

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**DESENVOLVIMENTO DE UM CATALISADOR ENZIMÁTICO
PARA A VALORIZAÇÃO DE RESÍDUOS DOMÉSTICOS DE
ALIMENTOS**

CAMILA ANGELA GONZATTI

Porto Alegre, fevereiro de 2024.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

CAMILA ANGELA GONZATTI

**DESENVOLVIMENTO DE UM CATALISADOR ENZIMÁTICO
PARA A VALORIZAÇÃO DE RESÍDUOS DOMÉSTICOS DE
ALIMENTOS**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a
obtenção do grau de Mestre em Química

Prof^a. Dra. Roberta da Silva Bussamara Rodrigues
Orientadora

Porto Alegre, fevereiro de 2024

CIP - Catalogação na Publicação

Gonzatti, Camila Angela
Desenvolvimento de um catalisador enzimático para a
valorização de resíduos domésticos de alimentos /
Camila Angela Gonzatti. -- 2024.
150 f.
Orientador: Roberta da Silva Bussamara Rodrigues.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Instituto de Química, Programa de
Pós-Graduação em Química, Porto Alegre, BR-RS, 2024.

1. biocatalisador. 2. enzimas. 3. imobilização. 4.
resíduos alimentares domésticos. 5. bioeconomia
circular. I. Rodrigues, Roberta da Silva Bussamara,
orient. II. Título.

A presente dissertação foi realizada inteiramente pelo autor, exceto as colaborações as quais serão devidamente citadas nos agradecimentos, no período entre (fevereiro/2022) e (fevereiro/2024), no Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul sob Orientação da Professora Dra. Roberta da Silva Bussamara Rodrigues. A dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de Mestre em Química pela seguinte banca examinadora:

Comissão Examinadora:

Prof^a. Dra. Fernanda Poletto

Prof^a. Dra. Jacqueline Ferreira Leite
Santos

Prof^a. Dra. Lilian Raquel Hickert

Prof^a. Dra. Roberta da Silva
Bussamara Rodrigues

Camila A. Gonzatti

Camila Angela Gonzatti

AGRADECIMENTOS

À prof^a. Dra. Roberta da Silva Bussamara Rodrigues por todos os conhecimentos passados, pela orientação maravilhosa e por todo o comprometimento comigo ao longo destes dois anos. Agradeço também a ela pelo apoio e confiança depositados, e por acreditar em mim desde o início, permitindo que eu executasse meu projeto.

Ao laboratório LATAMA, coordenado pelo prof. Dr. Éder Lima, pela parceria e síntese do meu biochar. Um agradecimento especial ao Dr. Pascal Silas Thue e à mestranda Beatris Lisboa Mello, por me ajudarem inúmeras vezes quando precisei, e me permitirem usar diversos equipamentos do laboratório.

Agradeço muito à prof^a. Dra. Lilian Hickert por realizar a análise de CLAE-IR em seu laboratório na UERGS, sendo muito ágil, prestativa e acolhedora. Ao prof. Dr. Alexandre Batista Schneider e à prof^a. Dra. Morgana Dessuy por me ajudarem na interpretação dos dados da titulação potenciométrica. Agradeço também à prof^a. Dra. Bruna Tischer por ter me deixado usar o liquidificador industrial em seu laboratório no ICTA, e à prof^a. Dra. Rosângela pela parceria.

À bolsista de iniciação científica, Kimberly Damo, por toda a ajuda e comprometimento em cada tarefa realizada. Agradeço ao meu amigo e colega de laboratório Leonardo Medeiros, por sempre encontrar uma forma de me ajudar quando precisei, pelas risadas e amizade sincera ao longo destes dois anos. Agradeço também aos meus amigos Lilian, Alex e Rodrigo, por toda ajuda, parceria, companheirismo e risadas. Todos vocês tornaram esta caminhada muito mais leve.

A todos os membros do laboratório E112 que me ajudaram de alguma forma, especialmente à prof^a. Dra. Legna Colina que me emprestou diversos materiais. Agradeço a todos os membros do IQ que prestaram algum auxílio, à CAPES e ao Programa de Pós-Graduação em Química pela oportunidade.

Ao Ardel Jr., meu namorado e parceiro de vida, pelo apoio incondicional, cumplicidade, conversas, risadas e por todo o amor e carinho. Aos meus pais, Margane e Cledio, por tudo, pelo apoio, preocupação e amor, sem eles não estaria aqui. Agradeço à Deus pelas oportunidades e saúde para vivê-las.

RESUMO

Aproximadamente 1,6 bilhão de toneladas de alimentos são descartadas anualmente, causando problemas ambientais ao serem depositadas em aterros sanitários. Assim, propõe-se valorizar os resíduos domésticos de alimentos por meio de um processo circular. Como estratégia, foi desenvolvido um catalisador enzimático para a degradação desta matriz, devido à alta eficiência da catálise enzimática e suas condições brandas de trabalho. Enzimas hidrolíticas foram selecionadas e suas concentrações otimizadas, para posterior imobilização em biochar magnético e na própria matriz alimentar. As amostras consistiram em resíduos alimentares (65% de carboidratos, 17% de lipídios e 18% de proteínas). A atividade da lipase foi medida pela quantificação de ácidos graxos na fase aquosa e oleosa via titulação com NaOH. Para avaliar a atividade da celulase, da pectinase e da amilase, foi aplicado o método do ADNS. A celulase livre apresentou a maior atividade (97 g/L de açúcares redutores) em comparação com o controle (18 g/L). A pectinase e a amilase também propiciaram a formação de concentrações mais altas destes açúcares (41 g/L e 47 g/L, respectivamente). A atividade da lipase promoveu uma acidez de 71% na fase oleosa em comparação com o controle (20%), e na fase aquosa gerou um aumento de 380% na concentração de ácidos graxos. Quando imobilizadas, todas as enzimas tornaram-se mais ativas, com eficiências de imobilização variando 121-258%. A análise por CLAE-IR foi aplicada para verificar os produtos gerados durante a hidrólise enzimática pelas proteínas livres e imobilizadas. O biochar sintetizado foi caracterizado pelo método BET e pelas análises de CHN, TGA e do ponto de carga zero. As enzimas, livres e imobilizadas, mostraram alta atividade hidrolítica, mesmo em condições atípicas, constituindo um sistema circular com grande potencial de aplicação.

Palavras-chave: biocatalisador, enzimas, imobilização, resíduos alimentares domésticos, bioeconomia circular.

ABSTRACT

Approximately 1.6 billion tons of food are discarded annually, causing environmental harms when deposited in landfills. Therefore, the aim is to valorize household food waste in a circular process. As a strategy, an enzymatic catalyst was developed for the degradation of this matrix due to the high efficiency of enzymatic catalysis and its mild working conditions. Hydrolytic enzymes were selected, and their concentrations optimized for subsequent immobilization on magnetic biochar and in the hydrolyzed food itself. The samples consisted of food residues in the proportion of 65% carbohydrates, 17% lipids, and 18% proteins. Lipase activity was measured by quantifying fatty acids in the aqueous and oil phases via titration with NaOH. To assess the activity of cellulase, pectinase and amylase, the DNS method was applied. Free cellulase showed the highest activity (97 g/L of reducing sugars) compared to the control (18 g/L). The studied pectinase and amylase also exhibited higher concentrations of reducing sugars (41 g/L and 47 g/L, respectively). Lipase activity reached an acidity value of 71% in the oil phase compared to the control (20%), and in the aqueous phase, it led to a 380% increase in the concentration of fatty acids. When immobilized, all enzymes became more active, with immobilization efficiencies ranging from 121-258%. The HPLC-RI analysis was applied to verify the products generated during the enzymatic hydrolysis of the food matrix by free and immobilized proteins. The synthesized biochar was characterized by the BET method, by CHN and TGA analyses, and zero point of charge determination. The enzymes, whether free or immobilized, demonstrated efficiency in degrading the matrix, even under atypical conditions, constituting a circular system with great potential for application.

Keywords: biocatalyst, enzymes, immobilization, domestic food waste, circular bioeconomy.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Esquema das etapas e produtos do processo de digestão anaeróbica (Adaptado de TYAGI et al.,2021). ¹⁴	5
Figura 2. Bioconversão dos resíduos alimentares e seus produtos de interesse comercial (YUKESH KANNAH et al., 2020). ³⁴	10
Figura 3. Esquema ilustrativo da atuação das celulases (GOLGERI M et al., 2022). ⁴⁷	15
Figura 4. Esquema ilustrativo da atuação das amilases (Adaptado de ŻYMAŃCZYK-DUDA et al., 2016). ⁵²	16
Figura 5. Produtos gerados pelas principais pectinases. ⁵⁵	18
Figura 6. Ação da lipase em meio aquoso – reação de hidrólise de óleos e gorduras.....	19
Figura 7. Reação de transesterificação catalisada pela lipase para geração de biodiesel. ⁵⁸	20
Figura 8. Estrutura de lipase de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . Tampa helicoidal de aminoácidos está representada em amarelo sobre o sítio ativo da enzima, formado pelos resíduos S82 (serina), D229 (ácido aspártico) e H251 (histidina). ⁶¹	21
Figura 9. Imobilização por ligação iônica, o suporte e a enzima necessitam estar com cargas opostas.	23
Figura 10. Imobilização de enzimas via adsorção pelo efeito hidrofóbico. ⁶³	23
Figura 11. Enzimas imobilizadas covalentemente: (A) ligação covalente pontual; (B) ligação covalente multipontual; (C) ligação covalente mediada por um grupo funcional com função de braço espaçador entre a enzima e o suporte. ⁶³	25
Figura 12. Métodos de modificação do biochar para melhorar propriedades conforme a aplicação final. ⁶⁷	26
Figura 13. Reação de neutralização dos ácidos graxos com hidróxido de sódio - princípio da quantificação destes compostos por titulação (Adaptado de HOCHSCHEIDT et al., 2020). ⁷⁴	29
Figura 14. Reação de redução do ácido 3,5-dinitrosalicílico (ADNS) pelos açúcares redutores - princípio do método ADNS para determinação destes compostos (Adaptado de MOURA DE VASCONCELOS et al., 2013). ⁸⁰	31

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1G	Primeira geração
2G	Segunda geração
ADNS	Ácido 3,5-dinitrossalicílico
APTES	(3-Aminopropil)trietoxissilano
ATP	Adenosina trifosfato
BET	Método desenvolvido por Brunauer, Emmett e Teller para cálculo da área de superfície específica
BSA	Do inglês “ <i>Bovine serum albumin</i> ” (Albumina sérica bovina)
CCM	Célula a Combustível Microbiana
CHN	Análise elementar de carbono, hidrogênio e nitrogênio
CLAE-IR	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector de índice de refração
CTC	Centro de Tecnologia Canavieira
DA	Digestão anaeróbica
DFT	do inglês “ <i>Differential Functional Theory</i> ” – método utilizado para estimativa do volume de poros
DRX	Difração de raios-X
EDX	Espectroscopia de energia dispersiva de raio X
IUBMB	do inglês “ <i>International Union of Biochemistry and Molecular Biology</i> ” (União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular)
LATAMA	Laboratório de Tecnologia Ambiental e Analítica
P.A	Reagente de padrão analítico
pH	Potencial hidrogeniônico
pH _i	Potencial hidrogeniônico inicial
pH _f	Potencial hidrogeniônico final
pH _{pcz}	pH do ponto de carga zero
PHA	Polihidroxialcanoato
pI	Ponto isoelétrico

TGA	Análise termogravimétrica
UV-vis	Espectroscopia de ultravioleta-visível
V	Volume

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
2.1 OBJETIVO GERAL.....	3
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1 RESÍDUOS DE ALIMENTOS COMO UMA PROBLEMÁTICA MUNDIAL	4
3.2 VALORIZAÇÃO DE RESÍDUOS DE ALIMENTOS COMO UMA MATÉRIA-PRIMA RENOVÁVEL	5
3.3 BIOECONOMIA CIRCULAR	9
3.4 ENZIMAS COMO CATALISADORES HIDROLÍTICOS DA BIOMASSA	11
3.4.1 Carboidrases	14
3.4.1.1 Celulases.....	14
3.4.1.2 Amilases.....	15
3.4.1.3 Pectinases.....	16
3.4.2 Lipases	18
3.5 IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS	21
3.5.1 Imobilização por adsorção física	22
3.5.2 Imobilização por ligação covalente	24
3.6 BIOSUPORTES	25
4. METODOLOGIA:	27
4.1 PREPARO DAS AMOSTRAS DE RESÍDUOS ALIMENTARES.....	27
4.2 AVALIAÇÃO DOS PRODUTOS DA ATIVIDADE DAS ENZIMAS	28
4.2.1 Produtos da atividade das lipases	28
4.2.2 Produtos da atividade das carboidrases	30
4.3 SÍNTESE DO BIOCHAR MAGNÉTICO.....	31
4.4 CARACTERIZAÇÃO DO BIOCHAR MAGNÉTICO	32

4.5 IMOBILIZAÇÃO DAS ENZIMAS.....	33
4.5.1 Imobilização das carboidrases.....	34
4.5.1.1 Imobilização no biochar magnético	34
4.5.2 Imobilização da lipase.....	35
4.6 DETERMINAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE IMOBILIZAÇÃO	35
4.7 ANÁLISE POR CLAE-IR	36
5. CONCLUSÃO	37
6. REFERÊNCIAS.....	37

1. INTRODUÇÃO

São descartadas mundialmente cerca de 1,6 bilhões de toneladas de alimentos por ano, gerando assim, um grande volume deste tipo de resíduo. De acordo com estatísticas nos países desenvolvidos o desperdício de alimentos ocorre principalmente no final da cadeia alimentar, durante a distribuição de alimentos e, especialmente, nas residências. Uma vez que as projeções preveem um aumento da população mundial, essa quantidade tende a aumentar futuramente.

