetics and pharmaceuticals industries. *Trends Food Sci. Technol.* **69**, 95-105 (2017)

Santos, M.P.F., Brito, M.J.P., Junior, E.C.S., Bonomo, R.C.F., Veloso, C.M.: Pepsin immobilization on biochar by adsorption and covalent binding, and its application for hydrolysis of bovine casein. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **94**, 1982-1990 (2019)

Sarkar, M., Acharya, P.K., Bhattacharya, B.: Modeling the adsorption kinetics of some priority organic pollutants in water from diffusion and activation energy parameters. *J. Colloid Interface Sci.* **266**, 28-32 (2003)

Sarno, M., Iuliano, M., Ciambelli, P.: High activity and selectivity immobilized lipase on  $Fe_3O_4$  nanoparticles for banana flavor synthesis. *Process Biochem.* **56**, 98-108 (2017)

Serra, E., Díez, E., Díaz, I., Blanco, R.M.: A comparative study of periodic mesoporous organosilica and different hydrophobic mesoporous silicas for lipase immobilization. *Microporous Mesoporous Mater.* **132**, 487-493 (2010)

Soares, C.M.F., De Castro, H.F., De Moraes, F.F., Zanin, G.M.: Characterization and utilization of *Candida rugosa* lipase immobilized on controlled pore silica. *Applied Biochem. Biotechnol.* **79**, 745-757 (1999)

Tacias-Pascacio, V.G., Peirce, S., Torrestiana-Sanchez, B., Yates, M., Rosales-Quintero, A., Virgen-Ortíz, J.J., Fernandez-Lafuente, R. Evaluation of different commercial hydrophobic supports for the immobilization of lipases: Tuning their stability, activity and specificity. *RSC Adv.* **6**, 100281-100294 (2016)

Uygun, D.A., Çorman, M.E., Öztürk, N., Akgöl, S., Denizli, A.: Poly(hydroxyethyl methacrylate-co-methacryloylamidotryptophane) nanospheres and their utilization as affinity adsorbents for porcine pancreas lipase adsorption. *Mater. Sci. Eng. C* **30**, 1285-1290 (2010)

Weber, W.J., Morris, C.J.: Kinetics of adsorption on carbon from solution. *J. Sanit. Eng. Div.* **89**, 31-60 (1963)

Wong, S., Lim, Y., Ngadi, N., Mat, R., Hassan, O., Inuwa, I.M., Mohamed, N.B., Low, J.H.: Removal of acetaminophen by activated carbon synthesized from spent tea leaves: equilibrium, kinetics and thermodynamics studies. *Powder Technol.* **338**, 878-886 (2018)

Xu, J., Chen, G., Qu, H., Jiao, Y., Xie, J., Xing, G.: Preparation and characterization of activated carbon from by chemical activation with H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. *Appl. Surf. Sci.* **320**, 674-680 (2014)

Yakout, S.M., El-Deen, G.S.: Characterization of activated carbon prepared by phosphoric acid activation of olive stones. *Arab. J. Chem.* **9**, 1155-1162 (2016)

Zhong, N., Chen, W., Liu, L., Chen, H.: Immobilization of *Rhizomucor miehei* lipase onto the organic functionalized SBA-15: Their enzymatic properties and glycerolysis efficiencies for diacylglycerols production. *Food Chem.* **271**, 739-746 (2019)

Zhou, Z., Hartmann, M.: Progress in enzyme immobilization in ordered mesoporous materials and related applications. *Chem. Soc. Rev.* **42**, 3894-3912 (2013).

## **CAPÍTULO 3**

---

### **Manuscript 2. Lipase immobilization on activated and functionalized carbon for the aroma ester synthesis**

---

\*Este artigo será submetido a revista Microporous and Mesoporous Materials (INSS:1387-1811), classificação Qualis-Capes: A1.

**Lipase immobilization on activated and functionalized carbon for the aroma ester synthesis**

Mylena Junqueira Pinto Brito<sup>1</sup>, Lucina Carolina Bauer<sup>1</sup>, Mateus Pereira Flores Santos<sup>1</sup>,  
Leandro Soares Santos<sup>2</sup>, Renata Cristina Ferreira Bonomo<sup>1</sup>, Rafael da Costa Ilhéu  
Fontan<sup>1</sup>, Cristiane Martins Veloso<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Process Engineering Laboratory, State University of Southwest Bahia, Itapetinga, Brazil

<sup>2</sup>Laboratory of Packaging and Agro-Industrial Projects, State University of Southwest  
Bahia, Itapetinga, Brazil

\*Corresponding author: e-mail address: [crismveloso@yahoo.com.br](mailto:crismveloso@yahoo.com.br) (C.M. Veloso)

Tel.:+55 77 32618659.



## **Abstract**

This study aimed to investigate the effect of functionalized activated carbon (AC) on lipase immobilization and to use the biocatalysts obtained in the synthesis of isoamyl acetate ester (banana odor). Pupunha palm sheaths were used as a precursor material in the synthesis of activated carbon, which was functionalized by the glutaraldehyde method. The effect of the medium pH and temperature on the lipase immobilization capacity in the different matrices was evaluated, as well as the hydrolytic activity of the derivatives obtained. The AC showed  $1260 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$  surface area and average pore diameter accessible to the enzyme (6.60 nm). The functionalization provided a modification of the matrix surface by the insertion of amine-aldehyde groups and a reduction in porosity and surface area ( $340 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ ) when compared to AC. The enzyme immobilized on both supports showed specific activity greater than 0.450 U/mg in the best immobilization conditions (pH 5.0 and 30 °C). The immobilized enzyme was used in the esterification reaction, using acetic acid and isoamyl alcohol as a substrate, reaching conversions around 93% and 91% for the enzyme immobilized in the activated and functionalized carbons, respectively, for a reaction time of 180 min. Operational stability showed promising results for both biocatalysts, with no significant reduction in the catalytic activity for ester synthesis during the 5 cycles of reuse studied.

**Keywords:** isoamyl acetate; biocatalysts; glutaraldehyde; porous supports

## **1. Introduction**

There is great interest in the industrial application of enzymes as they are natural biological catalysts used in various types of reactions [1, 2]. Among the enzymes, lipases (triacylglycerol acyl hydrolases, EC3.1.1.3) have been studied as alternative catalysts for different chemical reactions, such as fatty acid hydrolysis, esterification, transesterification, and interesterification in organic solvents [3-5].

Lipase plays an important role in the production of aroma esters, which are important compounds used in the food, cosmetics, and pharmaceutical industries. These esters are synthesized through an esterification reaction of fatty acid and an alcohol, in the presence (or not) of organic solvent, by natural, chemical, or biotechnological route [6, 7]. Biotechnological synthesis has been shown to be an attractive alternative due to the catalytic selectivity inherent to enzymes, the generation of purer products, and moderate

reaction conditions. In addition, products from enzyme-catalyzed reactions are generally labeled as natural flavors, thus being of great interest to the industry [6, 8].

However, despite these advantages, the industrial application of free lipases in ester synthesis reactions is not attractive due to the high cost, the impossibility of reuse, and low thermal and chemical stability. Therefore, the enzymatic immobilization stands out as one of the most promising strategies to overcome this problem since it allows the enzyme to be reused several times, maintaining its activity for a longer time of use, and in some cases improving the catalytic efficiency of the [7, 9].

Lipases have been immobilized by different protocols, such as physical adsorption, encapsulation, covalent bonding, or crosslinking [10-12]. Adsorption is a simple and widely used method for enzyme immobilization and consists of immobilizing enzymes in the support through hydrophobic interactions, Van der Waals forces, hydrogen bonds, and ionic interactions [13]. The main advantages of immobilization by adsorption include the ease and simplicity of the technique and the low cost associated with no need to activate the support [5, 14].

The immobilization by covalent bonding is another method widely used, in which the enzyme is attached to the inert support by covalent bonds, which are normally established between amino groups, residual amino groups, sulfhydryl groups, and the hydroxyl group of the phenolic ring of the enzyme amino acids with the reactive groups of the support [10]. This type of immobilization generally requires activation of the support and provides a significant improvement in enzyme stability when compared to immobilization by adsorption [15].

Currently, many studies have been focused on the production of supports to be used in lipase immobilization since each application needs adequate operational conditions despite the wide variety of existing supports [15-17]. Therefore, a support with potential for the proposed application is activated carbon (AC), which is a carbonaceous material, with a developed porous structure, a high specific surface area ( $> 700 \text{ m}^2/\text{g}$ ), and the presence of heteroatoms on its surface, which are characteristics that favor the immobilization process [18, 19].

Activated carbons are obtained basically by the carbonization of the precursor carbon material and its activation [18, 20]. When produced from lignocellulosic materials, it is considered an advantageous alternative, due to the lower production costs, when compared with other porous matrices. In addition, they are diverse, abundant, renewable raw materials and also contribute to reducing the costs of waste disposal and the negative

impact of inappropriate disposal to the environment [21]. In view of the above, this study aimed to immobilize lipase, using activated carbon and functionalized carbon as a support, synthesized from the pupunha palm heart sheaths, and to use the resulting biocatalysts in the synthesis of the isoamyl acetate ester (banana flavor).

## **2. Materials and methods**

### **2.1 Synthesis, functionalization, and characterization of activated carbons and biocatalysts**

Pupunha palm (*Bactris gasipaes*) sheaths were used as carbon-based precursor material, which according to [20] contains on a dry basis: 4.49% ash, 12.72% lignin, 47.29% cellulose, and 12.29% hemicellulose. First, the material was washed in running water, dried in an oven at 105 °C for 24 h, crushed in a mill, and sieved in a 420 µm sieve. The activated carbon was synthesized according to the methodology proposed by [22] using phosphoric acid (85% analytical grade-CAS7664-38-2) as an activating agent in the 3: 1 impregnation ratio (mass of activating agent/mass of the precursor), and temperature and carbonization time of 500 °C and 75 min, respectively. Then, it was functionalized using glutaraldehyde as an activation agent as proposed by [23], with modifications described by [20].

Samples were characterized using techniques of measurements of nitrogen adsorption-desorption, scanning electron microscopy (SEM), and Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR). The nitrogen adsorption and desorption isotherms of the pupunha activated carbon (PAC) and pupunha functionalized carbon (PFC) were obtained in an ASAP 2420 Micromeritics equipment (Micromeritics Instrument Corporation, Norcross, GA 30093 USA), using approximately 0.20 g of sample. The functional groups were analyzed directly by the attenuated total reflectance (ATR) in the infrared region of 4000-500 cm<sup>-1</sup>, in an FTIR spectrophotometer (Cary 630 FTIR, Agilent Technologies Inc, Santa Clara, CA, USA). The point of zero charge was determined as described by [24]. The morphology of activated carbon before and after the immobilization process was determined by scanning electron microscopy (Carl Zeiss, Model DSM940, Oberkochen, Germany).

## 2.2 Lipase immobilization tests and determination of the biocatalysts hydrolytic capacity

Lipase from porcine pancreas (LPP) Type II (Sigma-Aldrich; CAS number: 9001-62-1) was immobilized using the activated carbon and functionalized carbon as supports. To obtain the best parameters for the enzyme immobilization, the effect of the pH of the medium and the immobilization temperature on both the adsorptive capacity of the supports and the hydrolytic activity of the biocatalysts were evaluated. The experiments were performed as follows: in tubes containing 0.100 mg of the support, 5 mL of the lipase solution ( $6000 \text{ mg L}^{-1}$ ) was added and kept under constant agitation on an orbital shaker at 20 rpm, for 2 h, at predetermined conditions of pH and temperature. Buffer solution of sodium acetate ( $0.1 \text{ mol L}^{-1}$ ) and acetic acid ( $0.1 \text{ mol L}^{-1}$ ) was used to adjust the pH of the medium. The protein concentration in the medium after each assay was determined by the Bradford method [25], at 595 nm, using bovine serum albumin (BSA) as a standard. The immobilization capacity ( $C_{Imo}$ ) was determined according to Equation 1.

$$C_{Imo} = \frac{VC_{in}-VC}{m_{ads}} \quad (1)$$

where  $C_{Imo}$  is the adsorptive capacity ( $\text{mg g}^{-1}$ ),  $V$  is the volume of lipase solution (mL),  $C_{in}$  initial lipase concentration ( $\text{mg L}^{-1}$ ),  $C$  is the lipase concentration after 2 hours ( $\text{mg L}^{-1}$ ), and  $m_{ads}$  is the mass of the adsorbent (g).

The olive oil emulsion method was used to determine the hydrolytic activity of soluble and immobilized enzymes, according to the methodology adapted from [26] by [18].

## 2.3 Ester Synthesis

The isoamyl acetate synthesis reaction was carried out using a solution containing hexane as a solvent, and isoamyl alcohol and acetic acid as substrates in a 1: 2 molar ratio (acetic acid: isoamyl alcohol). The reactions were conducted in 100 mL glass flasks containing 5 mL of the reaction mixture, which was kept under agitation of 200 rpm in an orbital shaker at  $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$ . The reaction was initiated by the addition of 0.5 g of the biocatalyst previously prepared under the optimal conditions established in Section 2.2. Aliquots of the reaction mixture were removed at different time intervals (60, 120, 180, and 240 min).

The content of acetic acid consumed in the reaction was determined by liquid chromatography (Shimadzu, Japan) with a diode matrix detector (Shimadzu, Japan), at 210 nm. A CLC (M) stainless steel column (250 mm x 4.6 mm, Shimadzu) was used for chromatographic separation. The mobile phase was composed of acetonitrile/water (75:25, v/v) at a flow rate of 0.8 mL/min. A volume of 20  $\mu\text{L}$  was injected into the chromatograph and acid was eluted from the column using an isocratic method [27]. The yield of the esterification reaction for the production of isoamyl acetate was determined according to Equation 2.

$$Y (\%) = \frac{(C_0 - C_f)}{C_0} \times 100 \quad (2)$$

where  $C_0$  is the initial molar concentration of acetic acid ( $\text{mol.L}^{-1}$ ) and  $C_f$  is the final molar concentration of acetic acid ( $\text{mol.L}^{-1}$ ).

## 2.4 Operational stability

The operational stability of the biocatalysts of this study was evaluated through successive esterification reactions between acetic acid and isoamyl alcohol, according to the procedure described in Section 2.3. After each reaction cycle, 20 mL of 0.1 mol  $\text{L}^{-1}$  sodium acetate buffer at pH 5.0 was added to the flasks containing the biocatalysts, which was stirred (20 rpm/5 min) and centrifuged (3500 rpm/5 min). Then, successive washes of the biocatalysts were performed with hexane to remove unconverted starting materials and the products adsorbed in their microenvironment. After this procedure, the biocatalyst was recovered and incubated in a new reaction medium.

## 2.5 Statistical analysis

All experiments and determinations were performed in triplicate. Data were submitted to analysis of variance and the differences between means of immobilization capacity, hydrolytic activity, and conversion yields were analyzed by Tukey's test ( $p < 0.05$ ), using the SAS STUDIO software, student version (SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA).

