



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

THAINÁ PEIXOTO DE OLIVEIRA

**INSERÇÃO DE PARTÍCULAS METÁLICAS EM CARVÃO ATIVADO
OBTIDO DO RESÍDUO DE SABUGO DE MILHO: APLICAÇÃO COMO
SUPORTE PARA IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE E SUA UTILIZAÇÃO NA
SÍNTESE DE AROMA**

ITAPETINGA – BAHIA

ABRIL/2021

THAINÁ PEIXOTO DE OLIVEIRA

**INSERÇÃO DE PARTÍCULAS METÁLICAS EM CARVÃO ATIVADO
OBTIDO DO RESÍDUO DE SABUGO DE MILHO: APLICAÇÃO COMO
SUPORTE PARA IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE E SUA UTILIZAÇÃO NA
SÍNTESE DE AROMA**

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

Área de Concentração: Engenharia de Alimentos.

Orientadora: DSc. Cristiane Martins Veloso

Co-orientadores: DSc. Renata Cristina Ferreira Bonomo

DSc. Rafael da Costa Ilhéu Fontan

ITAPETINGA – BAHIA

ABRIL/2021

662.62 Oliveira, Thainá Peixoto de.
O52i Inserção de partículas metálicas em carvão ativado obtido do resíduo de sabugo de milho: aplicação como suporte para imobilização de lipase e sua utilização na síntese de aroma. / Thainá Peixoto de Oliveira. – Itapetinga-BA: Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, 2021.

72 fl.

Dissertação 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 Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos. Sob a orientação da Prof^a. D. Sc. Cristiane Martins Veloso e coorientação dos Profs. D. Sc. Renata Cristina Ferreira Bonomo e D. Sc. Rafael da Costa Ilhéu Fontan.

1. Resíduos industriais – Reaproveitamento – Imobilização de enzimas. 2. Carvão ativado – Subproduto industrial – Atividade hidrolítica. 3. Sabugo de milho – Usos – Resíduo – Imobilização de lipase – Síntese de aroma. I. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - Programa de Pós-Graduação de Mestrado em Engenharia e Ciências de Alimentos, *Campus* de Itapetinga. II. Veloso, Cristiane Martins. III. Bonomo, Renata Cristina Ferreira. IV. Rafael da Costa Ilhéu. V. Título.

CDD(21): 662.62

Catálogo na Fonte:

Cláudia Aparecida de Souza – CRB 1014-5ª Região
Bibliotecária – UESB – Campus de Itapetinga-BA

Índice Sistemático para desdobramentos por Assunto:

1. Resíduos industriais
2. Imobilização de enzimas
3. Carvão ativado : Subproduto industrial
4. Sabugo de milho : Usos : Resíduo
5. Imobilização de lipase



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS

Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB
Recredenciada pelo Decreto Estadual
Nº 16.825, de 04.07.2016



Governo do
Estado da Bahia

Itapetinga-BA, 29 de março de 2021.

DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO

Título: INSERÇÃO DE PARTÍCULAS METÁLICAS EM CARVÃO ATIVADO OBTIDO DO RESÍDUO DE SABUGO DE MILHO: APLICAÇÃO COMO SUPORTE PARA IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE PARA UTILIZAÇÃO NA SÍNTESE DE AROMA.

Autor (a): THAINÁ PEIXOTO DE OLIVEIRA

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

Coorientador (a): Prof. Dr. Rafael da Costa Ilhéu Fontan

Prof.ª Dr.ª Renata Cristina Ferreira Bonomo

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

Prof.ª Dr.ª Mylena Junqueira Pinto Brito
Membro Externo – EMBASA

Prof.ª Dr.ª Daniela Battaglia Hirata
Membro Externo – UNIFAL

Prof.ª Dr.ª Cristiane Martins Veloso
Orientadora - UESB
Presidente da Banca

Itapetinga-BA, 29 de março de 2021.

*“É preciso força pra sonhar e perceber
Que a estrada vai além do que se vê.”*

*A Deus,
Aos meus pais,
A minha irmã,
Aos que amo,
Dedico!*

AGRADECIMENTOS

A Deus, a minha maior gratidão, por ser minha fortaleza em meio a todo o caos, por me dar saúde, paciência, serenidade e me permitir concluir mais um ciclo.

Aos meus pais, Dilton e Rosa, por todo apoio, essência, cuidado e amor, vocês são os melhores do mundo!

A minha irmã, Mikelle, gratidão por ser minha alegria diária, se fazendo presente mesmo que um pouquinho distante.

A Lucas, por ser minha calma, por toda ajuda, cuidado e todo amor. Obrigada por ser companhia e alegria no dia-a-dia.

A Cristiane, por toda orientação ao longo desses anos e por ser um exemplo que contribuiu para meu crescimento pessoal e profissional.

Aos meus amigos, que acreditam, torcem por mim e comemoram cada conquista minha como se fosse deles.

Obrigada aos professores e membros do LEP, por acolher como uma família, compartilhar conhecimento e por toda ajuda. Em especial a Mateus, por todo suporte dado, conversas e risadas.

A Mylena, por estar disponível sempre, por todo auxílio e apoio. Te admiro demais, Mi!

A UESB e aos professores do Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos pelos ensinamentos.

À CAPES pelo financiamento da bolsa e por apoiar a pesquisa e o desenvolvimento científico no país.

Ao Grupo de Estudos em Leite pelas análises de FTIR, ao CETENE pelas análises de área e ao LabMic do Instituto de Física – UFG pelas análises de MEV e EDS.

A todos aqueles que contribuíram direta e indiretamente para essa conquista.

De coração, o meu muito obrigada!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE TABELAS	12
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	13
RESUMO	14
ABSTRACT.....	15
1. INTRODUÇÃO	16
2. OBJETIVOS	19
2.1 Objetivo geral.....	19
2.2 Objetivos específicos.....	19
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
3.1 Biomassa lignocelulósica	20
3.1.1 Composição lignocelulósica.....	20
3.1.2 Sabugo de milho.....	22
3.2 Carvão ativado	23
3.3 Enzimas	25
3.3.1 Lipase	26
3.3.2 Imobilização de enzimas	27
3.3.2.1 Imobilização de lipase por adsorção e ligação covalente	28
3.3.2.2 Suportes magnéticos para a imobilização de enzimas.....	30
3.4 Aplicação da lipase na obtenção de aromas	30
4. MATERIAIS E MÉTODOS	33
4.1 Materiais.....	33
4.2 Síntese do carvão ativado	33
4.2.1 Preparo do material precursor	33
4.2.2 Caracterização do material precursor	33
4.2.3 Síntese do carvão ativado por ativação química	34
4.2.4 Rendimento do processo de síntese e teor de cinzas do CASM.....	34
4.3 Incorporação de partículas metálicas no carvão ativado (CASM) - Metalização	34
4.4 Caracterizações dos carvões ativados obtidos (CASM e CASMF).....	35
4.4.1 Caracterização química dos suportes, medida de porosidade e área superficial específica do CASM e CASMF	35
4.5 Ensaios de imobilização da lipase e determinação da atividade hidrolítica	36

4.5.1	Influência do pH no processo de imobilização	37
4.5.2	Caracterização dos derivados por FTIR e MEV	37
4.5.3	Determinação da atividade hidrolítica.....	37
4.5.3.1	Influência do pH do meio na atividade hidrolítica da lipase	38
4.5.3.2	Influência da temperatura do meio na atividade hidrolítica da lipase	38
4.6	Reação de esterificação	38
4.6.1	Estabilidade operacional do biocatalisador	39
4.7	Análise Estatística	39
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
5.1	Caracterização do precursor de carbono	40
5.2	Rendimento do processo de síntese e caracterizações dos carvões ativados (CASM e CASMF).....	41
5.2.1	Espectrofotometria de absorção no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) .	42
5.2.2	Difratogramas de raios-X (DRX)	43
5.2.3	Ponto de carga zero dos carvões ativados (CASM e CASMF)	44
5.2.4	Medida de porosidade e área superficial específica	44
5.2.5	MEV e EDS dos carvões CASM e CASMF	46
5.3	Imobilização de lipase e Atividade hidrolítica da enzima.....	47
5.3.1	Influência do pH inicial da solução no processo de imobilização.....	47
5.3.1.1	Espectrofotometria de absorção no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) dos derivados.....	49
5.3.1.2	Caracterização dos derivados por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e por EDS	49
5.3.2	Influência do pH e da temperatura do meio reacional na atividade hidrolítica da lipase livre e dos derivados.....	50
5.4	Síntese do acetato de isoamila catalisada pelos biocatalisadores derivados	53
6.	CONCLUSÃO	56
7.	REFERÊNCIAS	57

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Arranjo da parede celular vegetal e seu complexo lignocelulósico	21
Figura 2. Plantio de milho (<i>Zea mays</i> L.)	22
Figura 3. Sabugo de Milho	23
Figura 4. Mecanismo de ativação interfacial de lipases em suportes hidrofóbicos.....	29
Figura 5. Esquema da reação de esterificação entre ácido carboxílico e álcool.....	31
Figura 6. Processo de elaboração do carvão metálico: (1) mistura do carvão com meio aquoso; (2) adição da solução de Fe^{2+} e Fe^{3+} na solução 1; (3) adição de NaOH completando o processo de formação da magnetita (Fe_3O_4).....	35
Figura 7. Curvas de TG e DTA do material precursor.	41
Figura 8. Espectros obtidos por FTIR para o RSM, CASM e CASMF.	42
Figura 9. Padrões de DRX das amostras CASM e CASMF.	43
Figura 10. Isotermas de adsorção/dessorção de nitrogênio (N_2) e distribuição de tamanho de poros obtida para o CASM (a e b) e para o CASMF (c e d).....	45
Figura 11. Microscopia Eletrônica de Varredura e espectros EDS dos suportes CASM (A) e CASMF (B).....	47
Figura 12. Avaliação do efeito do pH na capacidade adsortiva da lipase nos carvões ativados e comparação entre os suportes CASM e CASMF. Médias seguidas pela mesma letra mostra que os suportes não diferem significativamente entre si, para cada pH estudado a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.....	48
Figura 13. Espectros obtidos por FTIR para os derivados CASM-LPP e CASMF-LPP.	49
Figura 14. MEV e espectros EDS da lipase imobilizada nos suportes CASM-LPP (A) e CASMF-LPP (B).....	50

Figura 15. Avaliação do efeito do pH na determinação da atividade hidrolítica da lipase livre e dos derivados CASM-LPP e CASMF-LPP e comparação entre a enzima livre e o efeito dos suportes. Médias seguidas pela mesma letra para cada valor de pH não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey..... 52

Figura 16. Avaliação do efeito da temperatura na determinação da atividade hidrolítica da lipase livre e imobilizada em CASM-LPP e CASMF-LPP e comparação entre a enzima livre e o efeito dos suportes. Médias seguidas pela mesma letra para cada valor de pH não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. 52

Figura 17. Ciclo de reutilização da lipase imobilizada em carvão ativado (CASM e CASMF) na reação de esterificação do acetato de isoamila. Médias seguidas pela mesma letra, em cada ciclo estudado, mostra que as médias não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. 54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Caracterização química do sabugo de milho utilizada nesse trabalho..... 40

Tabela 2. Propriedades texturais do CASM e CASMF. 46

Tabela 3. Conversão do ácido acético em acetato de isoamila (Y%) catalisada pela lipase imobilizada em carvões ativados (CASM e CASMF). 54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CASM	Carvão ativado obtido do sabugo de milho
CASM-LPP	Lipase imobilizada em carvão ativado obtido do sabugo de milho
CASMF	Carvão ativado metalizado
CASMF-LPP	Lipase imobilizada em carvão ativado metalizado
D_p	Diâmetro médio de poros
DRX	Difratograma de raios-X
DTA	Análise térmica diferencial
EDS	Espectroscopia de raios-X por dispersão em energia
Fe^{2+}	Ferro bivalente
Fe^{3+}	Ferro trivalente
FTIR	Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier
LPP	Lipase de pâncreas de porco
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
pH_{PCZ}	pH do ponto de carga zero
RSM	Resíduo de sabugo de milho
S_g	Área superficial BET
TGA	Termogravimetria
V_{mes}	Volume de mesoporos
V_{mic}	Volume de microporos
V_{total}	Volume total de poros

RESUMO

OLIVEIRA, T. P. **Inserção de partículas metálicas em carvão ativado obtido do resíduo de sabugo de milho: aplicação como suporte para imobilização de lipase e sua utilização na síntese de aroma.** Itapetinga, BA: UESB, 2021. 72 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos, Área de Concentração: Engenharia de Alimentos). *

O aproveitamento dos resíduos agroindustriais (biomassa residual) surge com alternativa para evitar o descarte inadequado e agregar valor a biomassa. Isso é possível devido ao teor de celulose, lignina e hemicelulose presente em sua composição, que a partir de modificações bioquímicas, termoquímicas ou físicas na sua estrutura dão origem a subprodutos, como o carvão ativado, o qual possui uma versatilidade de aplicações industriais. Dentre elas, o mesmo pode ser utilizado como suporte para imobilização de enzimas, possibilitando que os biocatalisadores se tornem mais estáveis e tenham sua atividade otimizada, melhorando assim seu desempenho nas reações as quais são destinadas. Dessa maneira, este trabalho teve como objetivo utilizar resíduo de sabugo de milho para sintetizar carvão ativado através do método de ativação química (CASM), utilizando como agente ativante o ácido fosfórico. Posterior a síntese, uma reação de coprecipitação do Fe^{2+} e Fe^{3+} promoveu a inserção das partículas metálicas na superfície do suporte (CASMF) e os carvões ativados obtidos foram empregados na imobilização de lipase. Tais suportes apresentaram estrutura mesoporosa e o CASM apresentou uma área superficial BET de $1135 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$, característica de suportes provenientes de material precursor com alto teor de celulose, a qual foi reduzida no CASMF devido a inserção das partículas metálicas ($760 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$). Para determinar as melhores condições de imobilização e atividade hidrolítica da lipase foi avaliado o efeito do pH do meio de imobilização. A inserção de partículas metálicas no carvão ativado elevou a eficiência do processo, visto que o CASMF apresentou uma capacidade adsorptiva da lipase ligeiramente superior ao do CASM ($280,72 \pm 0,27 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ e $276,46 \pm 0,03 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, respectivamente). Ao variar o pH e temperatura do meio reacional a lipase imobilizada apresentou maior estabilidade e um aumento significativo na sua atividade, confirmando a vantagem associada ao método, sendo a eficiência ainda maior no CASMF, que alcançou nas melhores condições do meio (pH 7,0 a $30 \text{ }^\circ\text{C}$) atividade correspondente a $84,0 \pm 2,12 \text{ U}$, comparado a $72,3 \pm 1,7 \text{ U}$ para o CASM e $31,4 \pm 1,9 \text{ U}$ para a enzima livre. Investigando-se o potencial de aplicação dos derivados na síntese do éster acetato de isoamila, ambos os suportes levaram a conversão superior a 90% e estabilidade durante os 5 ciclos de reutilização.

Palavras-chaves: Imobilização; Metalização do suporte; Atividade hidrolítica.

ABSTRACT

OLIVEIRA, T. P. **Insertion of metallic particles in activated carbon obtained from corn cob residue: application as a support for lipase immobilization and its use in aroma synthesis.** Itapetinga, BA: UESB, 2021. 72 p. Dissertation (MSc. in Food Engineering and Food Science, Area of Concentration: Food Engineering). *

The use of agro-industrial waste (residual biomass) appears as an alternative to avoid defective disposal and add value to biomass. This is possible due to the content of cellulose, lignin and hemicellulose present in its composition, which from biochemical, thermochemical or physical changes in the structure give rise to by-products, such as activated carbon that has a versatility for industrial applications. Among them, the same can be used as a support for enzyme immobilization, allowing the biocatalysts to become more stable and have their activity optimized, thus improving their performance in the reactions to which they are destined. Thus, this work aimed to use corn cob residue to synthesize activated carbon through the chemical activation method (CASMF), using phosphoric acid as an activating agent. After synthesis, a co-precipitation reaction of Fe^{2+} and Fe^{3+} promoted the insertion of metallic particles on the support surface (CASMF) and the activated carbons obtained were employed in lipase immobilization. Such supports had a mesoporous structure and CASMF presented BET surface area of $1135 \text{ m}^2\cdot\text{g}^{-1}$, characteristic of supports from precursor material with a high cellulose content, which was reduced in CASMF due to the insertion of metallic particles ($760 \text{ m}^2\cdot\text{g}^{-1}$). To determine the best conditions of immobilization and hydrolytic activity of the lipase, the effect of the pH of the immobilization medium was evaluated. The insertion of metallic particles in activated carbon increased the efficiency of the process, since CASMF presented a slightly higher lipase absorptive capacity than CASM ($280.72 \pm 0.27 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ and $276.46 \pm 0.03 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$, respectively). By varying the pH and temperature of the reaction medium, the immobilized lipase showed greater stability and a significant increase in its activity, confirming the advantage associated with the method, with an even greater efficiency in CASMF, which it achieved under the best conditions of the medium (pH 7, 0 to $30 \text{ }^\circ\text{C}$) activity corresponding to $84.0 \pm 2.12 \text{ U}$, compared to $72.3 \pm 1.7 \text{ U}$ for CASM and $31.4 \pm 1.9 \text{ U}$ for free enzyme. Investigating the application potential of the derivatives in the synthesis of the isoamyl acetate ester, both supports led to a conversion greater than 90% and stability during the 5 cycles of reuse.

Keywords: Immobilization; Support metallization; Hydrolytic activity.

1. INTRODUÇÃO

Existe, atualmente, uma demanda mundial sobre os sistemas de produção de alimentos e agricultura. Assim, o aumento da produtividade nesses setores vem acompanhado pela geração de resíduos agroindustriais, o que representa no Brasil uma quantidade expressiva de cerca de 1 bilhão de toneladas de biomassa residual passível de ser alcançada até 2030 (MORAES et al., 2017; ARUN et al., 2020).

O milho (*Zea mays L.*) se destaca por ser uma das principais culturas agrícolas cultivadas no mundo e contribui com 39% da produção mundial de grãos (LOUIS e VENKATACHALAM, 2020). O Brasil é o terceiro maior produtor desse cereal e um dos principais exportadores (CONAB, 2019), que é bastante explorado em diversos setores, desde a produção de ração animal, como na indústria de alimentos e bebidas, farmacêutica e também na produção de álcool combustível. Após os grãos serem destinados ao processamento, o sabugo de milho torna-se um subproduto de baixo valor agregado, que o leva a ser descartado como resíduo (SAMANTA et al., 2012; SOLOGUREN; 2015).

Nas agroindústrias os resíduos gerados abrangem, majoritariamente, os materiais lignocelulósicos (celulose, hemicelulose e lignina), que são as fontes renováveis mais abundantemente encontradas na natureza. Geralmente, após o processamento da matéria-prima, esses materiais são direcionados para decomposição natural ou então queimados, visto que a coleta e reciclagem ou reutilização envolvem um investimento financeiro elevado para algumas agroindústrias, e isso acaba provocando significativos problemas ambientais (CASTRO e PEREIRA JR., 2010; SARAIVA et al., 2018).

Em razão disso, o aproveitamento da biomassa residual surge como alternativa para agregar valor e minimizar os danos ocasionados pelo descarte inadequado. Assim, métodos de conversão físicos, biológicos, químicos ou térmicos são capazes de modificar a estrutura desses materiais residuais dando origem a produtos sólidos, líquidos ou gasosos, como biocombustíveis e biocarvões (BISWAS et al., 2017).

O carvão ativado, derivado dos biocarvões, é originado a partir da carbonização e ativação da matéria orgânica, cujas propriedades características e qualidade do suporte depende diretamente do precursor utilizado, bem como dos agentes ativantes, tempo, condições de impregnação, temperatura de carbonização, entre outros (YAHYA et al., 2015; DHAWANE, KUMAR e HALDER, 2018). Por possuir elevados valores de área superficial BET e porosidade, apresentar capacidade adsortiva, estabilidade térmica e

química, resistência mecânica e ao ataque microbiano e facilidade de regeneração (MISTAR et al., 2020), o carvão ativado mostra-se um suporte promissor para a imobilização de enzimas (SANTOS et al. 2019; ASLAN, SHARIF e SAHIN, 2020; PINTO BRITO et al., 2020; SOUZA JUNIOR et al., 2020).