A gestão destes resíduos orgânicos domésticos é uma tarefa desafiadora devido ao seu alto teor de umidade e rápida decomposição em condições ambiente. A maioria é descartada em aterros sanitários ou incinerada, resultando em impactos ambientais significativos, como danos aos recursos naturais pelos produtos da degradação e emissões significativas de gases do efeito estufa. O despejo em aterros sanitários também contribui para o desenvolvimento de organismos patogênicos, contaminação de lençóis freáticos e inutilização de terrenos em potencial.

Integrando os princípios da economia circular na bioeconomia, define-se a bioeconomia circular, na qual o carbono é obtido de fontes biológicas para criar produtos e materiais que podem ser reutilizados em ciclos aprimorados. Neste contexto, os resíduos alimentares domésticos possuem grande potencial de aplicação como matérias-primas chave para implementação deste sistema circular, agregando valor e diminuindo os problemas ambientais derivados do seu descarte incorreto. A partir da hidrólise desses resíduos é possível obter compostos orgânicos como açúcares e ácidos graxos, que podem ser convertidos em diversos produtos químicos de valor agregado e gerar bioenergia, sendo uma opção em detrimento das fontes fósseis.

Contudo, a quebra dos carboidratos complexos em açúcares simples, bem como a de outras macromoléculas em seus monômeros, é a etapa limitante em termos de velocidade. Sendo assim, a hidrólise destes resíduos se torna um entrave para a tentativa de inserção dos mesmos na bioeconomia circular e consequente geração de bioprodutos.

Como possível solução, neste trabalho foi proposto o uso da catálise enzimática na hidrólise destes resíduos. As enzimas possuem alta especificidade, promovendo um rendimento e uma eficiência apreciáveis, e permitem condições brandas de trabalho, preservando os compostos de interesse e gerando economia de energia. Enzimas carboidrases hidrolisam carboidratos complexos dando origem a açúcares mais simples que podem ser fermentados e valorizados. Dentre elas estão as celulases, que hidrolisam as matrizes celulósicas, as amilases, que catalisam a conversão do amido em monômeros como glicose e maltose, e as pectinases, que quebram a pectina, presente nas cascas das frutas. As enzimas lipases também são de grande importância para a hidrólise de alimentos, pois hidrolisam gorduras e óleos, atuando sobre a ligação éster destes compostos.

As enzimas livres possuem algumas limitações que muitas vezes podem ser o gargalo de sua aplicação na indústria como a instabilidade em condições não fisiológicas, a susceptibilidade à inibição por substratos e produtos e à perda da atividade devido a variações nas condições do meio. Elas também são solúveis em água e, portanto, difíceis e dispendiosas de se recuperar, aumentando o custo do processo. Para um sistema doméstico de valorização da biomassa a possibilidade de recuperação e reutilização do biocatalisador também acaba sendo fundamental. Desta forma, a imobilização das proteínas surge como uma possibilidade para contornar estas características indesejáveis na aplicação comercial. Esta estratégia propicia uma fácil recuperação e maior estabilidade em relação à desnaturação causada por calor, solventes orgânicos e variações do meio, podendo também melhorar a atividade da enzima e aumentar o tempo de estocagem.

Portanto, levando em consideração os princípios da bioeconomia circular, o objetivo deste trabalho foi desenvolver um catalisador enzimático eficiente para a degradação de resíduos domésticos de alimentos visando a formação de produtos de valor agregado. Um conjunto de enzimas, composto por lipase, celulase, amilase e pectinase foi formulado e imobilizado para possibilitar a reutilização e recuperação do biocatalisador. Como suporte foram empregados um biochar magnético, sólido com alta área superficial, estável, inerte e renovável.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver um sistema catalítico enzimático eficiente utilizando resíduos de alimentos como substrato para formação de produtos de valor agregado utilizando-se dos princípios da bioeconomia circular.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os gargalos na aplicação dos resíduos domésticos de alimentos como matéria-prima renovável e propor sistemas catalíticos enzimáticos que tenham o potencial de suprir os entraves encontrados;
- Simular amostras de resíduos de alimentos de acordo com composições médias encontradas na literatura;
- Selecionar enzimas lipases e carboidrases, como pectinases, celulasas e amilases como catalisadores na degradação hidrolítica de resíduos de alimentos domésticos;
- Otimizar a concentração das enzimas selecionadas para serem utilizadas no processo;
- Testar a eficiência do uso de um *pool* de enzimas carboidrases, a partir das enzimas selecionadas em suas concentrações otimizadas, na degradação hidrolítica de resíduos de alimentos domésticos;
- Sintetizar um biochar magnético para imobilização das enzimas e caracterizá-lo;
- Imobilizar as enzimas selecionadas em biochar magnético, visando o aumento da eficiência na decomposição do resíduo e a reutilização do sistema catalítico;
- Comparar a atividade das enzimas livre e imobilizadas;

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 RESÍDUOS DE ALIMENTOS COMO UMA PROBLEMÁTICA MUNDIAL

Os resíduos alimentares são compostos por quaisquer alimentos não consumidos ou provenientes do preparo e estocagem dos mesmos, tanto em residências quanto em estabelecimentos comerciais. Eles representam um dos resíduos biológicos mais abundantes em todo o mundo.¹ São descartadas mundialmente cerca de 1,6 bilhões de toneladas de alimentos por ano, gerando assim, um grande volume deste tipo de resíduo.² De acordo com estatísticas, nos países desenvolvidos, o desperdício de alimentos ocorre principalmente no final da cadeia alimentar, durante a distribuição de alimentos e, especialmente, nas residências.³ Uma vez que as projeções preveem um aumento da população mundial, essa quantidade tende a aumentar futuramente.⁴

A gestão destes resíduos orgânicos é uma tarefa desafiadora devido ao seu alto teor de umidade e rápida decomposição em condições ambiente.⁵ A maioria é descartada em aterros sanitários ou incinerada, resultando em impactos ambientais significativos, como danos aos recursos naturais pelos produtos da degradação, e emissões significativas de gases do efeito estufa.⁶ O biogás gerado nos aterros é composto principalmente por metano (em torno de 40 a 70% em volume seco), que produz um efeito no aquecimento global cerca de 20 a 25 vezes mais significativo do que o dióxido de carbono.⁷ O despejo em aterros sanitários, também contribui para o desenvolvimento de organismos patogênicos, contaminação de lençóis freáticos e inutilização de terrenos em potencial.⁸

O resíduo orgânico de alimentos é composto majoritariamente por carboidratos (52-65%), proteínas (12-20%) e lipídios (15-35%), os quais podem ser posteriormente digeridos em compostos orgânicos mais simples, como glicose, aminoácidos e ácidos graxos durante a reação de hidrólise.^{9,10} Como alternativa, a partir destes compostos mais simples, este resíduo pode ser convertido em uma variedade de produtos químicos de valor agregado e gerar bioenergia, sendo uma opção em detrimento das fontes fósseis.¹¹

3.2 VALORIZAÇÃO DE RESÍDUOS DE ALIMENTOS COMO UMA MATÉRIA-PRIMA RENOVÁVEL

A fermentação anaeróbica é provavelmente o processo mais demandado para a valorização do resíduo alimentar. Ela pode resultar na produção de biocombustíveis, como metano e hidrogênio, e produtos químicos, como ácido acético, ácido propiônico, ácido butírico, ácido iso-butírico, ácido valérico e ácido iso-valérico.^{11,12} Este tipo de fermentação envolve um processo sequencial começando pela hidrólise, na qual as matrizes alimentares complexas são transformadas em monômeros simples, seguida pela acidogênese, na qual bactérias acidogênicas fermentam os açúcares gerados na hidrólise e produzem ácidos de interesse comercial. A etapa seguinte é a acetogênese, responsável por produzir acetato e hidrogênio, e por fim, ocorre a metanogênese, etapa produtora de metano¹³ - Figura 1.

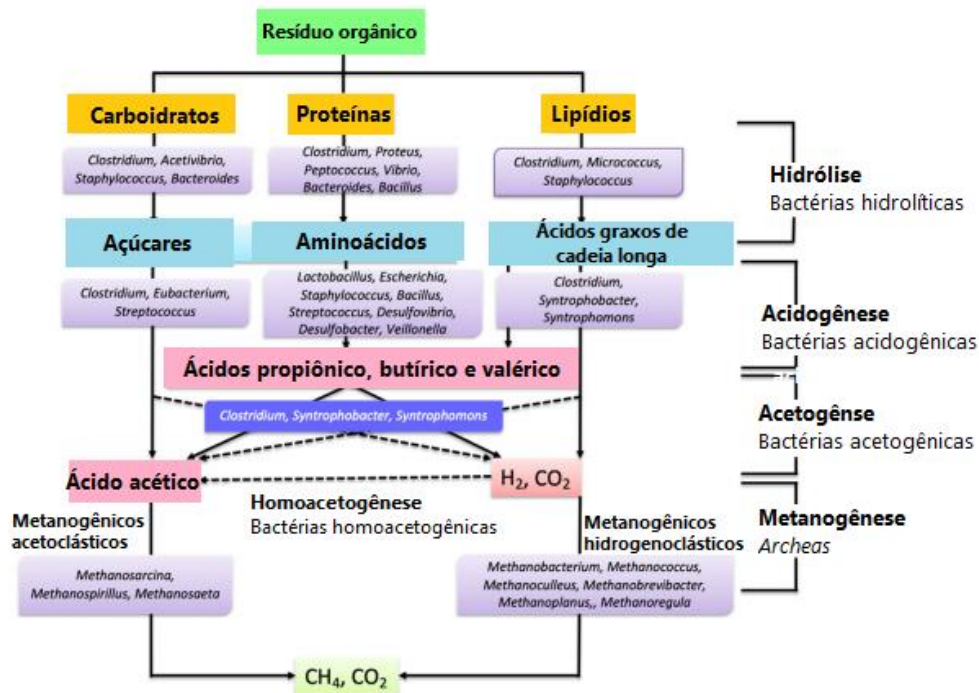


Figura 1. Esquema das etapas e produtos do processo de digestão anaeróbica (Adaptado de TYAGI et al.,2021).¹⁴

Cada estágio produz importantes bioprodutos: a hidrólise gera açúcares fermentáveis, a acidogênese e a acetogênese, ácidos de interesse, como ácido acético, cítrico, propiônico, butírico e tartárico, além do hidrogênio, e a etapa

final, biometano. Para geração de mais hidrogênio ou ácidos em detrimento dos demais produtos, pode-se fazer pré-tratamentos no inóculo.^{12,15} Os ácidos graxos voláteis produzidos podem ser convertidos biológica e/ou quimicamente em produtos como álcoois, polímeros, produtos farmacêuticos, etc.¹¹ Várias bactérias desempenham papéis cruciais nessas etapas, incluindo microrganismos hidrolíticos, acetogênicos, produtores de hidrogênio, formadores de acetato, metanogênicos acetoclásticos (geram metano a partir do acetato) e metanogênicos hidrogenoclásticos (geram metano a partir de hidrogênio).¹³ O resíduo resultante ao final da fermentação anaeróbica pode ser utilizado como biofertilizante visto que possui microrganismos como *Klebsiella* e *Clostridium*, que são fixadores de nitrogênio, e *Bacillus* e *Pseudomonas* que atuam como solubilizantes de fosfato.¹⁶