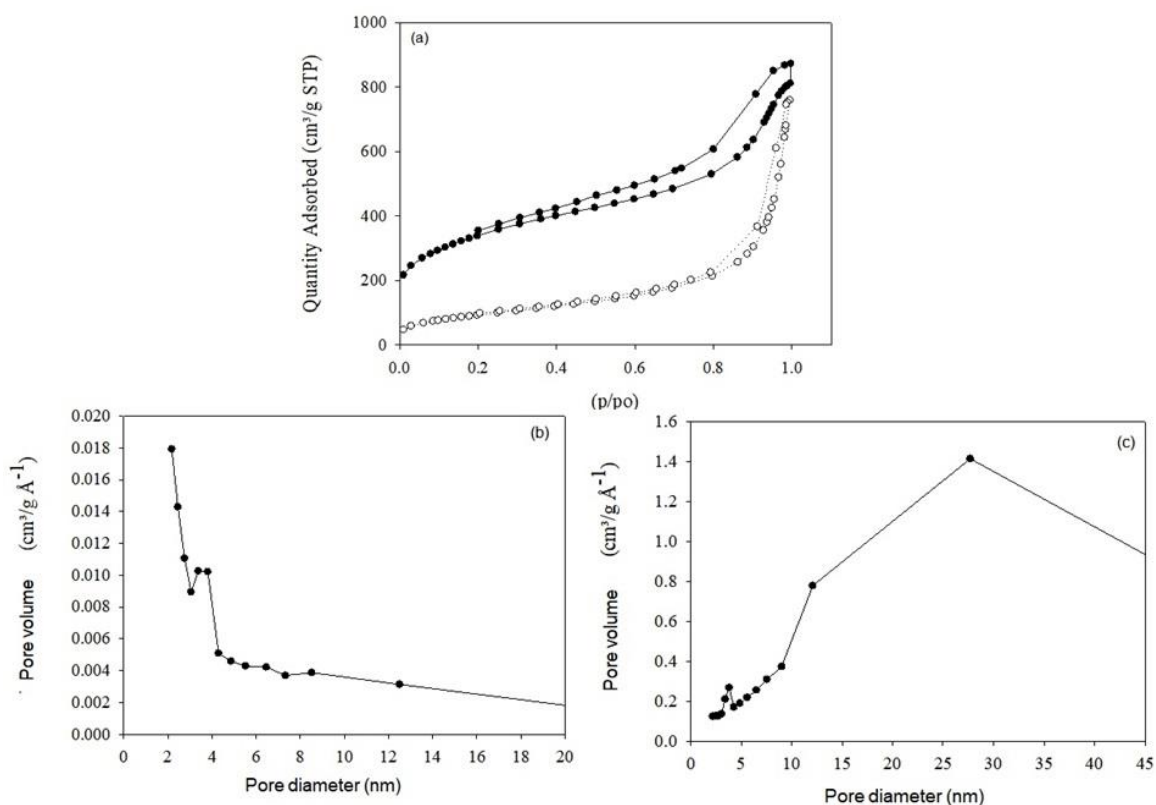
## 3. Results and discussion

### 3.1 Characterization of the activated carbon and the functionalized carbon

Fig. 1 shows the  $\text{N}_2$  adsorption and desorption isotherms and the pore distribution of the activated carbon and functionalized carbon. According to the form, and in accordance with the IUPAC classification [28], they can be classified as type IV. This type of

isotherm indicates the capillary condensation phenomenon, characteristic of mesoporous materials, in which the formation of a monolayer on the surfaces is followed by multilayer adsorption until the inflection point and saturation of the isotherm. The first slope (under low  $p/p_0$  values) corresponds to the monolayer coverage, while the second slope shows adsorption and capillary condensation. These results suggest that the isotherms with a wider hysteresis cycle at high relative pressures correspond to a mixed structure of the material, consisting of micropores and mesopores, as shown in activated carbon [29]. In the adsorption processes, it is desirable for the adsorbent to have a good interaction between mesopores and micropores, as the former can enable rapid diffusion of molecules within the carbons and access to micropores, in which the adsorption occurs in great extension [22]. It is also observed that the volume of  $N_2$  adsorbed by the PAC sample is higher when compared to that of the PFC sample, showing a greater volume of pores available for the adsorption phenomenon, consequently with a greater surface area.

The textural parameters of the adsorbents are summarized in Table 1. It is observed that the activated carbon exhibited a high surface area, due to the nature of the carbon precursor material and the activation mechanism with phosphoric acid. It is known that lignocellulosic materials containing higher cellulose contents, such as the pupunha palm sheaths, tend to originate activated carbons with a high surface area since they have less resistance to thermal degradation when compared with materials with high lignin contents [30]. In addition, the activation with phosphoric acid may lead to the formation of phosphate ester bonds between cellulose chains, which is considered the main contributor to the increase in the volume of the carbon structure, once these bonds are based on the insertion of phosphoric acid molecules between the cellulose chains, separating them even further, as reported in detail in previous studies [18, 22]. This is a desirable feature for the use of this support for enzyme immobilization by adsorption since the larger the surface area of the adsorbent, the greater the area available for the protein binding with the matrix. In addition, the high surface area allows a greater number of spacer arms to attach to the support surface during the functionalization process [31, 32]. The support also presented an average pore diameter around 4 nm that allows the lipase immobilization, which is fundamental in the adsorption process, as the pore structure limits the molecule dimensions that can be adsorbed by the matrix [33, 34].



**Fig. 1.** Nitrogen adsorption isotherms of activated carbon (○) and functionalized carbon (●) (a) and pore volume distribution of PAC (b) and PFC (c).

**Table 1.** Textural properties of the activated and functionalized carbon.

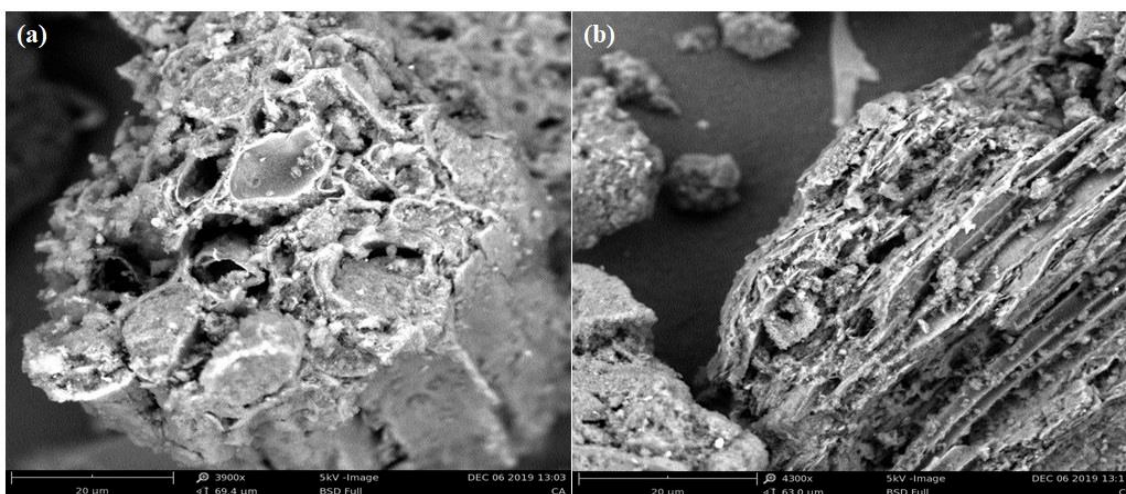
Sample	Surface area ( $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$ )	Pore diameter (nm) <sup>a</sup>	Mesopore volume ( $\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$ )	Micropore volume ( $\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$ )
PAC	1260	6.50	1.045	0.092
PFC	340	15.03	1.137	0.000

<sup>a</sup>Maximum pore size distribution

As shown in Table 1, the functionalization process generated a predominantly mesoporous material. This behavior may be due to the obstruction of the micropores by the insertion of glutaraldehyde molecules on the support surface during the functionalization. As a result, there was a marked reduction in the surface area of the functionalized carbon (PFC), reaching about 73%, when compared to the PAC. These

results are in agreement with those found by [20], who observed a 93% reduction in surface area after functionalization with glutaraldehyde.

The changes in the textural characteristics of the activated carbon as a function of the functionalization process were also demonstrated by scanning electron microscopy of the supports. Fig. 2 (a) shows the image of the activated carbon, revealing a porous structure with the presence of pores of different sizes, which corroborates with the results of the area and pore distribution analyses. In addition, it is observed that the average pore diameter of the matrix (6.50 nm) is large enough to allow substrate access and diffusion of products in the esterification process, besides accommodating the enzyme [18, 35]. The morphology of the functionalized carbon (Fig. 2 (b)), in turn, shows that the matrix surface was significantly altered after the functionalization process, once it presented a more regular structure, with the presence of very small pores, due to their obstruction by the insertion of the amino-aldehyde spacer arms.



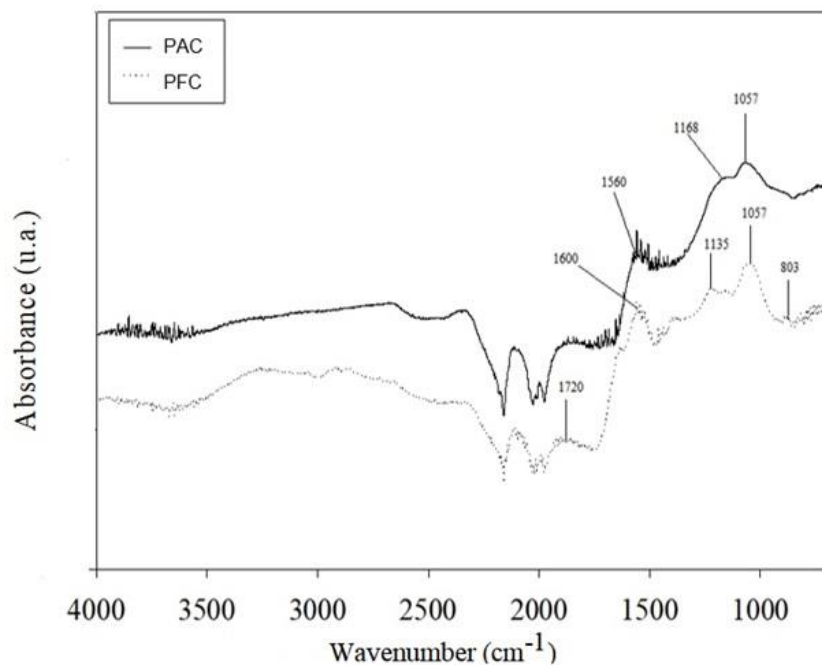
**Fig. 2.** Scanning Electron Microscopy (SEM) of activated carbon (a) and functionalized carbon (b).

The FTIR spectra of the carbons are shown in Fig. 3. For both supports, the skeleton stretching vibrations, characteristic of activated carbons, were observed at approximately  $1560\text{ cm}^{-1}$  and  $1600\text{ cm}^{-1}$ , attributed to the C = C symmetrical stretching of aromatic rings, typical of carbonaceous material [32, 36]. The band at  $1168\text{ cm}^{-1}$  is characteristic of P = O of phosphate esters, and an O-C group in P-O-C and P=OOH incorporated into the porous material due to the acid activation [29, 37]. The presence of an intense band at  $1057\text{ cm}^{-1}$  was also observed, which is associated with the stretching of glycosidic bonds (C-O-C) in the structure of the lignocellulosic components [38]. Concerning the PFC



sample, the incorporation of new functional groups in the support was observed, from compounds used in the functionalization process to produce reactive intermediates. Among these groups, the characteristic band of aldehyde carbonyl (C = O) at 1720-1740  $\text{cm}^{-1}$ , and the band at 1135  $\text{cm}^{-1}$  stood out and may be associated with the CO group of alcohols and ethers, or CN group of amines. In addition, a band at 803  $\text{cm}^{-1}$  can indicate the presence of functional amine groups, thus evidencing the occurrence of chemical modifications on the matrix surface [39, 40].

Chemical changes in the activated carbon after functionalization were also evidenced by the results of the point of zero charge (pH<sub>pzc</sub>) of the supports. Both supports exhibited acidic characteristics, with pH<sub>pzc</sub> in 4.5 and 4.9 for the activated carbon and functionalized carbon, respectively. This behavior may be due to the incorporation of functional groups of acidic character on the adsorbent surface through the activation with phosphoric acid. On the other hand, the differences between matrices are associated with the incorporation of basic functional groups on the surface of the functionalized carbon, such as the amine group, identified in the FTIR spectrum for the PFC sample, thus promoting a small increase in pH<sub>pzc</sub>.



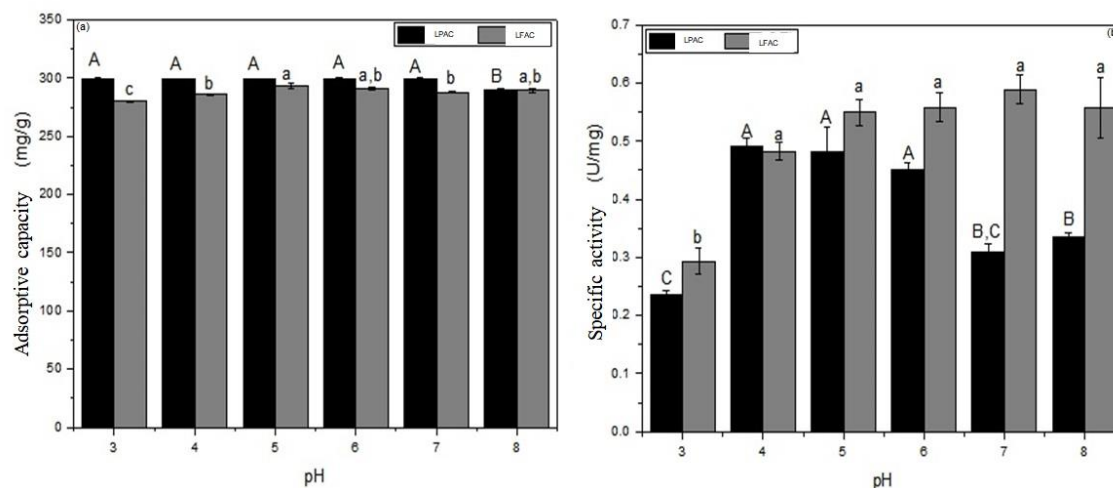
**Fig. 3.** FTIR of activated carbon (PAC) and functionalized carbon (PFC).

### 3.2 Effect of pH on the immobilization process

The adsorptive capacity of the supports and the hydrolytic activity of the biocatalysts were evaluated at pH values ranging from 3.0 to 8.0, and the results are shown in Fig. 4. When evaluating the immobilization capacity of the activated carbon, no significant differences ( $p > 0.05$ ) were observed in the pH range from 3.0 to 7.0, showing that hydrophobic interactions governed the enzyme immobilization process [41]. On the other hand, this parameter had a great effect on the specific activity of the biocatalyst, with higher values observed in the pH range 4.0 to 6.0 for the enzyme immobilized by adsorption. Possibly, in this condition, the interaction between the functional groups of lipase and the support may have promoted changes in the lipase conformational structure, which favored greater interfacial activation, thus increasing the enzymatic activity [42]. It is known that immobilization by physical adsorption on hydrophobic supports is governed by an important property of lipases, the interfacial activation in the presence of a hydrophobic interface. Lipases have two different configurations: a closed conformation, considered inactive, in which the contact between the active site and the reaction medium is blocked by a hydrophobic polypeptide chain (called flap or lid); and the open conformation, in which the lid is displaced and the active site is fully exposed to the reaction medium. In the presence of a hydrophobic surface, the lipase molecule undergoes a conformational change and the balance is shifted to the open conformation. In this case, the active enzyme site interacts with the support by hydrophobic adsorption since it recognizes as similar to its natural substrates (oil droplets). Thus, the lipase is immobilized in its active conformation by a unique mechanism called “interfacial activation”, therefore the conformational structure of lipase with the open lid can determine its activity [43, 44].

Regarding the lipase immobilized on functionalized carbon (LPFC) sample, the pH of the reaction medium significantly affected the enzyme immobilization capacity in the functionalized matrix, with a maximum value at pH 5.0, which is close to the isoelectric point of the enzyme (4.0-5.0) and the point of zero charge of the support (4.9). Immobilization on functionalized supports preferably occurs with the formation of a covalent bond, normally established between different groups of the side chains of the amino acid residues (amino, hydroxyls, thiol, among others) and the reactive groups of the support. Thus, as the enzyme surface contains a large number of acidic and basic groups, the charges can vary according to the pH of the medium, influencing the structural stability and solubility of the enzyme and, consequently, its ability to bind to the support,

as observed in this study [10, 45] . In turn, when assessing the specific activity, no significant difference was observed for a wide pH range (4.0-8.0). This result may be due to the strength of this bond, which is high and usually involves several enzyme residues, providing a great rigidity in the structure, which can keep the enzyme structure unchanged at higher pH values, as observed in this study [46].