Partículas metálicas também são utilizadas para imobilização enzimática, por possuírem capacidade de adsorção e permitir a separação de forma eficiente (YU et al., 2020). Entretanto, a forte atração dipolo-dipolo magnética tende a fazer com que as partículas se agreguem em líquidos, tornando essa fixação direta ineficiente. Assim, a ligação dessas partículas a materiais, como o carvão ativado, tende a produzir um suporte ideal para a imobilização de enzimas, proporcionando uma alta afinidade por proteínas e facilitando a separação e reutilização da enzima, através do campo magnético externo que pode ser formado (MAGRO et al., 2019).

Dentre as enzimas que mais movimentam o mercado mundial encontram-se as lipases (EC 3.1.1.3), as quais estão disseminadas entre plantas, animais e microrganismos, fazendo com que haja uma variedade de propriedades enzimáticas, como estabilidade, especificidade, pH e temperatura ótimas e conseqüentemente, uma diversidade de aplicações, que permite seu emprego tanto na indústria de alimentos, como na farmacêutica, cosmética e no tratamento de águas residuárias (YU et al., 2020).

Sob condições controladas, as lipases são capazes de catalisar um grande número de reações, sendo um dos biocatalisadores mais utilizados nas esterificações por via enzimática, devido a sua capacidade de realizar reações de síntese em meios não aquosos e reconhecer uma ampla variedade de substratos (RAHMAN et al., 2011).

Desse modo, o uso da lipase na sua forma imobilizada para síntese de ésteres surge como uma alternativa “verde” à síntese química, apresentando vantagens, como condições de reação moderadas, baixa necessidade de energia, alta seletividade e especificação (KHAN e RATHOD, 2015; ESFANDMAZ et al., 2018), sendo capaz de suprir o interesse despertado por compostos aromáticos produzidos biotecnologicamente, que aumentou nas últimas décadas, uma vez que essa abordagem é considerada uma forma sustentável de fornecer aditivos naturais para a indústria alimentícia (PAULINO et al., 2021). Assim, a proposta de se utilizar carvão ativado como suporte para imobilizar lipase mostra-se promissora para ser destinada posteriormente a síntese de aromas, como apresentado por Brito et al. (2020). Diante dessa demanda, o presente trabalho teve como objetivo principal avaliar o efeito da incorporação de partículas metálicas no carvão ativado, obtido a partir do sabugo de milho, na imobilização de lipase, visando garantir

melhoria da atividade enzimática da enzima imobilizada, para posterior aplicação dos derivados na síntese do éster acetato de isoamila (aroma de banana).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito da incorporação de partículas de ferro em carvão ativado, sintetizado a partir do resíduo do sabugo de milho, na eficiência de imobilização da lipase para aplicação na síntese de éster.

2.2 Objetivos específicos

- Síntese de carvão ativado pelo método de ativação química, utilizando como agente ativante o ácido fosfórico e como precursor de carbono resíduo de sabugo de milho;
- Incorporação de partículas de ferro no carvão ativado obtido;
- Caracterização dos carvões produzidos;
- Avaliar o efeito do pH do meio na imobilização de lipase utilizando os suportes obtidos;
- Avaliar o efeito do pH e a temperatura do meio reacional na determinação da atividade hidrolítica da lipase imobilizada nos suportes sintetizados;
- Utilização dos derivados na reação de esterificação para síntese do éster acetato de isoamila (aroma de banana).

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Biomassa lignocelulósica

Indústrias de processamento de alimentos, madeira, couro, álcool e açúcar, fibras, etc., geram além dos produtos, biomassa residual, que acabam se tornando, muitas vezes, um problema ambiental, visto que, se não forem tratados ou reaproveitados, acabam sendo descartados no meio ambiente tornando-se, assim, possíveis contaminantes dos solos e recursos hídricos (VIANA e CRUZ, 2016).

A utilização da biomassa com a finalidade de aproveitamento surge com o intuito de agregar valor econômico a esses materiais e minimizar a poluição causada pelo descarte inadequado. Tal perspectiva de aplicação é decorrente dos constituintes químicos e das propriedades físicas características da matéria-prima, principalmente quanto ao teor de lignina, celulose e hemicelulose que apresentam, os quais podem variar de acordo com a origem da biomassa (FURLAN et al., 2018).

Diversos métodos de modificação bioquímica (digestão anaeróbica), termoquímica (pirólise, combustão, gaseificação, liquefação) ou processos físicos são propostos para agregar valor a biomassa (FERMANELLI et al., 2020). Dentre eles a pirólise se destaca como uma das tecnologias mais promissoras, podendo transformar a biomassa em bio-óleo, biocarvão ou até mesmo gás, sendo que tais produtos podem ser aplicados como combustíveis, adsorventes/catalisadores e fonte de energia, respectivamente (DAI et al., 2019; LI et al., 2020).

3.1.1 Composição lignocelulósica

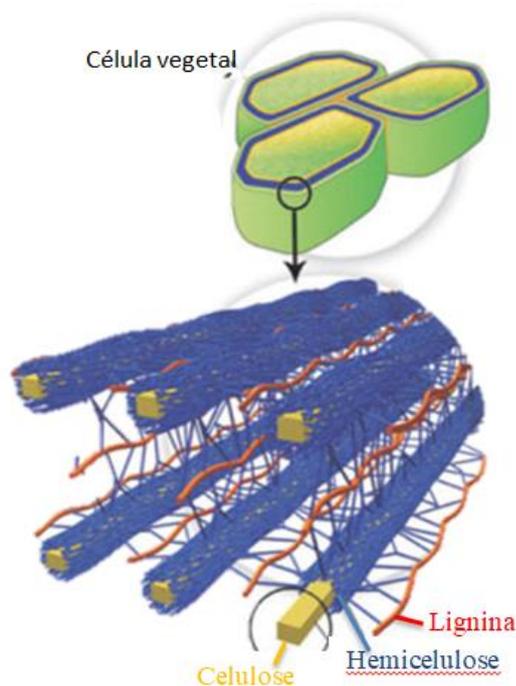
O interesse despertado no uso de materiais lignocelulósicos, compostos basicamente por frações poliméricas de celulose, hemicelulose e lignina, unidas entre si por ligações covalentes (Figura 1), advêm do fato de se conseguir agregar valor econômico a esses materiais quando submetidos a processos físicos, químicos ou biológicos (DIONIZIO et al., 2019). A composição das frações lignocelulósicas varia de acordo com a espécie de onde a biomassa é proveniente. De forma geral, a celulose encontra-se em maiores proporções, seguida da hemicelulose e, por fim, da lignina (CASTRO e PEREIRA JR., 2010).

Os resíduos agroindustriais são matérias-primas que se destacam por ser uma das principais fontes lignocelulósicas existentes. Os substratos potenciais são aqueles

provenientes, por exemplo, da colheita de cana-de-açúcar, milho, trigo e arroz após serem destinados a produção e se tornarem um subproduto residual (KUCHARSKA et al., 2020). Devido a sua capacidade de adaptação a variadas condições edafoclimáticas, o milho tem sido uma das culturas mais produzidas mundialmente e o seu sabugo é um dos resíduos gerados após processamento dos grãos, tendo na sua composição 32,3-45,6% de celulose, 39,8% de hemicelulose e 6,7-13,9% de lignina (ARUMUGAM et al., 2020).

A celulose é o composto orgânico mais abundante da natureza, sendo um polímero de cadeia longa e linear, insolúvel em água, formado por monômeros de glicose unidos por ligações glicosídicas do tipo β -1,4 (TONG et al., 2013). As hemiceluloses são macromoléculas ramificadas, que representam de 15,0 a 35,0% da biomassa vegetal, sendo uma classe heterogênea de polímeros que podem conter pentoses, hexoses e/ou ácidos urônicos (GÍRIO et al., 2010). A lignina se associa com a celulose e hemicelulose com o intuito de protegê-las contra agentes externos, assim é uma estrutura complexa formada pela polimerização de três diferentes monômeros: álcool cumárico, álcool coniferílico e álcool sinapílico, que diferem um do outro por possuírem diferentes substituintes em seu anel aromático (PEREIRA JR. et al., 2008).

Figura 1. Arranjo da parede celular vegetal e seu complexo lignocelulósico



Fonte: SANTOS et al. (2012)

3.1.2 Sabugo de milho

O milho (*Zea mays* L.) (Figura 2) é cultivado desde os tempos mais remotos e ocupa hoje a posição de um dos cereais mais produzidos e mais consumidos do mundo. Existe no mercado uma variedade de cultivares, com índices de produtividade e adaptação influenciados pelas condições edafoclimáticas e a sua utilização é bastante ampla, sendo empregado tanto para a alimentação, como também para o uso industrial e energético (FERREIRA e ARAUJO, 2012).

Figura 2. Plantio de milho (*Zea mays* L.)



Fonte: Valente (2018)

O maior produtor mundial de milho é os Estados Unidos, com uma produção estimada de 352,4 milhões de toneladas na safra 2019/20, seguido pela China e o Brasil, o qual ocupa a terceira maior produção do mundo com um cultivo estimado de 101 milhões de toneladas na safra 2019/20 (CONAB, 2019). No Brasil esse cultivo abrange todas as regiões do país, com a maior produção concentrada na região Centro-Sul. Na região Nordeste, a Bahia é o estado responsável pela maior produção, estimada em 1,897 milhões de toneladas na safra 2019/20 (CONAB, 2020).

A plantação de milho se destina, principalmente, à produção de ração para uso animal, no entanto ele também pode ser utilizado de outras diversas formas, desde o consumo direto, como também direcionado a aplicação industrial, dando origem a biocombustível (etanol) e principalmente na indústria de alimentos, na produção de fubás, farinhas, pipoca, canjicas, óleos, xarope de glucose, maltodextrinas, corantes caramelo, entre outros (SOLOGUREN, 2015).

Dentre as partes que compõe a planta do milho encontra-se o sabugo (Figura 3), que possui formato cilíndrico e é onde encontram-se fixados em fileiras os grãos do cereal, formando assim a espiga (RITCHIE, HANWAY e BENSON, 2003). Após os grãos de milho serem destinados ao processamento, o sabugo acaba tornando-se um subproduto residual, sendo geralmente destinado a cobertura do solo ou então descartados de forma inadequada no meio ambiente (DUAN et al., 2019; SURRA et al., 2019).

Segundo Zhang et al. (2012) para 1 kg de grãos de milho secos, cerca de 150 g de sabugo são gerados, dessa forma, visando o aproveitamento da biomassa residual, o sabugo pode sofrer modificações termoquímicas em suas frações lignocelulósicas, sendo destinado a biorrefinarias para dar a origem a biocombustíveis (LUQUE et al., 2016; BISWAS et al., 2017; KLAAS et al., 2020), pode passar por tratamentos bioquímicos para a produção de xilitol (BAPTISTA et al., 2020; DU et al., 2020) e pode também ser empregado como material precursor para produção de carvão ativado (DUAN et al., 2019; JAWAD et al., 2020).

Figura 3. Sabugo de Milho



Fonte: MFRURAL (2018?)

3.2 Carvão ativado

O carvão ativado é um material carbonáceo poroso, que pode ser produzido a partir de um precursor natural ou sintético. Os precursores naturais englobam, principalmente, as biomassas lignocelulósicas (resíduos agroindustriais), que são empregados na síntese de carvões ativados devido a sua grande disponibilidade e baixo custo, permitindo assim minimizar impactos ambientais, causados pelo descarte inadequado, e agregar valor ao material (GIRELLI, ASTOLFI e SCUTO, 2020).

A síntese do carvão ativado a partir de biomassa lignocelulósica envolve duas etapas principais: carbonização e ativação (física ou química). Durante a carbonização a

substância orgânica é decomposta e os compostos voláteis são removidos, sendo este processo influenciado pelas condições de síntese empregadas: temperatura, taxa de aquecimento, pressão, atmosfera e propriedades da matéria-prima. Já o processo de ativação é responsável por desenvolver a estrutura dos poros do carvão, sendo que na ativação física, a matéria-prima é primeiro pirolisada utilizando atmosfera inerte a uma temperatura acima de 400 °C, seguida de ativação com gases como vapor d'água ou dióxido de carbono a uma temperatura acima de 600 °C. Na ativação química, a matéria-prima é impregnada com agentes ativantes (ácidos, bases ou sais), seguidos por um tratamento térmico, com temperaturas entre 400 °C a 900 °C. Neste processo a carbonização e a ativação são realizadas simultaneamente. Esse método garante, na maioria das vezes, um maior rendimento de carbono e estrutura de poros mais desenvolvida (ABBAS e DARWEESH, 2016; KWIATKOWSKI e BRONIEK, 2017).

A estrutura física do carvão ativado é caracterizada por uma elevada área superficial BET (80 – 1500 m²g⁻¹), com distribuição de poros que podem variar na faixa de microporos (<2 nm), mesoporos (2 nm – 50 nm) e macroporos (>50 nm). Além disso o mesmo apresenta uma resistência térmica, química e mecânica (IUPAC, 1982; DUJEARIC-STEPHANE et al., 2020).

Muitas vezes, a superfície do carvão ativado também pode ser modificada por processos químicos, físicos ou térmicos, a fim de melhorar a capacidade de adsorção, promovendo uma melhor afinidade do suporte com o composto de interesse a ser retido (KAHOUSH et al., 2019). As modificações podem levar, a depender do método empregado, a inserção de grupos funcionais ou até mesmo uma redução dos mesmos, como também pode haver redução/aumento da porosidade e uma modificação da estrutura cristalina (RIVERA-UTRILLA et al., 2011).

Devido a suas características, o carvão ativado pode ser aplicado em processos de clarificação, desodorização e purificação de líquidos ou gases, pois o interior dos seus poros permite que ele atue como adsorvente, retendo de forma seletiva impurezas que tais fluidos podem conter. Assim, o uso mais comum do carvão ativado pelas indústrias alimentícias, químicas e farmacêuticas é em filtros para adsorção de gases e no tratamento de águas resultantes dos processos industriais (RAHMAN et al., 2020).

O carvão ativado também vem sendo empregado como suporte para imobilização de enzimas, visto que a sua porosidade permite fixar o biocatalisador, formando um espaço que aprisiona a enzima e restringe o seu movimento, mantendo assim sua estabilidade e atividade, facilitando sua recuperação e reutilização em processos

industriais. Superando assim as desvantagens associadas à utilização da enzima na sua forma livre, como custo de obtenção, instabilidade e dificuldade de reutilização (DALLAVECHIA et al., 2004; CORTEZ, CASTRO e ANDRADE, 2017; SANTOS et al., 2019; PINTO BRITO et al. 2020; SOUZA JUNIOR et al., 2020).

3.3 Enzimas

Enzimas são proteínas com atividade biológica capazes de catalisar reações bioquímicas em diferentes organismos de forma altamente específica, sendo responsáveis por processos vitais e mediar funções de síntese, rotatividade, sinalização e metabolismo (HERNÁNDEZ et al., 2015). Assim, diferentes setores produtivos utilizam a tecnologia enzimática, como as indústrias têxtil, farmacêutica, de alimentos e de papel e celulose (ANTUNES et al., 2017).

Devido a estas variedades de aplicações, a produção comercial de enzimas ganhou popularidade e diversas fontes, como vegetais, animais e, principalmente, microrganismos, podem ser utilizadas para sua obtenção (TARAFDAR et al., 2021). Desse modo, cada biocatalisador acaba possuindo um caráter bastante específico, agindo em um substrato particular para produzir um determinado produto a partir da reação catalisada (PALMER e BONNER, 2011).

A catálise enzimática ocorre quando o sítio ativo da enzima se liga ao substrato específico, proporcionando um ambiente adequado para que uma dada reação possa ocorrer mais rapidamente. Existem condições ótimas de pH, força iônica, temperatura, concentração de substrato, composição do solvente, etc., que favorecem a atuação das enzimas com sua atividade enzimática máxima, porém alterações desses parâmetros ótimos podem levar a desnaturação enzimática, que corresponde a mudanças estruturais e perda da sua função catalítica (NELSON e COX, 2014).

Nos alimentos as enzimas, geralmente, podem ser classificadas como endógenas, quando já estão presentes nos alimentos e podem ou não ser responsáveis por reações que afetam a qualidade, ou exógenas, quando são adicionadas para causar uma mudança desejável no alimento (DAMODARAN, PARKIN e FENNEMA, 2010). Dessa forma na indústria de alimentos o uso das enzimas ocorre, especialmente, em processos de panificação e de produtos cárneos, fabricação de cervejas, suco de frutas e vinhos e na produção de queijos (MONTEIRO e SILVA, 2009).

Segundo previsão do relatório “Industrial Enzymes – A Global Market Overview” publicado pela Industry Experts (2020) o mercado mundial de enzimas industriais deve ter atingido cerca de 6,1 bilhões de dólares em 2020, sendo que as principais enzimas que movimentam o mercado são as carboidrases, proteases, lipases, fitases, polimerases e nucleases.

3.3.1 Lipase

Pertencentes ao grupo das hidrolases, as enzimas denominadas lipases atuam na interface orgânico-aquosa e são capazes de catalisar reações que envolvem a conversão de triacilgliceróis em ácidos graxos livres e glicerol, além disso, também catalisam reações de síntese como esterificação e transesterificação (MESSIAS et al, 2011).

Tais enzimas são encontradas amplamente na natureza, podendo ser obtidas a partir de plantas, animais e microrganismos, e tem sua aplicação voltada a diversas atividades, como sínteses orgânicas, hidrólise de gorduras e óleos, modificação de gorduras, realce de sabor no processamento de alimentos e análises químicas. Dessa forma, as lipases podem ser utilizadas como aditivos em alimentos para modificar e realçar as propriedades sensoriais, em detergentes para hidrolisar gorduras, no tratamento de efluentes oleosos, na produção de aromas, e ainda, nas indústrias farmacêuticas, de cosméticos, agroquímicas e oleoquímicas (SHARMA et al., 2001; MESSIAS et al, 2011).

Na obtenção de aromas, o emprego das lipases para catalisar as reações de esterificação é considerada uma via de síntese natural, capaz de gerar ésteres com alto rendimento. Nas últimas décadas, a escolha de suportes para imobilizar a lipase e aplicá-la na síntese de aromas tem sido uma estratégia buscada como forma de facilitar a recuperação da enzima e sua reutilização, bem como melhorar sua estabilidade e atividade (ASMAT et al., 2019; ELIAS et al, 2019; BAYOUT et al., 2020; COSTA-SILVA et al., 2021).

O sítio catalítico da lipase é constituído por três resíduos de aminoácidos, serina, histidina e aspartato, e há também uma estrutura móvel hidrofóbica que cobre esse sítio, denominada de tampa ou “lid”, a qual se separa para tornar o sítio ativo capaz de se ligar ao substrato de acordo com a seletividade da lipase (BORNSCHEUER, 2002).

Segundo Castro et al. (2004), a massa molecular da lipase, a depender da fonte, pode variar de 20 a 75 kDa, e a atividade máxima pode ser alcançada em pH na faixa entre 4 a 9 e em temperaturas variando desde a ambiente até 70 °C. São comumente

estáveis em soluções aquosas neutras à temperatura ambiente apresentando, em sua maioria, uma atividade ótima na faixa de temperatura entre 30°C e 40°C.

As lipases são utilizadas na sua forma livre na maioria dos processos, porém nesse formato são relativamente instáveis e quanto maior seu grau de pureza, maior o seu custo e com isso, acabam sendo suscetíveis a presença de sais, surfactantes, álcalis, resíduos de outras substâncias presentes, etc., que podem atuar de forma inibidora ao catalisador, afetando a qualidade e quantidade de produtos, aumentando assim os custos operacionais (FOPASE et al., 2020). Dessa forma, a imobilização da lipase surge para promover o aprisionamento e a restrição do movimento da enzima em um espaço confinado com retenção de sua atividade catalítica, sendo uma alternativa que visa a redução dos custos, superar as desvantagens associadas ao uso da enzima livre e tornar o processo de produção mais eficiente (MATINJA et al., 2019).

3.3.2 Imobilização de enzimas

A imobilização de enzimas é uma técnica capaz de melhorar a estabilidade e atividade enzimática através da fixação da enzima livre ou solúvel em diferentes tipos de suportes, que atuam fornecendo uma proteção ao catalisador por meio da redução ou da perda de sua mobilidade (KHAN e ALZOHAIKY, 2010).