A integração da fermentação anaeróbica convencional com eletrodos em sistemas bioeletroquímicos também pode gerar bioeletricidade.¹¹ A Célula a Combustível Microbiana (CCM) é uma tecnologia sustentável que converte a energia química de resíduos em energia elétrica. Microrganismos no ânodo atuam como catalisadores, gerando elétrons e prótons para oxidar eletroquimicamente substratos orgânicos. Os elétrons são transferidos para o cátodo através de um circuito externo, gerando bioeletricidade, enquanto os prótons são transportados por uma membrana para o cátodo.¹⁷ Essa transferência resulta na redução de produtos valiosos durante o tratamento de resíduos alimentares.¹⁸

O biodiesel também pode ser produzido a partir de resíduos alimentares através de duas rotas: transesterificação direta ou transesterificação indireta. Na transesterificação direta do resíduo alimentar, utiliza-se catalisadores alcalinos ou ácidos. Já na transesterificação indireta, microrganismos produtores de óleo secretam óleos, utilizando o resíduo como fonte de carbono, que são posteriormente transesterificados para gerar biodiesel.^{19,20,21} Pleissner et al. (2013)²² verificaram que hidrolisados de resíduos alimentares atuam como fonte de nutrientes para o crescimento de microalgas, que podem ser utilizadas na produção de biodiesel por meio da transesterificação indireta. Neste estudo os microrganismos cresceram no hidrolisado gerando 20 g de biomassa, e os ácidos graxos armazenados neles mostraram-se promissores para geração de

biodiesel, ainda que este processo necessite de mais estudos para obtenção de um alto rendimento.²²

Além dos produtos citados, a produção de biosolventes a partir de resíduos alimentares está ganhando interesse devido à oferta limitada, altos custos econômicos e impactos ambientais da exploração de matérias-primas fósseis. Biosolventes, como bioetanol e biobutanol, têm a capacidade de substituir a dependência de fontes convencionais não renováveis.²³ Esses biosolventes podem ser produzidos como subprodutos no processo de fermentação do resíduo, utilizando microbiomas anaeróbicos.¹¹

O butanol é uma substância versátil, podendo ser usado como solvente, eluente, precursor de novos compostos, pode ser misturado à gasolina para uso como combustível, além de possuir baixa toxicidade e inflamabilidade. Culturas ricas em amido, como milho, trigo, arroz e mandioca, são amplamente utilizadas como substratos para a produção de bio-butanol.²⁴ O principal processo de produção de bio-butanol envolve a extração de açúcares do substrato por meio de diversas estratégias de pré-tratamento, seguida pela utilização do extrato por cepas pertencentes à família *Clostridiaceae*.²³

Os resíduos alimentares também podem servir como matéria-prima para produção de biopolímeros como os polihidroxialcanoatos (PHAs), que são completamente biodegradados em CO₂ e água, além de possuírem propriedades termoplásticas semelhantes às dos plásticos convencionais. Microrganismos como *Ralstonia eutropha*, *E. coli*, *Clostridia sp.*, *Bacillus megaterium* e isolados naturais de *Actinobacillus*, *Azotobacter*, *Agrobacterium*, *Rhodobacter* e *Sphaerotilium* utilizam resíduos de alimentos como substrato e produzem esses polímeros, seja como metabólitos intracelulares ou como reservas de carbono quando há disponibilidade limitada de nitrogênio e excesso de carbono.²⁵ Suas aplicações são versáteis, incluindo embalagens, tintas, adesivos e diversos usos médicos, como engenharia de tecidos, implantes e liberação de medicamentos.¹¹ O produto de fermentação do resíduo alimentar, quando aplicado na produção de PHAs, apresentou uma produção considerável deste biopolímero devido à pronta disponibilidade de ácidos graxos voláteis nos efluentes da etapa de acidogênese.²⁶ Delbecq et al., (2018)²⁷ também delinearam recentes avanços e

inovações para produção sustentável de furfural a partir matrizes ricas em polissacarídeos e açúcares.

Os resíduos orgânicos de alimentos também são de grande interesse na área da biotecnologia, pois, através da fermentação em estado sólido dos mesmos é possível gerar enzimas como amilases, pectinases, proteases e lipases. Bactérias do gênero *Bacillus* fermentam casca de batata a 35 °C e pH 7,5, gerando cerca de 676 U/mL de amilase.²⁸ Microrganismos como *Penicillium sp.*, *Bacillus sp.* e *Aspergillus sp.* fermentam resíduos de bagaço de maçã e casca de laranja, produzindo pectinases em quantidades significativas.²⁹ *Pseudomonas aeruginosa* atua sobre resíduos de camarão, alcançando aproximadamente 15.000 U/mL de protease em 24 horas, a 37 °C e 200 rpm.³⁰ *Bacillus coagulans* fermenta resíduos de banana, melão e melancia, resultando em uma concentração de aproximadamente 148,9 U/g de lipase a 37 °C e pH 7.³¹

Por fim, também é possível a obtenção do biochar a partir do processo de decomposição de resíduos alimentares via pirólise sob altas temperaturas (entre 400 e 900 °C) e condições limitadas de oxigênio ou anaeróbicas. O biochar é um produto sólido carbonizado resultante da combustão incompleta da matéria-prima. É caracterizado por ser um produto estável, rico em carbono com alta porosidade e baixa densidade.^{32,33} Este material é muito utilizado na remoção de compostos químicos de águas residuais, atuando como adsorvente. Além disso, sua aplicação como condicionador de solo melhora a retenção de água, a fertilidade e o conteúdo de nutrientes, tornando-se relevante para a agricultura.³⁴

Entretanto, ainda que existam todas estas outras possibilidades, a disposição em aterros sanitários representa 90% do total do manejo de resíduos alimentares em países em desenvolvimento. Portanto, é fundamental uma gestão apropriada dos resíduos alimentares, uma vez que seu descarte inadequado pode gerar inúmeros problemas ambientais.³⁵ Salienta-se que, para tornar esta gestão efetiva, são necessários grandes esforços voltados aos resíduos alimentares domésticos, visto que, como dito anteriormente, eles constituem uma grande parcela do montante total desperdiçado.

3.3 BIOECONOMIA CIRCULAR

As ações humanas desde a Revolução Industrial tornaram-se o principal impulsionador das mudanças ambientais globais. O sistema econômico linear de consumir-produzir-utilizar-descartar impulsionou a prosperidade global, mas ao custo da exploração exponencial de recursos planetários, como combustíveis fósseis. Uma opção possível para equilibrar o uso de recursos naturais finitos e tornar nossa economia mais resistente é fortalecer a mudança inicial de uma economia linear para uma circular.³⁶

A economia circular tem como princípio manter o valor agregado dos produtos, materiais e recursos pelo máximo de tempo possível, minimizando a geração de resíduos e evitando a extração de novos recursos naturais. O efeito cascata é um dos pilares da economia circular e refere-se à utilização sequencial e eficiente dos recursos. No contexto da madeira, por exemplo, o efeito cascata ocorre quando a madeira é processada para criar um produto, e esse produto é utilizado novamente, seja para propósitos materiais ou energéticos. Nos últimos anos este conceito vem sendo amplamente difundido, e pode ser complementado pela definição de bioeconomia, baseada na aplicação de fontes de carbono renovável para geração de produtos de valor agregado como energia, materiais e produtos químicos através de processos biológicos.³⁷ Integrando os princípios da economia circular na bioeconomia, define-se a bioeconomia circular, na qual o carbono é obtido de fontes biológicas para criar produtos e materiais que podem ser reutilizados em ciclos aprimorados. O objetivo é fechar o ciclo do carbono, ou seja, garantir que o carbono biogênico seja utilizado e reciclado de maneira eficaz, contribuindo para a sustentabilidade ambiental.³⁶

Como um mecanismo estratégico para concretização da bioeconomia circular, a implementação de biorrefinarias se faz de grande interesse.³⁸ As biorrefinarias surgem como uma abordagem sustentável para sintetizar eficientemente produtos de alto valor agregado a partir de matérias-primas renováveis, como bioenergia, biocombustíveis, produtos químicos e biomateriais. Essas sínteses se dão através de tecnologias de conversão

termoquímicas, bioquímicas, de combustão e plataformas de crescimento de microrganismos.³⁹

Os resíduos desempenham um papel fundamental na Economia Circular, proporcionando oportunidades para reutilização, reciclagem e remanufatura. Isso se deve à maturidade e disponibilidade imediata da maioria das tecnologias e rotas de conversão.³⁸ A bioeconomia requer matérias-primas renováveis que têm o potencial de gerar uma variedade de produtos biobaseados.⁴⁰ Neste contexto, os resíduos alimentares domésticos entram como matérias-primas chave para implementação deste sistema circular. Pois, como explicado anteriormente, é possível se obter uma vasta gama de produtos de valor agregado a partir deste resíduo (Figura 2). Desta forma, a inserção e valorização dos resíduos orgânicos domésticos como uma matéria-prima renovável dentro da bioeconomia circular se mostra uma alternativa de disposição correta dos mesmos, sendo o aterro sanitário não mais necessário.

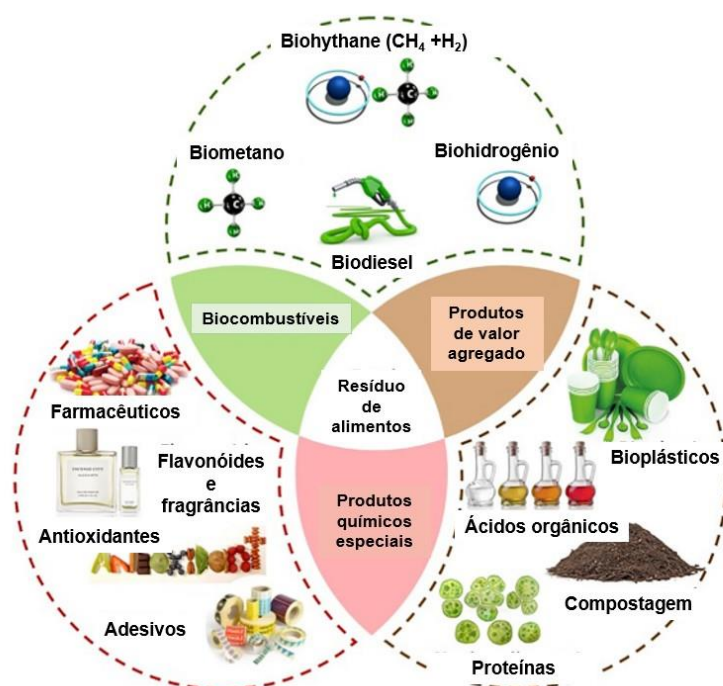


Figura 2. Bioconversão dos resíduos alimentares e seus produtos de interesse comercial (YUKESH KANNAH et al., 2020).³⁴

Durante a valorização destes resíduos alimentares, a quebra de carboidratos complexos em açúcares simples, bem como a de outras

macromoléculas em seus monômeros, é a etapa limitante em termos de velocidade.⁴¹ Sendo assim, a hidrólise destes resíduos se torna um entrave para a tentativa de inserção dos mesmos na bioeconomia circular e consequente geração dos bioprodutos apresentados. A implementação de pré-tratamentos eficientes na matriz antes da recuperação dos produtos de valor tem potencial de melhorar a biodisponibilidade dos compostos de interesse e, conseqüentemente, aumentar o rendimento e a lucratividade dos processos.

Pesquisadores têm desenvolvido métodos para recuperar biocombustíveis e produtos de valor, buscando maior eficiência e menor consumo de energia.³⁴ Apesar da maioria dos processos para geração de bioprodutos serem realizados a partir da ação de microrganismos, conforme apresentado anteriormente, eles possuem desvantagens que limitam seu uso em escala industrial. São elas alta susceptibilidade às condições do meio, como pH e temperatura, grande influência da composição do substrato, razão ideal de substrato:inóculo, dentre outras que muitas vezes são difíceis de serem controladas, mas que interferem substancialmente no crescimento destes agentes e, conseqüentemente na produção das enzimas responsáveis pelas reações que darão origem ao produto final. Aliando esta problemática com a necessidade anteriormente exposta de se aumentar a eficiência da reação de hidrólise, que é etapa limitante para valorização dos resíduos alimentares, é preciso uma estratégia para hidrolisar eficientemente a matéria orgânica de maneira a não tornar a eficiência do processo refém dos microrganismos presentes no meio. As enzimas possuem alta especificidade, promovendo um rendimento e uma eficiência apreciáveis, e permitem condições brandas de trabalho, preservando os compostos de interesse e gerando economia de energia.²

3.4 ENZIMAS COMO CATALISADORES HIDROLÍTICOS DA BIOMASSA

Enzimas são moléculas proteicas compostas por vários resíduos de aminoácidos unidos através de ligações peptídicas, e o caráter hidrofílico/hidrofóbico destes aminoácidos vai interferir nas características das mesmas. Elas atuam como catalisadores nas reações bioquímicas do metabolismo celular e têm suas propriedades como tal derivadas principalmente

de sua estrutura molecular. A catálise ocorre em uma pequena porção da proteína, chamada sítio ativo, que é formado por poucos resíduos de aminoácidos. O substrato se liga à enzima nesta porção, com determinada complementaridade geométrica e de grupamentos funcionais, desencadeando reações químicas que darão origem ao produto. Os demais aminoácidos possuem função estrutural, porém, caso ocorram mudanças significativas na sua sequência, a proteína pode perder estabilidade e desnaturar, perdendo sua estrutura natural e atividade. As enzimas, por atuarem em sistemas biológicos, operam eficientemente sob condições suaves de temperatura, pH e pressão, preservando a funcionalidade e integridade dos sistemas.^{42,43} Devido a isso, elas podem ser levadas além destes sistemas naturais e aplicadas na indústria favorecendo processos e minimizando o gasto energético.