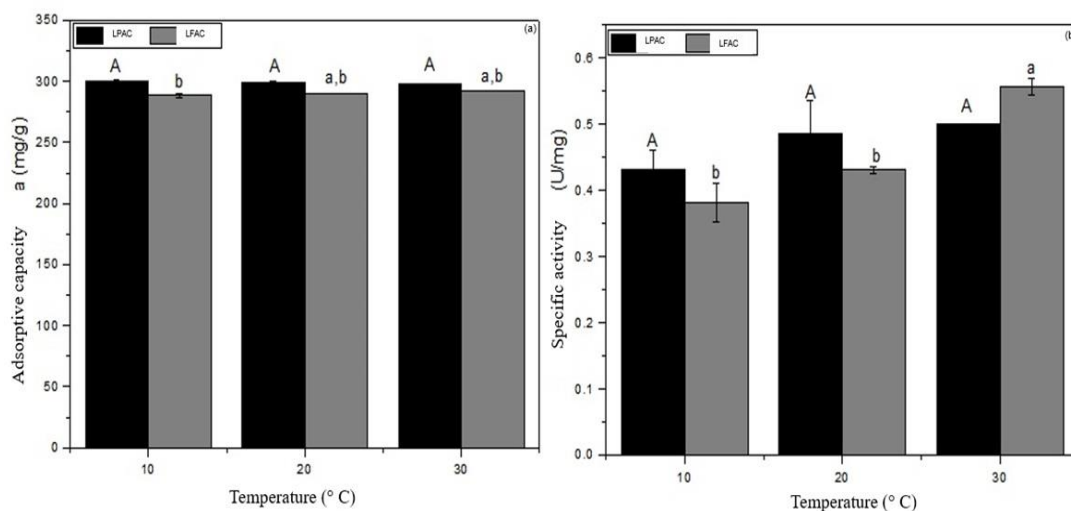
**Fig. 4.** Effect of pH on the immobilization capacity of the supports (a) and the hydrolytic activity of lipase immobilized on activated carbon (LPAC) and functionalized carbon (LPFC). Equal lowercase letters represent no significant differences ( $p > 0.05$ ) between the pH values for LPAC; equal uppercase letters represent no significant difference ( $p > 0.05$ ) between the pH values for the LPFC.

### 3.3 Effect of temperature on the immobilization process

The effects of temperature on the immobilization capacity and the hydrolytic activity of the enzyme in the two supports are shown in Fig. 5. Under experimental conditions, no significant effects of temperature were observed on the enzyme immobilization in the PAC support, thus demonstrating a high affinity between the enzyme and the support.

In contrast, for the PFC support, the temperature increase from 10 °C to 20 °C led to a slight increase in the adsorptive capacity of the matrix, with no significant differences observed for the higher temperature. It is known that higher temperatures cause greater kinetic energy to the lipase molecules, leading to a greater number of collisions per unit of time, which are necessary to promote surface diffusion and diffusion

through the pores of the functionalized carbon, leading to an increase in immobilization capacity. A similar result was observed by [23], who studied the lipase immobilization onto activated carbon functionalized with glutaraldehyde. In addition, the greater immobilization capacity with increased temperature suggests an endothermic and entropic-directed process, which promotes changes in the enzyme configuration, interfering with its specific activity when immobilized, as reported by [18].



**Fig. 5.** Effect of temperature on the immobilization capacity of the supports (a) and the hydrolytic activity of lipase immobilized on activated carbon (LPAC) and functionalized carbon (LPFC). Means followed by the same letter for each time interval did not differ significantly between them at  $p < 0.05$  by Tukey's test.

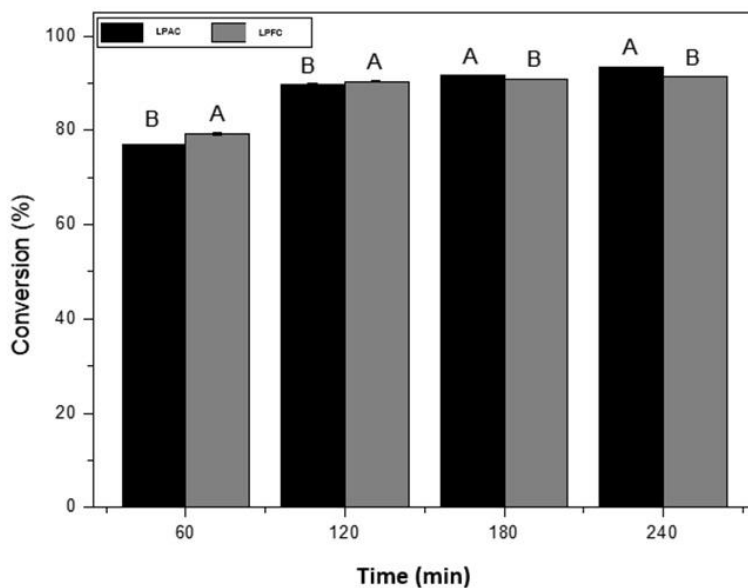
As shown in Fig. 5 (b), although no significant differences were observed for the immobilized protein content at temperatures of 20 °C and 30 °C, the less specific activity was observed at 20 °C. This behavior suggests that some molecules of the immobilized enzymes have unfavorable orientations, or even denatured on the support surface due to conformational changes during the immobilization process, thus reducing the enzyme activity [47]. Therefore, for the esterification tests, the lipase immobilization was carried out at pH 5.0 and 30 °C, once the maximum specific activity of 0.501 U/mg (298.08 mg / g) and 0.558 U/mg (292.52 mg/g) for the lipase immobilized on activated and functionalized carbons, respectively, were obtained under these conditions.

### 3.4 Ester Synthesis

Fig. 6 shows the results of the isoamyl acetate esterification as a function of the reaction time for the enzyme immobilized on activated carbon and functionalized carbon. A high esterification yield was observed for both biocatalysts, reaching the reaction equilibrium in a short time (~180 min). In the initial reaction times, the LPFC exhibited higher conversion yield when compared with LPAC. This behavior may be due to the characteristics of the support used in the immobilization and the immobilization method used. The enzymes immobilized on the functionalized carbon are preferably found on the external surface of the support, connected by the spacer arms, which facilitates the interaction between the catalyst and the substrate molecules [10, 23]. On the other hand, in the immobilization by adsorption on porous supports, the enzymes are confined to a large extent within the pores. This event allows the substrate to diffuse from the solution to the external surface, and to the interior of the support pores, where most of the catalyst molecules are located. The mass transfer limitations reduce the speed of the reactions due to the diffusion and transfer limitations of substrates and products through the support pores, therefore requiring a longer time to reach the reaction equilibrium [31].

When comparing the two immobilization methods, it is observed that the LPAC biocatalyst presented a slightly higher percentage of esterification (93.41%) when compared to the covalent bond method (91.42%). This difference is possibly due to the way the enzyme is immobilized in the matrix, which may have favored greater interfacial activation or substrate adsorption. From a commercial point of view, this is a very promising result, as this is a simple, low-cost method, with no need to functionalize the support, which can be reused after several cycles [14, 41]. However, further studies should be encouraged to assess the contribution of adsorption.

The short reaction time observed in this study, for both supports, is an advantage of the biocatalysts produced, once it is considered an important indicator of ester synthesis, once it is related to efficiency and productivity [48]. Other authors studied the isoamyl acetate synthesis using lipases from *Thermomyces lanuginosus* [9] and *Candida rugosa* [7], and reported reaction times of 7 h and 4 h for maximum yields of 61% and 75%, respectively, thus demonstrating the potential of the biocatalysts.



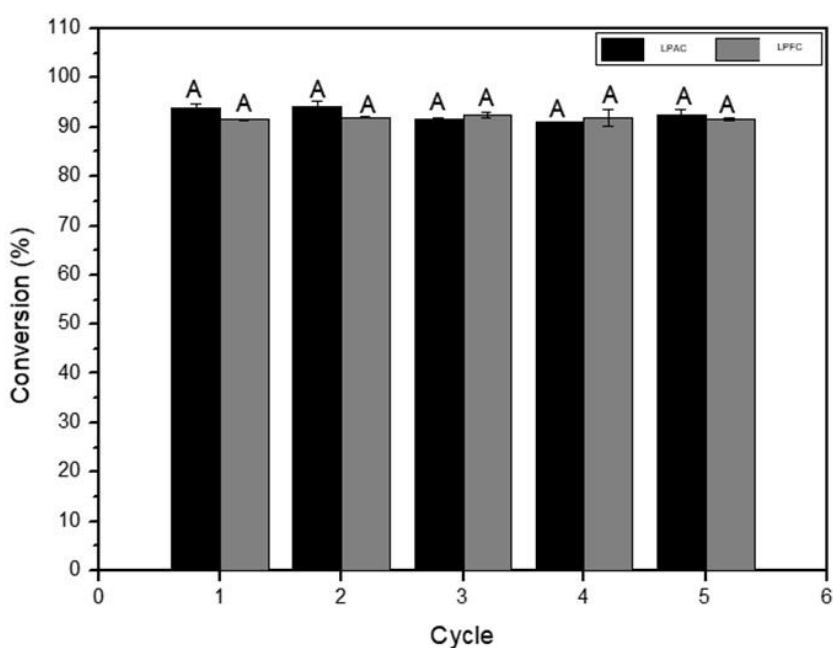
**Fig. 6.** Esterification yield (%) as a function of time for isoamyl acetate synthesis catalyzed by lipase from porcine pancreas immobilized on activated carbon (LPAC) and functionalized carbon (LPFC). Means followed by the same letter for each time interval did not differ significantly between them at  $p < 0.05$  by Tukey's test.

### 3.5 Operational stability

Operational stability is one of the most important characteristics for the application of the biocatalyst on an industrial scale, once the possibility to reuse the immobilized enzymes minimizes the process costs [7]. In this step, the successive cycles of reuse of the immobilized lipase in the isoamyl acetate esterification reaction were evaluated, for 180 min at 40 °C, and the results are shown in Fig. 7.

Promising results were observed in the reuse of the biocatalysts, once there was no significant decline in catalytic activity for the synthesis of esters during the 5 cycles evaluated, for both biocatalysts, suggesting a strong interaction and stabilization of the lipase structure on the surface of both functionalized and activated carbons. It can also be suggested that the high stability of the lipase immobilized by physical adsorption is possibly due to the carbon hydrophobicity, which tends to stabilize the conformational structure of the lipase in the open form [43, 49]. Asmat and collaborators [7] studied the reuse of lipase from *Candida rugosa* immobilized in carbon nanotubes functionalized with glutaraldehyde and reported 84% of enzyme activity during 10 cycles for the isoamyl

acetate synthesis. The high operational efficiency of reusing the biocatalyst suggested that the bonds between the enzyme and the matrix should have provided an increase in the lipase structure rigidity, and protected the enzyme from denaturation during its repetitive use, thus increasing its catalytic performance. It is also worth mentioning that washing the biocatalyst with hexane, after each cycle, may have contributed to greater retention of the enzyme activity. This non-polar solvent provides the removal of the product formed around the enzyme that causes loss of activity and limits the diffusion between the substrate and product. In addition, it removes substrate residues or secondary products that flow into the porous support, which can inactivate or inhibit the lipase activity [50, 51].

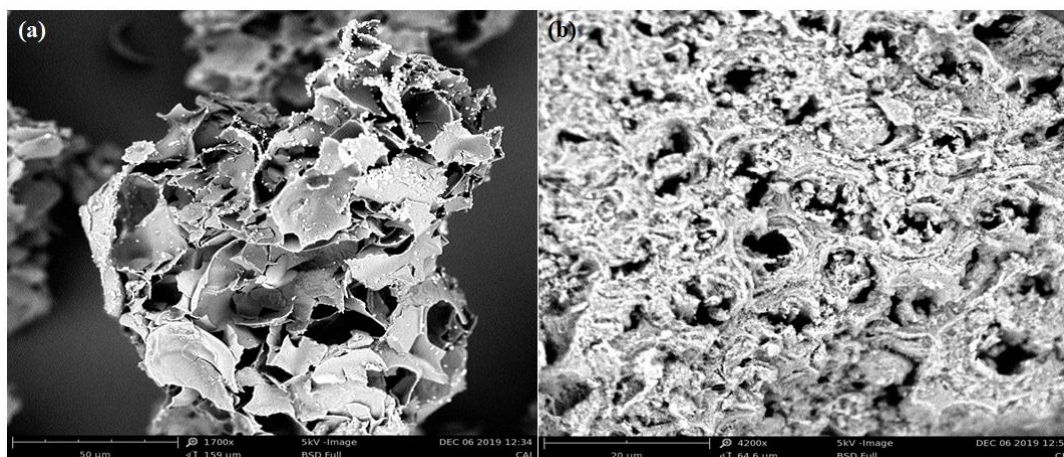


**Fig. 7.** Esterification yield of isoamyl acetate catalyzed by lipase from porcine pancreas immobilized by activated carbon (LPAC) and functionalized carbon (LPFC) as a function of the number of reuse cycles Means followed by the same letter for each cycle did not differ significantly at  $p < 0.05$  using the Tukey's test.

### 3.6 Scanning Electron Microscopy (SEM)

Scanning Electron Microscopy (SEM) was used to characterize the morphology of the biocatalysts. Fig. 8 (a) shows that the porous surface structure of the carbon was maintained, once, in this immobilization protocol, the enzyme molecules preferentially

diffuse inside the pores and, after occupying them, spread to the external surface area, leaving only traces of the enzyme on the surface [52]. On the other hand, concerning the LPFC sample (Fig. 8 (b)), a greater modification was observed in the structure of the support, in which enzymes are visualized on the surface or entrance of the pores, due to the interaction between enzymes and the spacer arms incorporated by the functionalization process, which was also observed by Kumar and collaborators [53]. In addition, protein aggregates may have formed on the surface of the supports.

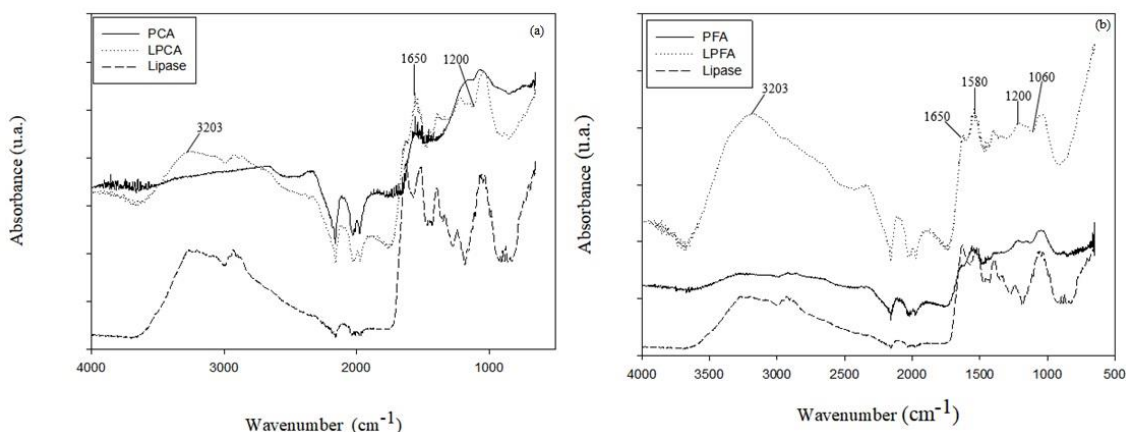


**Fig. 8.** Scanning Electron Microscopy of the biocatalysts LPCA (a) and LPFC (b).

### 3.7 FTIR spectroscopy

The FTIR spectra of the free enzyme, the biocatalysts, and the supports, were determined to verify the chemical changes on the matrix surfaces after immobilization. As shown in Fig. 9, the immobilization process promoted changes in both supports, which were more noticeable in the spectrum of the enzyme immobilized on the functionalized carbon, once the enzymes are predominantly on the matrix surface, connected by the amino-aldehydes spacer arms (Am-Al) formed during functionalization. In immobilization by adsorption, although the enzymes are also immobilized on the surface of the carbon, they are confined to a great extent within the pores, thus promoting less chemical changes on the surface [34]. In general, both in Fig. 9 (a) and Figure 9 (b) the biocatalyst had a typical spectrum, with absorption bands associated with the primary and secondary amine groups (CONH), from 1000-1200  $\text{cm}^{-1}$  to 1580 and 1650  $\text{cm}^{-1}$ , respectively [17]. A band at 1060  $\text{cm}^{-1}$  relative to C - NH - C stretching and another at 3203  $\text{cm}^{-1}$  was also observed, characterized by the O-H stretching and the presence of residual water, with greater intensity observed in the LPFC sample [29, 54].





**Fig. 9.** FTIR of lipase, supports, and the biocatalysts activated carbon (a) and functionalized carbon (b).

#### 4. Conclusion

The supports produced from the pupunha palm sheaths have chemical and textural characteristics that favored the lipase immobilization process. The AC presented a high surface area and average pore diameter that allowed both the accommodation of the enzyme, as well as the access of the substrate and diffusion of the products in the esterification reaction process. The functionalization of activated carbon by the glutaraldehyde method changed the surface of the porous material by the insertion of amine-aldehyde groups and reduced the matrix surface area. Both supports showed a high lipase immobilization capacity in the best immobilization conditions obtained. The immobilized enzyme was successfully tested in the synthesis of the isoamyl acetate ester, reaching molar conversions around 93% and 91% for the LPAC and LPFC biocatalysts, respectively, in a short time (180 min), maintaining the catalytic activity during five cycles of reuse. It is concluded that the biocatalysts showed a high conversion and possibility of reuse, therefore they can be used in the esterification reaction for the aroma ester synthesis, through the biotechnological route, contributing for the use of the enzymatic processes as an economically competitive alternative when compared to the chemical processes currently used in obtaining aroma esters.