Durante a escolha do suporte ao qual a enzima será imobilizada deve-se observar suas propriedades físicas e químicas, como morfologia, resistência física à compressão mecânica, solubilidade, resistência ao ataque microbiano, baixo custo de produção, ser inerte quimicamente a diferentes solventes e possuir elevada área superficial BET, que deve ser suficiente para reter a enzima e conseqüentemente sua atividade biológica, sem alteração das suas propriedades conformacionais e funcionais (MENDES et al., 2011; BRENA et al., 2013).

Existem diversos métodos disponíveis para a imobilização de enzimas, que podem ser divididos em duas classes: métodos físicos e métodos químicos. Nos métodos físicos há presença de interações fracas (ligações de hidrogênio, hidrofóbicas, interações eletrostáticas e forças de van der Waals), que tendem a ser reversíveis, entre a superfície do suporte e as moléculas da enzima, ao contrário dos métodos químicos, onde a enzima se fixa no suporte de forma irreversível por meio de ligações covalentes ou reticulação entre diferentes polímeros (CHIOU e WU, 2004; HOMAIEI et al., 2013).

Convencionalmente, quatro métodos são os mais utilizados para a imobilização de enzimas, sendo eles a adsorção, ligação covalente, confinamento/encapsulação e reticulação. Como cada enzima possui uma particularidade, ou seja, propriedades dos substratos e produtos, características físico-químicas e variadas aplicações dos produtos obtidos, acaba não existindo um único método ou suporte de imobilização que seja aplicável a todas as enzimas. Assim como existe também vantagens e desvantagens associadas a cada método: a adsorção é simples, de baixo custo e eficaz, mas frequentemente reversível; a ligação covalente e a reticulação são eficazes e duráveis, mas possuem custo alto e podem prejudicar o desempenho da enzima; e problemas de difusão são inerentes ao confinamento, aprisionamento e microencapsulações. (HOMAEI et al., 2013; SOUZA et al., 2017).

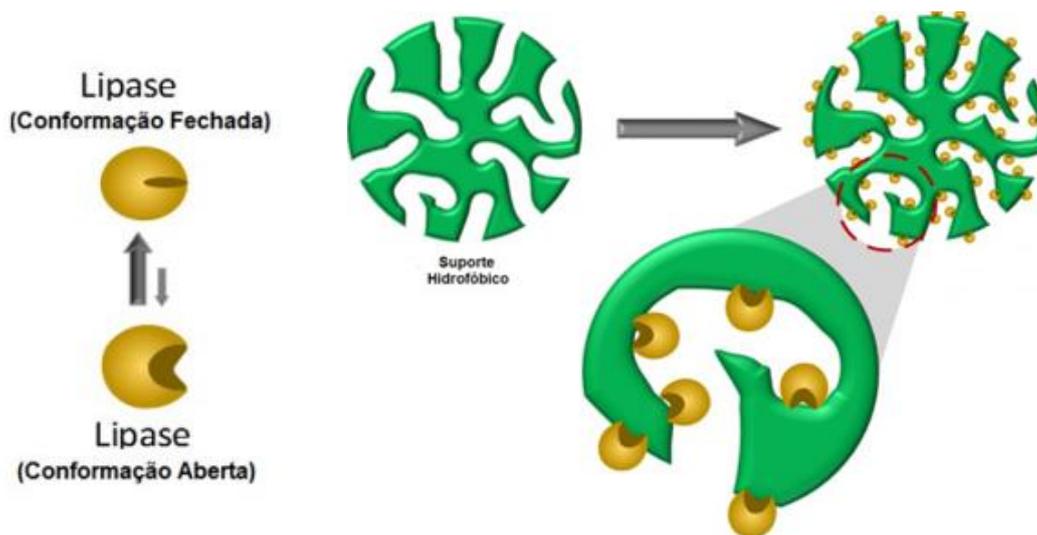
3.3.2.1 Imobilização de lipase por adsorção e ligação covalente

Segundo Fernandez-Lafuente et al. (1998), a instabilidade da lipase pode fazer com que ela não seja empregada com a sua atividade ótima e dessa forma, a imobilização pode permitir a otimização da atividade/estabilidade da enzima e por meio disso, ela se torna capaz de melhorar o desempenho dos reatores industriais, sendo importante que, além disso, o preparo do suporte seja feito de acordo com o meio no qual será aplicado, para que haja dessa forma, efetividade das reações.

O método mais comum para imobilização da lipase é baseado no processo de adsorção (KANDASAMY et al., 2010; PINTO BRITO et al., 2020), no qual a enzima se liga a superfície do suporte por meio de interações fracas. É uma técnica simples, que consiste em colocar o suporte insolúvel em contato com a solução enzimática, seguida da centrifugação, onde ocorre a separação do suporte contendo a enzima adsorvida do meio de reação. A eficiência deste método depende de variáveis tais como pH, força iônica do meio e a natureza do solvente empregado, bem como da relação entre a concentração da enzima e do suporte (FERNANDES, LIMA e LOPES, 2010; ZHANG et al, 2013).

Durante a imobilização, pode ocorrer o mecanismo denominado “ativação interfacial”, no qual o sítio ativo da enzima fica exposto ao meio de reação (Figura 4). Isso acontece quando há presença de alguma interface hidrofóbica, que faz com que a “tampa” se abra e a lipase seja adsorvida nessa forma aberta (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010; BASSI et al., 2016).

Figura 4. Mecanismo de ativação interfacial de lipases em suportes hidrofóbicos.



Fonte: Bassi et al. (2016)

A eficiência da imobilização por adsorção está diretamente relacionada com as propriedades do suporte, como por exemplo, a sua porosidade interna, área superficial BET, volume e tamanho de poros (DENG et al., 2010). Um exemplo de suporte sólido que vem sendo utilizados no processo de adsorção física para imobilização de enzimas é o carvão ativado ou biocarvão (TRIPATHI et al., 2014).

No entanto, as interações fracas que mantêm a enzima ligada ao suporte podem acarretar na dessorção das moléculas e para superar essa desvantagem a imobilização por ligação covalente vem sendo utilizada como alternativa. Para isso, existem diversos reagentes que causam modificações na superfície do carvão ativado (RAMANI et al., 2012; LEE et al., 2019), onde são inseridos grupos funcionais, que tenham afinidade com um grupo ligante da enzima, necessários para favorecer a formação das ligações mais fortes, promovendo uma estrutura mais rígida e estável (SOUZA et al., 2017).

De acordo com Fernandes, Lima e Lopes (2010), deve ser tomado um cuidado especial para que grupos importantes para o desempenho da atividade catalítica não sejam envolvidos na formação da ligação covalente entre enzima e suporte, pois isso iria ter como consequência uma enzima retida com perda de atividade. Além disso, este método pode apresentar inconvenientes, como maior número de etapas para sua realização, a enzima pode ser quimicamente alterada e não existe um método de imobilização por ligação covalente idêntico e regular para todas as enzimas (ASHKAN et al., 2021).

3.3.2.2 Suportes magnéticos para a imobilização de enzimas

A utilização de partículas metálicas tem sido destinada a uma variedade de aplicações, incluindo nos meios de extração e purificação de materiais biológicos. Existem diversos métodos para a síntese de partículas metálicas e no geral, o mais utilizado envolve as reações de precipitação química, que pode ser dividida em (i) redução parcial de Fe^{3+} , (ii) oxidação parcial de Fe^{2+} , ambas seguidas por precipitação e (iii) coprecipitação de Fe^{2+} e Fe^{3+} (HRIBERNIK et al., 2012).

Nanopartículas de óxido de ferro (Fe_3O_4) têm sido aplicadas em suportes para imobilização de enzimas, como a lipase, devido a fácil separação e a reciclagem efetiva sob o campo magnético externo. No entanto, as partículas de Fe_3O_4 tendem a se agregar em líquidos, por causa da forte atração dipolo-dipolo magnética das próprias partículas e, além disso, por possuírem alta atividade química tendem a ser facilmente oxidadas no ar levando à perda de magnetismo e dispersibilidade. Esses fatores tornam a separação magnética menos eficaz, resultando na ineficiência de nanopartículas de Fe_3O_4 para a fixação direta de enzimas (WANG et al., 2015; BILAL et al., 2018).

Nesse contexto, a combinação de carvão ativado e partículas metálicas é considerada uma forma de superar os problemas de oxidação e separação do Fe_3O_4 e permitir a sua aplicação de forma mais eficaz na imobilização enzimática por adsorção. Porém, uma desvantagem associada é que parte do espaço dos poros internos do carvão ativado pode ser ocupado pelas nanopartículas metálicas, levando a uma diminuição acentuada na área de superfície (JUANG et al., 2018; ASTUTI et al., 2019).

3.4 Aplicação da lipase na obtenção de aromas

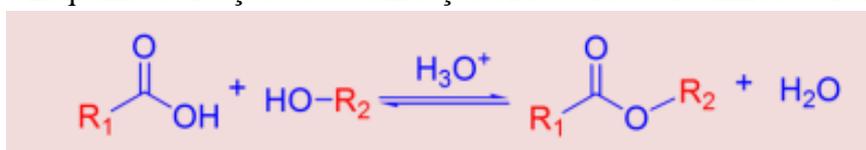
O aroma é uma propriedade sensorial fundamental dos alimentos e considerado um dos fatores-chave que determinam a qualidade de um produto. Dessa forma, os aromatizantes constituem uma das principais classes de aditivos utilizados, sobretudo, pelas indústrias de alimentos, laticínios e bebidas, tendo esse mercado uma taxa de crescimento anual estimada em 2,76% para o período de 2019-2023, movimentando cerca de 28,37 bilhões de dólares (FOCUS ON SURFACTANTS, 2019).

Segundo a RDC nº 2 de 15 de janeiro de 2007 aromatizantes são substâncias ou misturas de substâncias com propriedades odoríferas e/ou sápidas, capazes de conferir ou intensificar o aroma e/ou sabor dos alimentos e podem ser classificados em naturais e sintéticos. Os aromas naturais compreendem os óleos essenciais, extratos,

bálsamos/oleoresinas/oleogomaresinas, e substâncias aromatizantes isoladas, que são obtidos exclusivamente por métodos físicos, microbiológicos ou enzimáticos, a partir de matérias-primas aromatizantes naturais (produtos de origem vegetal ou animal). Já os aromas sintéticos são compostos obtidos por processos químicos e compreendem os aromatizantes idênticos ao natural e os aromatizantes artificiais (BRASIL, 2007).

Os ésteres de cadeia curta, derivados da reação de ácidos carboxílicos e álcoois (Figura 5), são os compostos orgânicos responsáveis pela característica de sabor e aroma adocicado e frutado, que despertam interesse industrial, visto que podem ser utilizados em produtos alimentares, como bebidas, doces, geleias, produtos de confeitaria, produtos lácteos e sorvetes (SILVA et al., 2014; WAGHMARE et al., 2017).

Figura 5. Esquema da reação de esterificação entre ácido carboxílico e álcool



Fonte: Oliveira et al. (2014)

Em escala industrial, os aromas são frequentemente produzidos por via sintética, que possui alto rendimento e custo baixo, porém o processo é de baixa seletividade e os produtos gerados são de baixa qualidade, utiliza altas temperaturas e pressões que geram um alto custo energético. Além disso, o uso dos produtos químicos pode causar corrosão do equipamento, problemas ambientais devido ao alto volume de solventes orgânicos utilizados e deixarem rastros de impureza possivelmente tóxicos a saúde humana (SÁ et al., 2017).

Devido a isso, as indústrias de alimentos vêm buscando, cada vez mais, inserir na sua linha de produção aditivos/ingredientes naturais. No entanto, compostos naturais extraídos diretamente da natureza estão associados a desafios como sazonalidade; questões ecológicas, sociais e políticas; e baixo rendimento, que acaba levando a um alto preço do produto (FELIPE, OLIVEIRA e BICAS, 2017).

Dessa forma, a biotecnologia vem empregando rotas biológicas e enzimáticas para a síntese natural de aromas, tornando o processo mais correto ecologicamente, visto que as condições de operação são mais amenas, não havendo uso de catalisadores potencialmente tóxicos e ocorrendo menos problemas com o gerenciamento de resíduos (PAULINO et al., 2021).

A extração dos ésteres por via enzimática tem sido buscada devido ao fato de ser uma síntese natural, com vantagens ambientais associadas, alta eficiência catalítica e condições mais favoráveis de reação, que permitem a reutilização das enzimas (PIRES-CABRAL et al., 2007). Nesse contexto, a lipase é um exemplo de enzima que vem sendo usada para catalisar reações de esterificação para obtenção de, por exemplo, butirato de isoamila, caprilato de butila, acetato de isoamila, butanoato de metilo, metilo benzoato e butirato de butila (TODERO et al., 2015; GUMEL e ANNUAR, 2016; SARNO et al., 2017; SOSE et al., 2017; BRITO et al., 2020; COSTA-SILVA et al.; 2021).

As reações de esterificação que ocorrem por síntese enzimática são predominantemente obtidas em meios orgânicos com baixo teor de água, a fim de manter a conformação ativa da lipase e sua termoestabilidade. A utilização da enzima em sua forma imobilizada em meio orgânico permite além da sua reutilização, uma alta produtividade, estabilidade e fácil recuperação (ELIAS et al., 2019; PIAZZA et al., 2021).

Diferentes suportes vêm sendo empregados para imobilizar lipase e aplicá-la na síntese de aromas: Mahapatra et al. (2009), imobilizaram a enzima em sílica e sintetizaram acetato de butila e acetato de propila, com butanol e propanol, respectivamente. Bayramoğlu et al. (2011), utilizaram uma membrana hidrofóbica de cloreto de polipropileno para imobilização e produziu aroma de maçã verde (valerato de etila) em meio orgânico. Suporte a base de quitosana foi empregado por Weber, Nascimento e Parize (2019) para imobilizar lipase e aplicaram o biocatalisador na síntese do éster acetato de geranila. Machado et al. (2019), também utilizaram sílica como suporte para imobilização e promoveu a síntese de estearato de cetila.

O carvão ativado, produzido por Brito et al. (2020), mostrou ser um suporte promissor e inovador para síntese de aromas. Nesse caso, a lipase imobilizada foi aplicada para a produção do aroma de banana (acetato de isoamila) e foi atingida uma alta conversão em éster de aroma (>90%) sem redução considerável da atividade catalítica da enzima retida no carvão.

A determinação dos parâmetros de reação envolvidos na síntese do éster, catalisadas por lipase, é importante para que se obtenha a máxima conversão do aroma e o melhor rendimento, evitando desperdícios e processos prolongados, que acarretem prejuízo para a indústria. Ainda, deve-se aplicar estratégias que mantenham a atividade catalítica pelo máximo de tempo possível, como por exemplo, lavar a enzima com o solvente orgânico, a fim de eliminar qualquer substância adsorvida no suporte, otimizando assim o processo (MARTINS et al., 2011).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

Empregou-se na produção de carvões ativados, sabugo de milho verde como precursor de carbono, ácido fosfórico (VETEC 85% P.A.) como agente químico ativante e a Lipase de pâncreas de porco (LPP) 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.

4.2 Síntese do carvão ativado

4.2.1 Preparo do material precursor

O resíduo de sabugo de milho verde, obtido na cidade de Vitória da Conquista - Ba, foi seco em estufa a 105 °C por 24 h e após este período foi triturado em moinho de facas e peneirado até a granulometria desejada (20 mesh). O farelo obtido foi utilizado na síntese do carvão ativado.

4.2.2 Caracterização do material precursor

Foi realizada a caracterização do resíduo de sabugo de milho (RSM) em relação ao teor de cinzas, determinado submetendo-se as amostras à calcinação a 550 °C em forno mufla, e umidade, baseado na perda de peso do material quando submetido a aquecimento de 105 °C, até atingir peso constante, através das metodologias 920.03 e 925.45, respectivamente descritas pela AOAC (2000). Para os teores de lignina, celulose e hemicelulose, utilizou-se a metodologia de fibra detergente neutra e fibra detergente ácida (FDN e FDA) descrita por Van Soest et al. (1991).

Os grupos funcionais do RSM foram avaliados por espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR). A amostra avaliada foi analisada de forma direta utilizando a técnica de refletância total atenuada (ATR) na região infravermelha de 4000-500 cm⁻¹ em espectrofotômetro Agilent (Cary 630 FTIR, Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA).

A decomposição térmica do RSM foi avaliada por análise térmica diferencial (DTA) e termogravimetria (TGA) em equipamento STA PT-1000 (Linseis, Alemanha), na faixa de temperatura de 10 °C-1000 °C, a uma taxa de aquecimento de 10 °C.min⁻¹, utilizando aproximadamente 20 mg da amostra.

4.2.3 Síntese do carvão ativado por ativação química

O RSM foi impregnado com H₃PO₄ (VETEC 85% P.A.) na razão de impregnação de 1,5:1 (massa de ativante/massa do precursor) e seco em estufa a 105 °C por 48 h. Posteriormente, os mesmos foram carbonizados a 500 °C em forno mufla (taxa de aquecimento de 5 °C.min⁻¹), sob fluxo de nitrogênio (50 mL.min⁻¹) durante 1 h. O carvão ativado obtido a partir do RSM (CASM) foi lavado com água, à temperatura aproximada de 60 °C, até ser alcançado o pH da água de lavagem (próximo ao pH 7,0). Em seguida, a amostra foi seca a 105 °C durante 24 h.

4.2.4 Rendimento do processo de síntese e teor de cinzas do CASM

O rendimento do processo de síntese do carvão ativado obtido a partir do resíduo de sabugo de milho foi calculado através da Equação 1.

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

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

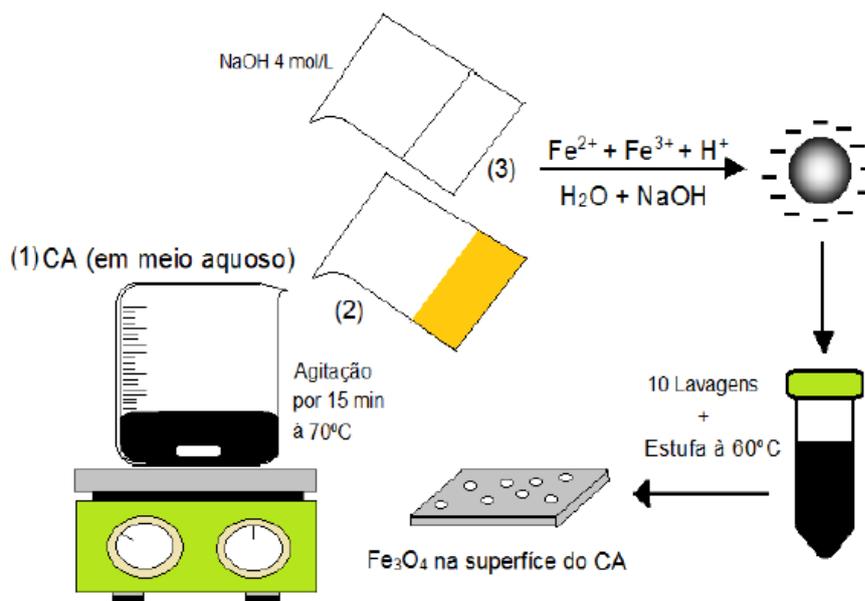
O teor de cinzas foi determinado utilizando metodologia 920.03, proposta pela AOAC (2000).

4.3 Incorporação de partículas metálicas no carvão ativado (CASM) - Metalização

O carvão ativado (CASM) teve sua estrutura modificada com a incorporação de partículas de ferro, utilizando o sulfato ferroso e cloreto férrico (Figura 6). Para isso, seguiu-se a metodologia descrita em Mohan et al. (2011), com algumas adaptações, na qual 10 g de carvão ativado (CASM) foram adicionados a 500 mL de água destilada e mantido sob agitação (1). Enquanto isso, 0,067 mol de ferro trivalente (Fe³⁺) foram misturados a 0,033 mol de ferro bivalente (Fe²⁺) em 400 mL de água. Também foram adicionados a esta solução 2,5 mL de ácido clorídrico (HCl), desta forma, produzindo a solução de ferro (2). Esta solução foi misturada ao carvão ativado aquoso preparado anteriormente e agitada vigorosamente por 15 minutos a 70 °C. Após esse tempo, foi adicionada à mistura 500 mL de uma solução (3) de hidróxido de sódio (NaOH) 4 mol.L⁻¹, para que o pH da solução aumentasse para a faixa de pH 10-11, e deixou-se sob agitação por 2 horas.