As enzimas são classificadas de acordo com as diretrizes do Comitê de Nomenclatura da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB) em seis classes, com base no tipo de reação química que catalisam. Oxirredutases catalisam reações de oxidação/redução envolvendo a transferência de elétrons, hidrogênio ou átomos de oxigênio. Transferases catalisam a transferência de um grupo funcional de um doador para um aceptor, com subgrupos baseados na natureza química do grupo transferido. Hidrolases catalisam reações de hidrólise, ou seja, a quebra de uma ligação química pela ação da água, com subgrupos de acordo com o tipo de ligação suscetível. Liasas catalisam reações de clivagem ou formação de ligações duplas via mecanismo não hidrolítico e não oxidativo. Isomerases catalisam reações de conversão de um substrato em seu isômero. Ligases catalisam a ligação covalente entre duas moléculas às custas de ATP. Dentre todas, as hidrolases têm mais aplicações tecnológicas. Isso ocorre devido à robustez dessas enzimas, que são proteínas simples e não requerem coenzimas, muitas sendo extracelulares. Sendo assim, sua produção é facilitada e, os custos, mais são baixos.⁴²

Estes biocatalisadores são de grande interesse para a indústria, pois apresentam alta eficiência catalítica e especificidade para o substrato, bem como regio e estereoespecificidade. Essas características permitem que as enzimas catalisem uma variedade de reações de biotransformação, produzindo uma

ampla gama de compostos úteis em aplicações farmacêuticas, alimentícias e agroquímicas.⁴⁴

Elas podem ser obtidas de várias fontes biológicas, como plantas, animais e microrganismos, sendo suas propriedades/ atividade modificada de acordo com a sua origem. Contudo, enzimas provenientes de microrganismos são preferíveis devido à sua grande disponibilidade, variedade de atividades catalíticas, altos rendimentos, facilidade de manipulação genética e fornecimento constante, sem depender de flutuações sazonais. Além disso, os microrganismos podem crescer rapidamente em meios de baixo custo.⁴⁵

Para valorização da biomassa e geração de biocombustíveis, enzimas pertencentes aos grupos das hidrolases e liases são de grande interesse e já possuem aplicações em vários processos. Amilases são amplamente utilizadas na hidrólise do amido de milho para produzir etanol de primeira geração (1G) através da geração de açúcares fermentáveis. A hidrólise enzimática neste caso evita a indesejada reação de Maillard, por ser conduzida sob temperaturas amenas. Celulases e xilanases são promissoras na hidrólise de materiais lignocelulósicos para a produção de etanol de segunda geração (2G). Pesquisadores brasileiros da Embrapa e do Centro de Tecnologia Canavieira (CTC) também desenvolveram um coquetel enzimático, chamado CMX, composto por diferentes enzimas, como exoglucanases, β -glucosidases, polissacarídeo monooxigenases e xilanases, para a produção de etanol de segunda geração (2G) a partir de bagaço de cana-de-açúcar e resíduos de colheitas. Lipases também são catalisadores interessantes para converter efetivamente triacilgliceróis e ácidos graxos livres de vários óleos vegetais ou gorduras animais em biodiesel.⁴⁶

Na digestão anaeróbica para produção de biogás, também pode ser aplicada a hidrólise enzimática como um pré-tratamento. Estudos indicam que uma etapa prévia de hidrólise enzimática, pode aumentar a produção de biogás. Essa etapa fragmenta macromoléculas (lipídios, proteínas e carboidratos) por meio de enzimas específicas, facilitando a assimilação por bactérias anaeróbicas.⁴⁶

3.4.1 Carboidrases

As carboidrases, também chamadas de glicosidasas, são enzimas que catalisam a hidrólise de carboidratos, como oligossacarídeos e polissacarídeos, em açúcares mais simples, os monossacarídeos. Elas são de grande importância na indústria alimentícia e possuem grande potencial de aplicação na valorização da biomassa para gerar produtos de valor agregado. As carboidrases são predominantemente de origem microbiana e compreendem diversas classes, incluindo as amilases (α -amilases e glucoamilases), lacases, responsáveis pela oxidação de compostos fenólicos, invertases, catalisadoras da hidrólise da sacarose em glicose e frutose, e inulinases, que hidrolisam a inulina, gerando frutose. Também integram o grupo das carboidrases as galactosidasas, envolvidas na hidrólise de galactosídeos como a lactose, as celulases, especializadas na quebra de compostos ricos em celulose, as xilanases, que atuam sobre as xilanas, e as pectinases, responsáveis pela hidrólise da pectina presente em frutas.⁴⁷

3.4.1.1 Celulases

As celulases são hidrolases que catalisam a hidrólise das ligações glicosídicas da celulose, um polímero insolúvel, promovendo a sua depolimerização em monômeros solúveis e gerando açúcares fermentáveis. Elas são provenientes de diversas fontes microbianas e podem ser classificadas em três grupos principais de acordo com o tipo de ligação quebrada: endocelulases (EC 3.2.1.4), exocelulases (EC 3.2.1.74) e β -glucosidase (EC 3.2.1.21). Todas elas devem atuar sinergicamente para promover a degradação eficiente das fibras da celulose cristalina. Os principais produtos da ação da celulase são principalmente glicose e pentoses como xilose e arabinose, com traços de outros hexoses como galactose e manose.⁴⁸

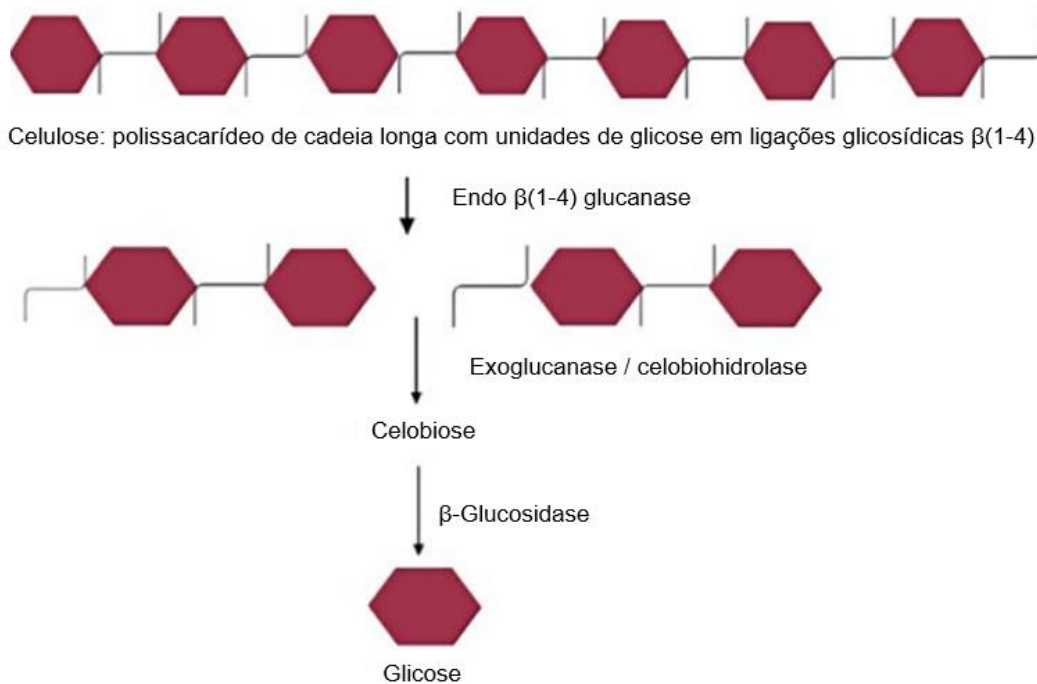


Figura 3. Esquema ilustrativo da atuação das celulases (GOLGERI M et al., 2022).⁴⁷

As endo- β -glucanases iniciam a solubilização da celulose realizando a hidrólise das ligações β -1,4 glicosídicas internas, presentes nas regiões amorfas. Esse processo resulta na geração de oligômeros de cadeia longa, com novos terminais, sendo um redutor e um não redutor. Esses oligômeros são então alvo da ação das exoglucanases ou celobiohidrolases, que atuam nas ligações externas da celulose e conseguem hidrolisar estas moléculas em oligossacarídeos de cadeia curta (Figura 3). Por fim, as β -glucosidases hidrolisam os mesmos gerando glicose.⁴⁸

3.4.1.2 Amilases

As amilases são hidrolases que catalisam a conversão do amido em monômeros como glicose e maltose, promovendo a liquefação do polímero e gerando açúcares fermentáveis. O amido é constituído por uma mistura de 15-20% de amilose (polímero de glicose ligado por ligações α -1,4) e 75-80% de amilopectina (polímero de glicose ligado por ligações α -1,4 e ramificado por ligações α -1,6). Existem duas principais classes de amilases, são elas: α -amilase (EC 3.2.1.1) e glucoamilase (EC 3.2.1.3). A α -amilase quebra aleatoriamente as

ligações α -1,4 nas cadeias lineares de amilose, enquanto a glucoamilase hidrolisa ligações α -1,4 nas extremidades não redutoras de amilose e amilopectina de forma sequencial. Além disso, a glucoamilase atua também nas ligações α -1,6 nos pontos de ramificação da amilopectina, embora em uma taxa mais lenta do que as ligações alfas.⁴⁹ O principal produto da ação da glucoamilase são unidades de glicose (Figura 4).⁵⁰ Em altas concentrações de sólidos dissolvidos, ela pode condensar a glicose em diferentes dissacarídeos, trissacarídeos e tetrassacarídeos, sendo a isomaltose a mais significativa.⁵¹

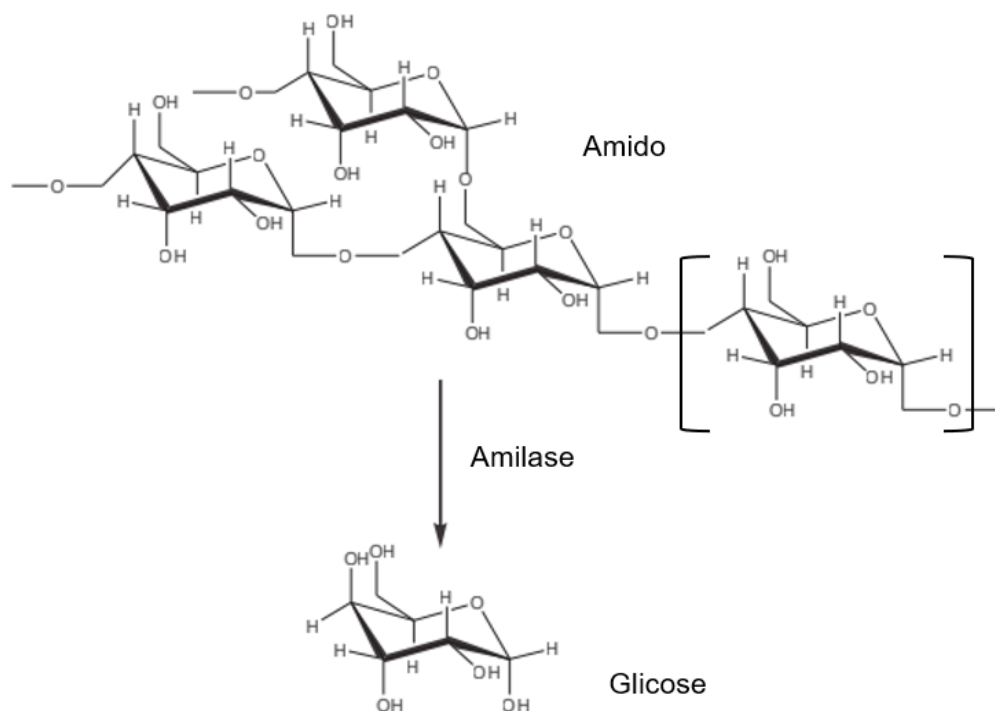


Figura 4. Esquema ilustrativo da atuação das amilases (Adaptado de ŻYMAŃCZYK-DUDA et al., 2016).⁵²

O mercado global de enzimas alimentares tem projeção de crescimento, com perspectivas de atingir US\$ 3.125,1 milhões até 2024.⁵³ As amilases são de grande importância na hidrólise do amido para fins industriais, representando aproximadamente 25% a 30% de todo o mercado de enzimas.