#### Acknowledgments

The authors acknowledge CETENE by analysis, the FAPESB, UESB, CNPq and CAPES-Brazil (Finance Code 001) for financial support.

## References

- [1] S. Wang, D. Zheng, L. Yin, F. Wang, Preparation, activity and structure of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) with nanoparticle, *Enzyme Microb. Technol.*, 107 (2017) 22-31.
- [2] M.C.P., Gonçalves, T.G. Kieckbusch, R.F. Perna, J.T. Fujimoto, S.A.V. Morales, J.P. Romanelli, Trends on enzyme immobilization researches based on bibliometric analysis, *Process Biochem.* 76 (2019) 95-110.
- [3] A.S. Miranda, L.S.M. Miranda, R.O.M.A. De Souza, Lipases: valuable catalysts for dynamic kinetic resolutions, *Biotechnol. Adv.* 33 (2015) 372-393.
- [4] R. Jambulingam, M. Shalma, V. Shankar, Biodiesel production using Lipase Immobilized Functionalized Magnetic Nanocatalyst from Oleaginous Fungal Lipid, *J. Clean. Prod.* 215 (2019) 245-258.
- [5] R.N. Lima, C.S. Anjos, E.V.M. Orozco, A.L.M. Porto, Versatility of *Candida antarctica* lipase in the amide bond formation applied in organic synthesis and biotechnological processes, *Mol. Cataly.* 466 (2019) 75-105.
- [6] A.G.A. Sá, A.C. Meneses, P.H.H. Araújo, D. Oliveira, A review on enzymatic synthesis of aromatic esters used as flavor ingredients for food, cosmetics and pharmaceuticals industries, *Trends Food Sci. Technol.* 69 (2017) 95-105.
- [7] S. Asmat, A.H. Anwer, Q. Husain, Immobilization of lipase onto novel constructed polydopamine grafted multiwalled carbon nanotube impregnated with magnetic cobalt and its application in synthesis of fruit flavours. *Int. J. Biol. Macromol.* 140 (2019) 484-495.
- [8] A.M. Gumel, M.S.M. Annuar, *Thermomyces lanuginosus* lipase-catalyzed synthesis of natural flavor esters in a continuous flow microreactor, *Biotech* 6 (2016) 1-24.
- [9] M. Sarno, M. Iuliano, P. Ciambelli, High activity and selectivity immobilized lipase on Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles for banana flavor synthesis, *Process Biochem.* 56 (2017) 98-108.
- [10] O. Barbosa, R. Torres, C. Ortiz, Á. Berenguer-Murcia, R.C. Rodrigues, R. Fernandez-Lafuente, Heterofunctional Supports in Enzyme Immobilization: From Traditional Immobilization Protocols to Opportunities in Tuning Enzyme Properties, *Biomacromolecules* 14 (2013) 2433-2462.

- [11] E.P. Cipolatti, E.A. Manoel, R. Fernandez-Lafuente, D.M.G. Freire, Support engineering: relation between development of new supports for immobilization of lipases and their applications, *Biotechnol. Res. Innov.* 1 (2017) 26-34.
- [12] Y. Lia, W. H. Lua, J. Chua, A. Zhanga, L. Dinga, Z. Xua, G. Gua, Preparation of immobilized lipase by modified polyacrylonitrile hollow membrane using nitrile-click chemistry, *Bioresour. Technol.* 274 (2019) 9-17.
- [13] T. Jesionowski, J. Zdarta, B. Krajewska, Enzyme immobilization by adsorption: a review, *Adsorption* 20 (2014) 801-821.
- [14] S.H. Dhawane, T. Kumar, G. Halder, Process optimisation and parametric effects on synthesis of lipase immobilised carbonaceous catalyst for conversion of rubber seed oil to biodiesel, *Energy Convers. Manag.* 176 (2018) 55-68.
- [15] N. Zhong, W. Chen, L. Liu, H. Chen, Immobilization of *Rhizomucor miehei* lipase onto the organic functionalized SBA-15: Their enzymatic properties and glycerolysis efficiencies for diacylglycerols production, *Food Chem.* 271 (2019) 739-746.
- [16] Z. Gao, J. Chu, T. Jiang, T. Xu, B. Wu, B. He, Lipase immobilization on functionalized mesoporous TiO<sub>2</sub>: Specific adsorption, hyperactivation and application in cinnamyl acetate synthesis, *Process Biochem.* 64 (2018) 152-159.
- [17] R. Joshi, R. Sharma, A. Kuila, Lipase production from *Fusarium incarnatum* KU377454 and its immobilization using Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> NPs for application in waste cooking oil degradation, *Bioresour. Technol. Rep.* 5 (2019) 134-140.
- [18] M.J.P. Brito, C.M. Veloso, R.C.F. Bonomo, R.C.I. Fontan, L.S. Santos, K.A. Monteiro, Activated carbons preparation from yellow mombin fruit stones for lipase immobilization, *Fuel Process. Technol.* 156 (2017) 421-428.
- [19] D. Pandey, A. Daverey, K. Arunachalam, Biochar: Production, properties and emerging role as a support for enzyme immobilization, *J. Clean. Prod.* **255** (2020) 120-267.
- [20] M.P.F., Santos, M.J.P. Brito, E.C.S. Junior, R.C.F. Bonomo, C.M. Veloso, Pepsin immobilization on biochar by adsorption and covalent binding, and its application for hydrolysis of bovine casein, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 94 (2019) 1982-1990.
- [21] S. Rangabhashiyam, P. Balasubramanian, The potential of lignocellulosic biomass precursors for biochar production: Performance, mechanism and wastewater application - A review, *Ind. Crops Prod.* 128 (2019) 405-423.
- [22] M.J.P. Brito, C.M. Veloso, L.S. Santos, R.C.F. Bonomo, R.C.I. Fontan, Adsorption of the textile dye Dianix® royal blue CC onto carbons obtained from yellow mombin

fruit stones and activated with KOH and H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>: kinetics, adsorption equilibrium and thermodynamic studies, *Powder Technol.* 339 (2018) 334-343.

[23] K. Ramani, S. Karthikeyan, R. Boopathy, L. Kennedy, A.B. Mandal, G. Sekaran, Mesoporous activated carbon surface functionalized for the immobilization of lipase and its application acidic hydrolysis waste oil prepared: Isotherm and kinetic studies, *Process Biochem.* 47 (2012) 435-445.

[24] J.R. Regalbuto, J. Robles, *The engineering of Pt/Carbon Catalyst Preparation*, University of Illinois, Chicago, 2004.

[25] M.M.A., Bradford, Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248-254.

[26] C.M.F. Soares, H.F. De Castro, F.F. De Moraes, G.M. Zanin, Characterization and utilization of *Candida rugosa* lipase immobilized on controlled pore silica, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 79 (1999) 745-757.

[27] J.P. Chen, Production of ethyl butyrate using gel-entrapped *Candida cylindracea* lipase, *J. Ferment. Bioengineer.* 82 (1996) 404-407.

[28] IUPAC: União Internacional de Química Pura e Aplicada, Reporting Physisorption data for gás/solid systems 54 (1982) 2201-2218.

[29] A. Kumar, H.M. Jena, Preparation and characterization of high surface area activated carbon from Fox nut (*Euryale ferox*) shell by chemical activation with H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, *Results Phys.* 6 (2016) 651-658.

[30] M. Fujishige, I. Yoshida, Y. Toya, Y. Banba, K. Oshida, Y. Tanaka, P. Dulyaseree, W. Wongwiriyan, K. Takeuchi, Preparation of Activated Carbon from Bamboo-Cellulose Fiber and Its Use for EDLC Electrode Material, *Biochem. Pharmacol.* 5 (2017) 1801-1808.

[31] N. Carlsson, H. Gustafsson, C. Thörn, L. Thörn, K. Holmberg, B. Åkerman, Enzymes immobilized in mesoporous silica: A physical-chemical perspective, *Adv. Colloid Interface Sci.* 205 (2014) 339-360.

[32] J.A. Torres, M.C. Silva, J.H. Lopes, A.E. Nogueira, F.G.E. Nogueira, A.D. Corrêa, Development of a reusable and sustainable biocatalyst by immobilization of soybean peroxidase onto magnetic adsorbent, *Int. J. Biol. Macromol.* 114 (2018) 1279-1287.

- [33] E. Serra, E. Díez, I. Díaz, R.M. Blanco, A comparative study of periodic mesoporous organosilica and different hydrophobic mesoporous silicas for lipase immobilization, *Microporous and Mesoporous Mater.* 132 (2010) 487-493.
- [34] Z. Zhou, M. Hartmann, Progress in enzyme immobilization in ordered mesoporous materials and related applications, *Chem. Soc. Rev.* 42 (2013) 3894-3912.
- [35] C. Reichardt, S. Utgenannt, K.P. Stahmann, O. Klepe, Barig, S., Highly stable adsorptive and covalent immobilization of *Thermomyces lanuginosus* lipase on tailor-made porous carbon material, *Biochem. Eng. J.* 138 (2018) 63-67.
- [36] S.N. Andrade, C.M. Veloso, R.C.I. Fontan, R.C.F. Bonomo, L.S. Santos, M.J.P. Brito, G.A. Diniz, Chemical-activated carbon from coconut (*Cocos nucifera*) endocarp waste and its application in the adsorption of  $\beta$ -lactoglobulin protein, *Rev. Mex. Ing. Quím.* 17 (2018) 441-453.
- [37] R.G. Pereira, C.M. Veloso, N.M. Da Silva, L.F. De Sousa, R.C.F. Bonomo, A.O. De Souza, M.O. Da Guarda, R.D.C.I. Fontan, Preparation of activated carbons from cocoa shells and siriguela seeds using  $H_3PO_4$  and  $ZnCl_2$  as activating agents for BSA and  $\alpha$ -lactalbumin adsorption, *Fuel Process. Technol.* 126 (2014) 476-486.
- [38] S.S. Brum, M.L. Bianchi, V.L. Da Silva, M. Gonçalves, M.C. Guerreiro, L.C.A. De Oliveira, Preparação e caracterização de carvão ativado produzido a partir de resíduos do beneficiamento do café, *Quím. Nova* 31 (2008) 1048-1052.
- [39] M.L. Mamiński, J. Pawlicki, Improved Water Resistance and Adhesive Performance of a Commercial UF Resin Blended with Glutaraldehyde, *J. Adhes.* 82 (2006) 629-641, 2006.
- [40] G.R.F. Gonçalves, O.R.R. Gandolfi, C.M.S. Santos, R.C.F. Bonomo, C.M. Veloso, R.C.I. Fontan, Development of supermacroporous monolithic adsorbents for purifying lectins by affinity with sugars, *J. Chromatogr. B*, 1033-1034 (2016) 406-412.
- [41] M.D. Alves, F.M. Aracri, É.C. Cren, A.A. Mendes, Isotherm, kinetic, mechanism and thermodynamic studies of adsorption of a microbial lipase on a mesoporous and hydrophobic resin. *Chem. Eng. J.* 3111 (2017) 1-12.
- [42] X. Zhao, F. Qi, C. Yuan, W. Du, D. Liu, Lipase-catalyzed process for biodiesel production: Enzyme immobilization, process simulation and optimization, *Renew. Sustain. Energy Rev.* 44 (2015) 182-197.
- [43] M. Kapoor, M.N. Gupta, Lipase promiscuity and its biochemical applications, *Process Biochem.* 47 (2012) 555-569.

- [44] A.A. Mendes, P.C. Oliveira, H.F. de Castro, Properties and biotechnological applications of porcine pancreatic lipase, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 78 (2012) 119-134.
- [45] K. Li, J. Wang, Y. He, G. Cui, M.A. Abdulrazaq, Y. Yan, Enhancing enzyme activity and enantioselectivity of *Burkholderia cepacia* lipase via immobilization on melamine-glutaraldehyde dendrimer modified magnetic nanoparticles, *Chem. Eng. J.* 351 (2018) 258-268.
- [46] S. Gupta, A. Bhattacharya, C.N. Murthy, Tune to immobilize lipases on polymer membranes: Techniques, factors and prospects, *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 2 (2013) 171-190.
- [47] M. Khoobi, S.F. Motevalizadeh, Z. Asadgol, H. Forootanfar, H. Shafiee, M.A. Faramarzi, Synthesis of functionalized polyethylenimine-grafted mesoporous silica spheres and the effect of side arms on lipase immobilization and application, *Biochem. Eng. J.* 88 (2014) 131-141.
- [48] L.A.A. Veríssimo, P.C.G. Mol, W.C.L. Soares, V.P.R. Minim, M.C. Hespanhol, L.A. Minim, Development of a bioreactor based on lipase entrapped in a monolithic cryogel for esterification and interesterification reactions. *Rev. Mex. Ing. Quím.* 17 (2018) 177-187.
- [49] G. Fernandez-Lorente, Z. Cabrera, C. Godoy, R. Fernandez-Lafuente, J.M. Palomo, J. M. Guisan, Interfacially activated lipases against hydrophobic supports: Effect of the support nature on the biocatalytic properties, *Process Biochem.* 43 (2008) 1061-1067.
- [50] A.B. Martins, N.G. Graebim, A.S.G. Lorenzoni, R. Fernandez-Lafuente, M.A.Z. Ayub, R.C. Rodrigues, Rapid and high yields of synthesis of butyl acetate catalyzed by Novozym 435: Reaction optimization by response surface methodology, *Process Biochem.* 46 (2011) 2311-2316.
- [51] J.L.R. Friedrich, F.P. Peña, C. Garcia-Galan, R. Fernandez-Lafuente, M.A.Z. Ayub, R.C. Rodrigues, Effect of immobilization protocol on optimal conditions of ethyl butyrate synthesis catalyzed by lipase B from *Candida Antarctica*. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 88 (2013) 1089-1095.
- [52] L.C. Almeida, A.S. Barbosa, A.T. Fricks, L.S. Freitas, Á.S. Lima, C.M.F. Soares, Use of conventional or non-conventional treatments of biochar for lipase immobilization. *Process Biochem.* 61 (2017) 124-129.
- [53] A. Kumar, H.M. Jena, Preparation and characterization of high surface area activated carbon from Fox nut (*Euryale ferox*) shell by chemical activation with H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, *Results Phys.* 6 (2016) 651-658.

[54] A., Natalello, D. Ami, S. Brocca, M. Lotti, S.M. Doglia, Secondary structure, conformational stability and glycosylation of a recombinant *Candida rugosa* lipase studied by Fourier-transform infrared spectroscopy, *Biochem. J.* 385 (2005) 511-517.

## **CAPÍTULO 4**

---

### **Síntese de carvões ativados utilizando o bagaço do malte: aplicação na imobilização de lipase por adsorção e ligação covalente para emprego em reação de esterificação**

---

\* Este artigo será submetido a revista Industrial Crops and Products (INSS: 096-6690),  
classificação Qualis-Capes: A1, Fator de impacto: 4.072.



## RESUMO

Este trabalho teve como objetivo otimizar o processo de síntese de carvões ativados, utilizando como fonte precursora de carbono o bagaço do malte, e empregar o material produzido como suporte na imobilização da lipase pelo método de adsorção e ligação covalente. Os carvões foram sintetizados por meio a ativação química, utilizando ácido fosfórico como agente ativante com posterior carbonização. O Delineamento Composto Central Rotacional foi empregado como ferramenta estatística para avaliar a influência das diferentes condições de síntese (razão de impregnação, tempo e temperatura de carbonização) no desenvolvimento da área superficial ( $S_{\text{BET}}$ ) do material poroso. A temperatura e o tempo de carbonização apresentaram efeito significativo na variável resposta, sendo obtida uma  $S_{\text{BET}}$  de  $900 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$  nas condições otimizadas. O carvão ativado produzido nas melhores condições foi funcionalizado pelo método do glutaraldeído. A funcionalização promoveu a modificação da superfície do material poroso pela inserção de grupos amina-aldeído, identificados através do espectro de FTIR e também pela redução da área superficial da matriz ( $3 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ ). A lipase imobilizada foi aplicada com o na síntese do éster acetato de isoamila, atingindo conversões molares em torno de 95% e 89% para a enzima imobilizada no carvão ativado (CAOI) e no carvão funcionalizado (CAOFI), respectivamente. A avaliação da estabilidade operacional mostrou que o biocatalisador CAOI pode ser reutilizado por pelo menos quatro vezes consecutivas sem perda significativas da atividade catalítica. Estes resultados indicam que o carvão ativado e o carvão funcionalizado podem ser considerados uma alternativa promissora de suporte para imobilização de lipase, uma vez que os biocatalisadores produzidos apresentaram elevada atividade na síntese de éster de aroma, pela rota biotecnológica.