Posteriormente a este procedimento, o precipitado formado foi coletado em tubos de 50 mL, lavados com água destilada repetidas vezes e o carvão metalizado (CASMF) obtido foi seco em estufa por volta de 60 °C/48 h.

Figura 6. Processo de elaboração do carvão metálico: (1) mistura do carvão com meio aquoso; (2) adição da solução de Fe^{2+} e Fe^{3+} na solução 1; (3) adição de NaOH completando o processo de formação da magnetita (Fe_3O_4)



Fonte: Leite (2016)

4.4 Caracterizações dos carvões ativados obtidos (CASM e CASMF)

4.4.1 Caracterização química dos suportes, medida de porosidade e área superficial específica do CASM e CASMF

Os grupos funcionais dos suportes obtidos foram avaliados por espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), seguindo a metodologia já descrita no item 4.2.2.

Para obtenção dos difratogramas de raios-X (DRX), os carvões ativados foram condicionados em portas amostras e analisados em um difratômetro D2 Phaser (Bruker, Alemanha). Os raios-X ($\lambda = 1,54184 \text{ \AA}$) foram gerados por uma fonte $\text{Cu K}\alpha$ e a difração foi medida na faixa 2θ de 5° – 90° .

O pH do ponto de carga zero (pH_{PCZ}), que define qual o pH em que a superfície do carvão possui carga neutra, foi determinado pela metodologia descrita por Kuśmierk, Szala e Świątkowski (2016). O procedimento consistiu em colocar 50 mg da amostra de cada carvão em contato com 50 mL de solução de cloreto de sódio $0,10 \text{ mol.L}^{-1}$ em diferentes valores de pH (1-11), mantidas sobre agitação constante durante 24 h. O pH de cada solução foi ajustado com solução $0,50 \text{ mol.L}^{-1}$ de ácido clorídrico ou hidróxido de sódio. Ao final de 24 h, o pH foi medido e construído o gráfico, do pH final versus o pH inicial. O pH_{PCZ} corresponde à faixa onde o pH final se mantém constante independentemente do pH inicial, ou seja, a superfície comporta-se como um tampão.

As isotermas de adsorção e dessorção do CASM e do CASMF foram obtidas a 77 K em um equipamento Micromeritics modelo ASAP 2420, utilizando aproximadamente 0,20 g de cada amostra. Antes das medidas as amostras foram submetidas a uma etapa de pré-tratamento, que consistiu no aquecimento a 333 K. A área superficial específica foi determinada pela equação de BET (BRUNAUER, 1938). A distribuição de poros foi obtida a partir da isoterma de dessorção utilizando o método BJH (BARRET, 1951), enquanto que o volume dos microporos foi determinado pela análise *t-plot* a partir da isoterma de adsorção (LIPPENS, 1964).

A técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) foi utilizada para investigar a morfologia superficial dos suportes produzidos e a Espectroscopia de raios-X por dispersão em energia (EDS) foi empregada para avaliar a composição da superfície dos mesmos. As amostras foram polvilhadas em cima de fita dupla face condutora de carbono. Após isto, elas foram recobertas com material condutor, ouro, usando o Sistema para deposição de filmes de ouro, Desk V (Denton Vacuum LLC Moorestown, New Jersey, USA), equipado com o acessório de carbono. Em seguida, as amostras foram analisadas no Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) JSM – 6610 (Jeol, Tokyo, Japan), equipado com EDS Thermo scientific (NSS Spectral Imaging).

4.5 Ensaios de imobilização da lipase e determinação da atividade hidrolítica

A lipase foi imobilizada nos carvões ativados obtidos CASM e CASMF.

4.5.1 Influência do pH no processo de imobilização

Com o intuito de avaliar a influência do pH da solução enzimática no processo de imobilização de lipase nos carvões ativados, realizou-se a imobilização partindo-se de uma solução 6000 mg.L⁻¹ de lipase. Os valores de pH da solução inicial de lipase avaliados foram: 3,0, 4,0, 5,0, 6,0, 7,0 e 8,0. Foi utilizada solução tampão acetato de sódio (0,1 mol.L⁻¹) para valores de pH 3,0 a 5,0 e fosfato de sódio (0,1 mol.L⁻¹) para os valores de pH 6,0 a 8,0. Alíquotas de 5 mL da solução de lipase, em cada pH avaliado, foram adicionados em tubos contendo aproximadamente 0,1 g de cada suporte. Os tubos foram mantidos sob agitação constante (20 rpm), por 2 h em um agitador orbital à temperatura de 30 °C. Uma vez atingido o tempo de contato, os tubos foram retirados e em seguida centrifugados a 4000 rpm por 10 min, sendo o sobrenadante coletado para a quantificação das proteínas em solução pelo método de Bradford (1976). A partir da diferença entre a quantidade inicial e final de proteínas, determinou-se a capacidade adsorptiva de cada um dos carvões, utilizando-se a Equação 2.

$$q = \frac{V \cdot C_{in} - V \cdot C}{m_{ads}} \quad (2)$$

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

4.5.2 Caracterização dos derivados por FTIR e MEV

Para os derivados foram avaliados os grupos funcionais presentes por espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), seguindo a metodologia já descrita no item 4.2.2. Assim como a morfologia e composição da superfície dos mesmos foram obtidas por análises MEV e EDS, respectivamente, conforme metodologia já descrita no item 4.4.1.

4.5.3 Determinação da atividade hidrolítica

Após a definição do melhor pH para imobilização da lipase no CASM e no CASMF foi realizado um estudo com o objetivo de determinar as melhores condições de

pH e temperatura para a determinação da atividade hidrolítica da enzima imobilizada e livre.

4.5.3.1 Influência do pH do meio na atividade hidrolítica da lipase

Para a avaliação do pH do meio para determinação da atividade hidrolítica da enzima livre e imobilizada nos suportes CASM e CASMF, foram testados os valores: 4,0, 5,0, 6,0, 7,0 e 8,0 a 30 °C. Foi utilizado solução tampão acetato de sódio ($0,1 \text{ mol.L}^{-1}$) para valores de pH 4,0 e 5,0 e fosfato de sódio ($0,1 \text{ mol.L}^{-1}$) para os valores de pH 6,0 a 8,0. A quantificação da atividade hidrolítica da solução enzimática seguiu o método de hidrólise da emulsão de azeite de oliva, conforme a metodologia adaptada de Soares et al (1999).

4.5.3.2 Influência da temperatura do meio na atividade hidrolítica da lipase

Após a determinação do pH ótimo do meio para avaliação da atividade da lipase imobilizada, o efeito da temperatura de hidrólise da emulsão do azeite de oliva foi avaliado para os dois derivados (CASM-LPP e CASMF-LPP) e para enzima livre. Foram testadas as seguintes temperaturas: 20 °C, 30 °C, 40 °C e 50 °C.

4.6 Reação de esterificação

Para a reação de síntese do acetato de isoamila a metodologia de Brito et al. (2020) foi empregada com adaptações. Foi utilizada uma mistura de álcool isoamílico (240 mM) e ácido acético (240 mM), solubilizados em hexano na razão molar de 1:1. As reações foram conduzidas em frascos Duran de 100 mL contendo 5 mL do meio reacional e cerca de 0,5 g do carvão contendo a lipase imobilizada nas condições ótimas estabelecidas na seção 4.5. Os frascos foram mantidos sob agitação de 200 rpm, a 40 °C, em shaker orbital por um período de 4 horas. Posterior a reação, aproximadamente 500 µL de alíquotas foram retiradas do meio e diluídas em 10 mL da mistura etanol:acetona (1:1) (v/v) para a quantificação do ácido residual por titulação com solução de 20 mM de NaOH, empregando fenolftaleína como indicador (SILVA et al., 2014). Dois experimentos controle (branco) foram realizados utilizando o mesmo método, sendo que em um adicionou-se o carvão sem a enzima e o outro conteve apenas o meio de reação (sem

carvão). A conversão em ésteres, medida como conversão do ácido acético em ésteres (Y%) na síntese do acetato de isoamila foi determinada de acordo com a Equação 3.

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

Em que: Y é a conversão em ésteres (%), A_I é a concentração inicial de ácido acético (mM) e A_F é a concentração final de ácido acético (mM).

4.6.1 Estabilidade operacional do biocatalisador

A estabilidade operacional dos derivados foi avaliada pela realização de 5 ciclos sucessivos de reações de esterificação, utilizando o mesmo procedimento descrito anteriormente. Após cada ciclo, os derivados eram lavados com tampão acetato de sódio ($0,1 \text{ mol.L}^{-1}$) em pH 4,0 e posteriormente com hexano para remoção dos substratos remanescentes, em seguida colocado em contato com uma nova solução de substrato e a reação era realizada nas mesmas condições anteriores e o rendimento de esterificação para cada ciclo foi determinado utilizando a Equação 3. A redução da conversão considerou a conversão do primeiro ciclo como 100% e as demais reduções foram calculados em relação a este.

4.7 Análise Estatística

O programa SAS versão Studio foi utilizado para realizar as análises estatísticas dos ensaios de imobilização de lipase, determinação da atividade hidrolítica e reação de esterificação, descritos anteriormente. O teste Tukey a 5% de significância foi aplicado para as variáveis qualitativas.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização do precursor de carbono

Os resultados para caracterização química do sabugo de milho são apresentados na Tabela 1. O conhecimento da composição do resíduo é importante, pois tem influência direta na estrutura final e nas propriedades do carvão ativado (GONZÁLEZ-GARCÍA, 2018). Assim, o sabugo de milho do estudo apresentou, no geral, um baixo teor de cinzas e um teor de celulose superior ao de lignina em sua composição. Precursores com um baixo teor de cinzas (<10%) são considerados adequados para a síntese de carvão ativado, uma vez que um alto teor impede o desenvolvimento dos poros do carvão (ZHANG et al., 2020). Segundo Fujishige et al. (2017), materiais com elevado teor de celulose tendem a apresentar maiores valores de área superficial BET, enquanto a lignina é o principal componente da biomassa lignocelulósica responsável pelo desenvolvimento dos microporos (MOHAMAD NOR et al., 2013; GONZÁLEZ-GARCÍA, 2018).

Tabela 1. Caracterização química do sabugo de milho utilizada nesse trabalho.

Amostra	Celulose (%)	Lignina (%)	Hemicelulose (%)	Cinzas (%)
Sabugo de Milho	47,49 ± 1,67	24,88 ± 0,98	13,60 ± 1,43	2,12 ± 0,04

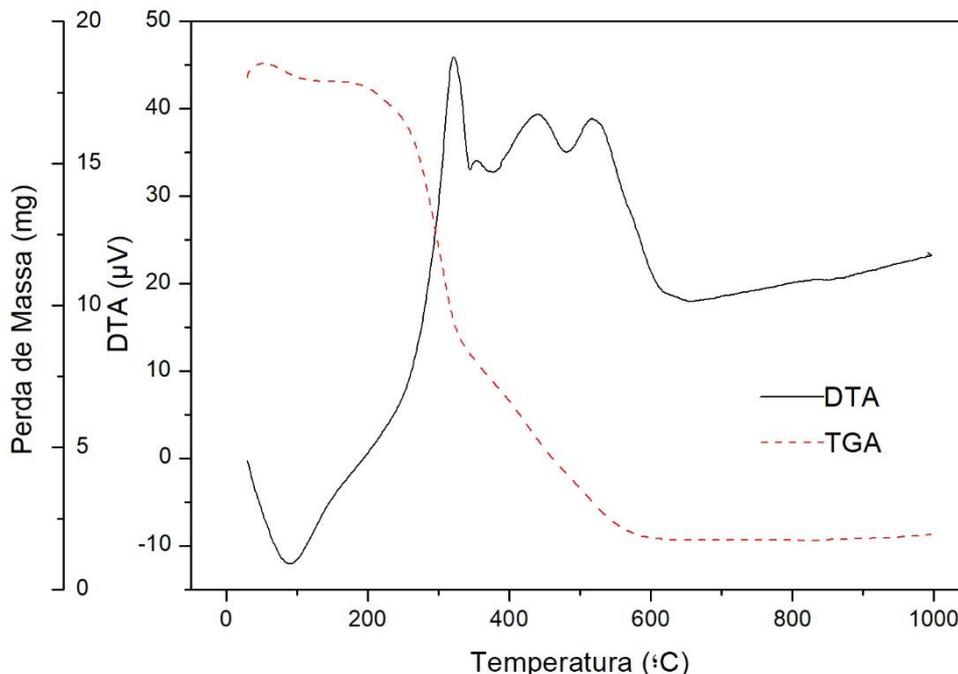
Na Figura 7 é apresentado o perfil de decomposição térmica do sabugo de milho usado na síntese do carvão ativado. De acordo com Zhu et al. (2016), a perda de massa no processo de pirólise da matéria-prima ocorre em três estágios:

- (i) um evento endotérmico (DTA) no primeiro estágio (40 °C-200 °C), que acontece devido a evaporação da água;
- (ii) o segundo estágio (200 °C-400 °C) é atribuída a pirólise da celulose, hemicelulose e parte da lignina, apresentando pico exotérmico (DTA) nessa faixa de temperatura;
- (iii) a perda de massa que ocorre no terceiro estágio (400 °C-520 °C), é devido principalmente a pirólise da lignina.

A ativação química com H₃PO₄ em atmosfera inerte pode então alterar o processo de pirólise do material precursor, que reage, a princípio, com a hemicelulose e a lignina e leva a perda de água e voláteis leves (CO, CO₂, alguns hidrocarbonetos, etc.). Em seguida, o ácido fosfórico forma um composto de fosfato entre a hemicelulose e a celulose e ocorre perda de água, proveniente da condensação do ácido, e de voláteis de baixo ponto

de ebulição. Com o aumento da temperatura, as moléculas de ácido fosfórico se condensam com diferentes polímeros, havendo a formação de ácido pirofosfórico, trifosfórico e polifosfórico, que ao final do processo de carbonização tendem a ser eliminadas até ser atingida o máximo de perda de massa (BRITO et al., 2017).

Figura 7. Curvas de TG e DTA do material precursor.



5.2 Rendimento do processo de síntese e caracterizações dos carvões ativados (CASM e CASMF)

O rendimento do processo de síntese do carvão ativado a partir do resíduo de sabugo de milho (CASM) foi de 43,2%, sendo esse parâmetro um indicativo da eficiência do processo e influenciado pelas condições de síntese, como taxa de aquecimento, temperatura final de carbonização, agente ativante, o fluxo de gás de arraste, natureza e características da matéria-prima (SAMANTRAY e MISHRA, 2020).

Isto é confirmado por outros autores que também utilizaram ácido fosfórico como agente ativante para diferentes materiais precursores, provenientes de resíduos agroindustriais com alto teor de celulose em sua composição, semelhante ao sabugo de milho utilizado no trabalho, e encontraram bons rendimentos: 37,2% para casca de amendoim (GARG et al., 2019); 34,9 e 36,12% para casca de maracujá (MONTALVO

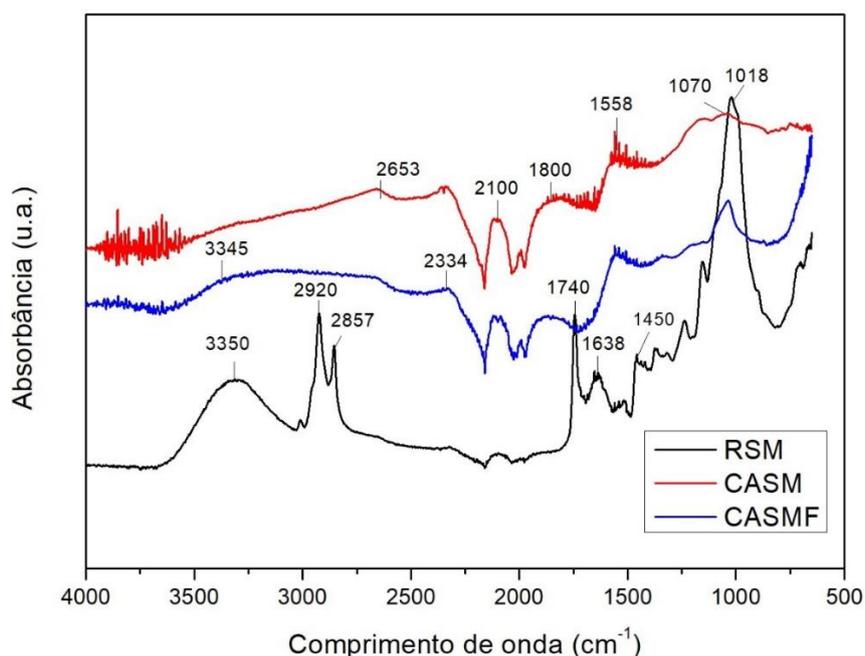
ANDIA et al., 2020) e 45-55% para a torta obtida após processamento do óleo de palma (LIM et al., 2015).

O teor de cinzas para o CASM correspondeu a 7,13%. Segundo Maulina e Iriansyah (2018), carvões ativados devem apresentar no máximo 10% de cinzas em sua composição, visto que o excesso pode causar entupimento dos poros e conseqüentemente redução da área superficial do carvão. Além disso, a presença da matéria mineral em maiores proporções prejudica o processo de adsorção, pois o carvão ativado torna-se mais hidrofílico (MAHAMAD et al., 2015).

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

A técnica de FTIR foi empregada com o objetivo de obter informações sobre a estrutura química e grupos funcionais presentes no material precursor (RSM) e dos carvões CASM e CASMF. Os espectros são mostrados na Figura 8.

Figura 8. Espectros obtidos por FTIR para o RSM, CASM e CASMF.



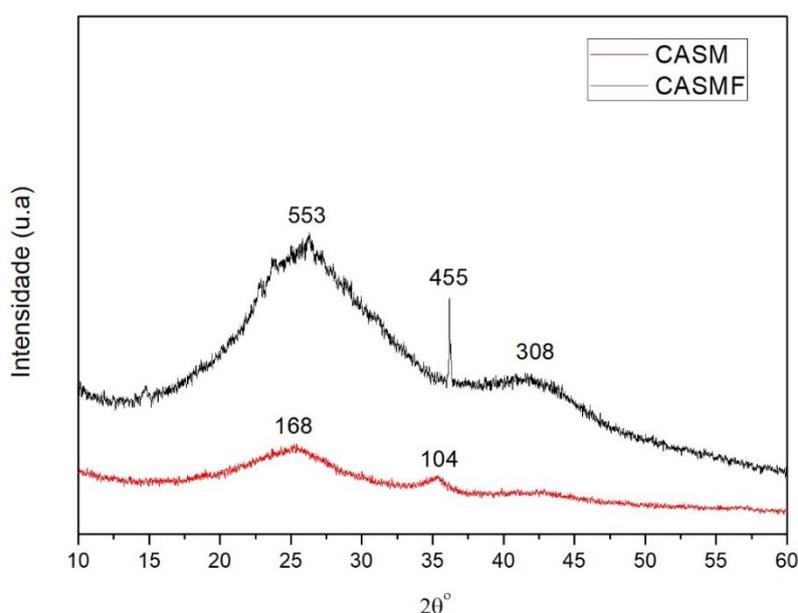
Para a amostra do precursor de carbono (RSM) a banda larga em 3350 cm^{-1} corresponde ao alongamento dos grupos —OH atribuídos as ligações de hidrogênio presentes, a banda em 2920 cm^{-1} e 2857 cm^{-1} representa o alongamento do grupo —CH_2 e

os picos em 1740 cm^{-1} e 1638 cm^{-1} podem ser atribuídos aos grupos $\text{C}=\text{O}$ e $\text{C}=\text{C}$, respectivamente. O alongamento do grupo $-\text{OH}$ da estrutura dos grupos carboxílicos aparece em 1450 cm^{-1} e o do éster aromático ($\text{O}-\text{C}-\text{C}$) aparece em 1018 cm^{-1} (MISHRA et al., 2019). Esses grupos representam, sobretudo, a composição lignocelulósica do sabugo de milho, que ao sofrer o aumento da temperatura de pirólise, tem seus picos de absorção reduzidos na superfície do CASM e CASMF. Contudo, nos suportes podem ser observados picos em 1800 cm^{-1} e 1558 cm^{-1} , referentes ao alongamento dos grupos $\text{C}=\text{O}$ e $\text{C}=\text{C}$, característicos de materiais carbonáceos, e em 1070 cm^{-1} , que pode ser atribuído ao estiramento dos grupos fosfatos, provenientes da ativação química com ácido fosfórico (SANTOS et al., 2019; RAMAMOORTHY et al., 2020). Conforme Wang et al. (2015), na superfície do suporte magnetizado (CASMF) não há muitos grupos ativos, exceto uma pequena quantidade de grupos hidroxila na superfície das partículas do Fe_3O_4 , os quais estão representados na faixa de $4000\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$. Porém não foi possível observar os mesmos no espectro de FTIR na amostra CASMF.