3.4.1.3 Pectinases

As pectinases catalisam a quebra da pectina, um polissacarídeo estrutural, composto por unidades de α -1,4-ácidos galacturônicos, que possuem

uma quantidade variável de resíduos metilados de ácidos carboxílicos.⁵⁴ Esta cadeia polimérica contém moléculas de L-ramnose, arabinose, galactose e xilose como grupamentos laterais. Conforme o mecanismo de ação sobre a pectina, as enzimas pectinases podem ser classificadas essencialmente em três grupos: pectina esterase (EC 3.1.1.11); pectina liase (4.2.2.10) e pectato liase (EC 4.2.2.2); poligalacturonases (EC 3.2.1.15) (Figura 5). A enzima pectina esterase (polimetilgalacturonato esterase) realiza a hidrólise dos grupos metil éster da pectina, resultando na liberação de metanol e na conversão da pectina em pectato (polímero não esterificado). As poligalacturonases promovem a hidrólise de ligações glicosídicas α -1,4 entre dois resíduos de ácido galacturônico. Essa enzima apresenta a maior função hidrolítica, podendo hidrolisar ligações endo ou exo do ácido péctico, produto gerado pela protonação do pectato. As poligalacturonases provenientes de fungos possuem alta atividade e possuem pH ótimo levemente ácido e temperatura ideal entre 30 e 50 °C.⁵⁵

Já a pectato liase catalisa a quebra de ligações α -1,4 do ácido péctico por meio da reação de trans-eliminação, podendo atuar tanto de maneira endo quanto exo. Sua atividade requer a presença de íons Ca^{2+} e seu pH ótimo situa-se na região alcalina. Por fim, a pectina liase catalisa a reação de β -eliminação entre dois resíduos de ácido galacturônico da pectina. Essa reação pode ocorrer de maneira endo (clivagem interna aleatória) ou exo (clivagem sequencial nas extremidades da molécula).⁵⁵

As pectinases possuem uma diversa gama de aplicações, sendo utilizadas na produção de café e chocolate para melhorar a fermentação e remover a mucilagem dos grãos. No setor de alimentos, são amplamente empregadas para aumentar rendimentos de suco e acelerar a clarificação. Elas também são aplicadas para intensificar a cor dos sucos, promover a formação de antioxidantes e favorecer a extração de componentes de cor, sabor e açúcares fermentáveis quando adicionadas a uvas ou mostos durante a produção de vinho.⁴⁹

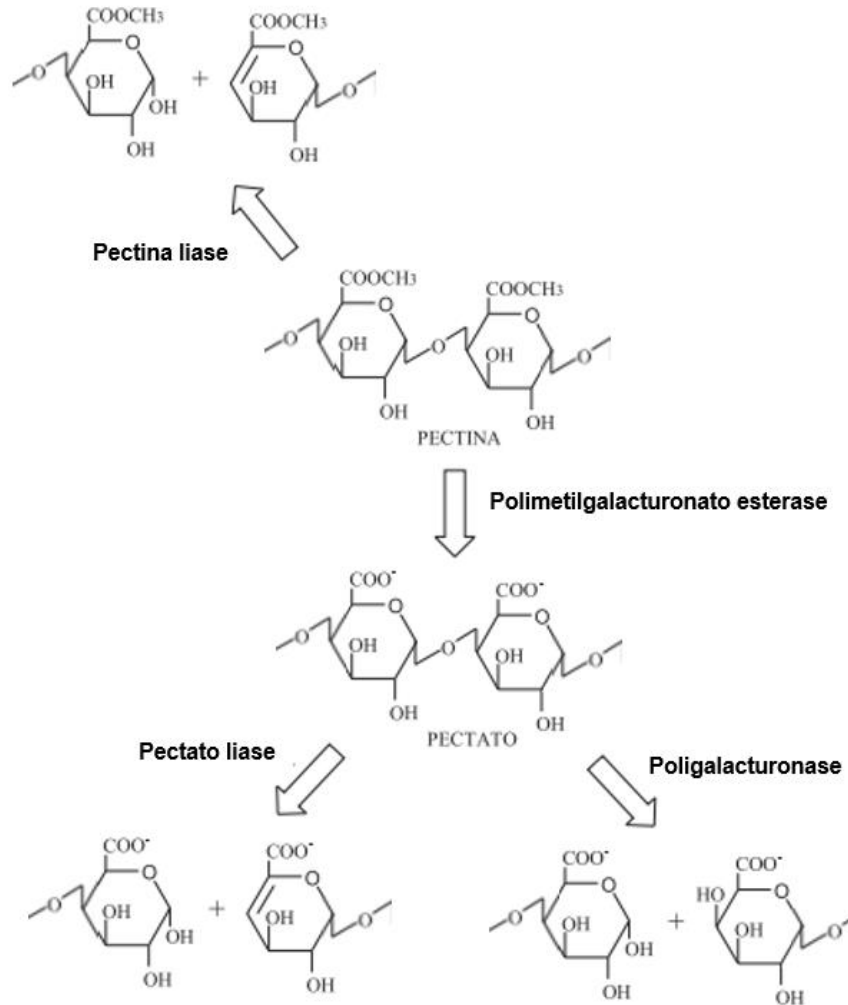


Figura 5. Produtos gerados pelas principais pectinases.⁵⁵

3.4.2 Lipases

As lipases (triacilglicerol acil hidrolases, EC 3.1.1.3) pertencem a família das hidrolases e são enzimas solúveis em água que desempenham um papel fundamental no metabolismo e na digestão de gorduras em sistemas biológicos. Elas catalisam a hidrólise de gorduras e óleos na interface água/lipídio quando estão meios aquosos, atuando sobre a ligação éster destes compostos (Figura 6). A hidrólise dos triacilgliceróis presentes nos óleos e gorduras geram diacilglicerol, monoacilglicerol, glicerol e ácidos graxos livres.⁵⁶

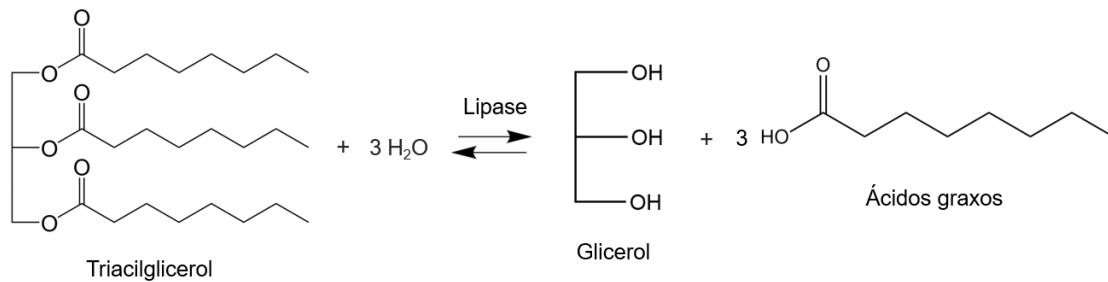
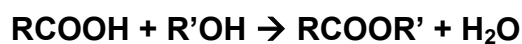


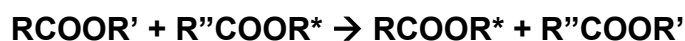
Figura 6. Ação da lipase em meio aquoso – reação de hidrólise de óleos e gorduras.

Em meios não aquosos, as reações bioquímicas impulsionadas por lipases são reações de síntese como: esterificação, interesterificação, alcoólise, acidólise e a transesterificação, reação que gera biodiesel.⁵⁷

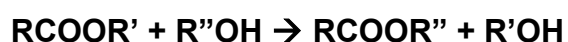
(a) Esterificação: reação entre um ácido carboxílico e um álcool para formação de um éster.



(b) Interesterificação: reação entre dois ésteres para formação de dois novos ésteres com grupamentos trocados.



(c) Alcoólise: reação entre um éster e um álcool para formação de um novo éster e um novo álcool.



(d) Acidólise: reação entre um éster e um ácido carboxílico para formação de um novo éster e um novo ácido.



(e) Transesterificação: reação entre triacilgliceróis e metanol para geração de metil ésteres (biodiesel) e glicerol.

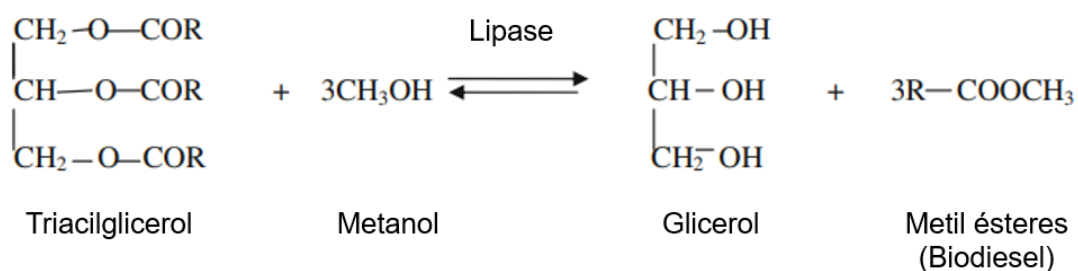


Figura 7. Reação de transesterificação catalisada pela lipase para geração de biodiesel.⁵⁸

Estas enzimas também exibem propriedades quimio-, regio- e estereoseletivas, tornando-as altamente desejáveis para diversos tipos de aplicações industriais.⁵⁶ Todas as características citadas as fazem ser de grande interesse, sendo as lipases o terceiro maior grupo de enzimas aplicado comercialmente, atrás somente das proteases e amilases. Elas são extensivamente empregadas em setores como alimentos, saborizantes, detergentes, produtos farmacêuticos, bioenergia e produtos químicos finos.⁵⁹

As lipases também exibem uma característica interessante denominada "ativação interfacial", quando em contato com a interface água/óleo. Seu mecanismo de ação envolve a movimentação da tampa do resíduo de aminoácido sobre sítio ativo, resultando em um estado conformacional aberto da enzima e expondo o mesmo para que a reação ocorra. Essa capacidade permite que as lipases, entre outras funções, hidrolisem compostos contendo grupos éster de ácido carboxílico que estão agregados em meio aquoso. Essa configuração é crucial para a atividade da lipase, como a atividade enantiosseletiva e lipolítica – Figura 8.⁶⁰

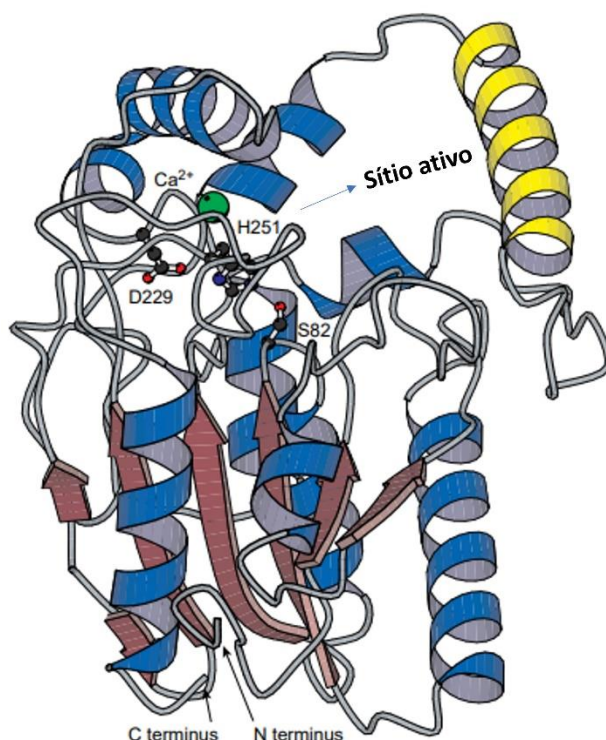


Figura 8. Estrutura de lipase de *Pseudomonas aeruginosa*. Tampa helicoidal de aminoácidos está representada em amarelo sobre o sítio ativo da enzima, formado pelos resíduos S82 (serina), D229 (ácido aspártico) e H251 (histidina).⁶¹

3.5 IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

As enzimas, devido às suas excelentes propriedades funcionais (atividade, seletividade, especificidade), apresentam um grande potencial como catalisadores industriais em várias áreas da indústria química. No entanto, essas moléculas foram otimizadas pela evolução para operar em ambientes complexos dentro de células vivas, e não em condições necessárias nos reatores industriais. Desta forma, elas possuem limitações que muitas vezes podem ser o gargalo para sua aplicação na indústria. Dentre elas destacam-se a instabilidade em condições não fisiológicas, a susceptibilidade à inibição por substratos e produtos e à perda da atividade devido a variações nas condições do meio. Assim, frequentemente, é necessário realizar melhorias significativas nas enzimas para adaptá-las ao contexto industrial.⁴² Somam-se a essas questões o fato de as enzimas serem solúveis em água e, portanto, difíceis e dispendiosas de recuperar. Como resultado, muitas enzimas são utilizadas de forma descartável, o que não é econômico e não está alinhado com as ideias atuais de

economia circular.⁶² Para um sistema doméstico de valorização da biomassa, a possibilidade de recuperação e reutilização do biocatalisador também acaba sendo fundamental.