**Palavras-chave:** adsorção; biocatalisadores; ésteres aromáticos; ligação covalente; resíduos lignocelulósicos

## 1. INTRODUÇÃO

Ésteres de ácidos carboxílicos são componentes importantes utilizados na indústria alimentícia para a formação e intensificação de aromas em diversos produtos. Como exemplo pode-se citar o acetato de isoamila, que apresenta-se como um dos compostos aromatizantes mais importante usado nas indústrias alimentícias devido ao aroma característico de banana, sendo adicionados em vários alimentos e bebidas tais

como caramelos, misturas para bolos e bebidas alcoólicas (Saha et al., 2018; Azudin et al., 2019).

Os ésteres de aroma são formados pela reação de esterificação direta de um ácido carboxílico com um álcool na presença de catalisador, com a opção de ser realizada na presença (ou não) de solvente orgânico e podem ser obtidos por via natural, química ou biotecnológica (Sá et al., 2017; Asmat et al., 2019). A produção de ésteres de aroma com o emprego de enzimas ou através de fontes microbianas vêm ganhando importância industrial, devido a diversas vantagens que ela oferece em relação às tecnologias convencionais (Padilha et al., 2018). A síntese biotecnológica oferece um alto rendimento em comparação com a síntese química e acelera as reações em até  $10^8$ - $10^{15}$  vezes, requer condições moderadas para reação e o produto, assim gerado, pode ser caracterizado como natural ou idêntico ao natural, sendo, portanto, de grande interesse para a indústria de alimentos (Gumel e Annuar, 2016; Sá et al., 2017).

Nos últimos anos, a utilização de enzimas para a catálise de reações de esterificação tem sido extensivamente estudada. Dentre elas, as lipases (triacilglicerol acilhidrolases, E.C.3.1.1.3) vêm se destacando, uma vez, que são capazes de hidrolisar uma ampla variedade de ésteres e, em condições adequadas, catalisam reações de esterificação e transesterificação (interesterificação, alcoólise e acidólise), levando à síntese de diferentes ésteres carboxílicos e amidas (Paques e Macedo, 2006; Lima et al., 2019).

Entretanto apesar das inúmeras vantagens da aplicação da biotecnologia para produção de aromas, um fator importante a ser considerado é o custo da própria enzima, que é uma desvantagem para o processo biotecnológico comparado com a síntese química. Neste sentido a imobilização enzimática, destaca-se como uma das estratégias mais promissoras para superar tal inconveniente, uma vez que permite que a enzima seja reutilizada várias vezes, mantendo a sua atividade tanto tempo quanto possível, e em alguns casos promovendo a melhoria da eficiência catalítica da enzima (Sarno et al., 2017; Asmat et al., 2019).

Uma decisão importante a ser tomada quando se procura estabelecer um método de imobilização enzimática é a escolha do suporte. Apesar de existirem uma grande variedade de suportes para imobilização de lipases, cada aplicação específica necessita de condições operacionais adequadas para tal fim. Existe, portanto, uma constante demanda pelo desenvolvimento de novos suportes para imobilização enzimática e de

técnicas elaboradas especificamente para a imobilização nestes suportes (Brito et al., 2017; Santos et al., 2019).

Um suporte com potencialidades para a aplicação que se propõe é o carvão ativado que é um material carbonáceo, detentor de uma estrutura porosa desenvolvida, elevada área superficial específica, com presença de heteroátomos em sua superfície, características essas que favorecem a imobilização. Esses materiais são obtidos basicamente por processos que contam com a carbonização do material precursor de carbono e sua ativação (Brito et al., 2017; Dhawane et al., 2018). Quando produzidos a partir de resíduos lignocelulósicos, tona-se uma opção vantajosa, devido ao custo reduzido de produção, ao se comparar com outros matrizes porosas.

As propriedades físicas da superfície do CA são descritas pela sua área superficial específica e porosidade, enquanto que as propriedades químicas dependem da presença ou ausência de grupos ácidos ou básicos em sua superfície (Yahya et al., 2015). Os carvões ativados preparados a partir de resíduos lignocelulósicos são predominantemente microporosos, implicando na necessidade de tratamentos específicos durante a síntese que favoreçam a formação de poros mais largos, acessíveis a moléculas maiores, como as proteínas (Pereira et al., 2014). Neste sentido, este trabalho teve como objetivo otimizar o processo de produção de carvões ativados, utilizando como fonte precursora de carbono o bagaço do malte, e avaliar a eficiência dos materiais sintetizados na imobilização da lipase, pelos métodos de adsorção e ligação covalente. Além disso, esse estudo visa empregar os biocatalisadores obtidos na obtenção de ésteres (aromas) através da reação de esterificação.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 Materiais**

Bagaços do malte, doados por uma indústria de cerveja artesanal situada no estado da Bahia-Brasil, foram utilizados como precursor de carbono para a produção dos carvões ativados. Ácido fosfórico (Synth) foi empregado como agente químico ativante. Lipase de pâncreas de porco tipo *II* (Sigma-Aldrich; CAS number: 9001-62-1) foi utilizada para realização dos testes de imobilização. Os demais reagentes estão descritos ao longo da metodologia e todos possuíam, no mínimo, grau de pureza PA-ACS.

### **2.2 Planejamento Experimental das condições de síntese dos carvões ativados**

O delineamento composto central rotacional (DCCR) foi utilizado como ferramenta estatística para verificar uma tendência de otimização do processo de produção do carvão ativado. Os parâmetros razão de impregnação, temperatura de carbonização e tempo de carbonização foram selecionados para avaliar o efeito no desenvolvimento da área superficial ( $S_{BET}$ ) do carvão ativado. Os mesmos foram sintetizados em condições específicas de acordo com as condições experimentais apresentadas na Tabela 1. Os efeitos significativos foram estudados em três níveis, com um total de 19 ensaios e 15 tratamentos, com cinco repetições no ponto central.

Os resultados obtidos foram submetidos a análise de regressão linear múltipla, de modo a identificar quais variáveis apresentaram efeito significativo sobre o desenvolvimento da área superficial dos carvões ativados, o que foi definido com base na significância do modelo e dos parâmetros ( $p < 0,05$ ), falta de ajuste do modelo ( $p > 0,05$ ) e coeficiente de determinação. Todas as análises estatísticas necessárias foram realizadas no pacote estatístico *Statistical Analysis System*® versão *for student*.

**Tabela 1.** Variáveis e níveis do delineamento composto central rotacional ( $2^3$ ).

Variáveis reais	Variáveis codificadas	Nível				
		-1,68	-1	0	1	1,68
Temperatura de carbonização (°C)	X <sub>1</sub>	300	380	500	620	700
Tempo de carbonização (min)	X <sub>2</sub>	30	48	75	102	120
Razão de impregnação (massa de ativante/massa do precursor)	X <sub>3</sub>	0,333	0,873	1,667	2,460	3,000

### 2.2.1 Síntese dos carvões ativados

O bagaço do malte foi lavado em água corrente, secos em estufa a 105 °C por 24 h, triturados em moinho e peneirados em uma peneira de 420 µm. O farelo obtido (precursor) foi impregnado com ácido fosfórico (85% m/m) na razão mássica de impregnação (massa de ativante/massa do precursor) e seco em estufa (TECNAL,

modelo: 393-1) a 105 °C por 24 h. Em seguida o material foi carbonizado em forno mufla (EDG 3P-S, modelo 3000), sob fluxo de nitrogênio (50 mL min<sup>-1</sup>) com taxa de aquecimento de 5°C min<sup>-1</sup>, até a temperatura final pré-estabelecida, mantida constante por intervalo de tempo definido. Os carvões obtidos foram lavados com água quente até que o pH próximo a 7,0 fosse alcançado. Em seguida, foram secos em estufa a 105 °C por 24 h e peneirados em uma peneira de 420 µm.

### **2.3 Funcionalização do carvão ativado**

O carvão ativado produzido a partir das melhores condições de síntese (CAO), obtido pelo resultado do delineamento experimental, foi funcionalizado utilizando o glutaraldeído como agente de ativação de acordo com metodologia proposta por Ramani et al. (2012), com modificações descritas por Santos et al. (2019).

### **2.4 Caracterização do material precursor e dos carvões ativados**

O material precursor (MP) foi inicialmente caracterizado em relação a sua composição em material lignocelulósico (lignina, celulose e hemicelulose), utilizando-se a metodologia de fibra detergente neutra e fibra detergente ácida (FDN e FDA) descrita por Van Soest et al (1991). A decomposição térmica do MP foi avaliada por análise térmica diferencial (DTA) e termogravimetria (TG) em um equipamento Shimadzu DTG-60 TGA/DTG, na faixa de temperatura de 10°C -1000 °C, a uma taxa de aquecimento de 10 °C min<sup>-1</sup> sob fluxo de nitrogênio (50 mLmin<sup>-1</sup>), utilizando 0,005 g da amostra. As isotermas de adsorção e dessorção dos carvões, para determinação da área superficial, foram obtidas em um equipamento Micromeritics modelo ASAP 2420 (Micromeritics Instrument Corporation, Norcross, GA 30093 USA), utilizando aproximadamente 0,20 g de amostra (Brito et al., 2018). Determinou-se também o ponto de carga zero do carvão (CAO), sintetizado nas melhores condições de síntese obtidas pela análise estatística, assim como do carvão funcionalizado (Regalbuto e Robles, 2004). Os grupos funcionais dos materiais porosos foram avaliados por FTIR. As amostras foram analisadas de forma direta utilizando a técnica de refletância total atenuada (ATR) na região infravermelha de 4000-500 cm<sup>-1</sup> em espectrofotômetro FTIR (Cary 630 FTIR, Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA). A morfologia do CAO e do CAO-F foi determinado por microscopia eletrônica de varredura. Para isso, as amostras foram fixadas em suportes apropriados (stub) e em seguida foram conduzidas para análise em microscópio eletrônico de varredura (Carl Zeiss, Modelo DSM940, Oberkochen, Alemanha).

## 2.5 Ensaio de imobilização da lipase

A lipase foi imobilizada por dois métodos de imobilização: adsorção e ligação covalente, utilizando como suportes o carvão ativado obtido a partir das melhores condições de síntese (CAO) e o carvão funcionalizado (CAOF), respectivamente. 5 ml da solução de lipase ( $6000 \text{ mg L}^{-1}$ ) foram colocados em tubos contendo 0,100 mg do suporte e mantidos sob agitação constante num agitador orbital a 20 rpm, durante 2 h, em pH 5,0 na temperatura de  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ . O ajuste do pH foi realizado com adição de solução tampão acetato de sódio ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ) e ácido acético ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ). Ao final do processo os tubos foram centrifugados ( $3500 \text{ rpm}/10 \text{ min}$ ). A concentração de proteína no sobrenadante foi determinada pelo método de Bradford (1976), em comprimento de onda de 595 nm, utilizando uma curva de calibração padrão de BSA. A capacidade de imobilização foi determinada de acordo com procedimento descrito por Brito et al., 2017.

## 2.6 Determinação da atividade hidrolítica

O método de hidrólise da emulsão de azeite de oliva, conforme metodologia adaptada de Soares et al (1999), foi empregada para determinar a atividade hidrolítica das enzimas solúveis e imobilizadas. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima que libera  $1 \mu\text{mol}$  de ácido graxo por minuto de reação, nas condições do ensaio ( $37 \text{ }^\circ\text{C}$ , pH 8,0 e 150 rpm).

## 2.7 Reação de esterificação

A reação de esterificação foi conduzida utilizando álcool isoamílico e ácido acético como substratos, na razão molar de 1:2 (ácido acético: álcool isoamílico) e hexano como solvente. Os ensaios foram conduzidos em frascos de vidros com capacidade para 100 ml contendo 5 ml da mistura reacional e incubadas em agitador orbital a  $40 \text{ }^\circ\text{C}$  com uma taxa de rotação de 200 rpm. A reação foi iniciada pela adição de 0,5 g do biocatalisador preparado previamente nas condições estabelecidas no item 2.5. Alíquotas da mistura de reação foram retiradas no tempo 180 min. O ácido acético consumido para a formação do acetato de isoamila, foi determinado por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). O rendimento de esterificação em acetato de isoamila foi determinado de acordo com a Equação 1.

$$Y\% = \frac{(C_0 - C_f)}{C_0} \times 100 \quad (1)$$

Onde  $C_0$  é a concentração molar inicial de ácido acético (mol/L) e  $C_f$  é a concentração molar final de ácido acético (mol/L).

### **2.7.1 Quantificação do ácido acético**

O teor de ácido acético consumido na reação foi determinado utilizando cromatógrafo líquido (Shimadzu, Japão) com um detector de matriz de diodo (Shimadzu, Japão), em um comprimento de onda de 210 nm. Uma coluna de aço inoxidável CLC (M) (250 mm x 4,6 mm, Shimadzu) foi empregada para separação cromatográfica. A fase móvel foi composta de acetonitrila / água (75:25, v/v) com fluxo de 0,8 mL/min. Um volume de 20  $\mu$ L foi injetado no cromatógrafo e ácido foi eluído da coluna usando um método isocrático (Chen, 1996).

### **2.8 Estabilidade operacional**

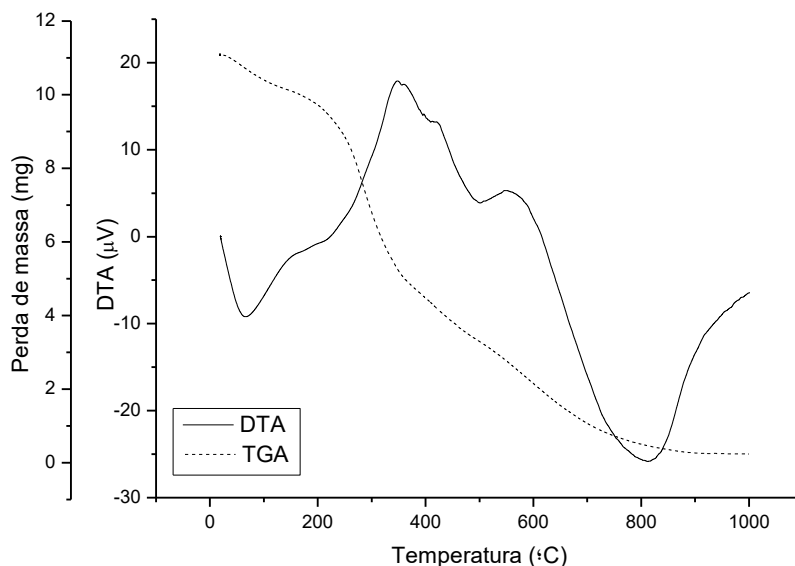
A estabilidade operacional dos biocatalisadores preparados neste estudo na síntese do acetato de isoamila, foi avaliada por sucessivas reações de esterificação do ácido acético com álcool isoamílico, usando o procedimento descrito na seção 2.6. Após cada ciclo de reação foram adicionados 20 ml de tampão acetato de sódio 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 5,0 nos frascos contendo os biocatalisadores, os quais passaram por um processo de agitação (20rpm/5min) e posterior a centrifugação (3500/5 min). Em seguida foram realizadas sucessivas lavagens dos biocatalisadores com hexano para a remoção de materiais de partida não convertidos e produtos adsorvidos em seu microambiente. Após este procedimento, o biocatalisador foi recuperado e incubado em um novo meio reacional.

## **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **3.1 Composição do material precursor**

O material precursor (bagaço do malte) possui em sua composição 24,89% de lignina, 18,83% de celulose e 19,02% de hemicelulose. A composição do material lignocelulósico exerce influência direta no desenvolvimento da porosidade dos carvões produzidos. Isto ocorre, pois, a celulose e a hemicelulose são as frações voláteis removidas mais facilmente durante os processos de pirólise e ativação, causando o desenvolvimento de poros, enquanto que a lignina, que confere rigidez à matriz de biomassa, é o constituinte que apresenta maior resistência à degradação térmica (Muley

et al., 2016; Selvaraju et al., 2017). O perfil de decomposição térmica do material precursor está apresentado na Figura 1.