5.2.2 Difratoogramas de raios-X (DRX)

Os padrões de DRX dos carvões ativados CASM e CASMF podem ser observados na Figura 9.

Figura 9. Padrões de DRX das amostras CASM e CASMF.



Para o CASM picos largos (halos amorfos) em 25° (168) e 35° (104) podem ser observados, mostrando que o material se aproxima de uma estrutura amorfa. Para o CASMF os halos se tornam mais bem definidos, como pode ser observado para picos próximos a 25° (553) e 35° (455), que podem ser relacionados a estrutura cristalina encontradas em Fe₃O₄, que também promove a grafitação do carbono amorfo (JUANG et al., 2018; ASTUTI et al., 2019, XIE et al., 2019; LIU et al. 2021). Um halo amorfo pode ser observado para ângulos superiores a 40° (308).

5.2.3 Ponto de carga zero dos carvões ativados (CASM e CASMF)

Visando avaliar a carga superficial dos carvões ativados foi determinado o pH do ponto de carga zero (pH_{PCZ}), uma das propriedades que devem ser avaliadas em adsorventes, por estar relacionado com propriedades intrínsecas do suporte, cargas químicas presentes e tratamentos dados ao material. O pH_{PCZ} corresponde ao pH em que a superfície do carvão ativado possui carga neutra (MA et al., 2017), ou seja, quando o pH da solução é menor que o pH_{PCZ} do material sólido a superfície deste ficará carregada positivamente, favorecendo a adsorção de ânions, enquanto que se o pH da solução for maior do que o pH_{PCZ} do material sólido a superfície deste ficará carregada negativamente e a adsorção de cátions é preferida (JAWAD et al., 2018).

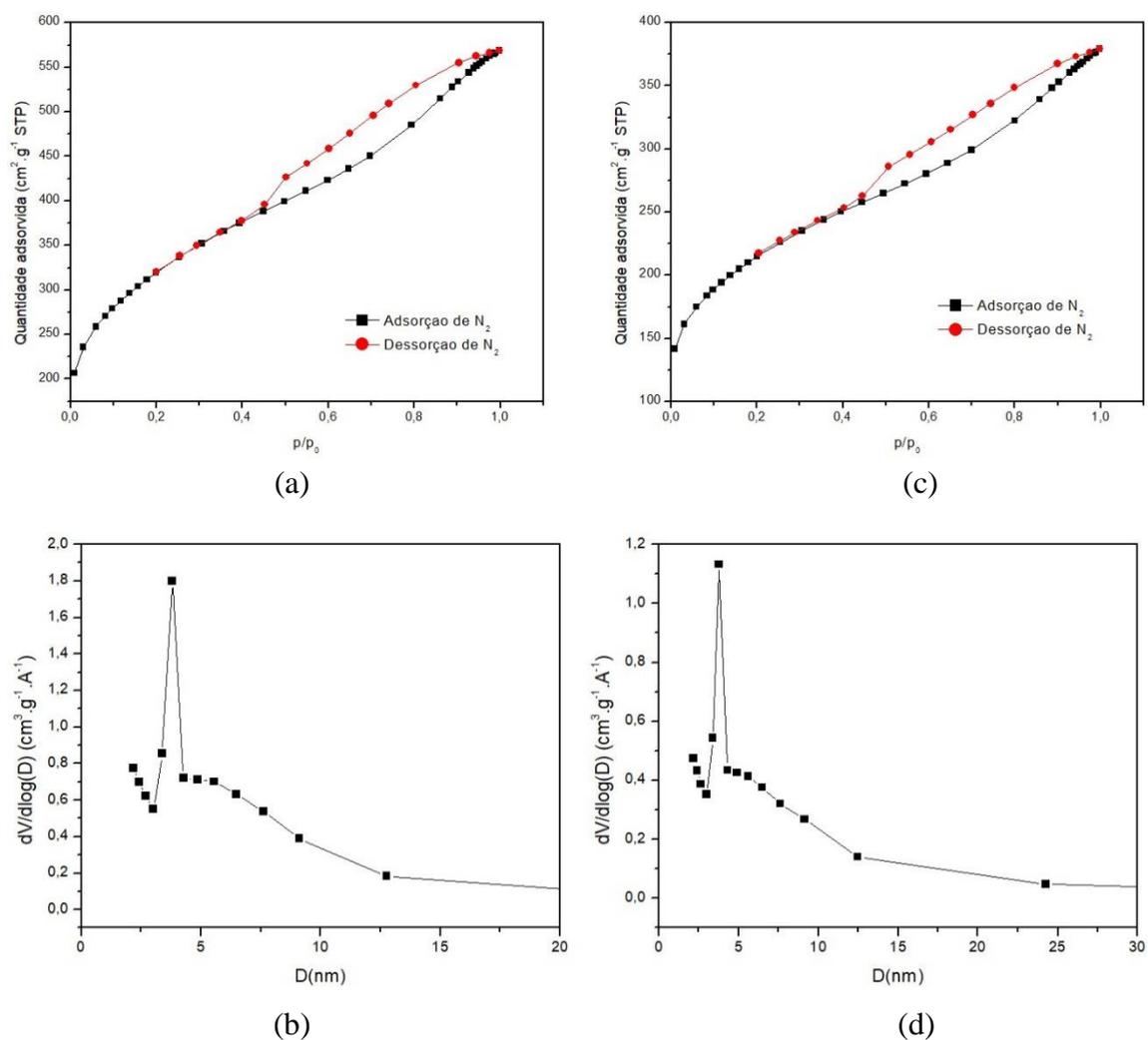
Para o CASM e o CASMF o pH_{PCZ} equivaleu a 4,5 e 7,4, respectivamente. O caráter ácido do CASM ocorre por causa da presença de grupos ácidos formados na superfície do suporte pelo agente ativante H₃PO₄ (BRITO et al., 2017). Já o aumento do pH_{PCZ} do CASMF é justificado pelo processo empregado na incorporação das partículas de ferro, onde inicialmente o carvão ativado entra em contato com a solução ácida de sais de ferro bivalente e trivalente seguido pela adição da solução de NaOH, que eleva o pH e favorece a neutralização dos grupos funcionais presentes na superfície do CASMF, sendo ao final realizada a lavagem para eliminar o excesso de sais, ácido e base que não reagiram (DELGADILLO-VELASCO et al., 2020).

5.2.4 Medida de porosidade e área superficial específica

As isotermas de adsorção-dessorção de N₂ a 77 K do CASM e do CASMF são apresentadas na Figura 10a e 10c. De acordo com a classificação da IUPAC (1982), ambas as isotermas possuem um formato misto (tipo I-IV), visto que em sua parte inicial,

o nitrogênio começa a ser adsorvido em baixas pressões relativas (p/p_0), típico de sólidos microporosos e característico de isotermas tipo I. Para pressões relativas intermediárias e altas ($p/p_0 > 0,5$), ocorre a formação de histerese (diferentes caminhos entre os processos de adsorção e dessorção), devido ao fenômeno de condensação capilar do nitrogênio no interior dos poros, indicando a presença de mesoporos (LU et al., 2014; GEBREEGZIABHER et al., 2019).

Figura 10. Isotermas de adsorção/dessorção de nitrogênio (N_2) e distribuição de tamanhos de poros obtida para o CASM (a e b) e para o CASMF (c e d).



Isto pode ser confirmado ao avaliar a distribuição do tamanho dos poros (Figura 10b e 10d) e as propriedades texturais dos suportes (Tabela 2). Os carvões CASM e CASMF apresentam diâmetro médio de poros situado na faixa de 4 nm, sendo classificado como mesoporoso e apresenta uma tendência de distribuição de poros

inferiores a 3 nm. Além disso possuem um volume total de poros de 0,701 cm³/g e 0,462 cm³/g, respectivamente, localizados, principalmente, na faixa de mesoporos. A área superficial BET do CASM apresentou valor dentro da faixa encontrada para carvões ativados obtidos ao empregar a ativação química com ácido fosfórico. Essas características são próprias de carvões sintetizados a partir de materiais precursores com altos teores de celulose em sua composição, isso porque, a celulose não apresenta alta resistência térmica durante a pirólise, aumentando assim o diâmetro dos poros (DUJEARIC-STEPHANE et al., 2020; GHOLAMIYAN et al., 2020). A redução da área de superfície BET e do volume de micro e mesoporos para o CASMF acontece devido a inserção das partículas metálicas na superfície do CASM, obstruindo os poros do material (LIU et al., 2021).

Tabela 2. Propriedades texturais do CASM e CASMF.

Amostra	S _g (m ² /g) ^a	D _p (nm) ^b	V _{Meso} (cm ³ /g) ^c	V _{Micro} (cm ³ /g) ^d	V _{total} (cm ³ /g) ^e
CASM	1135	4,35	0,586	0,115	0,701
CASMF	760	4,46	0,376	0,086	0,462

^a Área Superficial específica. ^b Diâmetro médio de poros. ^c Volume de mesoporos. ^d Volume de microporos. ^e Volume total de poros.

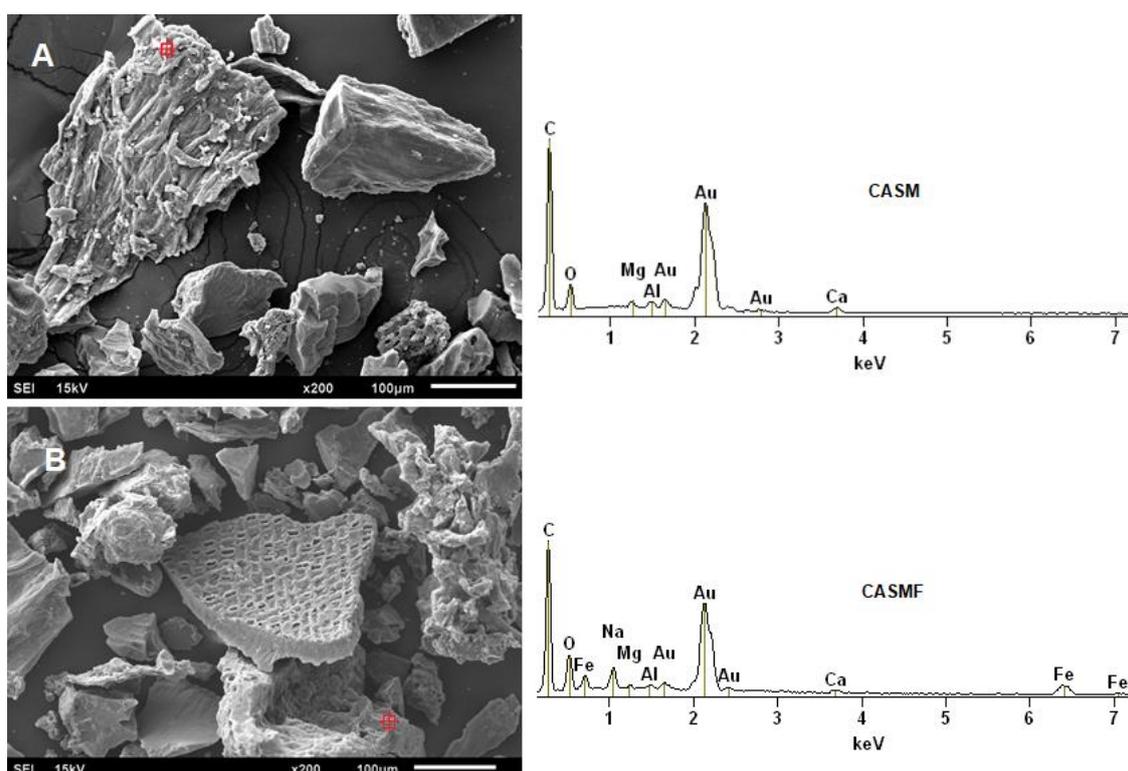
5.2.5 MEV e EDS dos carvões CASM e CASMF

A microscopia eletrônica de varredura foi utilizada para avaliar a estrutura das amostras CASM e CASMF (Figura 11). Ambos os carvões apresentam superfície porosa, onde é possível visualizar poros de diferentes tamanhos, como confirmado pelos resultados da distribuição de tamanho de poros dos suportes (Figura 10b e 10d). Tais estruturas fornecem a característica desejável para que os suportes sejam empregados no processo de imobilização de enzimas. Além disso, o CASM e o CASMF apresentam estrutura porosa adequada para imobilizar a lipase, cujas dimensões são em torno de 4 nm (SERRA et al., 2010), bem como a difusão do substrato até o seu sítio catalítico e dos produtos do processo de esterificação (BRITO et al., 2020).

Ainda na Figura 11 são apresentados os dados obtidos a partir da análise EDS para os pontos identificados em vermelho na imagem MEV. Sendo possível detectar por meio dos espectros do CASM a presença de carbono, oxigênio, magnésio e cálcio, que são

elementos químicos associados a estrutura do carvão ativado e também a composição do resíduo de sabugo de milho utilizado como precursor. Na superfície do CASMF foi possível observar além dos elementos já citados, diferentes picos que indicam a presença do ferro, complementando-se a análise de FTIR do suporte metalizado (Figura 8) cujo pico que indicaria as partículas de ferro não foi observado, bem como do sódio, provenientes do tratamento para inserção das partículas metálicas.

Figura 11. Microscopia Eletrônica de Varredura e espectros EDS dos suportes CASM (A) e CASMF (B).



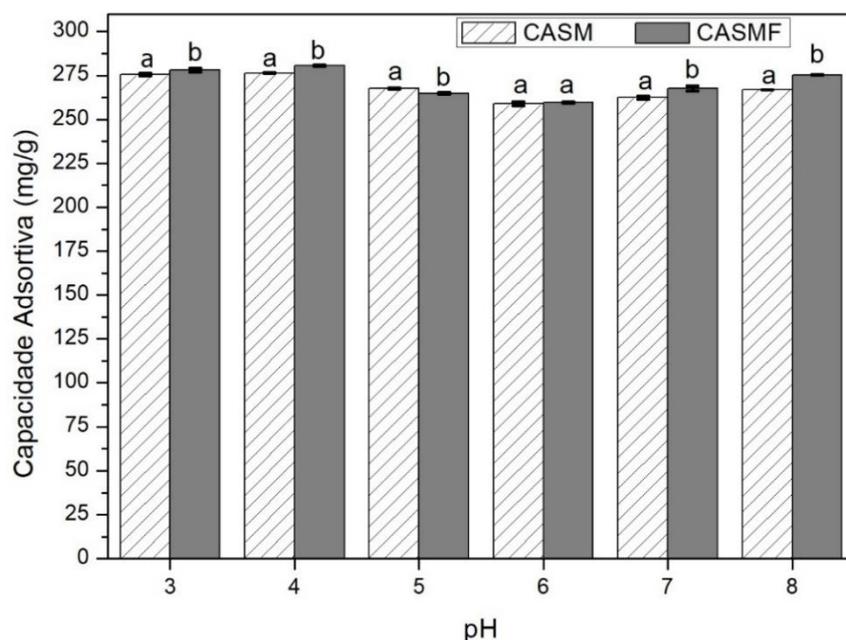
5.3 Imobilização de lipase e Atividade hidrolítica da enzima

5.3.1 Influência do pH inicial da solução no processo de imobilização

Visando determinar as melhores condições do processo de imobilização, foi realizado um estudo do efeito do pH, visto que esse parâmetro permite definir a carga líquida da proteína e determinar a contribuição das interações eletrostáticas entre a enzima e o suporte. Na Figura 12 estão apresentados os resultados da capacidade adsortiva dos carvões CASM e CASMF em função das variações de pH. É possível observar que para ambos os suportes as maiores capacidades adsortivas ocorreram nos valores de pH 3,0 e

4,0. Dessa forma, o valor de pH 4,0 foi escolhido, para ambos os suportes, por proporcionar um meio menos ácido, o que, para o caso do CASMF, pode reduzir as perdas por lixiviação das partículas metálicas. Ainda na Figura 12, verifica-se que no valor de pH 4,0 escolhido houve diferença significativa para capacidade de lipase adsorvida dos carvões CASM e CASMF.

Figura 12. Avaliação do efeito do pH na capacidade adsortiva da lipase nos carvões ativados e comparação entre os suportes CASM e CASMF. Médias seguidas pela mesma letra mostra que os suportes não diferem significativamente entre si, para cada pH estudado a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

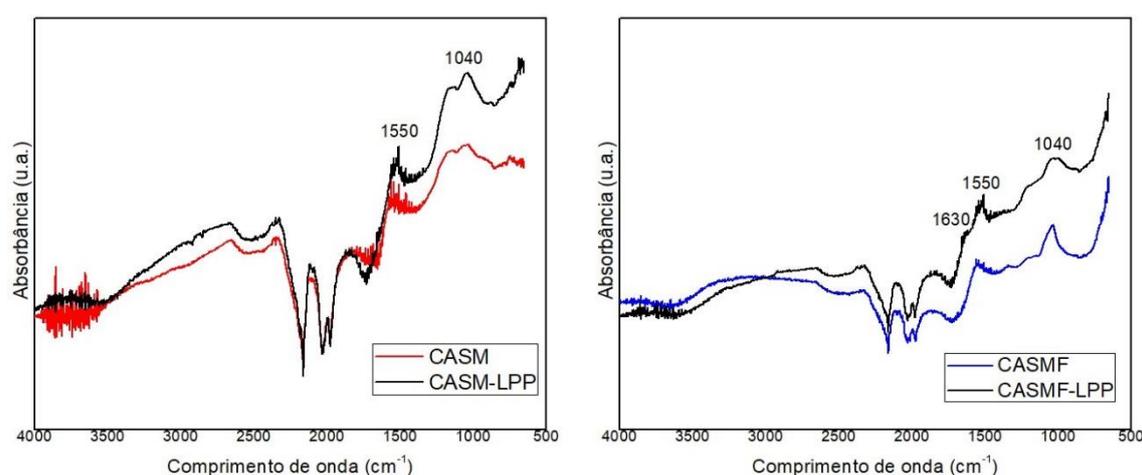


O ponto isoelétrico (pI) da lipase ácida está entre pH 4,0 e 5,0 e isso significa que acima desses valores de pH a enzima apresentará cargas negativas e abaixo desses valores carga positiva. Ao analisar o pH_{PCZ} dos carvões e o pI da enzima nota-se que em pH 4,0, tanto o CASM quanto o CASMF possuem cargas superficiais positivas e a lipase apresenta carga neutra. Logo, a maior capacidade adsortiva do CASM e CASMF se deu próximo ao pI da enzima (pH 4,0) onde houve pouca contribuição de interações eletrostáticas e maior contribuição de interações hidrofóbicas. De acordo com Binhayeeding et al. (2020) próximo ao seu pI a enzima tende a formar, de forma espontânea, agregados menos ativos e valores de pH mais extremos pode acarretar uma desnaturação irreversível, o que explica a redução da capacidade adsortiva à medida que se aumentou o pH da solução de imobilização.

5.3.1.1 Espectrofotometria de absorção no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) dos derivados

Comparando os espectros obtidos por FTIR dos suportes CASM e CASMF com os seus respectivos derivados (CASM-LPP e CASMF-LPP) (Figura 13), é possível observar um aumento da intensidade dos picos relacionado com as interações que ocorrem entre a enzima e os suportes, principalmente em 1630 cm^{-1} e 1550 cm^{-1} , que são associados aos grupos amida I e II e em 1040 cm^{-1} relacionado a presença da α -hélice, característicos da lipase (JOSHI, SHARMA e KUILA, 2019).

Figura 13. Espectros obtidos por FTIR para os derivados CASM-LPP e CASMF-LPP.