Desta forma, a imobilização das proteínas surge como uma possibilidade para contornar estas características indesejáveis na aplicação comercial. A transformação de um catalisador homogêneo em um catalisador heterogêneo permite a sua recuperação e reutilização, simplificando o processo, aprimorando a qualidade do produto, por evitar contaminações, e reduzindo efeitos nocivos ao ambiente. A imobilização também proporciona uma maior estabilidade em relação à desnaturação causada por calor, solventes orgânicos e variações do meio, podendo também melhorar a atividade da enzima e aumentar o tempo de estocagem.⁶²

A imobilização de enzimas consiste na separação dessas biomoléculas do meio reacional podendo essa se dar através da fixação da proteína em um suporte sólido, gerando um biocatalisador heterogêneo. Existem várias estratégias para imobilização, dentre elas ligação covalente, adsorção física, reticulação e confinamento. A diversidade de propriedades dos substratos, as distintas aplicações dos produtos obtidos, os diferentes materiais utilizados como suporte e as variadas características físico-químicas de cada enzima demandam a utilização de diversos métodos de imobilização e suportes, não havendo uma abordagem única que seja universalmente aplicável a todas as enzimas.⁶³ O custo da imobilização enzimática inclui o gasto com o material (suporte) e o processo de imobilização. Desta forma, é importante salientar também que o protocolo de imobilização, especialmente o suporte, deve ser economicamente viável.⁶⁴

3.5.1 Imobilização por adsorção física

A imobilização de enzimas por adsorção é o método mais simples de imobilização e é baseado na interação entre o suporte, que tem que ser inerte, e a enzima, através de interações iônicas (Figura 9) ou do efeito hidrofóbico (Figura 10). As interações iônicas ocorrem quando a carga do suporte e da enzima são opostas. O tipo de interação formada depende da química superficial do suporte e do tipo e carga dos resíduos de aminoácidos presentes na

superfície da proteína. Este controle normalmente é feito através do pH, comparando os pontos isoelétricos das enzimas com o ponto de carga zero do material. Esta estratégia oferece vantagens como maior estabilidade enzimática, facilidade de regeneração do suporte, pois através da mudança da carga a enzima pode ser removida, além de promover uma menor perda de atividade da enzima ao ser imobilizada. Porém, ainda pode ocorrer perda de atividade, dependendo de como a enzima for fixada na superfície do material, devido a impedimentos estéricos e difusionais. É importante considerar que a enzima suportada por interações eletrostáticas deve operar em um pH compatível com seu ponto isoelétrico e atividade, uma vez que a conformação enzimática varia conforme o pH. ⁶⁵



Figura 9. Imobilização por ligação iônica, o suporte e a enzima necessitam estar com cargas opostas.



Figura 10. Imobilização de enzimas via adsorção pelo efeito hidrofóbico.⁶³

O procedimento para este tipo de imobilização é extremamente simples, basta colocar a enzima em contato com o suporte, que deve ter grande área superficial, em condições adequadas de pH e força iônica. O processo é de baixo custo, em comparação com as demais técnicas, tornando-a umas das

estratégias mais utilizadas.^{62,63} Alguns suportes que podem ser utilizados para a adsorção são: carvão ativado, polímeros como quitosana, sílica e óxidos metálicos.

3.5.2 Imobilização por ligação covalente

A imobilização de enzimas por meio da ligação covalente oferece uma interação química forte entre o suporte e a enzima, gerada por uma ligação covalentes entre eles (Figura 11A). O número de ligações químicas entre o suporte e a enzima é o que define a estabilização da enzima imobilizada, quanto mais ligações, mais estável será a enzima, por isso muitas vezes a imobilização por múltiplas ligações covalentes com grupamentos da superfície do suporte pode ser interessante (Figura 11B). Esta ligação forte confere rigidez a estrutura da enzima mantendo sua estrutura inalterada frente a agentes desnaturantes como pH, calor, solventes orgânicos, etc, aumentando a eficiência do biocatalisador em comparação a forma livre. Porém, caso a enzima tenha uma conformação diferente em sua forma ativa, este tipo de imobilização pode impedir a mudança na estrutura para atingi-la, gerando perda de atividade. Ademais, dependendo de como a enzima é imobilizada, o sítio ativo pode ficar inacessível ao substrato.^{62,63}

A fim de diminuir esta rigidez estrutural da proteína, pode-se modificar a superfície do material com algum grupo funcional que funcionará como um braço espaçador entre a proteína e o suporte (Figura 11C). Estes grupos promoverão uma reação química com resíduos de aminoácidos da enzima, fixando-a. Podem ser utilizados grupos aldeído, amina e carboxílicos e as moléculas normalmente utilizadas para fornecê-los são o glutaraldeído, glicoxil e silanos aminados como APTES.^{49,63} Os suportes devem ter uma alta área superficial e podem ser usados polímeros inorgânicos como sílica, polímeros naturais e sintéticos como celulose, quitosana e nylon. Em geral, o processo de imobilização via ligação covalente tem um custo alto, porém permite sua aplicação e uma maior reutilização em uma ampla gama de processos.

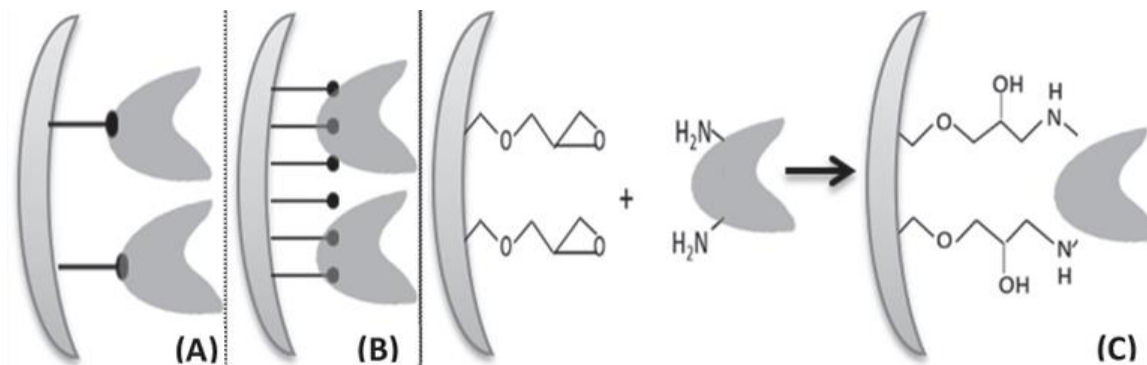


Figura 11. Enzimas imobilizadas covalentemente: (A) ligação covalente pontual; (B) ligação covalente multipontual; (C) ligação covalente mediada por um grupo funcional com função de braço espaçador entre a enzima e o suporte.⁶³

3.6 BIOSUPORTES

Levando em consideração os princípios da bioeconomia circular e a atual demanda por metodologias sustentáveis e verdes na indústria de enzimas, o uso de biosuportes pode ser uma alternativa válida. Dentre estes materiais sustentáveis com grande potencial para a imobilização de enzimas estão os resíduos agroindustriais, que trazem benefícios econômicos para a indústria e uma redução dos problemas no descarte dos mesmos.⁶⁶

Um possível suporte renovável gerado a partir da biomassa é o biochar. O biochar é um composto sólido, negro, altamente poroso, estável e leve, formado pela decomposição térmica da biomassa a 300-950 °C sem a presença de oxigênio para evitar sua combustão. Essa decomposição ocorre por meio da pirólise, processo no qual a biomassa é submetida a elevadas temperaturas, resultando em alterações em suas composições químicas. O rendimento do biochar e suas propriedades físico-químicas, como área superficial, tamanho de poro, teor de carbono e grupos funcionais, dependem principalmente das condições do processo de pirólise e do tipo de matéria-prima utilizada em sua preparação. Sua produção e aplicação contribuem diretamente para a bioeconomia circular, pois é possível utilizar diversas fontes de biomassa como matéria-primas (materiais lignocelulósicos como madeira, resíduos agroindustriais, algas, resíduos de esgoto, etc).^{67,68}

O biochar, por possuir alta área superficial (600–1300 m²/g) e alta estabilidade, por ser insolúvel em água e ser inerte, se faz um material promissor

para a imobilização de enzimas. Ademais, o biochar possui abundância de grupamentos poliaromáticos e de grupos funcionais, como -OH, C-O, -COOH, C=O, e NH_x, em sua superfície, o que o torna um suporte interessante para a imobilização de enzimas.^{68,69} Aplicando-se modificações ácidas/básicas na sua superfície é possível melhorar propriedades como a área superficial e expor ainda mais grupamentos funcionais, aumentando a interação com as enzimas. Os principais métodos de imobilização de enzimas neste material são a adsorção e a ligação covalente.^{67,68}

De acordo com a necessidade, é comumente alterado para ajustar suas propriedades e melhorar sua adequação para a aplicação final. Para ser utilizado como suporte de imobilização, o biochar precisa passar por modificações para aumentar sua área superficial específica e fração de poros, ou para desenvolver grupos funcionais reativos (Figura 12).

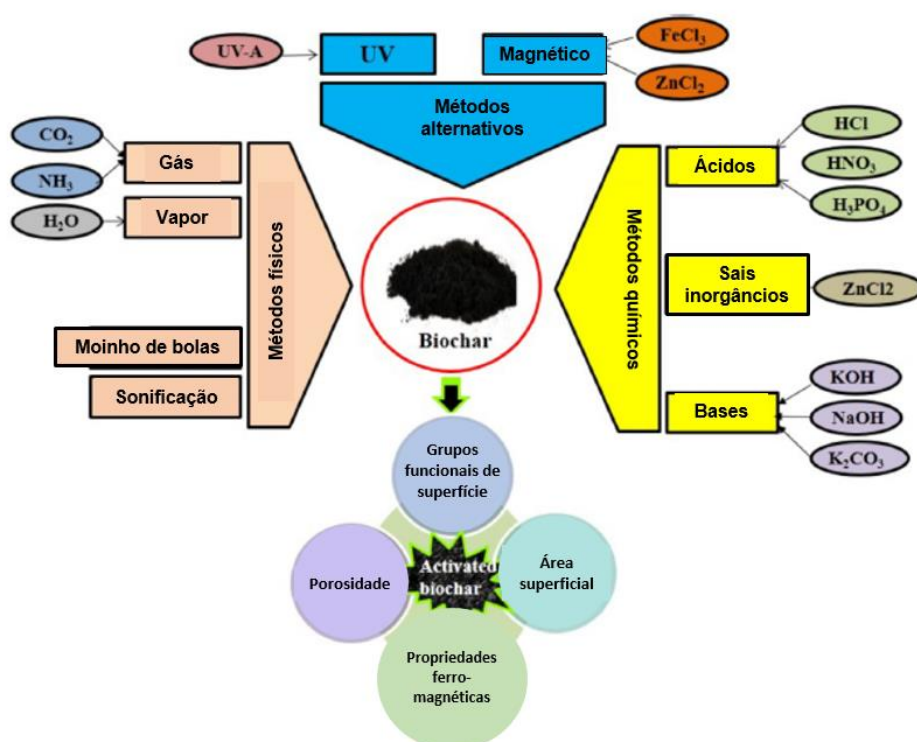


Figura 12. Métodos de modificação do biochar para melhorar propriedades conforme a aplicação final.⁶⁷

As modificações físicas envolvem o uso de agentes físicos, como vapor, dióxido de carbono, nitrogênio, etc., para a modificação. Aplicando vapor é

possível abrir poros finos contidos na estrutura do carbono, que depois darão origem a poros maiores, o que aumentará a área superficial. A oxidação branda do biochar utilizando ar também demonstrou aumentar a densidade de grupos funcionais superficiais oxigenados. Já as modificações químicas, envolvem o uso de agentes químicos como ácidos, que possuem a capacidade de aumentar os grupos oxigenados na superfície e a hidrofiliabilidade, e bases como KOH, que podem aumentar a área superficial e a porosidade, como citado anteriormente. Outros métodos de modificação também são possíveis, como por exemplo a adição de FeCl_3 para proporcionar propriedades ferromagnéticas, permitindo uma separação mais eficiente das partículas de biochar. A pirólise térmica da biomassa tratada com FeCl_3 resulta na formação de um composto biochar/ γ - Fe_2O_3 . A aplicação de luz UV também pode oxidar o material e gerar grupos funcionais oxigenados.^{67,70}