**Figura 1.** Curvas de TG e DTA do material precursor.

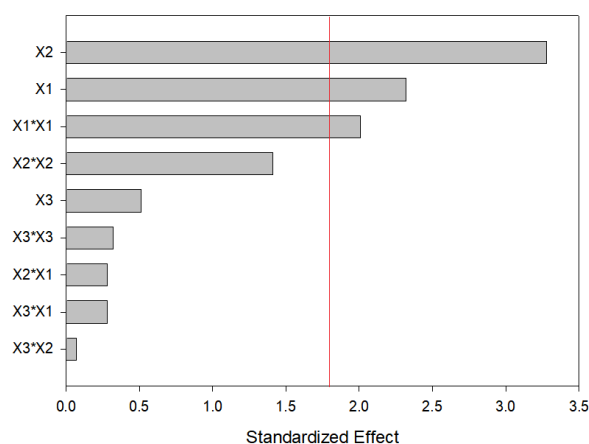
Como é possível observar (Figura 1) a decomposição térmica do bagaço do malte ocorre em três etapas distintas. A primeira etapa, evidente no intervalo de 40-180 °C, ocorre principalmente como resultado da desidratação da matéria-prima. O pico endotérmico em temperaturas inferiores a 100 °C, pode ser atribuído à dessorção de água fisissorvida e outros voláteis (Pereira et al., 2014). A segunda etapa, que corresponde a maior perda de massa, na região entre 200- 400 °C, pode ser atribuída a decomposição da hemicelulose (200-270 °C) e da celulose (270-400 °C), sendo também evidente a partir do pico exotérmico (DTG) nessa faixa de temperatura. A terceira etapa é observada em temperaturas superiores a 375 °C a 500 °C, indicando a decomposição de lignina, principal componente lignocelulósico do bagaço do malte. Observa-se também uma queda contínua entre 600-800°C, que podem ser atribuídas a uma prolongação da degradação da lignina, uma vez que este composto tem alta estabilidade térmica (Jain e Tripathi, 2014). Além disso, esse estágio revela a decomposição de uma porção de celulose e hemiceluloses residuais. Avaliando-se a curva do DTG, verifica-se que a degradação da lignina é a que apresenta o processo exotérmico mais intenso, atribuindo assim a maior



concentração de energia da biomassa à este componente (Pereira et al., 2014). A perda total de massa da amostra ultrapassa 90% em temperaturas superiores a 500 °C.

### 3.2 Efeito das condições de síntese nas propriedades texturais do carvão ativado

Na Figura 2 está apresentado o gráfico de Pareto que representa os resultados da ANOVA para o modelo completo do efeito da temperatura de carbonização, do tempo de carbonização e da razão de impregnação no desenvolvimento da área superficial dos carvões ativados. Os dados obtidos foram submetidos à análise de regressão linear múltipla para verificar a significância dos parâmetros pelo teste t ( $p = 0,05$ ).



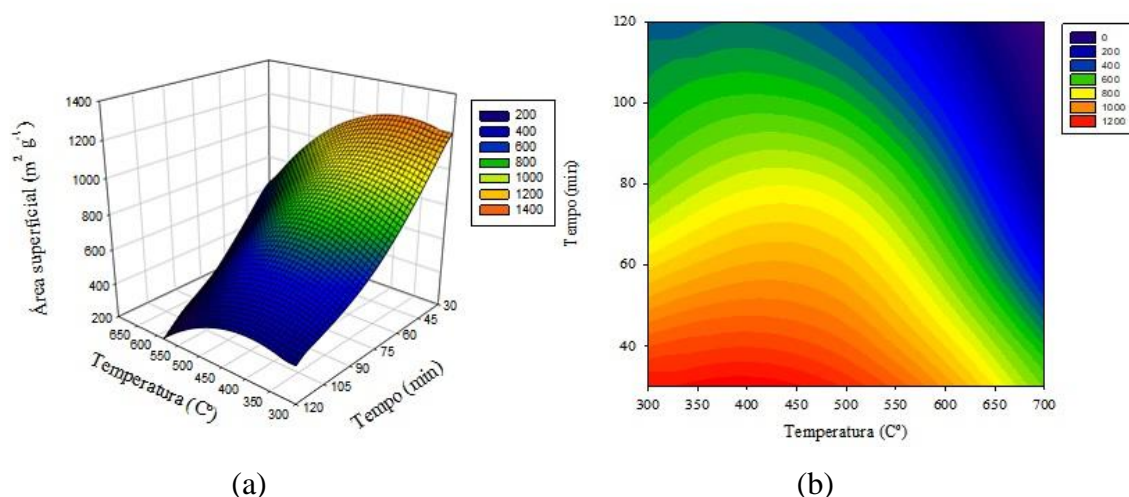
**Figura 2.** Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados das variáveis Temperatura de carbonização ( $X_1$ ), Tempo de carbonização ( $X_2$ ) e Razão de impregnação ( $X_3$ ) sobre o desenvolvimento da área superficial dos carvões ativados ( $p=0,05$ ).

É possível observar através do gráfico de Pareto que o tempo, assim como a temperatura de carbonização, e seu efeito quadrático, afetaram significativamente ( $p \leq 0,05$ ) o desenvolvimento da área superficial dos carvões ativados. Sendo a equação final do modelo ( $R^2=0,90$ ) para as variáveis não codificadas, descrita pela Equação (2).

$$S_{BET} = -164,237 + 7,718X_1 - 0,009X_1^2 - 8,775X_2 \quad (2)$$

Onde  $S_{BET}$  é a área superficial do carvão ativado,  $X_1$  é Temperatura de carbonização (°C) e  $X_2$  é Tempo de carbonização. O modelo foi significativo ( $p=0,0015$ ), a falta de ajuste foi não significativa ( $p > 0,05$ ) e todos os efeitos retidos no modelo foram

significativos ( $p \leq 0,05$ ). O uso da Metodologia de Superfície de Resposta (MSR) permitiu uma melhor compreensão das relações entre o efeito da temperatura e do tempo de carbonização no desenvolvimento da área superficial dos carvões, sendo os resultados apresentados na Figura 3.



**Figura 3.** Gráfico de superfície de resposta (a) e gráfico de curva de contorno do modelo ajustado para a área superficial dos carvões ativados ( $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$ ) em função da temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ) e do tempo (min) de carbonização.

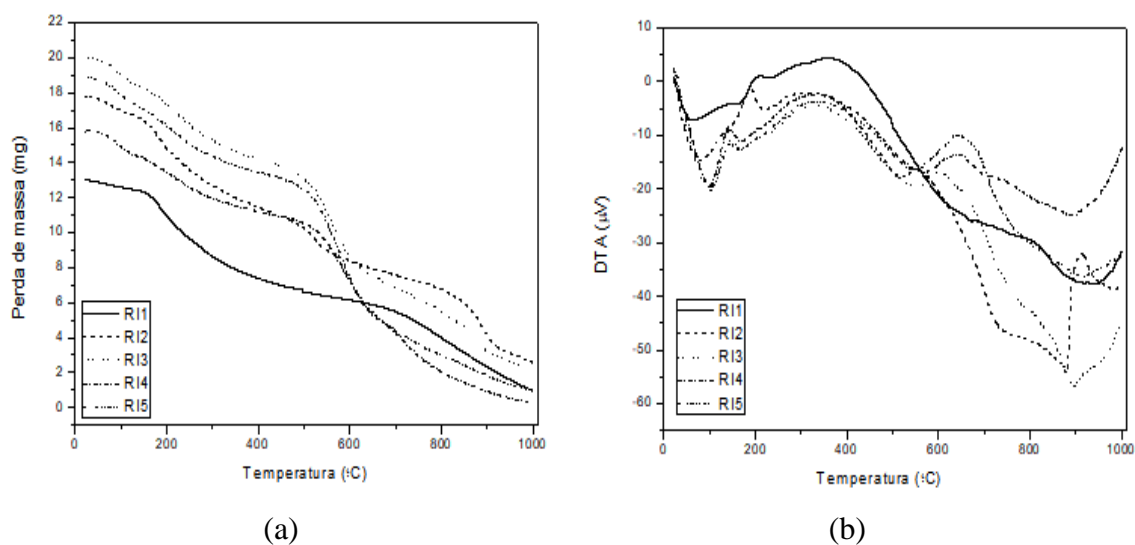
Nas Figuras 3(a) e (b) são apresentados respectivamente os gráficos de superfície de resposta e de curva de contorno do modelo ajustado para a área superficial dos carvões ativados ( $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$ ) em função da temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ) e do tempo (min) de carbonização. Ao avaliar o efeito da temperatura de carbonização, observa-se uma redução acentuada nos valores de área superficial quando a mesma foi superior à aproximada  $425^{\circ}\text{C}$ . Estudos demonstram que as reações químicas envolvendo a ativação de precursores lignocelulósicos com o ácido fosfórico, começam a ocorrer em temperaturas mais brandas de ativação, sendo que um aumento no volume estrutural global e o desenvolvimento concomitante de microporosidade são normalmente identificados para temperaturas na faixa de  $150^{\circ}\text{C}$  a  $350^{\circ}\text{C}$ , e que geralmente em temperaturas superiores de  $450^{\circ}\text{C}$ , uma contração secundária ocorre quando as ligações do fosfato tornam-se termicamente instáveis, podendo com isso promover o alargamento dos poros, causando assim uma redução na área superficial, como demonstrado (Jagtoyen and Derbyshire, 1998; Nahil and Williams, 2012). Isso ocorre devido à agressividade do ácido fosfórico, que associado com temperaturas elevadas promove a quebra de ligações covalentes e interações

químicas como ligações de hidrogênio que favorecem a formação de estruturas rígidas de celulose, hemicelulose e lignina e também por sua ação catalisadora, promovendo a ruptura de ligações aril-éter e formando ésteres fosfóricos pela ligação do agente ativante com os grupos hidroxila da lignina na superfície do material precursor. Estas reações provocam o afastamento das cadeias e geram a expansão da estrutura e a redistribuição dos carbonos remanescentes, ocorrendo a posterior polimerização destes grupos fosfatos com o aumento de temperatura, aumentando o volume de mesoporos e reduzindo a área superficial (Nahil and Williams, 2012; Kumar e Jena, 2016; Brito et al., 2018).

Em relação ao tempo de carbonização, observa-se que maiores valores de  $S_{BET}$  são obtidos quando menores tempos de carbonização são empregados. Este comportamento pode ser atribuído a ação do ácido fosfórico nas transformações das frações lignocelulosicas. A reação de hidrólise desse agente ativante com o material precursor começa assim que os componentes são misturados. O ácido ataca primeiro a lignina (principal componente lignocelulósico do resíduo do malte) juntamente com a hemicelulose, já que a celulose é mais resistente à hidrólise ácida (Yakout e El-Deen, 2016). Com isso o tempo de carbonização deve ser apenas o suficiente para eliminar toda a umidade, a maior parte dos componentes voláteis do material precursor e promover as reações de hidrólise, fazendo com que a porosidade seja desenvolvida. Tempos mais longas de carbonização podem promover o alargamento dos poros à custa da área da superficial, como evidenciado nos gráficos (Gratuito et al., 2008; Sulaiman et al., 2018).

Para uma melhor compreensão das reações envolvendo o resíduo de biomassa com o ácido fosfórico no desenvolvimento da porosidade e aumento da área superficial dos carvões ativados, foi realizada a análise térmica do material impregnado nas cinco razões de impregnação estabelecidas pelo delineamento (Figura 4). As curvas TGA/DTA de todas as amostras mostram uma perda de massa intensa até 300 °C, seguida de uma perda de massa mais lenta e gradual no intervalo de 300-500 °C e uma terceira na gama 500-800 °C. Durante a primeira fase a perda de peso observada, assim como um pico endotérmico na temperatura de 100 °C, pode ser atribuída principalmente à evaporação da água. Componentes voláteis e gases leves, tais como  $CO_2$  e  $CO$ , também são liberados nessa fase (Silva et al., 2016). O segundo estágio, corresponde à formação de microporos e mesoporos, pela reação de  $H_3PO_4$  com o resíduo lignocelulósico (lignina, hemicelulose e celulose) que formam fragmentos de biopolímero com ligações cruzadas ligadas com fosfato e polifosfato (expansão dos materiais) (Nahil e Williams, 2012). O outro pico exotérmico em 180-210°C, pode ser associado à perda do ácido fosfórico que tem ponto

de ebulição em torno de 158°C. A terceira perda de massa pode ser atribuído à oxidação final do material de carbono, depois de reação com  $H_3PO_4$ , devido à decomposição das pontes de fosfato (acompanhada por uma contração do material e uma redução do volume microporoso) (Xu et al., 2014). Observa-se ainda, que perda de massa nessas amostras é mais gradual, ao se comparar com o material precursor (Figura 1) sendo que em 500°C está em torno de 50%. Vale ressaltar também que apesar da razão de impregnação não ser significativa nas condições de síntese avaliadas, com menor razão de impregnação as reações de hidrólise apresentam menor intensidade que as demais.



**Figura 4.** Curvas de TG (a) e DTA (b) do material impregnado em diferentes razões de impregnação: RI1:0,333:1; RI2:0,873:1; RI3: 1,667:1; RI4: 2,460:1 e RI5: 3,000:1.

Com isso o carvão ativado a ser utilizado como suporte na imobilização da lipase foi produzido empregando-se a temperatura de carbonização de 425 °C com um tempo de 30 minutos de residência. Como a razão de impregnação não apresentou efeito significado nos intervalos estudados, optou-se por empregar a menor razão de ácido fosfórico (0,33:1) na síntese do carvão nas condições anteriormente citadas. Demonstrando assim que além de ser possível obter um suporte para imobilização da lipase com elevada porosidade em condições mais brandas de ativação, o controle da temperatura, a baixa razão de impregnação e o curto tempo de carbonização, serão vantajosos no que tange ao aspecto econômico, uma vez que equivale a redução no consumo de energia e de gastos com o agente químico.

### **3.3 Caracterizações do carvão ativado e do carvão funcionalizado obtidos a partir das melhores condições de síntese**

Na Tabela 2 estão apresentadas as propriedades texturais do carvão ativado sintetizado nas melhores condições de síntese e do carvão funcionalizado produzido a partir do mesmo. O valor teórico da  $S_{BET}$  do material poroso fornecido pelo modelo (Equação 2) foi de  $1227 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$  e o valor experimental foi de  $900 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ , demonstrando uma variação de 26% do valor estimado. Essa variação pode ser atribuída pela razão de impregnação utilizada, uma vez que, apesar do modelo não apresentar efeito significativo para este parâmetro, o emprego de menores concentrações de ácido fosfórico pode levar a uma pequena redução da área que não foi previsto pelo mesmo. Porém, mesmo empregando uma razão de impregnação menor é possível obter materiais porosos com área superficiais superiores as obtidas em outros trabalhos que empregaram razões maiores, a partir de outros materiais precursores. Mostrando mais uma vez na necessidade de fazer a otimização para cada material precursor utilizado, pois a composição lignocelulósicos é um fator importante no desenvolvimento da porosidade como demonstrado por Santos et al. (2020).

A área superficial apresenta-se como um dos parâmetros mais importantes ao se desenvolver uma nova matriz porosa para ser empregada como suporte na imobilização de enzimas pelo protocolo de adsorção, uma vez que nesse método quanto maior a área superficial, maior será a área disponível para que ocorra a ligação da enzima a matriz (Reichardt et al., 2018; Pandey et al., 2020). Além disso, o processo de síntese levou ao desenvolvimento de um carvão mesoporoso, uma vez que possui diâmetro médio de poros entre 2 nm e 50 nm (IUPAC, 1982), característica essa desejável para utilização em processos adsortivos de macromoléculas. No processo de adsorção é vantajoso que o adsorvente apresente uma boa relação entre os mesoporos e microporos, pois os primeiros podem possibilitar uma rápida difusão das moléculas no seu interior e o acesso aos microporos, onde ocorre efetivamente o processo adsortivo em grande extensão (Brito et al., 2018). Vale ressaltar também que a elevada  $S_{BET}$  do suporte permitirá que uma maior quantidade de braços espaçadores se liguem à sua superfície durante o processo de funcionalização. A área superficial do CAO é superior as encontradas para outros carvões ativados empregadas na imobilização da lipases, tais como  $412 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ ,  $409 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$  e  $820 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$  para carvões ativados produzido a partir da casca de arroz (Ramani et al., 2010),

do caroço do cajá (Brito et al., 2017) e da *Flamboyant pods* (uma espécie típica da Índia) (Dhawane et al., 2018) respectivamente, evidenciando assim a potencialidade do suporte.