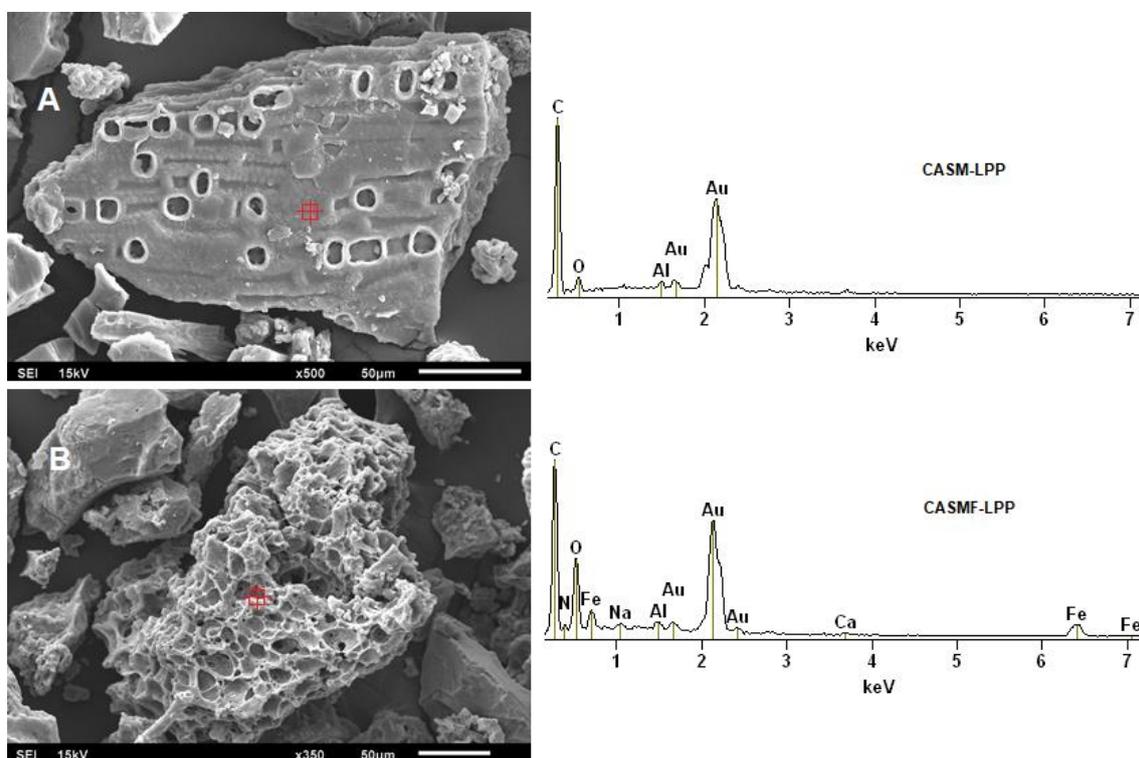


5.3.1.2 Caracterização dos derivados por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e por EDS

Para caracterizar a morfologia dos derivados a técnica de MEV e o espectro EDS foram novamente empregados. A Figura 14 mostra que a estrutura porosa do carvão foi mantida, porém a superfície dos carvões torna-se menos rugosa devido a presença da lipase imobilizada, a qual se difunde preferencialmente no interior dos poros e após ocupá-los, espalham-se para a superfície externa, deixando apenas traços da enzima na superfície (ALMEIDA et al. 2017; BRITO et al., 2020). Isso é confirmado através dos espectros de EDS do derivado CASM-LPP, com a presença de picos associados a presença do carbono e do oxigênio na sua superfície, sugerindo que a adsorção da lipase ocorreu no interior dos poros. Diferente do espectro para o CASMF-LPP, onde foi possível identificar a presença do nitrogênio e o aumento da intensidade do pico associado ao oxigênio, indicando a presença da proteína na superfície do carvão. Esses resultados

confirmam a presença da ligação entre a enzima e as partículas metálicas incorporadas na superfície do carvão, favorecendo a adsorção da enzima na superfície do suporte.

Figura 14. MEV e espectros EDS da lipase immobilizada nos suportes CASM-LPP (A) e CASMF-LPP (B).



5.3.2 Influência do pH e da temperatura do meio reacional na atividade hidrolítica da lipase livre e dos derivados

Quando a enzima se liga ao suporte, pode ocorrer mudanças nas suas propriedades e no seu comportamento, isso porque o processo de imobilização altera o ambiente molecular natural da enzima e com isso os efeitos sobre estabilidade, propriedades cinéticas e especificidade devem ser considerados. A estrutura conformacional da molécula pode sofrer alterações e acarretar em uma acessibilidade reduzida do substrato para o sítio ativo ou a enzima pode ser imobilizada numa posição na qual esse sítio fique inacessível; pode haver efeitos decorrentes do processo de transferência de massa (resistência na difusão de substrato até o centro catalítico) e efeitos no microambiente onde ocorre o processo, que também afeta na atividade catalítica (SECUNDO, 2013).

O pH é um destes parâmetros, que influencia fortemente o ambiente iônico de uma enzima e afeta as suas interações com o substrato. Dessa forma, foi também investigado o efeito do pH sobre a atividade da lipase livre e imobilizada (Figura 15). É possível

observar que a atividade da lipase livre aumenta com o aumento do pH do meio, tendo em pH 8,0 a sua maior atividade. Segundo Mendes, Castro e Oliveira (2012), a lipase pancreática suína exibe a maior atividade em meio alcalino dentro do intervalo de 7,3-9,0, conforme observado. Isso pode ser explicado pela melhor adaptação da enzima ao meio de reação alcalino, que possibilita maior acesso ao substrato e conseqüentemente um aumento da taxa de hidrólise. Para os derivados, tanto no CASM-LPP quanto no CASMF-LPP, também é possível observar um aumento da atividade até pH 7,0, ocorrendo a redução da mesma em pH 8,0, mostrando que o comportamento da lipase imobilizada muda, em relação à livre, sendo suscetível, nesse caso, a variações no pH do meio, o qual altera a estrutura conformacional da enzima. Esse tipo de alteração entre o comportamento da lipase livre e imobilizada, em função das variações do microambiente reacional, também foi observada por Spinelli et al. (2014), Dikshit e Kim (2020), Mosayebi et al. (2020) e Brito et al. (2020).

O processo de transferência de massa que rege a imobilização de enzimas inicia-se com o substrato migrando da solução por convecção e/ou difusão até chegar ao sítio catalítico e no caso de suportes porosos, o substrato deve se difundir no interior dos poros até atingir o sítio ativo da enzima (SOUZA JÚNIOR. et al., 2020). Ao comparar a enzima livre com a enzima imobilizada observa-se que há um aumento da atividade da lipase quando suportada nos carvões sintetizados, sendo superior para o CASMF em relação ao CASM. Ainda na Figura 15 é possível comparar o efeito dos suportes em relação a atividade hidrolítica da lipase e também da enzima livre. Verifica-se que na faixa de pH 5,0-8,0 ocorre uma diferença significativa da atividade da lipase imobilizada, demonstrando que os carvões atuam de forma diferente na imobilização da enzima, fazendo com que haja uma melhoria da sua atividade. A principal vantagem da presença dos íons metálicos é que eles ajudam na conformação favorável do sítio ativo das enzimas, regulando a orientação ideal que a enzima deve ter com o suporte e também desempenham um papel na sua estabilidade, possibilitando o aumento da atividade enzimática (VAGHARI et al., 2016; ALTINKAYNAK et al., 2020). Esses resultados demonstram a eficácia da combinação das partículas metálicas com o carvão ativado.

O pH 7,0 foi o escolhido como o pH do meio de reação, pois foi onde se alcançou maior atividade dos derivados estudados: $(71,9 \pm 1,1)$ U para o CASM-LPP e $(79,8 \pm 1,7)$ U para o CASMF-LPP. Na sequência foi analisada a influência da temperatura da atividade hidrolítica da lipase livre e imobilizada nos carvões (Figura 16).

Figura 15. Avaliação do efeito do pH na determinação da atividade hidrolítica da lipase livre e dos derivados CASM-LPP e CASMF-LPP e comparação entre a enzima livre e o efeito dos suportes. Médias seguidas pela mesma letra para cada valor de pH não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

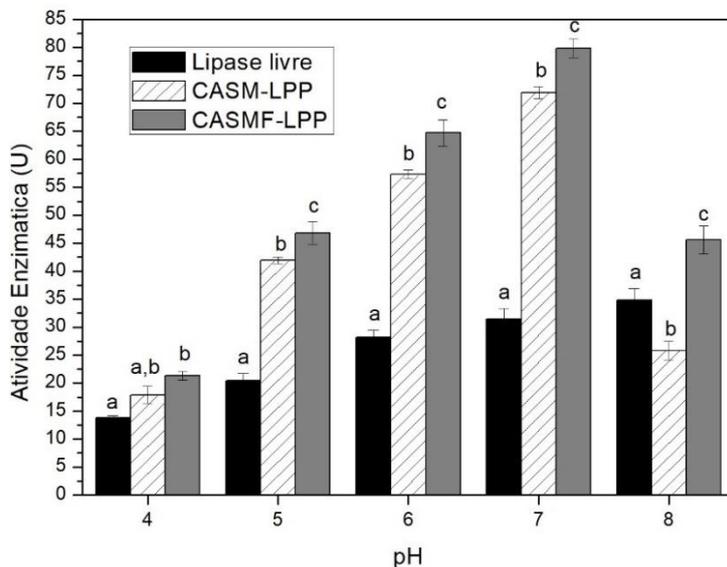
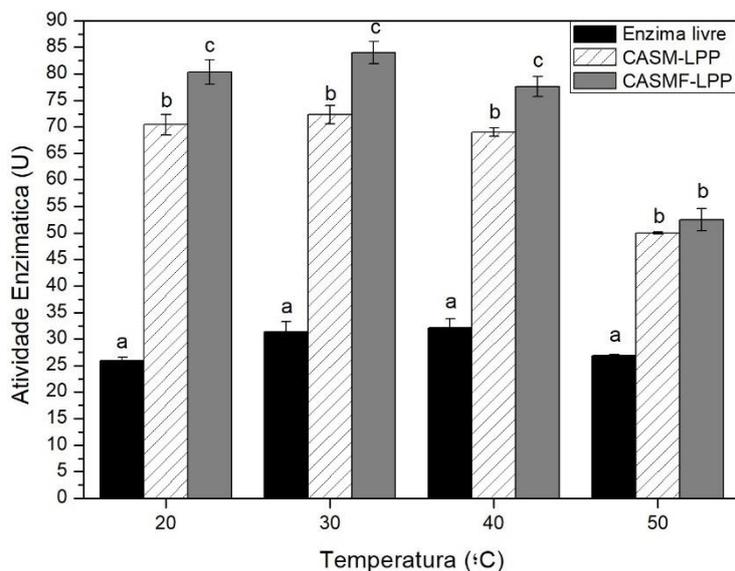


Figura 16. Avaliação do efeito da temperatura na determinação da atividade hidrolítica da lipase livre e imobilizada em CASM-LPP e CASMF-LPP e comparação entre a enzima livre e o efeito dos suportes. Médias seguidas pela mesma letra para cada valor de pH não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.



A lipase pancreática suína é uma enzima mesófila (MENDES, OLIVEIRA e CASTRO, 2012) e através da Figura 16 vê-se que tanto a enzima livre, quanto a imobilizada apresentam o mesmo comportamento diante do aumento da temperatura,

tendo a lipase imobilizada maior atividade a 30 °C: $(72,3 \pm 1,7)$ U para o CASM-LPP e $(84,0 \pm 2,1)$ U para o CASMF-LPP. Também pode ser observado que a atividade específica da lipase imobilizada em ambos os suportes é superior à da enzima livre. Ao se considerar o efeito da metalização observa-se que a modificação levou ao aumento da atividade da enzima imobilizada para temperaturas inferiores a 50 °C, porém para a temperatura mais extrema (50°C) não houve diferença significativa entre os suportes. O aumento da atividade da enzima imobilizada sugere que a imobilização hidrofóbica ajuda a proteger a estrutura da enzima de mudanças conformacionais induzidas pela temperatura, além de limitar também o movimento que ocorre devido a agitação das moléculas, quando ocorre a adição de energia no sistema. Assim ao fixar a enzima no suporte se reduz a susceptibilidade à desnaturação pelo calor, a qual acaba reduzindo a atividade enzimática e permite promover maior estabilidade e maiores rendimentos de reação (MARKOGLU e WAINER, 2003; BINHAYEEDING et al., 2020).

5.4 Síntese do acetato de isoamila catalisada pelos biocatalisadores derivados

A eficiência da imobilização enzimática se dá, segundo Basso e Serban (2019), quando o transportador selecionado consegue maximizar a estabilidade física e enzimática do biocatalisador e através disso aumentar a concentração de produtos. Como confirmado, ao utilizar os suportes CASM e CASMF para imobilizar a lipase, obteve-se uma maior tolerância as variações no microambiente reacional, quando comparado a enzima na sua forma livre. O principal objetivo da imobilização de enzimas é aumentar a economia dos processos biocatalíticos, visto que suas propriedades catalíticas melhoram, torna-se possível reutilizar o catalisador e eles tornam-se mais estáveis (AGGARWAL et al., 2021). Assim a utilização de lipases imobilizadas mostra-se vantajosa, principalmente no setor de produção de aromas, pois permite a comercialização do produto final como natural. O acetato de isoamila é um exemplo de éster de cadeia curta, que pode ser obtido através da reação catalisada por essa enzima e é amplamente utilizado como aromatizante na indústria de alimentos pela sua fragrância frutada de banana (ZARE et al., 2019).

Diante do exposto, o potencial de aplicação da lipase imobilizada nos carvões ativados CASM e CASMF, na síntese do éster acetato de isoamila foi investigado e os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 3. Uma conversão do éster superior a 90% foi obtida para ambos os derivados, em um tempo de reação de 240 min a 40 °C. Entre os suportes, a maior conversão do aroma foi alcançada ao usar a enzima suportada

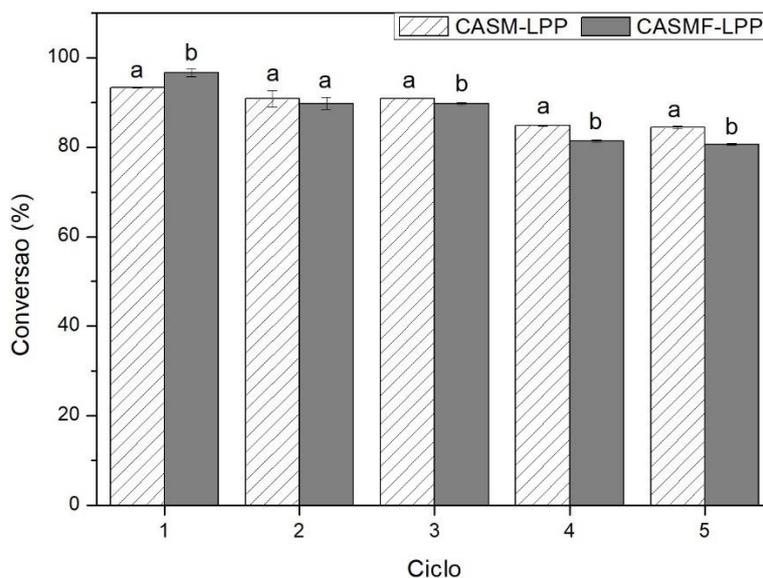
no CASMF, o que está relacionado com a maior atividade da lipase imobilizada nesse suporte, quando comparado com o CASM.

Tabela 3. Conversão do ácido acético em acetato de isoamila (Y%) catalisada pelos derivados (CASM-LPP e CASMF-LPP).

Parâmetro	Amostra	
	CASM-LPP	CASMF-LPP
Y (%)	93,23 ± 0,12	96,62 ± 0,85

Visto que a imobilização possibilita a reutilização da enzima, mantendo sua atividade ao longo de vários ciclos de reação, a estabilidade operacional do derivado foi avaliada repetidamente por 5 ciclos na síntese do acetato de isoamila (Figura 17). É possível visualizar, a princípio, que a lipase imobilizada em ambos os suportes apresentou boa estabilidade durante as reutilizações, alcançando no último ciclo de estudo uma conversão de (84,84 ± 0,11) % para o CASM-LPP e de (81,35 ± 0,23) % para o CASMF-LPP, o que representa aproximadamente 9,0% e 19,0%, de redução de conversão, em relação ao primeiro ciclo, para o CASM-LPP e CASMF-LPP, respectivamente. A partir disso, é observado que o CASMF-LPP tem sua eficiência reduzida ao longo dos ciclos, diferente do CASM-LPP que se mantém praticamente estável durante os 3 ciclos iniciais e a partir do terceiro apresenta maior taxa de conversão do éster comparado ao CASMF-LPP. Essa redução está associada com a lixiviação dos íons metálicos para o meio de reação, que reduz consequentemente a concentração de lipase fixada no suporte (WANG et al., 2015; LONG et al., 2021). Esse inconveniente poderia ser solucionado, provavelmente, pela incorporação de ligantes especiais (agentes quelantes) junto com as partículas metálicas, que evitaria a ocorrência da lixiviação (CARREÑO et al., 2002).

Figura 17. Ciclo de reutilização da lipase imobilizada em carvão ativado (CASM e CASMF) na reação de esterificação do acetato de isoamila. Médias seguidas pela mesma letra, em cada ciclo estudado, mostra que as médias não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.



Os rendimentos encontrados estão condizentes com os reportados na literatura para a síntese do aroma de banana empregando lipase como biocatalisador. Sarno et al (2017) utilizaram a enzima imobilizada em nanopartículas de Fe_3O_4 para síntese do éster, onde foi obtida uma conversão de 61%. Brito et al. (2020) utilizaram carvão ativado e funcionalizado com glutaraldeído para imobilização da lipase e conseguiu manter durante 5 ciclos uma conversão de 93% e 91% de aroma de banana, respectivamente. Já Taghizadeh et al. (2021) obtiveram 78% de conversão em éster utilizando uma membrana zeolítica para imobilizar lipase.

6. CONCLUSÃO

O sabugo de milho apresentou características promissoras para ser utilizado como material precursor de carbono na produção de carvão ativado obtido pelo método da ativação química, visto que foi originado uma estrutura de carvão mesoporosa, com valor de área superficial BET e volume de poros adequados para ser empregado em processos de adsorção. Através da inserção de partículas metálicas foi possível modificar a estrutura amorfa do carvão ativado sintetizado.

No estudo da influência do pH da solução enzimática de imobilização da lipase, o pH 4,0 foi escolhido para ambos os suportes, que mostraram atuar de forma diferente em relação a quantidade de lipase imobilizada, sendo o CASMF responsável pela maior capacidade adsortiva.

No estudo da influência do pH do meio para determinação da atividade hidrolítica da lipase, os derivados apresentaram comportamento diferente em relação a enzima livre diante das variações no meio de reação, confirmando que quando a enzima é imobilizada ocorrem mudanças conformacionais na sua estrutura, pois o seu ambiente natural é alterado. O pH 7,0 foi o responsável pela maior atividade enzimática em ambos os suportes. Já o estudo da influência da temperatura do meio para determinação da atividade hidrolítica da lipase mostrou o mesmo comportamento para a enzima livre e imobilizada conforme a temperatura do meio aumentava, entretanto, a lipase imobilizada mostrou um aumento significativo da sua atividade.

Os derivados foram utilizados na síntese do éster acetato de isoamila (aroma de banana), onde foi verificado, em ambos, um rendimento de esterificação superior a 90%, além de ter apresentado estabilidade ao longo de 5 ciclos de reutilização sendo o CASMF-LPP menos estável, pois ocorre a lixiviação das partículas metálicas para o meio de reação, que reduz consequentemente a concentração de lipase fixada no suporte.

A incorporação das partículas de ferro no carvão ativado gerou um suporte promissor para a imobilização de lipase, visto que houve um aumento da sua atividade enzimática e dessa forma apresenta potencial para ser utilizado na síntese de aromas, entretanto deve ser avaliado uma forma de reduzir a lixiviação das partículas metálicas, para que haja maior possibilidade de reutilização do biocatalisador.

7. REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. S.; DARWEESH, T. M. Preparation and Characterization of Activated Carbon for Adsorption of Fluoroquinolones Antibiotics. **Journal of Engineering**, v. 22, n. 8, p. 140-157, 2016.
- AGGARWAL, S.; CHAKRAVARTY, A.; IKRAM, S. A comprehensive review on incredible renewable carriers as promising platforms for enzyme immobilization & thereof strategies. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 167, p. 962-986, 2021.
- ALMEIDA, L. C.; BARBOSA, A. S.; FRICKS, A. T.; FREITAS, L. S.; LIMA, A. 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
- ALTINKAYNAK, C.; GULMEZ, C.; ATAKISI, O.; ÖZDEMİR, N. Evaluation of organic-inorganic hybrid nanoflower's enzymatic activity in the presence of different metal ions and organic solvents. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 164, p. 162–171, 2020.
- ANTUNES, R. S.; LOPES, F. M.; BRITO, A. O.; GARCIA, L. F.; FERRAZ, D. F.; GIL, E. S. Enzimas vegetais: extração e aplicações biotecnológicas. **Infarma - Ciências Farmacêuticas**, v. 29, p.181-198, 2017.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists). Official Methods of Analysis, 17th ed. **Association of Official Analytical Chemists**, Gaithersburg, MD. 2000.
- ARUMUGAM, A.; MALOLAN, V. V.; PONNUSAMI, V. Contemporary Pretreatment Strategies for Bioethanol Production from Corncobs: A Comprehensive Review. **Waste and Biomass Valorization**, 2020.
- ARUN, K. B.; MADHAVAN, A.; SINDHU, R.; BINOD, P. PANDEY, A.; R, R.; SIROHI, R. Remodeling agro-industrial and food wastes into value-added bioactives and biopolymers. **Industrial Crops & Products**, v. 154, 2020.
- ASHKAN, Z.; HEMMATI, R.; HOMAIEI, A.; DINARI, A.; JAMLIDOOST, M.; TASHAKOR, A. Immobilization of enzymes on nanoinorganic support materials: An update. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 168, p. 708-721, 2021.
- ASLAN, Y.; SHARIF, Y. M.; ŞAHİN, Ö. Covalent immobilization of *Aspergillus niger* amyloglucosidase (ANAG) with ethylenediamine-functionalized and glutaraldehyde-activated active carbon (EFGAAC) obtained from sesame seed shell. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 142, p. 222-231, 2020.
- 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.

- ASTUTI, W.; SULISTYANINGSIHB, T.; KUSUMASTUTIB, E.; THOMAS, G. Y. R. S.; KUSNAD, R. Y. Thermal conversion of pineapple crown leaf waste to magnetized activated carbon for dye removal. **Bioresource Technology**, v. 287, 2019.
- BAPTISTA, S. L.; CARVALHO, L. C.; ROMANÍ, A.; DOMINGUES, L. Development of a sustainable bioprocess based on green technologies for xylitol production from corn cob. **Industrial Crops & Products**, v. 156, 2020.
- BARRET, E. P., JOYNER, L. G., HALENDA, P. P., The determination of pore volume and area distributions in porous substances. I. Computations from nitrogen isotherms, **Journal of The American Chemical Society**, v.73, 373-380, 1951.
- BASSI, J. J.; TODERO, L. M.; LAGE, F. A. P.; KHEDY, G. I.; DELL DUCAS, J.; CUSTÓDIO, A. P.; PINTO, M. A.; MENDES, A. A. Interfacial activation of lipases on hydrophobic support and application in the synthesis of a lubricant ester. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 92, p. 900-909, 2016.
- BASSO, A.; SERBAN, S. Industrial applications of immobilized enzymes – A review. **Molecular Catalysis**, v. 479, 2019.
- BAYOUT, I.; BOUZEMI, N.; GUO, N.; MAO, X.; SERRA, S.; RIVA, S.; SECUNDO, F. Natural flavor ester synthesis catalyzed by lipases. **Flavour and Fragrance Journal**, v.35, n. 2, p. 209-218, 2020.
- BAYRAMOĞLU, G.; HAZER, B.; ALTINTAŞ, B.; ARICA, M. Y. Covalent immobilization of lipase onto amine functionalized polypropylene membrane and its application in green apple flavor (ethyl valerate) synthesis. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 1, p. 372–378, 2011.
- BINHAYEEDING, N.; YUNU, T.; PICHID, N.; KLOMKLAO, S.; SANGKHARAK, K. Immobilisation of *Candida rugosa* lipase on polyhydroxybutyrate via a combination of adsorption and cross-linking agents to enhance acylglycerol production. **Process Biochemistry**, v. 95, p. 174-185, 2020.
- BISWAS, B.; PANDEY, N.; BISHT, Y.; SINGH, R.; KUMAR, J.; BHASKAR, T. Pyrolysis of agricultural biomass residues: Comparative study of corn cob, wheat straw, rice straw and rice husk. **Bioresource Technology**, v. 237, p. 57-63, 2017.
- BILAL, M.; ZHAO, Y.; RASHEED, T.; IQBAL, H. M. N. Magnetic nanoparticles as versatile carriers for enzymes immobilization: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 120, p. 2530-2544, 2018.
- BORNSCHEUER, U. T. Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 26, n. 1, p. 73–81, 2002.
- BRADFORD, M. M. A. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **RDC nº 2, de 15 de janeiro de 2007**. Aprova o Regulamento Técnico sobre Aditivos Aromatizantes. Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, 15 jan. 2007.

BRENA, B.; GONZÁLEZ-POMBO, P.; BATISTA-VIEIRA, F. **Immobilization of Enzymes: A Literature Survey**. In: GUISAN, J. M. (ed.), *Immobilization of Enzymes and Cells: Third Edition, Methods in Molecular Biology*, New York: Springer, 2013. p.15-31.

BRITO, M. J. P.; BAUER, L. C.; FLORES SANTOS, M. P.; SANTOS, L. S.; BONOMO, R. C. F.; FONTAN, R. C. I.; VELOSO, C. M. Lipase immobilization on activated and functionalized carbon for the aroma ester synthesis. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 309, 2020.

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.

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

CARREÑO, N. L. V.; LEITE, E. R.; SANTOS, L. P. S.; LISBOA-FILHO, P. N.; LONGO, E.; ARAÚJO, G. C. L.; BARISON, A.; FERREIRA, A. G.; VALENTINI, A.; PROBST, L. F. D. Síntese, caracterização e estudo das propriedades catalíticas e magnéticas de nanopartículas de Ni dispersas em matriz mesoporosa de SiO₂. **Química Nova**, v. 25, n. 6a, p. 935-942, 2002.

CASTRO, A. M.; PEREIRA JR., N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 33, n. 1, p. 181-188, 2010.

CASTRO, H.F.; MENDES, A.A; SANTOS, J.C.; AGUIAR, C.L. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. **Química Nova**, v. 27, n. 1, p. 146-156, 2004.

CHIOU, S.-H.; WU, W.-T. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on chitosan with activation of the hydroxyl groups. **Biomaterials**, v. 25, n. 2, p. 197–204, 2004.

CONAB (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO). **Séries históricas de área semeada, produtividade e produção**. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/analises-do-mercado-agropecuario-e-extrativista/analises-do-mercado/historico-mensal-de-milho/item/download/28400_a7ac31374a6551d606bc8939e829427c>. Acesso em 03/11/2020.

CONAB (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO). **Acompanhamento da safra brasileira de grãos, Safra 2019/20**, v. 7, n. 4, Brasília: CONAB, 2020.

CORTEZ, D. V.; CASTRO, H. F.; ANDRADE, G. S. S. Potencial catalítico de lipases ligadas ao micélio de fungos filamentosos em processos de biotransformação. **Química Nova**, v. 40, n. 1, p. 85-96, 2017.

COSTA-SILVA, T. A.; CARVALHO, A. K. F.; SOUZA, C. R. F.; DE CASTRO, H. F.; BACHMANN, L.; SAID, S.; OLIVEIRA, W. P. Immobilized enzyme-driven value enhancement of lignocellulosic-based agricultural byproducts: Application in aroma synthesis. **Journal of Cleaner Production**, v. 284, 2021.

DAI, L.; WANG, Y.; LIU, Y.; RUAN, R.; He, C.; YU, Z.; JIANG, L.; ZENG, Z.; TIAN, X. Integrated process of lignocellulosic biomass torrefaction and pyrolysis for upgrading bio-oil production: A state-of-the-art review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 107, p. 20–36, 2019.

DALLA-VECHIA, R.; NASCIMENTO, M. G.; SOLDI, V. Aplicações de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 623-630, 2004.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de Alimentos de Fennema**. 4ª ed. Porto Alegre: Artmed. 2010.

DELGADILLO-VELASCO, L.; HERNÁNDEZ-MONTOYA, V.; RAMÍREZ-MONTOYA, L. A.; MONTES-MORÁN, M. A.; DEL ROSARIO MORENO-VIRGEN, M.; RANGEL-VÁZQUEZ, N. A. Removal of phosphate and aluminum from water in single and binary systems using iron-modified carbons. **Journal of Molecular Liquids**, v. 323, 2021.

DENG, H.; ZHANG, G.; XU, X.; TAO, G. DAI, J. Optimization of preparation of activated carbon from cotton stalk by microwave assisted phosphoric acid-chemical activation. **Journal of Hazardous Materials**, v. 182, p. 217–224, 2010.

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.

DIKSHIT, P. K.; KIM, B. S. Bacterial cellulose production from biodiesel-derived crude glycerol, magnetic functionalization, and its application as carrier for lipase immobilization. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 153, p. 902-911, 2020.

DIONIZIO, A. F.; VALE, A. T.; MOREIRA, A. C. O.; GALVÃO, L. G. O.; CHAVES, B. S.; COSTA, M. A. Agregação de valor a resíduos agroindustriais para fins energéticos. **Rev. de Ciências Agrárias**, v.42, n. 2, p. 251-260, jun. 2019.

DU, C.; LI, Y.; ZONG, H.; YUAN, T.; YUAN, W.; JIANG, Y. Production of bioethanol and xylitol from non-detoxified corn cob via a twostage fermentation strategy. **Bioresource Technology**, v. 310, 2020.

- DUAN, X.-L.; YUAN, C.-G.; JING, T.-T.; YUAN, X.-D. Removal of elemental mercury using large surface area micro-porous corn cob activated carbon by zinc chloride activation. **Fuel**, v. 239, p. 830–840, 2019.
- DUJEARIC-STEPHANE, K.; PANTAA, P.; SHULGAB, Y.M.; KUMARC, A.; GUPTAA, M.; KUMAR, Y. Physico-chemical characterization of activated carbon synthesized from *Datura metel's* peels and comparative capacitive performance analysis in acidic electrolytes and ionic liquids. **Bioresource Technology Reports**, v. 11, 2020.
- ELIAS, N.; WAHAB, R. A.; CHANDREN, S.; ABDUL RAZAK, F. I.; JAMALIS, J. Effect of operative variables and kinetic study of butyl butyrate synthesis by *Candida rugosa* lipase activated by chitosan-reinforced nanocellulose derived from raw oil palm leaves. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 130, 2019.
- ESFANDMAZ, S.; CHAIBAKHSH, N.; MORADI-SHOEILI, Z.; MOHAMMADI, A. Eco-friendly synthesis of maleate ester: A comparison between solid acid and enzyme-catalyzed esterification. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, v. 8, p. 82-87, 2018.
- FELIPE, L. O.; OLIVEIRA, A. M.; BICAS, J. L. Bioaromas – Perspectives for sustainable development. **Trends in Food Science & Technology**, v. 62, p. 141–153, 2017.
- FERMANELLI, C. S.; CÓRDOBA, A.; PIERELLA, L. B.; SAUX, C. Pyrolysis and copyrolysis of three lignocellulosic biomass residues from the agro-food industry: A comparative study. **Waste Management**, v. 102, p. 362–370, 2020.
- FERNANDES, K. F.; LIMA, C. S.; LOPES, F. M. Técnicas de Imobilização de Enzimas. **Revista Processos Químicos**, v. 4, n. 7, p. 53-58, 2010.
- FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; ARMISÉN, P.; SABUQUILLO, P.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; GUISÁN, J. M. Immobilization of lipases by selective adsorption on hydrophobic supports. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 93, p. 185–197, 1998.
- FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Lipase from *Thermomyces lanuginosus*: Uses and prospects as an industrial biocatalyst. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 62, p. 197–212, 2010.
- FERREIRA, T. C.; ARAUJO, N. C. Cultivo orgânico de *Zea mays* L. com Manipueira. In: Congresso Brasileiro de Mamona, 5; Simpósio Internacional de Oleaginosas Energéticas, 2 & I Fórum Capixaba de Pinhão Manso, 2012, Guarapari. Desafios e Oportunidades: **Anais...** Campina grande: Embrapa Algodão, 2012. p. 301.
- FOPASE R, PARAMASIVAM S, KALE P, PARAMASIVAN B, Strategies, challenges and opportunities of enzyme immobilization on porous silicon for biosensing applications. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 8, n. 5, 2020.
- FUJISHIGE, M.; YOSHIDA, I.; TOYA, Y.; BANBA, Y.; OSHIDA, K.; TANAKA, Y.; DULYASEREE, P.; WONGWIRIYAPAN, W; TAKEUCHI, K. Preparation of activated

carbon from bamboo-cellulose fiber and its use for EDLC electrode material. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 5, n. 2, p. 1801–1808, 2017.

FURLAN, F. L.; FILHO, N. C.; CONSOLIN, M. F. B.; GONÇALVES, M. S.; VALDERRAMA, P.; GENENA, A. K. Use of agricultural and agroindustrial residues as alternative adsorbents of manganese and iron in aqueous solution. **Rev. Ambient. Água**, Taubaté, v. 13, n. 2, 2018.

GARG, D.; KUMAR, S.; SHARMA, K.; MAJUMDER, C. B. Application of waste peanut shells to form activated carbon and its utilization for the removal of Acid Yellow 36 from wastewater. **Groundwater for Sustainable Development**, v. 8, p. 512-519, 2019.

GEBREEGZIABHER, T. B.; WANG, S.; NAM, H. Adsorption of H₂S, NH₃ and TMA from indoor air using porous corncob activated carbon: Isotherm and kinetics study. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 7, 2019.

GHOLAMIYAN, S.; HAMZEHLOO, M.; FARROKHANIA, A. RSM otimizado adsorptivo remoção de eritromicina usando magnético ativado carbono: Adsorção isoterma, cinética modelagem e termodinâmico estudo. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, v. 17, 2020.

GIRELLI, A. M.; ASTOLFI, M. L.; SCUTO, F. R. Agro-industrial wastes as potential carriers for enzyme immobilization: A review. **Chemosphere**, v. 244, 2020.

GÍRIO, F. M.; FONSECA, C.; CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L. C.; MARQUES, S.; BOGEL-ŁUKASIK, R. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4775–4800, 2010.

Global flavours & fragrances market projecting a CAGR of 2.76% to 2023, **Focus on Surfactants**, v. 2019, n. 10, p. 4, 2019.

GONZÁLZ-GARCIA, 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.

GUMEL, A. M.; ANNUAR, M. S. M. Thermomyces lanuginosus lipase-catalyzed synthesis of natural flavor esters in a continuous flow microreactor. **3 Biotech**, v. 6, n.1, 2016.

HERNÁNDEZ, Á. S. M.; ARMENTIA, B. M.; RODRÍGUEZ, A. S. M.; MEDINA, A. A. El laboratorio clínico en la hipersensibilidad alérgica a enzimas alimentarias en población cada vez más joven. **Revista Del Laboratorio Clínico**, v. 8, n. 4, p. 151–153, 2015.

HRIBERNIK, S.; SFILIGOJ-SMOLE, M.; BELE, M.; GYERGYEK, S.; JAMNIK, J.; STANA-KLEINSCHEK, K. Synthesis of magnetic iron oxide particles: Development of

an in situ coating procedure for fibrous materials, **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 400, p. 58–66, 2012.

HOMAEI, A. A.; SARIRI, R.; VIANELLO, F.; STEVANATO, R. Enzyme immobilization: an update. **Journal of Chemical Biology**, v. 6, p. 185–205, 2013.

Industrial enzymes – a global market overview. **Industry Experts**, 2020. Disponível em: <<https://industry-experts.com/verticals/biotechnology/industrial-enzymes-a-global-market-overview>> Acesso em: 07/11/2020.

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

JAWAD, A.H.; BARDHAN, M.; ISLAM, A.; ISLAM, A.; SYED-HASSAN, S. S. A.; SURIP, S. N. Insights into the modeling, characterization and adsorption performance of mesoporous activated carbon from corn cob residue via microwave- assisted H₃PO₄ activation. **Surfaces and Interfaces**, v. 21, 2020.

JAWAD, A. H.; MOHAMMED, S. A.; MASTULI, M. S.; ABDULLAH, M. F. Carbonization of corn (*Zea mays*) cob agricultural residue by one-step activation with sulfuric acid for methylene blue adsorption. **Desalination and Water Treatment**, v. 118, p. 342–351, 2018.

JOSHI, R.; SHARMA, R.; KUILA, A. Lipase production from *Fusarium incarnatum* KU377454 and its immobilization using Fe₃O₄ NPs for application in waste cooking oil degradation. **Bioresource Technology Reports**, v. 5, 2019.

JUANG, R.-S.; YEI, Y.-C.; LIAO, C.-S.; LIN, K.-S.; LU, H.-C.; WANG, S.-F.; SUN, A.-C. Synthesis of magnetic Fe₃O₄/activated carbon nanocomposites with high surface area as recoverable adsorbents. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 90, p. 51–60, 2018.

KAHOUSH, M.; BEHARY, N.; CAYLA, A.; MUTEL, B.; GUAN, J.; NIERSTRASZ, V. Surface modification of carbon felt by cold remote plasma for glucose oxidase enzyme immobilization. **Applied Surface Science**, v. 476, p.1016–1024, 2019.

KANDASAMY, R.; JOHN KENNEDY, L.; VIDYA, C.; BOOPATHY, R.; SEKARAN, G. Immobilization of acidic lipase derived from *Pseudomonas gessardii* onto mesoporous activated carbon for the hydrolysis of olive oil. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 62, n. 1, p. 58-65, 2010.

KHAN A. A.; ALZOHAIRY M. A. Recent Advances and Applications of Immobilized Enzyme Technologies: A Review. **Research Journal of Biological Sciences**, v. 5, p. 565-575, 2010.

KHAN, N. R.; RATHOD, V. K. Enzyme catalyzed synthesis of cosmetic esters and its intensification: A review. **Process Biochemistry**, v. 50, n. 11, p. 1793–1806, 2015.

KLAAS, M.; GREENHALF, C.; OUADI, M.; JAHANGIRI, H.; HORNUNG, A.; BRIENS, C.; BERRUTI, F. The effect of torrefaction pre-treatment on the pyrolysis of corn cobs. **Results in Engineering**, v. 7, 2020.

KUCHARSKA, K.; RYBARCZYK, P.; HOŁOWACZ, I.; KONOPACKA-ŁYSKAWA, D.; SŁUPEK, E.; MAKOSĆ, P.; CIEŚLIŃSKI, H.; KAMIŃSKI, M. Influence of alkaline and oxidative pre-treatment of waste corn cobs on biohydrogen generation efficiency via dark fermentation. **Biomass and Bioenergy**, v. 141, 2020.

KUŚMIEREK, K.; SZALA, M.; ŚWIĄTKOWSKI, A. Adsorption of 2,4-dichlorophenol and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid from aqueous solution on carbonaceous materials obtained by combustion synthesis, **J. Taiwan Inst. Chem. Eng.**, v. 63, p. 371-378, 2016.

KWIATKOWSKI, M.; BRONIEK, E. An analysis of the porous structure of activated carbons obtained from hazelnut shells by various physical and chemical methods of activation. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 529, p. 443–453, 2017.

LEE, J. H.; LEE, J. H.; KIM, D. S.; YOO, H. Y.; PARK, C.; KIM, S. W. Biodiesel production by lipases co-immobilized on the functionalized activated carbon. **Bioresource Technology Reports**, v. 7, 2019.

LEITE, M. A. F. O. **Elaboração de carvão magnético para remoção de bisfenol A em águas contaminadas**. 2016. xi, 65 f., il. Dissertação (Mestrado em Nanociências e Nanobiotecnologia) – Universidade de Brasília, Brasília, 2016.

LI, X.; ZENG, D.; KE, P.; WANG, G.; ZHANG, D. Synthesis and characterization of magnetic chitosan microspheres for drug delivery. **RSC Adv.**, v. 10, p. 7163–7169, 2020.