Outros tipos de biosuportes que podem ser empregados são aqueles oriundos de resíduos agroindustriais, que são facilmente disponíveis e não tóxicos e podem ser adequados para a imobilização enzimática. A ampla área superficial é uma das propriedades fundamentais dessas matérias-primas, assegurando uma carga elevada de enzimas e uma porosidade significativa que possibilita a proteção dos sítios catalíticos do ambiente. Resíduos agrícolas apresentam também a presença de diferentes grupos químicos (amino, hidroxila, carboxila, tiol e fosfato), que podem promover vários mecanismos complexos, incluindo adsorção superficial, atração iônica, complexação, quelação e coordenação.⁶⁶

4. METODOLOGIA:

4.1 PREPARO DAS AMOSTRAS DE RESÍDUOS ALIMENTARES

Segundo Chang & Chen (2010)⁷¹, a composição média, em massa, dos resíduos alimentares de cozinha é de 12-20% de proteínas, 52-65% de carboidratos e 15-35% de lipídios. Desta forma, para realização dos experimentos e possibilidade de controle sobre a matriz estudada, foi simulada uma amostra de resíduos alimentares contendo 18% de proteína, 64,6 % de carboidratos e 17,5 % de lipídios. Para a composição majoritária destes grupos de macromoléculas foi levado em consideração um estudo relacionado a

evolução dos alimentos mais consumidos no Brasil entre 2008-2009 e 2017-2018.⁷² Desta forma, a fração proteica foi composta de carne de frango e a fração lipídica, de óleo de soja e pele de frango. A fração de carboidratos foi composta de casca de laranja, casca de banana, casca de maçã, folhas de alface e rúcula, batata-doce cozida, arroz cozido, batata cozida e macarrão cozido. Todos os alimentos foram processados em liquidificador industrial até que fosse gerada uma mistura homogênea. Essa mistura foi posteriormente fracionada em embalagens herméticas de polietileno e armazenada no freezer.

4.2 AVALIAÇÃO DOS PRODUTOS DA ATIVIDADE DAS ENZIMAS

Ao final das reações de hidrólise, coletaram-se as fases aquosa e oleosa, nas quais a atividade enzimática foi quantificada de acordo com o tipo de enzima empregada. Todos os resultados foram comparados com aqueles obtidos para uma amostra controle. Sendo um aumento significativo na concentração dos analitos avaliados em relação ao controle, um indicativo da atividade enzimática. Para verificar este aumento significativo em relação ao controle e comparar a atividade das enzimas durante os experimentos de otimização da concentração, foi aplicado o teste estatístico de Tukey ($p=0.05$), que gerou resultados com 95% de confiança.

4.2.1 Produtos da atividade das lipases

As lipases hidrolisam lipídios para produzir ácidos graxos e glicerol; portanto, sua atividade foi quantificada pela determinação da acidez e da concentração de ácidos graxos através de titulação com NaOH.⁷³ Os produtos da atividade das lipases foram avaliados inicialmente na fase oleosa. Posteriormente, nos experimentos de otimização, eles foram avaliados em ambas as fases, aquosa e oleosa.



Figura 13. Reação de neutralização dos ácidos graxos com hidróxido de sódio - princípio da quantificação destes compostos por titulação (Adaptado de HOCHSCHEIDT et al., 2020).⁷⁴

Para determinação da atividade na fase oleosa, após a centrifugação, as amostras foram submetidas a um processo de extração líquido-líquido para obtenção do óleo, segundo um método modificado de Quadros et al. (2016).⁷⁵ Ao final da reação enzimática no resíduo alimentar, as amostras foram centrifugadas a 3500 rpm por 10 minutos. A fase sólida foi descartada e, as fases oleosa e aquosa foram transferidas para tubos Falcon de 15 mL. A estes tubos, foram adicionados 2 mL de diclorometano seguidos por uma vigorosa agitação. Então, os mesmos foram postos em banho ultrassônico por 2 minutos e posteriormente centrifugados (Centrífuga FANEM® Excelsa® II) a 3500 rpm por 5 minutos. A fase orgânica contendo os ácidos graxos foi coletada e o processo foi repetido. Por fim, deixou-se evaporar o solvente para posterior titulação do óleo com NaOH 0,1 M previamente padronizado. A titulação foi realizada conforme o procedimento a seguir: num Erlenmeyer foram pesadas aproximadamente 0,75 g de amostra do óleo extraído, adicionados 10 mL de álcool etílico P.A e 6 gotas do indicador fenolftaleína 0,1%. O conteúdo do erlenmeyer foi titulado com NaOH 0,1 M até o aparecimento da coloração rósea.⁷³ A porcentagem de acidez na fase oleosa foi calculada segundo a equação abaixo, sendo a 873,32 g/mol a massa molar do óleo de soja.⁷⁶

$$\% \text{ acidez} = \left(\frac{[\text{NaOH}] \times V}{\frac{m_{\text{óleo}}}{873,32}} \right) \times 100 \quad (1)$$

Onde:

[NaOH] = concentração da solução padronizada de hidróxido de sódio (mol/L)

V = volume corrigido lido na bureta (L)

$m_{\text{óleo}}$ = massa de amostra de óleo pesada para a titulação (g)

Para a avaliação da atividade na fase aquosa, houve um problema na visualização do ponto final com o auxílio da fenolftaleína, pois a solução da lipase de interesse é colorida. Assim, a fim de minimizar erros oriundos desta dificuldade visual, foi empregada a titulação potenciométrica a fim de quantificar os ácidos graxos gerados, seguindo uma metodologia adaptada de OSAWA et al. (2006).⁷⁷ Nesta técnica foi monitorado o pH do meio em função do volume de titulante adicionado. Construiu-se uma curva de titulação para as fases aquosas das amostras controle e daquelas geradas na hidrólise com as lipases, a fim de verificar o pH e o volume do ponto de equivalência. Verificou-se que o pH do ponto de equivalência se manteve o mesmo tanto para as amostras controle como para aquelas com diferentes concentrações de enzima. Assim, não foi construída uma curva de titulação para cada amostra, o volume de titulante foi adicionado até ser atingido o pH do ponto de equivalência, previamente determinado para cada grupo de amostras. Para realização da titulação potenciométrica, 7 mL de etanol foram adicionados a 7 mL da fase aquosa a fim de solubilizar possíveis microemulsões; a mistura foi titulada com NaOH 0,1 M padronizado. As medidas foram realizadas utilizando um pHmetro Simpla PH 140.

4.2.2 Produtos da atividade das carboidrases

As celulasas, pectinases e amilase estudadas promovem a hidrólise dos carboidratos (matrizes celulósicas, pectina e amido) gerando açúcares redutores como produtos majoritários. Açúcares redutores caracterizam-se por possuírem extremidades reductoras em sua cadeia carbônica, como grupos cetônicos e carboxílicos livres, capazes de sofrerem oxidação em meio básico na presença de agentes oxidantes.⁷⁸ Assim, a determinação dos produtos gerados pela atividade das carboidrases estudadas se deu pelo método ADNS, baseado na capacidade do ácido 3,5-dinitrosalicílico (ADNS) ser reduzido por esses açúcares. A redução do ADNS gera o ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, um composto aromático que absorve fortemente a luz em 540 nm. Sendo assim, é

possível estabelecer uma correlação direta entre a medida colorimétrica e a concentração de açúcares redutores presentes na amostra.⁷⁹

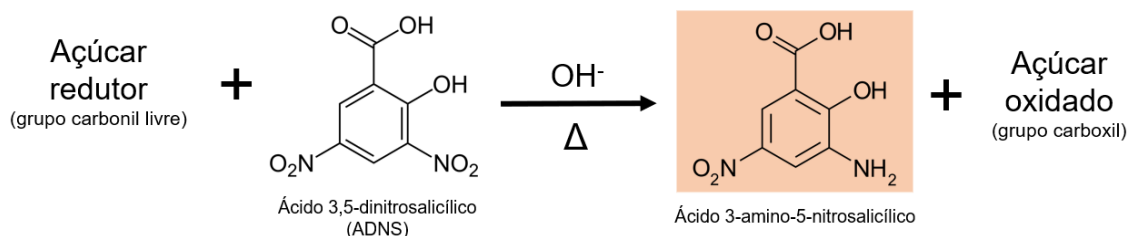


Figura 14. Reação de redução do ácido 3,5-dinitrosalicílico (ADNS) pelos açúcares redutores - princípio do método ADNS para determinação destes compostos (Adaptado de MOURA DE VASCONCELOS et al., 2013).⁸⁰

Neste caso, foram analisadas as fases aquosas obtidas pós-centrifugação da mistura produto da reação de hidrólise enzimática. O procedimento analítico consistiu em transferir 0,5 mL de cada amostra para tubos de ensaio, adicionar 0,5 mL do reagente DNS a cada tubo e homogeneizar vigorosamente. Os tubos foram levados para banho-maria com água em 100 °C por 15 min e, posteriormente resfriados em banho de gelo para interromper a reação. O volume de cada tubo foi completado para 5 mL com água deionizada e a absorbância, lida em 540 nm (Espectrofotômetro UV-1600, PRÓ-ANÁLISE). O reagente DNS foi preparado a partir da mistura de duas soluções: solução A (10 g de ácido 3,5-dinitrossalicílico em 200 mL de NaOH 2M) e solução B (300 g de tartarato duplo de sódio e potássio em 500 mL de água). Para quantificação, foi utilizada uma curva padrão de glicose com 10 pontos de calibração nas concentrações de 0,1 a 1 g/L.⁸⁰ A concentração de açúcares redutores obtida em equivalente de glicose.

4.3 SÍNTESE DO BIOCHAR MAGNÉTICO

Para imobilização das enzimas avaliadas neste estudo, foi preparado um biochar magnético de biomassa de *Ayous* com o intuito de utilizá-lo como suporte. O material foi preparado pelo Laboratório de Tecnologia Ambiental e Analítica (LATAMA). Durante a síntese, adicionou-se o hidróxido de potássio (KOH) como agente ativador a fim de aumentar a área específica da superfície do biochar. Primeiramente, foi preparada uma solução de FeCl₃. Em seguida, o

pó da biomassa de *Ayous* e o KOH foram adicionados à solução e misturados completamente para formar uma pasta.⁸¹ A mistura foi agitada com um agitador magnético a 90°C por duas horas. A pasta homogênea formada foi seca em estufa e, após a secagem, foi introduzida em um reator de tubo de quartzo dentro de um forno convencional (Sanchis, Brasil). O aquecimento foi realizado da temperatura ambiente até 700°C sob atmosfera inerte. Finalizada a pirólise, o forno foi desligado, mas o fluxo de nitrogênio foi mantido até a temperatura atingir um valor inferior a 100°C.^{82,83} Após o resfriamento, o material obtido foi lavado com uma solução de HCl 0,1 mol/L em um sistema de refluxo a cerca de 80°C por 120 minutos com o objetivo de lixiviar o ferro em excesso. Posteriormente, ele foi lavado exaustivamente com água deionizada até que o pH das águas de lavagem atingisse o pH de neutralidade e seco em estufa a 105°C durante a noite.