As características texturais do carvão funcionalizado foram completamente alteradas após o processo de funcionalização, sendo observada uma redução de cerca de 99,6% da área superficial quando comparado ao material de origem. Este comportamento pode ser atribuído a inserção dos braços espaçadores aos poros do material durante o processo de funcionalização, que levou a obstrução dos microporos e praticamente todos os mesoporos, promovendo conseqüentemente a redução acentuada da área superficial da matriz (Santos et al., 2019). Esses resultados estão de acordo com os reportados por Ramani et al. (2012), onde a área superficial do carvão ativado foi reduzida significativamente de  $412 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$  para  $3,12 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$  após a funcionalização com glutaraldeído, ou seja, uma diminuição de 99,17%, em função da inserção dos braços espaçadores.

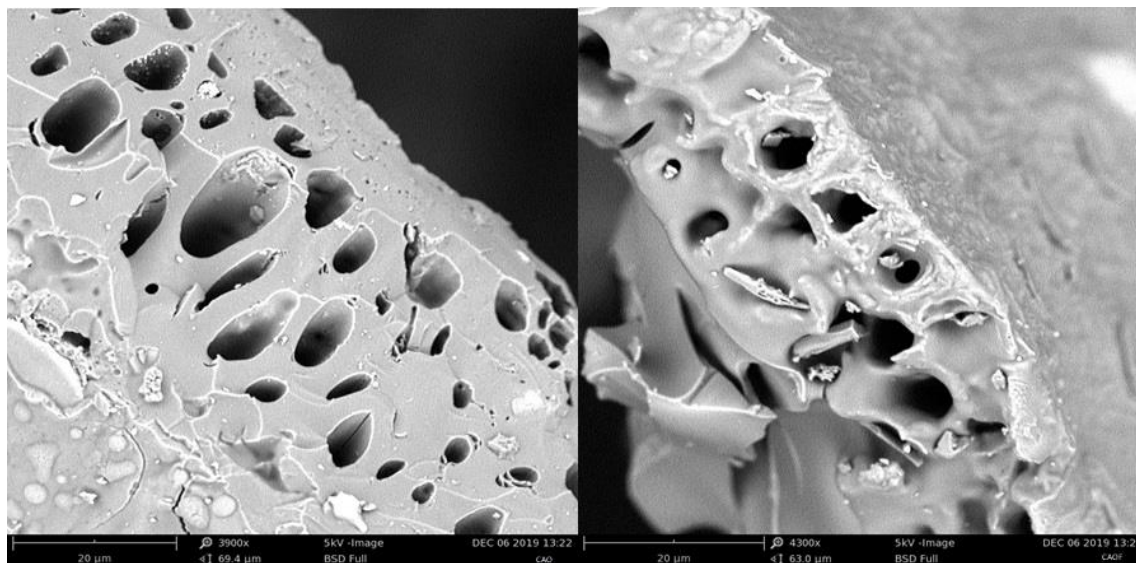
**Tabela 2.** Propriedades texturais dos suportes.

Amostra	Area superficial ( $\text{m}^2 \text{ g}^{-1}$ )	Diâmetro dos poros (nm) <sup>a</sup>	Volume de mesoporos ( $\text{cm}^3 \text{ g}^{-1}$ )	Volume de microporos ( $\text{cm}^3 \text{ g}^{-1}$ )
CAO	900	2,28	0,037	0,191
CAOF	3	2,32	0,001	0,000

<sup>a</sup>Máximo da distribuição de tamanho de poro.

A técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) foi utilizada para investigar a morfologia das superfícies dos suportes produzidos. Na Figura 5(a) é apresentada a imagem obtida para o carvão ativado, onde é possível observar uma estrutura superficial porosa, com a presença de poros de tamanhos diferentes, bem como a presença de canais (fendas), que provavelmente, estendem-se até a parte interna da matriz, que possivelmente irão contribuir para aumentar o acesso da molécula ao interior dos poros, aumentando assim a sua capacidade adsortiva (Small et al., 2012). A imagem do carvão funcionalizado (Figura 5(b)) por sua vez, apresenta uma superfície mais regular com uma quantidade de poros reduzida. A formação deste tipo de estrutura ocorreu em

função do processo de funcionalização que promoveu à obstrução poros pela inserção dos braços espaçadores de amino-aldeído e consequentemente a redução da área superficial como evidenciado nos resultados apresentados na Tabela 2.

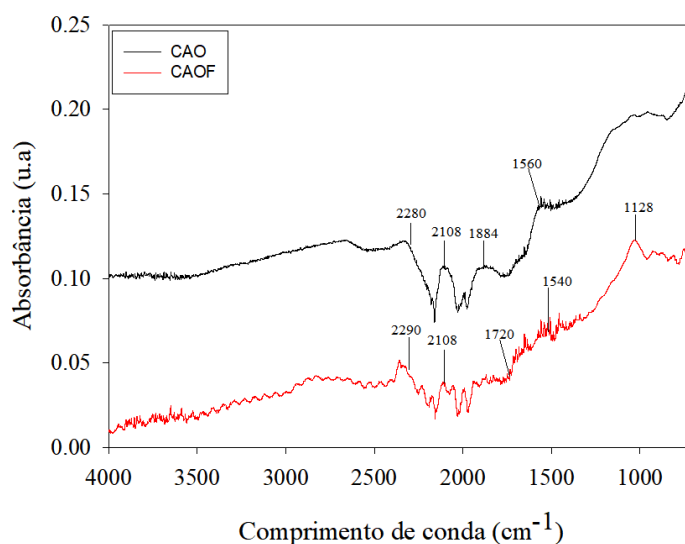


**Figura 5.** Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) do carvão ativado (CAO) (a) e do carvão funcionalizado (CAOF) (b).

Os espectros de FTIR do carvão ativado (CAO) e do carvão funcionalizado (CAOF) estão apresentados na Figura 6. As bandas observadas em  $1860\text{ cm}^{-1}$  e  $1560\text{ cm}^{-1}$ , referentes ao alongamento C=O e C=C, identificados em ambos espectros, são associadas a grupos funcionais característicos de materiais carbonáceos (Andrade et al., 2018). A banda localizada em  $1230\text{ cm}^{-1}$  é provavelmente causada pela incorporação do grupamento fosfato do agente ativante, uma vez que revela as vibrações do estiramento P=O (Pereira et al., 2014; Liu et al., 2018). Observa-se também, um pico pronunciado em  $2108\text{ cm}^{-1}$ , que pode ser atribuído ao estiramento do grupo carbono-oxigênio, derivados do grupo cetona, da estrutura do precursor lignocelulósico (Yakout e El-Deen, 2016). Ao avaliar o espectro do carvão funcionalizado, é possível identificar a presença de novos grupos funcionais na superfície desse material, com destaque para a banda de  $1720\text{ cm}^{-1}$ , referente as vibrações do grupo aldeído (C=O) e  $1128\text{ cm}^{-1}$ , que pode estar associado ao grupo amina (C-N) oriundos dos compostos utilizados no processo de funcionalização, evidenciando assim, as alterações químicas na superfície da matriz e confirmando a efetividade do processo (Ramani et al., 2012).

A carga superficial dos materiais porosos foi avaliada pela determinação do pH de ponto de carga zero ( $\text{pH}_{\text{pcz}}$ ). Ambas amostras apresentam caráter ácido com ponto de

carga zero em pH 4,2 e pH 4,7, para o carvão ativado e funcionalizado respectivamente, evidenciando assim predominância de grupos funcionais superficiais ácidos incorporados aos materiais em virtude da natureza do agente químico empregado na ativação. O diferente comportamento de ionização frente ao pH da solução, observado na amostra CAOF, pode ser atribuído ao processo de funcionalização que esse material foi submetido. A incorporação de grupos funcionais com um caráter básico, como por exemplo o grupo amina (C-N), identificados apenas no espectro desse carvão, pode ter promovido essa pequena elevação no  $pH_{pcz}$  da matriz. Este é um parâmetro importante, uma vez que permite prever a carga na superfície do suporte em função do pH e, desta forma, avaliar o efeito do pH da solução no processo de imobilização (Brito et al., 2017).



**Figura 6.** FTIR do carvão ativado (CAO) e do carvão funcionalizado (CAOF).

### 3.4 Aplicação do CAO e do CAFO na imobilização da lipase

Na Tabela 3 estão apresentados os dados da imobilização da lipase no carvão ativado e no carvão funcionalizado, pelo método de adsorção e ligação covalente respectivamente. Observa-se que o suporte CAO apresentou a capacidade e eficiência de imobilização um pouco superior ao CAOF, comportamento este que pode ser atribuído as características texturais do carvão, uma vez que no processo de imobilização por adsorção em materiais porosos a enzima pode ser adsorvida tanto na superfície externa quanto no interior dos poros do suporte, aumentando com isso a capacidade de imobilização da matriz (Gupta et al., 2013; Dhawane et al., 2018). É interessante destacar que apesar do carvão funcionalizado apresentar uma área superficial bastante reduzida, o



mesmo também apresentou uma boa capacidade de imobilização. Isso se deve ao fato de que nesse tipo de imobilização o número de ligações covalentes entre o suporte e a enzima irá depender entre outros fatores, da densidade dos grupos reativos por unidade de área do suporte e da reatividade dos grupos funcionais tanto da enzima quanto do suporte (Reichardt et al., 2018). Sabe-se que a ativação do carvão ativado com glutaraldeído cria grupos funcionais aldeídos que se ligam aos resíduos de aminoácidos da enzima, formando ligações covalentes. Com isso, a funcionalização aumenta a densidade de grupos funcionais na superfície de contato do COF, favorecendo assim a retenção de proteínas a matriz (Barbosa et al., 2013; Santos et al., 2019).

**Tabela 3.** Capacidade de imobilização ( $C_{Im}$ ), Atividade específica, Eficiência de imobilização ( $Efic_{Im}$ ) da lipase imobilizada carvão ativado (CAOI) e no carvão funcionalizado (CAOFI).

Amostra	$C_{Im}$ (mg/g)	Atividade específica (U/mg)	$Efic_{Im}$ (%)
CAOI	121,14 ± 0,05	0.144 ± 0,01	83.92 ± 0,26
CAOFI	113,97 ± 1,21	0.126 ± 0,05	79,00 ± 0,01

A maior atividade específica da enzima imobilizada por adsorção pode ser atribuída a forma como a mesma está ligada ao suporte, uma vez que as lipases, especificamente, apresentam aumento de atividade quando adsorvidas em suportes hidrofóbicos, devido a mudanças conformacionais que tornam seu sítio ativo acessível aos substratos (Mateo et al., 2007). Na presença de uma superfície hidrofóbica, essa enzima sofre uma ativação interfacial e o equilíbrio de suas formas é deslocado para a conformação aberta. Neste caso, a região do sítio ativo da enzima interage com o suporte por adsorção hidrofóbica, uma vez que o reconhece como similar aos seus substratos naturais. Assim, a lipase é imobilizada em sua conformação ativa (Mateo et al. 2007; Hanefeld et al., 2009). Como o processo de imobilização foi conduzido em pH 5,0, valor de pH próximo ao ponto isoelétrico da enzima (4,0-5,0) e do ponto de carga zero do carvão ativado ( $pH_{pcz}=4,2$ ), possivelmente tenha ocorrido uma forte interação hidrofóbica entre a lipase e a superfície de suporte favorecendo assim, o mecanismo de ativação interfacial da mesma. Já no processo de imobilização por ligação covalente, a força de ligação entre os grupos reativos da enzima e do suporte é forte e, normalmente, envolve

vários resíduos da enzima. Dessa forma, quando a enzima é ligada ao suporte, tende a sofrer alguma mudança na conformação, o que poderá afetar sua eficiência catalítica, reduzindo assim sua atividade, como evidenciado neste estudo (Erdemir e Yilmaz, 2009; Cipolatti et al., 2017).

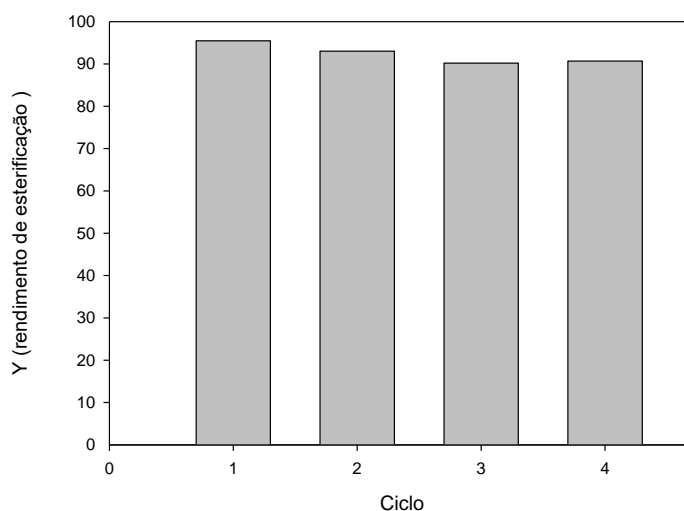
### 3.5 Reação de esterificação

Na Tabela 4 estão apresentados os resultados obtidos para a conversão de ácido acético em acetato de isoamila com um tempo de reação de 240 minutos e na temperatura de 40 °C, para a lipase imobilizada no carvão ativado e no carvão funcionalizado. Observa-se para ambos biocatalisadores conversões superiores a 80 %, sendo que o maior percentual foi obtido para a amostras CAOI, que possivelmente está relacionado à maior atividade específica e eficiência de imobilização neste suporte (Mateo et al. 2007). Como discutido anteriormente, a imobilização da lipase por ligação covalente, pode promover alterações na conformação da enzima, uma vez que o processo de interação enzima suporte é quase sempre aleatório, fazendo com que a região do sitio ativo se torne menos acessível ao substrato (impedimento estérico). Os rendimento de conversão, obtido principalmente no biocatalisador CAOI, são superiores aos reportados na literatura para esterificação em acetato de isoamila catalisado por lipase imobilizada em diferentes suportes, tais como os resultados apresentados por Padilha et al. (2018), que alcançaram o máximo rendimento de esterificação de 92% na síntese do aroma de banana catalisado por lipase de *Burkholderia* imobilizada em esferas de alginato e por Asmat et al. (2019) que obtiveram uma rendimento de conversão do éster de 75% catalisado pela lipase de *Candida rugosa* imobilizada em nanotubos de carbono funcionalizado com gluteraldeído.

**Tabela 4.** Conversão do ácido acético em acetato de isoamila (Y), catalisada pela lipase imobilizada em carvão ativado (CAOI) e carvão funcionalizado (CAOFI). As reações foram realizadas em hexano com razão molar do substrato de ácido acético: álcool isoamílico de 1:1, temperatura de 40 °C e 240 min de reação.

Parâmetro	Amostra	
	CAOI	CAOFI
Y (%)	95,46 ± 0,93	89,95 ± 0,10

A reutilização de catalisadores imobilizados é um parâmetro importante e que, em geral, determinam a viabilidade econômica de processos catalíticos. Neste sentido, foram avaliados os sucessivos ciclos de reuso da lipase imobilizada no carvão ativado por adsorção na reação de esterificação do acetato de isoamila, conforme mostrado na Figura 7. Os resultados evidenciam que o biocatalisador CAOI pode ser reutilizado pelo menos por quatro vezes consecutivas, considerando que os valores se mantiveram praticamente constantes. Este comportamento pode ser atribuído a forte adsorção da lipase na superfície do suporte, o que evitou uma possível dessorção da mesma pelos ciclos consecutivos. Vale ressaltar também, que a lavagem do biocatalisador com hexano, após cada ciclo, possivelmente pode ter contribuído para proporcionar uma maior retenção na atividade da enzima. Este solvente apolar promove a remoção da camada de produto formado em torno da enzima que provoca a perda da atividade e limita a difusão de substrato e produto. Além disso, remove quaisquer resíduos de substrato ou produtos que fluem para dentro do suporte poroso, que poderiam inativar ou inibir a atividade da lipase (Martins et al., 2011; Friedrich et al., 2013).