LI, Y.; XING, B.; DING, Y.; HAN, X.; WANG, S. A critical review of the production and advanced utilization of biochar via selective pyrolysis of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 312, 2020.

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

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

LIU, Y.; ZHU, Z.; CHENG, Q.; REN, H.; WANG, S.; ZHAO, Y.; LI, J.; ZHU, J.; BING KONG, L. One-step preparation of environment-oriented magnetic coal-based activated carbon with high adsorption and magnetic separation performance. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 521, n. 1, 2021.

LONG, Y.; LI, S.; SU, Y.; WANG, S.; ZHAO, S.; WANG, S.; ZHANG, Z.; HUANG, W.; LIU, Y.; ZHANG, Z. Sulfur-containing iron nanocomposites confined in S/N co-

doped carbon for catalytic peroxymonosulfate oxidation of organic pollutants: Low iron leaching, degradation mechanism and intermediates. **Chemical Engineering Journal**, v. 404, 2021.

LOUIS, A. C. F.; VENKATACHALAM, S. Energy efficient process for valorization of corn cob as a source for nanocrystalline cellulose and hemicellulose production. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 163, p. 260-269, 2020.

LU, X.; JIANG, J.; SUN, K.; XIE, X. Preparation and characterization of sisal fiber-based activated carbon by chemical activation with zinc chloride, **Bulletin of the Korean Chemical Society**, v. 35, n. 1, p. 103-110, 2014.

LUQUE, L.; OUDENHOVEN, S.; WESTERHOF, R.; VAN ROSSUM, G.; BERRUTI, F.; KERSTEN, S.; REHMANN, L. Comparison of ethanol production from corn cobs and switchgrass following a pyrolysis-based biorefinery approach. **Biotechnology for Biofuels**, v. 9, n. 1, 2016.

MA, D.; WANG, Y.; HAN, X.; XU, S.; WANG, J. Separation and Purification Technology Electrode configuration optimization of capacitive deionization cells based on zero charge potential of the electrodes. **Sep. Purif. Technol.** v. 189, p. 467–474, 2017.

MACHADO, N. B.; MIGUEZ, J. P.; BOLINA, I. C. A.; SALVIANO, A. B.; GOMES, R. A. B.; TAVANO, O. L.; LUIZ, J. H. H.; TARDIOLI, P. W.; CREN, E. C.; MENDES, A. A. Preparation, functionalization and characterization of rice husk silica for lipase immobilization via adsorption. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 128, p.9-21, 2019.

MAGRO, L. D.; MOURA, K. S.; BACKES, B. E.; MENEZES, E. W.; BENVENUTTI, E. V.; NICOLODI, S.; KLEIN, M. P.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; RODRIGUES, R. C. Immobilization of pectinase on chitosan-magnetic particles: Influence of particle preparation protocol on enzyme properties for fruit juice clarification. **Biotechnology Reports**, v. 24, 2019.

MAHAMAD, M. N.; ZAINI, M. A. A.; ZAKARIA, Z. A. Preparation and characterization of activated carbon from pineapple waste biomass for dye removal. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 102, p. 274–28, 2015.

MAHAPATRA, P.; KUMARI, A.; KUMAR GARLAPATI, V.; BANERJEE, R.; NAG, A. Enzymatic synthesis of fruit flavor esters by immobilized lipase from *Rhizopus oligosporus* optimized with response surface methodology. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 60, n. 1-2, p. 57–63, 2009.

MARKOGLU, N.; WAINER, I. W. Immobilized enzyme reactors in liquid chromatography: On-line bioreactors for use in synthesis and drug discovery. **Handbook of Analytical Separations**, p. 215–234, 2003.

MARTINS, A. B.; GRAEBINA, N. G.; LORENZONI, A. S. G.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; AYUBB, M. A. Z.; RODRIGUES, R. C. Rapid and high yields of synthesis of butyl acetate catalyzed by Novozym 435: Reaction optimization by response surface methodology. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 2311–2316, 2011.

MATINJA, A. I.; ZAIN, N. A. M.; SUHAIMI, M. S.; ALHASSAN, A. J. Optimization of biodiesel production from palm oil mill effluent using lipase immobilized in PVA-alginate-sulfate beads. **Renewable Energy**, v. 135, p. 1178-1185, 2019.

MAULINA, S.; IRIANSYAH, M. Characteristics of activated carbon resulted from pyrolysis of the oil palm fronds powder. **IOP Conf. Series: Materials Science and Engineering**, v. 309, 2018.

MENDES, A. A.; OLIVEIRA, P. C.; CASTRO, H. F.; GIORDANO, R. L. Aplicação de quitosana como suporte para imobilização de enzimas de interesse industrial. **Quim. Nova**, v. 34, n. 5, p. 831-840, 2011.

MENDES, A. A.; OLIVEIRA, P. C.; CASTRO, H. F. Properties and biotechnological applications of porcine pancreatic lipase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 78, p. 119–134, 2012.

MESSIAS, J. M.; COSTA, B. Z.; LIMA, V. M. G.; GIESE, E. C.; DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. M. Lipases microbianas: Produção, propriedades e aplicações biotecnológicas. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, Londrina, v. 32, n. 2, p. 213-234, 2011.

MISHRA, S.; YADAV, S. S.; RAWAT, S.; SINGH, J.; KODURU, J. R. Corn husk derived magnetized activated carbon for the removal of phenol and para-nitrophenol from aqueous solution: Interaction mechanism, insights on adsorbent characteristics, and isothermal, kinetic and thermodynamic properties. **Journal of Environmental Management**, v. 246, p. 362–373, 2019.

MISTAR, E. M.; ALFATAH, T.; SUPARDAN, M. D. Synthesis and characterization of activated carbon from *Bambusa vulgaris striata* using two-step KOH activation. **Journal of Materials Research and Technology**, v. 9, n. 3, p. 6278-3286, 2020.

MOHAMAD NOR, N.; LAU, L. C.; LEE, K. T.; MOHAMED, A. R. Synthesis of activated carbon from lignocellulosic biomass and its applications in air pollution control – a review. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 1, p. 658–66, 2013.

MOHAN, D.; SARSWAT, A.; SINGH, V. K.; ALEXANDRE-FRANCO, M.; PITTMAN, C. U. Development of magnetic activated carbon from almond shells for trinitrophenol removal from water. **Chemical Engineering Journal**, v. 172, p. 1111-1125, 2011.

MONTALVO ANDIA, J.; LARREA, A.; SALCEDO, J.; REYES, J.; LOPEZ, L.; YOKOYAMA, L. Synthesis and characterization of chemically activated carbon from

Passiflora ligularis, *Inga feuillei* and native plants of South America. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 8, 2020.

MONTEIRO, V. N.; SILVA, R. N. Aplicações Industriais da Biotecnologia Enzimática. **Revista Processos Químicos**, Goiás, v. 3, n. 5, jan./jun., 2009.

MORAES, S. L.; MASSOLA, C. P.; SACCOCCIO, E. M.; SILVA, D. P.; GUIMARÃES, Y. B. T. Cenário brasileiro da geração e uso de biomassa adensada. **Revista IPT - Tecnologia e Inovação**, v.1, n.4, p. 58-73, 2017.

MOSAYEBI, M.; SALEHI, Z.; DOOSTHOSSEINI, H.; TISHBI, P.; KAWASE, Y. Amine, thiol, and octyl functionalization of GO-Fe₃O₄ nanocomposites to enhance immobilization of lipase for transesterification. **Renewable Energy**, v. 154, p. 569–580, 2020.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios da bioquímica de Lehninger**. 6ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

OLIVEIRA, C. A.; SOUZA, A. C. J.; SANTOS, A. P. B.; SILVA, B. V.; LACHTER, E. R.; PINTO, A. C. Síntese de Ésteres de Aromas de Frutas: Um Experimento para Cursos de Graduação dentro de um dos Princípios da Química Verde. **Rev. Virtual Quim.**, v. 6, n. 1, p. 152-167, 2014.

PALMER, T.; BONNER, P. L. An Introduction to Enzymes. **Enzymes**, n. 2, p. 2–13, 2011.

PAULINO, B. N.; SALES, A.; FELIPE, L.; PASTORE, G. M.; MOLINA, G.; BICAS, J. L. Recent advances in the microbial and enzymatic production of aroma compounds. **Current Opinion in Food Science**, v. 37, p. 98-106, 2021.

PEREIRA JR., N.; COUTO, M. A. P. G.; SANTA ANNA, L. M. M. **Biomass of lignocellulosic composition for fuel ethanol production and the context of biorefinery**. Series on Biotechnology, 1 ed., Rio de Janeiro, Brazil, Brazilian National Library, 2008.

PIAZZA, S. P.; PUTON, B. M.; DALLAGO, R. M.; OLIVEIRA, D.; CANSIAN, R. L.; MIGNONI, M.; PAROUL, N. Production of benzyl cinnamate by a low-cost immobilized lipase and evaluation of its antioxidant activity and toxicity. **Biotechnology Reports**, v. 29, 2021.

PINTO BRITO, M. J.; SANTOS, M. P. F.; DE SOUZA, C. E.; SANTOS, L. S.; BONOMO, R. C. F.; FONTAN, R. C. I.; VELOSO, C. M. Development of activated carbon from pupunha palm heart sheaths: Effect of synthesis conditions and its application in lipase immobilization. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 8, 2020.

PIRES-CABRAL, P.; FONSECA, M. M. R.; FERREIRA-DIAS, S. Modelling the production of ethyl butyrate catalysed by *Candida rugosa* lipase immobilized in polyurethane foams. **Biochem. Eng. J.**, v. 33, p. 148–158, 2007.

RAHMAN, A.; HANGO, H. J.; DANIEL, L.; VEIKKO, U.; JAIME, S. J.; BHASKARUNI, S. V. H. S.; JONNALAGADDA, S. B. Chemical preparation of activated carbon from *Acacia erioloba* seed pods using H₂SO₄ as impregnating agent for water treatment: An environmentally benevolent approach. **Journal of Cleaner Production**, v. 237, 2020.

RAHMAN, M. B. A.; JARMI, N. I.; CHAIBAKHSH, N.; BASRI, M. Modeling and optimization of lipase-catalyzed production of succinic acid ester using central composite design analysis. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 38, p. 229–234, 2011.

RAMAMOORTHY, M.; RAGUPATHY, S.; SAKTHI, D.; ARUN, V.; KANNADASAN, N. Enhanced sunlight photodegradation activity of methylene blue using Mn doped SnO₂ loaded on corn cob activated carbon. **Results in Materials**, v. 8, 2020.

RAMANI, K.; KARTHIKEYAN, S.; BOOPATHY, R.; KENNEDY, L. J.; MANDAL, A. B.; SEKARAN, G. Surface functionalized mesoporous activated carbon for the immobilization of acidic lipase and their application to hydrolysis of waste cooked oil: Isotherm and kinetic studies. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 3, p. 435–445, 2012.

RIVERA-UTRILLA, J.; SÁNCHEZ-POLO, M.; GÓMEZ-SERRANO, V.; ÁLVAREZ, P. M.; ALVIM-FERRAZ, M. C. M.; DIAS, J. M. Activated carbon modifications to enhance its water treatment applications. An overview. **Journal of Hazardous Materials**, v. 187, p. 1–23, 2011.

RITCHIE, S. W.; HANWAY, J. J.; BENSON, G. O. **Como a planta de milho se desenvolve**. Encarte do Informações Agronômicas 103. K P Potafos, Arquivo do Agrônomo, n. 15, 2003.

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.

Sabugo de Milho. **MFRURAL**, 2018?. Disponível em: <<https://www.mfrural.com.br/detalhe/311579/sabugo-de-milho>> Acesso em: 03/11/2020.

SAMANTA, A. K.; SEMANI, S.; KOLTE, A. P.; SRIDHAR, M.; SAMPATH, K. T.; JAYAPAL, N.; DEVI, A. Production and in vitro evaluation of xylooligosaccharides generated from corn cobs. **Food and Bioproducts Processing**, v. 90, p. 466–474, 2012.

SAMANTRAY, R.; MISHRA, S. C. Saccharum spontaneum, a precursor of sustainable activated carbon: Synthesis, characterization and optimization of process parameters and its suitability for supercapacitor applications. **Diamond & Related Materials**, v. 101, 2020.

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**, v. 94, p. 1982–1990, 2019.

SANTOS, F. A.; QUEIRÓZ, J. H.; COLODETTE, J. L.; FERNANDES, S. A.; GUIMARÃES, V. M.; REZENDE, S. T. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Química Nova**, v. 35, n. 5, p. 1004-1010, 2012.

SARAIVA, B. R.; VITAL, A. C. P.; ANJO, F. A.; CESARO, E.; MATUMOTO-PINTRO, P. T. Valorização de resíduos agroindustriais: fontes de nutrientes e compostos bioativos para a alimentação humana. **Pubsaúde**, v. 1, n. 7, 2018.

SARNO, M.; IULIANO, M.; POLICHETTI, M.; CIAMBELLI, P. High activity and selectivity immobilized lipase on Fe₃O₄ nanoparticles for banana flavour synthesis. **Process Biochemistry**, v. 56, p. 98–108, 2017.

SECUNDO, F. Conformational changes of enzymes upon immobilization. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, 2013.

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 and Mesoporous Materials**, v. 132, n. 3, p. 487-493, 2010.

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

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

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

SOLOGUREN, L. Demanda mundial cresce e Brasil tem espaço para expandir produção. **Visão Agrícola**, v. 13, n. 9, jul./dez. 2015.

SOSE, M. T.; BANSODE, S. R.; RATHOD, V. K. Solvent free lipase catalyzed synthesis of butyl caprylate. **Journal of Chemical Sciences**, v. 129, n. 11, p. 1755–1760, 2017.

SOUZA JÚNIOR, E. C.; SANTOS, M. P. F.; SAMPAIO, V. S.; FERRÃO, S. P. B.; FONTAN, R. C. I.; BONOMO, R. C. F.; VELOSO, C. M. Hydrolysis of casein from different sources by immobilized trypsin on biochar: effect of immobilization method. **Journal of Chromatography B**, v. 1146, 2020.

SOUZA, L. T. A.; VERÍSSIMO, L. A. A.; PESSELA, B. C. P.; SANTORO, M. M.; RESENDE, R. R.; MENDES, A. A. Imobilização enzimática: princípios fundamentais e tipos de suporte. **Biociência Aplicada à Agro&Indústria**, v. 4, p. 529-568, 2017.

SPINELLI, D.; COPPI, S.; BASOSI, R.; POGNI, R. Biosynthesis of ethyl butyrate with immobilized *Candida rugosa* lipase onto modified Eupergit®C. **Biocatalysis**, v. 1, n. 1, p. 1–12, 2014.

SURRA, E.; COSTA NOGUEIRA, M.; BERNARDO, M.; LAPA, N.; ESTEVES, I.; FONSECA, I. New adsorbents from maize cob wastes and anaerobic digestate for H₂S removal from biogás. **Waste Management**, v. 94, p. 136–145, 2019.

TAGHIZADEH, T.; AMERI, A.; TALEBIAN-KIAKALAIEH, A.; MOJTABAVI, S.; AMERI, A.; FOROOTANFAR, H.; TARIGHI, S.; FARAMARZI, M. A. Lipase@zeolitic imidazolate framework ZIF-90: A highly stable and recyclable biocatalyst for the synthesis of fruity banana flavour. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 166, p. 1301-1311, 2021.

TARAFDAR, A.; SIROHI, R.; GAUR, V. K.; KUMAR, S.; SHARMA, P.; VARJANI, S.; PANDEY, H. O.; SINDHU, R.; MADHAVAN, A.; RAJASEKHARAN, R.; SIM, S. J. Engineering interventions in enzyme production: Lab to industrial scale. **Bioresource Technology**, v. 326, 2021.

TODERO, L. M.; BASSI, J. J.; LAGE, F. A. P.; CORRADINI, M. C. C.; BARBOZA, J. C. S.; HIRATA, D. B.; MENDES, A. A. Enzymatic synthesis of isoamyl butyrate catalyzed by immobilized lipase on poly-methacrylate particles: optimization, reusability and mass transfer studies. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 38, n. 8, p. 1601–1613, 2015.

TONG, D. S.; XIA, X.; LUO, X. P.; WU, L. M.; LIN, C. X.; YU, W. H.; ZHOU, C. H.; ZHONG, Z. K. Catalytic hydrolysis of cellulose to reducing sugar over acid-activated montmorillonite catalysts. **Applied Clay Science**, 74, 147–153, 2013.

TRIPATHI, R.; SINGH, J.; BHARTI, R. K.; THAKUR, I. S. Isolation, Purification and characterization of lipase from *Microbacterium* sp. and its application in biodiesel production. **Energy Procedia**, v. 54, p. 518-529, 2014.

VAGHARI, H.; JAFARIZADEH-MALMIRI, H.; MOHAMMADLOU, M.; BERENJIAN, A.; ANARJAN, N.; JAFARI, N.; NASIRI, S. Application of magnetic nanoparticles in smart enzyme immobilization, *Biotechnology Letters*, v. 38, n. 2, 2016.

VALENTE, J. Produção e exportação de milho devem crescer na safra 2018/2019. **Agência Brasil**, Brasília, 20 de agosto de 2018. Disponível em: <<https://agenciabrasil.ebc.com.br/economia/noticia/2018-08/producao-e-exportacao-de-milho-devem-crescer-na-safra-20182019>> Acesso em: 03/11/2020.

VAN SOEST, P.J.; ROBERTSON, J.B.; LEWIS, B.A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. **Journal of Dairy Science**. v. 74, p. 3583–3597, 1991.

VIANA, L. G.; CRUZ, P. S. **Reaproveitamento de resíduos agroindustriais**. In: IV Congresso Baiano de Engenharia Sanitária e Ambiental, julho, 2016.

WAGHMARE, G. V.; CHATTERJI, A.; RATHOD, V. K. Kinetics of enzymatic synthesis of cinnamyl butyrate by immobilized lipase. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v. 183, n. 3, p. 792-806, 2017.

WANG, X.-Y.; JIANG, X.-P.; LI, Y.; ZENG, S.; ZHANG, Y.-W. Preparation Fe₃O₄@Chitosan Magnetic Particles for Covalent Immobilization of Lipase from *Thermomyces lanuginosus*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 75, p. 44-50, 2015.

WEBER, D.; NASCIMENTO, M. G.; PARIZE, A. L. Immobilization of Burkholderia cepacia lipase on crosslinked chitosan-based support for the synthesis of geranyl acetate. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 19, 2019.

XIE, A.; CUI, J.; CHEN, Y.; LANG, J.; LI, C.; YAN, Y.; DAI, J. Simultaneous activation and magnetization toward facile preparation of auricularia-based magnetic porous carbon for efficient removal of tetracycline. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 784, p. 76-87, 2019.

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**, v. 46, p. 218-235, 2015.

YU, D.; CHEN, K.; LIU, J.; PAN, Z.; JIANG, L.; WANG, L.; ELFALLEH, W. Application of magnetic immobilized papain on passivated rice bran lipase. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 157, p.51-59, 2020.

ZARE, M.; GOLMAKANI, M.-T.; NIAKOUSARI, M. Lipase synthesis of isoamyl acetate using different acyl donors: Comparison of novel esterification techniques. **LWT**, v. 101, p. 214-219, 2019.

ZHANG, D. H.; YUWEN, L. X.; PENG, L. J. Parameters Affecting the Performance of Immobilized Enzyme. **Journal of Chemistry**, v. 2013, p. 1-7, 2013.

ZHANG, Y.; GHALY, A. E.; LI, B. Physical Properties of Corn Residues. **American Journal of Biochemistry and Biotechnology**, v. 8, n. 2, p. 44-53, 2012.

ZHANG, Y.; SONG, X.; ZHANG, P.; GAO, H.; OU, C.; KONG, X. Production of activated carbons from four wastes via one-step activation and their applications in Pb²⁺ adsorption: Insight of ash content. **Chemosphere**, v. 245, 2020.

ZHU, G.; DENG, X.; HOU, M.; SUN, K.; ZHANG, Y.; LI, P.; LIANG, F. Comparative study on characterization and adsorption properties of activated carbons by phosphoric acid activation from corncob and its acid and alkaline hydrolysis residues. **Fuel Processing Technology**, v. 144, p. 255–261, 2016.