**Figura 7.** Ciclo de reutilização da lipase imobilizada carvão ativado (CAOI) para conversão de ácido acético na reação de esterificação do acetato de isoamila. As reações foram realizadas em hexano com razão molar do substrato de ácido acético: álcool isoamílico de 1:1, temperatura de 40 ° C e 240 min de reação.

#### 4. Conclusão

Os resultados obtidos a partir do DCCR mostram que a temperatura e o tempo de carbonização apresentaram efeito significativo no desenvolvimento da porosidade e aumento da área superficial do carvão ativado, sendo sintetizado um material com elevada  $S_{\text{BET}}$  ( $900 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ ) nas condições selecionadas. A funcionalização do carvão ativado, pelo método do glutaraldeído, propiciou a modificação da superfície do carvão ativado pela inserção de grupos amina-aldeído, confirmados através do FTIR, e observados também pela redução da porosidade e área superficial do material de origem, evidenciando assim a efetividade do processo. Os resultados parciais demonstraram que a enzima imobilizada foi aplicada com sucesso na síntese do éster acetato de isoamila, atingindo conversões molares em torno de 95% e 89% para biocatalisador CAOI e CAOFI, respectivamente. Os resultados obtidos de reuso da enzima imobilizada por adsorção mostram que o biocatalisador permaneceu ativo pelos 4 ciclos de reação avaliados, sem perda considerável de atividade. Com base nos resultados encontrados neste estudo verifica-se o potencial do carvão ativado produzido para ser utilizado como suporte na imobilização da lipase, tanto por adsorção física quanto por ligação covalente, uma vez que as reações catalisadas pelo biocatalisador obtido apresentaram elevada conversão para produção de aroma de banana, sem perda significativa de atividade.

## 5. Referências

- Almeida, L.C., Barbosa, A.S., Fricks, A.T., Freitas, L.S., Lima, Á.S., Soares, C.M.F., 2017. Use of conventional or non-conventional treatments of biochar for lipase immobilization. *Process Biochemistry* 61, 124-129.
- Andrade, S.N., Veloso, C.M., Fontan, R.C.I., Bonomo, R.C.F., Santos, L.S., Brito, M.J.P., Diniz, G.A., 2018. Chemical-activated carbon from coconut (*Cocos nucifera*) endocarp waste and its application in the adsorption of  $\beta$ -lactoglobulin protein. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 17, 441-453.
- Asmat, S., Anwer, A.H., Husain, Q. 2019. Immobilization of lipase onto novel constructed polydopamine grafted multiwalled carbon nanotube impregnated with magnetic cobalt and its application in synthesis of fruit flavours. *International Journal of Biological Macromolecules* 140, 484-495.
- Barbosa, O., Torres, R., Ortiz, C., Berenguer-Murcia, Á., Rodrigues, R.C., Fernandez-Lafuente, R., *Heterofunctional Supports in Enzyme Immobilization: From Traditional*

Immobilization Protocols to Opportunities in Tuning Enzyme Properties, *Biomacromolecules* 14 (2013) 2433-2462.

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

Brito, M.J.P., Veloso, C.M., Bonomo, R.C.F., Fontan, R.C.I., Santos, L.S., Monteiro, K.A., 2017. Activated carbons preparation from yellow mombin fruit stones for lipase immobilization. *Fuel Processing Technology* 156, 421-428.

Brito, M.J.P., Veloso, C.M., Santos, L.S., Bonomo, R.C.F., Fontan, R.C.I., 2018. Adsorption of the textile dye Dianix® royal blue CC onto carbons obtained from yellow mombin fruit stones and activated with KOH and H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>: kinetics, adsorption equilibrium and thermodynamic studies. *Powder Technology* 339, 334-343.

Chen, J.P. Production of ethyl butyrate using gel-entrapped *Candida cylindracea* lipase. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 82 (1996) 404-407.

Cipolatti, E.P., Manoel, E.A., Fernandez-Lafuente, R., Freire, D.M.G., 2017. Support engineering: relation between development of new supports for immobilization of lipases and their applications. *Biotechnology Research and Innovation* 1, 26-34.

Danish. M., Ahmad, T. 2018. A review on utilization of wood biomass as a sustainable precursor for activated carbon production and application. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 87, 1-21.

Dhawane, S.H., Kumar, T., Halder, G., 2016. Biodiesel synthesis from *Hevea brasiliensis* oil employing carbon supported heterogeneous catalyst: Optimization by Taguchi method. *Renew Energy* 89, 506-14.

Dhawane, S.H., Kumar, T., Halder, G., 2018. Process optimisation and parametric effects on synthesis of lipase immobilised carbonaceous catalyst for conversion of rubber seed oil to biodiesel. *Energy Conversion and Management* 176, 55-68.

Erdemir, S., Yilmaz, M. 2009. Synthesis of calix[n]arene-based silica polymers for lipase immobilization. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 58, 29-35.

Friedrich, J.L.R., Peña, F.P., Garcia-Galan, C. Fernandez-Lafuente, R., Ayub, M.A.Z., Rodrigues, R.C. 2013. Effect of immobilization protocol on optimal conditions of ethyl butyrate synthesis catalyzed by lipase B from *Candida Antarctica*. *Journal Chemical Technology Biotechnology* 88, 1089-1095.

- Gao, Z., Chu, J., Jiang, T., Xu, T., Wu, B., He, B., 2018. Lipase immobilization on functionalized mesoporous TiO<sub>2</sub>: Specific adsorption, hyperactivation and application in cinnamyl acetate synthesis. *Process Biochemistry* 64, 152-159.
- González-García, P. 2018. Activated carbon from lignocellulosics precursors: A review of the synthesis methods, characterization techniques and applications. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 82, 1393-1414.
- Gratuito, M.K.B., Panyathanmaporn, T., Chumnanklang, R.A., Sirinuntawittaya, N., Dutta, A., 2008. Production of activated carbon from coconut shell: Optimization using response surface methodology. *Bioresource Technology* 99, 4887-4895.
- Gupta, S., Bhattacharya, A., Murthy, C.N., 2013. Tune to immobilize lipases on polymer membranes: Techniques, factors and prospects *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 2, 171-190.
- Hanefeld, U., Gardossi, L., Magner, E. 2009. Understanding enzyme immobilization. *Chemical Society Reviews* 38, 453-468.
- IUPAC: União Internacional de Química Pura e Aplicada. Reporting Physisorption data for gas/solid systems 54, 2201-2218, 1982.
- Jagtoyen, M., Derbyshire, F., 1998. Activated carbons from yellow poplar and white oak by H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> activation. *Carbon* 36, 1085-1097.
- Jain, A., Tripathi, S.K., 2014. Fabrication and characterization of energy storing supercapacitor devices using coconut shell based activated charcoal electrode. *Materials Science and Engineering B* 183, 54-60.
- Kato, K., Nakagaki, S., Nishida, M., Hirao, K. 2011. Enzyme encapsulation in silica particles prepared using enzyme-assisted sol-gel reactions in ionic liquids. *J. Ceram. Soc.* 119, 140.
- Kumar, A., Jena, H.M., Preparation and characterization of high surface area activated carbon from Fox nut (*Euryale ferox*) shell by chemical activation with H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, *Results in Physics* 6 (2016) 651-658.
- Lima, R.N., Anjos, C.S., Orozco, E.V.M., Porto, A.L.M., 2019. Versatility of *Candida antarctica* lipase in the amide bond formation applied in organic synthesis and biotechnological processes. *Molecular Catalysis* 466, 75-105.
- Liu, X., He, C., Yu, X., Bai, Y., Ye, L., Wang, B., Zhang, L., 2018. Net-like porous activated carbon materials from shrimp shell by solution-processed carbonization and H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> activation for methylene blue adsorption. *Powder Technology* 326, 181-189.

Martins, A.B., Graebim, N.G., Lorenzoni, A.S.G., Fernandez-Lafuente, R., Ayub, M.A.Z.; Rodrigues, R.C. 2011. Rapid and high yields of synthesis of butyl acetate catalyzed by Novozym 435: Reaction optimization by response surface methodology. *Process Biochemistry* 46, 2311-2316.

Mateo, C., Palomo, J.M., Fernandez-Lorente, G., Guisan, J.M., Fernandez-Lafuente, R. 2007. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme and Microbial Technology* 40, 451-1463.

Muley, P.D., Henkel, C., Abdollahi, K.K., Marculescu, C., Boldor, D. 2016. A critical comparison of pyrolysis of cellulose, lignin, and pine sawdust using an induction heating reactor. *Energy Conversion and Management* 117, 273-280.

Nahil, M.A., Williams, P.T., 2012. Pore characteristics of activated carbons from the phosphoric acid chemical activation of cotton stalks. *Biomass and bioenergy* 37, 142-149.

Padilha, G.S., Tambourgi, E.B., Alegre, R.M. 2018. Evaluation of lipase from *Burkholderia cepacia* immobilized in alginate beads and application in the synthesis of banana flavor (isoamyl acetate). *Journal Chemical Engineering Communications* 205, 23-33.

Pandey, D., Daverey, A., Arunachalam, K., 2020. Biochar: Production, properties and emerging role as a support for enzyme immobilization. *Journal of Cleaner Production* 255, 120-267.

Paques, F.W., Macedo, G.A. 2006. Lipases de látex vegetais: propriedades e aplicações industriais, *Quimica Nova* 29, 93-99.

Pereira, R.G., Veloso, C.M., Da Silva, N.M., De Sousa, L.F., Bonomo, R.C.F., De Souza, A.O., Da Guarda, M.O., Fontan, R.D.C.I., 2014. Preparation of activated carbons from cocoa shells and siriguela seeds using  $H_3PO_4$  and  $ZnCl_2$  as activating agents for BSA and  $\alpha$ -lactalbumin adsorption. *Fuel Processing Technology* 126, 476-486.

Ramani, K., Lourdasamy, J.K., Vidya, C., Boopathy, R., Sekaran, G. 2010. Immobilization of acidic lipase derived from *Pseudomonas gessardii* onto mesoporous activated carbon for the hydrolysis of olive oil. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzimática* 62, 58-65.

Ramani, K., Karthikeyan, S., Boopathy, R., Kennedy, L., Mandal, A.B., Sekaran, G., 2012. Mesoporous activated carbon surface functionalized for the immobilization of lipase and its application acidic hydrolysis waste oil prepared: Isotherm and kinetic studies. *Process Biochemistry* 47, 435-445.

Rangabhashiyam, S., Balasubramanian, P., 2019. The potential of lignocellulosic biomass precursors for biochar production: Performance, mechanism and wastewater application - A review Rangabhashiyam. *Industrial Crops & Products* 128, 405-423.

Regalbuto, J.R., Robles, J., 2004. *The engineering of Pt/Carbon Catalyst Preparation*, University of Illinois, Chicago.

Reichardt, C., Utgenannt, S., Stahmann, K.P., Klepe, O., Barig, S. 2018. Highly stable adsorptive and covalent immobilization of *Thermomyces lanuginosus* lipase on tailor-made porous carbon material, *Biochemical Engineering Journal* 138, 63-67.

Sá, A.G.A., Meneses, A.C., Araújo, P.H.H., Oliveira, D., 2017. A review on enzymatic synthesis of aromatic esters used as flavor ingredients for food, cosmetics and pharmaceuticals industries. *Trends in Food Science & Technology* 69, 95-105.

Santos, M.P.F., Brito, M.J.P., Junior, E.C.S., Bonomo, R.C.F., Veloso, C.M. 2019. Pepsin immobilization on biochar by adsorption and covalent binding, and its application for hydrolysis of bovine casein, *Journal Chemical Technology Biotechnology* 94, 1982-1990.

Santos, M.P.F., Da Silva, J.F., Fontan, R.C.I.; Bonomo, R.C.F., Santos, L.S., Veloso, C.M. 2020. New insight about the relationship between the main characteristics of precursor materials and activated carbon properties using multivariate analysis. *Can. J. Chem. Eng.* 1–11.

Sarno, M., Iuliano, M., Iuliano, M., Ciambelli, P., 2017. High activity and selectivity immobilized lipase on Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles for banana flavor synthesis. *Process Biochemistry* 56, 98-108.

Sartova, K., Omurzak, E., Kambarova, G., Dzhumayev, I., Borkoev, B., Abdullaeva, V. 2019. Activated carbon obtained from the cotton processing wastes, *Diamond and Related Materials* 91, 90-97.

Selvaraju, G.; Kartini, N.; Bakar, A. 2017. Production of a new industrially viable green-activated carbon from *Artocarpus integer* fruit processing waste and evaluation of its chemical, morphological and adsorption properties. *Journal of Cleaner Production* 141, 989-999.

Silva, T.L., Ronix, A., Pezoti, O., Souza, L.S., Leandro, P.K.T., Bedin, K.C., Beltrame, K.K., Cazetta, A.L., Almeida, V.C., 2016. Mesoporous activated carbon from industrial laundry sewage sludge: Adsorption studies of reactive dye Remazol Brilliant Blue R. *Chemical Engineering Journal* 303, 467-476.



Soares, C.M.F., De Castro, H.F., De Moraes, F.F., Zanin, G.M., Characterization and utilization of *Candida rugosa* lipase immobilized on controlled pore silica, *Applied Biochemistry and Biotechnology* 79 (1999) 745-757.

Sulaiman, N.S.; Hashim, R., Amini, M.H.M., Danish, M., Sulaiman, O., 2018. Optimization of activated carbon preparation from cassava stem using response surface methodology on surface area and yield. *Journal of Cleaner Production* 198, 1422-1430.

Van Soest, P.J., Robertson, J.B., Lewis, B.A., 1991. Symposium: carbohydrate methodology, metabolism, and nutritional implications in dairy cattle. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science* 74, 3583-3597.

Veríssimo, L.A.A., Mol, P.C.G., Soares, W.C.L., Minim, V.P.R., Hespanhol, M.C., Minim, L.A. Development of a bioreactor based on lipase entrapped in a monolithic cryogel for esterification and interesterification reactions. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 17 (2018) 177-187.

Xu, J., Chen, G., Qu, H., Jiao, Y., Xie, J., Xing, G. 2014. Preparation and characterization of activated carbon from by chemical activation with  $H_3PO_4$ . *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 320, 674-680.

Yahya, M.A., Al-Qodah, Z., Ngah, C.W.Z., 2015. Agricultural bio-waste materials as potential sustainable precursors used for activated carbon production: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 46, 218-235.

Yakout, S.M., El-Deen, G.S., 2016. Characterization of activated carbon prepared by phosphoric acid activation of olive stones. *Arabian Journal of Chemistry* 9, 1155-1162.

### Considerações finais

---

Foram produzidos carvões ativados (CA) a partir de bainhas do palmito de pupunha e do bagaço do malte. Os resultados mostram que o desenvolvimento de porosidade e o aumento da área superficial dos carvões ativados estão diretamente relacionados à natureza do material precursor de carbono e ao mecanismo de ação do ácido fosfórico. Os CA produzidos nas melhores condições, para ambos resíduos, foram funcionalizados pelo método do glutaraldeído. Com isso, a lipase de pâncreas de porco (LPP) foi imobilizada pelo método de adsorção, nos carvões ativados, e pelo método da ligação covalente nos suportes funcionalizados. A funcionalização promoveu a modificação da superfície da matriz pela inserção de grupos amina-aldeído e também uma redução da porosidade e área superficial em relação ao carvão ativado. Os experimentos de imobilização foram conduzidos em batelada sob diferentes condições de pH e temperatura. De maneira geral, observou-se que os suportes apresentam características químicas e texturais que favoreceram o processo de imobilização da lipase, sendo que tanto os carvões ativados quanto os funcionalizados apresentaram capacidade adsortiva e atividade de específica superiores superior a  $100 \text{ mg.g}^{-1}$ . A enzima imobilizada foi testada com sucesso na síntese o éster acetato de isoamila em meio orgânico, atingindo em um curto intervalo de tempo conversões molares em torno de 90%, mantendo a atividade catalítica nos 5 ciclos de reutilização avaliados. Com base nos resultados encontrados neste estudo verifica-se o potencial dos carvões ativados e funcionalizados, para serem utilizados como suporte na imobilização da lipase, uma vez que as reações catalisadas pelos biocatalisadores obtidos apresentaram uma boa conversão para produção de aroma de banana, sem perda significativa de atividade, vindo a contribuir então, para que o uso efetivo dos processos enzimáticos possa a vir torna-se mais econômico e competitivo frente aos processos químicos utilizados atualmente na obtenção de ésteres de aroma.