4.4 CARACTERIZAÇÃO DO BIOCHAR MAGNÉTICO

Para imobilização das enzimas no biochar, a área específica e o volume de poros do material são de grande importância. Caso estes parâmetros tenham valores significativamente altos, permitem a adsorção na superfície e a permeação das proteínas nos poros. Assim, as isotermas de adsorção e dessorção de nitrogênio foram obtidas na temperatura de ebulição do nitrogênio, no Equipamento Micromeritics Tristar II Kr 3020 (Norcross, EUA). As amostras foram previamente aquecidas a 120 °C, sob vácuo, por 10h. As áreas específicas foram estimadas usando-se o método BET (Brunauer, Emmett and Teller) e a distribuição de tamanho de poros, usando-se o método DFT (Differential Functional Theory).⁸⁴

Foi determinado o pH no qual a superfície do material se torna eletricamente neutra (pH do ponto de carga zero, pH_{pcz}) a fim de traçar uma relação com os pontos isoelétricos das enzimas e definir a faixa de pH na qual a imobilização seria estudada. Preparou-se uma solução de NaCl 0,05 mol/L, que então foi porcionada em frascos nos quais os valores de pH foram ajustados entre 2,0 e 10,0 por meio da adição de NaOH ou HCl 0,10 mol/L. Adicionou-se 20 mL da solução de cada um dos frascos a 50 mg da amostra do biochar. As suspensões foram agitadas por 12 horas a 25°C e 120 rpm numa Mesa Agitadora

Recíproca Refrigerada Oxy-303 (Oxylab). O pH foi medido antes (pH inicial, pH_i) e após o período de contato do material com o meio (pH final, pH_f). O valor de pH_{pcz} foi determinado através da curva de ΔpH ($pH_f - pH_i$) em função do pH_i , sendo o ponto de carga zero aquele no qual a curva ΔpH ($pH_f - pH_i$) x pH_i cruza o eixo da abscissa.⁸⁵

Com o intuito de obter mais informações sobre os grupamentos funcionais da superfície do biochar, foi realizada a análise elementar C,H,N que fornece o teor de carbono, nitrogênio e hidrogênio no material sintetizado (analisador Perkin Elmer 2400 Series II). A análise termogravimétrica (TGA, do inglês *Thermogravimetric Analysis*) tem como objetivo determinar a estabilidade térmica de um material e sua fração de componentes voláteis pelo acompanhamento da variação da massa que ocorre quando uma amostra é aquecida. Assim, a análise termogravimétrica no biochar sintetizado foi realizada em um equipamento TA Instruments, modelo SDT Q600 (Newcastle, Estados Unidos da América). Para realização da análise, aproximadamente 10 miligramas do biochar foi colocada em um cadinho de platina na panela de uma microbalança e, em seguida, aquecida entre 20 °C e 1000 °C a uma taxa de aquecimento de 10 °C/ min e fluxo de ar sintético de 100 mL/min.⁸⁶

4.5 IMOBILIZAÇÃO DAS ENZIMAS

Para a imobilização das enzimas, foi estudado o biochar magnético de biomassa de *Ayous* previamente sintetizado. A porcentagem de imobilização foi avaliada através do método de Bradford para determinação de proteínas totais, baseado na ligação do Azul Brilhante de Coomassie G-250 à proteína. A ligação do corante à proteína provoca um deslocamento no máximo de absorção do corante de 465 para 595 nm, e é o aumento na absorção em 595 nm que é monitorado e relacionado com a concentração de proteína no meio. Este complexo proteína-corante tem coloração azul e estabilidade por até 1 h, sendo possível sua quantificação por espectrometria no UV-vis com alta sensibilidade através de uma relação linear.⁸⁷

O procedimento experimental consistiu em adicionar 20 μ L de amostra à 1 mL do reagente de Bradford comercial (Quick Start™ Bradford 1x Dye Reagent, Bio-Rad), homogeneizar e, após 30 minutos, ler a absorbância em 595

nm (Espectrofotômetro UV-1600, PRÓ-ANÁLISE). Utilizou-se como referência um controle negativo/branco contendo o reagente e água tipo II. Para quantificação, foi utilizada uma curva padrão de albumina sérica bovina (BSA) dissolvida em água tipo II contendo 10 pontos de calibração nas concentrações de 0,1 a 1 mg/mL.

4.5.1 Imobilização das carboidrases

Para as concentrações das enzimas carboidrases que demonstraram o melhor custo-benefício no estudo inicial da atividade na forma livre, foi avaliada a imobilização no biochar magnético. Portanto, para imobilização foi preparada uma solução contendo o mix destas enzimas na concentração determinada na fase de otimização.

4.5.1.1 Imobilização no biochar magnético

Através da análise do ponto de eletroneutralidade das enzimas e do biochar sintetizado, foi constatado que a faixa de pH que poderia gerar uma diferença significativa de carga entre as proteínas e o suporte era 5,0 – 5,5. Assim, a imobilização das carboidrases no biochar magnético foi testada em pH 5,0 e 5,5, pois esta foi a faixa que apresentou a maior diferença entre os pHs de eletroneutralidade das enzimas (pH= 3,4 - 4,3) e do suporte (pH = 5,9), aumentando a probabilidade de imobilização por atração eletrostática.

Neste contexto, foram preparados tampões citrato/fosfato 0,15 M em pH 5,0 e 5,5. As soluções do mix de enzimas foram preparadas nestes tampões. Estas soluções foram postas em contato com o suporte em incubadora de bancada CIENTECH CT-712 por 24 h. Foi feita uma amostra controle do biochar no tampão a fim de verificar se haveria algum grupamento funcional que, naquele pH, poderia interagir com o alimento posteriormente durante o estudo da eficiência de imobilização. Após as 24 h de imobilização, as amostras foram centrifugadas a 3500 rpm por 5 minutos (Centrífuga FANEM® Excelsa® II). O sobrenadante foi coletado e o sólido, lavado com 2 mL de tampão a fim de retirar as enzimas não adsorvidas no suporte.

A fim de determinar a porcentagem de imobilização, aplicou-se o método de Bradford para quantificação de proteína total, como descrito no tópico 4.7. A

concentração de proteína total foi determinada na solução enzimática que foi posta em contato com o biochar, no sobrenadante, nas lavagens e nas amostras controle. A porcentagem de imobilização foi calculada de acordo com a fórmula abaixo:

$$\% \text{ imobilização} = \left(\frac{[\text{proteína}]_o - ([\text{proteína}]_f + [\text{proteína}]_{lav})}{[\text{proteína}]_o} \right) \times 100 \quad (2)$$

Onde:

$[\text{proteína}]_o$ = concentração de proteína na solução enzimática que foi posta em contato com o biochar (mg/mL)

$[\text{proteína}]_f$ = concentração de proteína no sobrenadante remanescente após a hidrólise (mg/mL)

$[\text{proteína}]_{lav}$ = concentração de proteína na lavagem (mg/mL)

4.5.2 Imobilização da lipase

Como será discutido posteriormente, o pH de eletroneutralidade da lipase ficou muito próximo ao ponto de carga zero do biochar magnético. Portanto, uma imobilização via atração eletrostática fica dificultada neste caso. Assim, foi necessária uma estratégia diferente para imobilização desta enzima.

4.6 DETERMINAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE IMOBILIZAÇÃO

Para estudar a atividade das enzimas imobilizadas, realizou-se a reação de hidrólise do resíduo alimentar com os biocatalisadores obtidos da imobilização. Foi estudado também o comportamento das amostras controle obtidas da imobilização. Para isso, os materiais contendo as enzimas imobilizadas e as amostras controle foram postos em contato com o alimento em água e incubados conforme os procedimentos da hidrólise descrito no item 4.2. Para avaliar a atividade da enzima lipase imobilizada no suporte, foram feitas as titulações da fase aquosa e oleosa recuperadas após a reação de hidrólise, como já descrito anteriormente no item 4.3.1. Além disso, o método do ADNS também foi utilizado para avaliar esta atividade da lipase na fração sólida.

Bem como, para avaliar a atividade do mix de carboidrases imobilizadas no biochar, foi determinada a concentração de açúcares redutores na fase

aquosa obtida após a hidrólise, segundo o método do ADNS (tópico 4.3.2). A eficiência de imobilização foi calculada de acordo com a equação abaixo:

$$Eficiência = \left(\frac{[produto]_{imobilizada}}{([produto]_{livre} \times \% imobilização)} \right) \times 100 \quad (3)$$

Onde:

[produto]_{imobilizada} = concentração de produto (açúcares redutores ou ácidos graxos) obtida através da hidrólise com a enzima imobilizada

[produto]_{livre} = concentração de produto (açúcares redutores ou ácidos graxos) obtida através da hidrólise com a enzima livre

% imobilização = porcentagem de imobilização dividida por 100

4.7 ANÁLISE POR CLAE-IR

Com o intuito de quantificar e verificar os produtos gerados na hidrólise enzimática da matriz alimentar, os produtos da fase aquosa foram submetidos a análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, com detector de índice de refração. Esse detector foi utilizado, pois é universal e largamente empregado para a análise de açúcares, produto majoritário das enzimas aplicadas. Esta análise foi realizada nas amostras controle e na melhor concentração das carboidrases e lipase estudadas, em suas formas livres e imobilizadas. Além disso, foram analisados também os produtos aquosos de hidrólise gerados pela combinação das carboidrases em sua forma livre.

Os teores de açúcares, ácido galacturônico e glicerol foram determinados por CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência), em equipamento Shimadzu, empregando-se coluna Bio-Rad Aminex HPX-87H a 45°C e detector de índice de refração. A fase móvel foi composta por H₂SO₄ (5 mM) com fluxo de 0,6 mL/min e o volume de amostra injetada foi de 30 µL. As amostras foram previamente diluídas 10x e filtradas em filtro “Sep-Pack” C18 (Millipore).⁸⁸ Para quantificação, foram utilizadas curvas-padrão de maltose, glicose, frutose, arabinose, glicerol e ácido galacturônico, que constituem os principais produtos teóricos das enzimas aplicadas neste trabalho.

5. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos neste trabalho conclui-se que foi possível desenvolver um sistema catalítico enzimático eficiente para valorização do resíduo doméstico de alimentos. Através do biocatalisador sintetizado degradou-se em torno de 50% da fração sólida do resíduo alimentar transformando-a em açúcares redutores e ácidos graxos que são de grande valor para geração de uma vasta gama de bioprodutos. A atividade das proteínas livres e imobilizadas foi comparada, obtendo-se resultados satisfatórios com a imobilização, que trouxe estabilidade e tornou as enzimas mais ativas, propiciando o uso de uma menor concentração de proteínas, o que é de grande interesse econômico. Finalmente, o presente estudo se mostra inovador e com potencial de revolucionar o valor do resíduo doméstico de alimentos, sendo base para o desenvolvimento de pesquisas para síntese doméstica de produtos de valor agregado, como biocombustíveis, por exemplo.

6. REFERÊNCIAS

- (1) Gustavsson, Jenny.; Food and Agriculture Organization of the United Nations.; ASME/Pacific Rim Technical Conference and Exhibition on Integration and Packaging of MEMS, N. *Global Food Losses and Food Waste: Extent, Causes and Prevention: Study Conducted for the International Congress "Save Food!" At Interpack 2011 Düsseldorf, Germany.*
- (2) Ajay, C. M.; Mohan, S.; Dinesha, P. Decentralized Energy from Portable Biogas Digesters Using Domestic Kitchen Waste: A Review. *Waste Management*. Elsevier Ltd April 15, **2021**, pp 10–26.
- (3) Bräutigam, K. R.; Jörissen, J.; Priefer, C. The Extent of Food Waste Generation across EU-27: Different Calculation Methods and the Reliability of Their Results. *Waste Management and Research* **2014**, 32 (8), 683–694.
- (4) Kumar Singh, A.; Kumar Jha, V.; Pratap Singh, V.; Goel, D. Fabrication and design of self pressurised portable biogas plant for kitchen waste.

- (5) Yin, J.; Wang, K.; Yang, Y.; Shen, D.; Wang, M.; Mo, H. Improving Production of Volatile Fatty Acids from Food Waste Fermentation by Hydrothermal Pretreatment. *Bioresour Technol* **2014**, *171*, 323–329.
- (6) Gallipoli, A.; Braguglia, C. M.; Gianico, A.; Montecchio, D.; Pagliaccia, P. Kitchen Waste Valorization through a Mild-Temperature Pretreatment to Enhance Biogas Production and Fermentability: Kinetics Study in Mesophilic and Thermophilic Regimen. *J Environ Sci (China)* **2020**, *89*, 167–179.
- (7) El-Fadel, M.; Findikakis, A. N.; Leckie, J. O. Environmental Impacts of Solid Waste Landfilling. *Journal of Environmental Management* **1997**; Vol. 50. Pages 1-25
- (8) Ma, J.; Duong, T. H.; Smits, M.; Verstraete, W.; Carballa, M. Enhanced Biomethanation of Kitchen Waste by Different Pre-Treatments. *Bioresour Technol* **2011**, *102* (2), 592–599.
- (9) Dahiya, S.; Sarkar, O.; Swamy, Y. V.; Venkata Mohan, S. Acidogenic Fermentation of Food Waste for Volatile Fatty Acid Production with Co-Generation of Biohydrogen. *Bioresour Technol* **2015**, *182*, 103–113.
- (10) Lin, C. S. K.; Pfaltzgraff, L. A.; Herrero-Davila, L.; Mubofu, E. B.; Abderrahim, S.; Clark, J. H.; Koutinas, A. A.; Kopsahelis, N.; Stamatelatou, K.; Dickson, F.; Thankappan, S.; Mohamed, Z.; Brocklesby, R.; Luque, R. Food Waste as a Valuable Resource for the Production of Chemicals, Materials and Fuels. Current Situation and Global Perspective. *Energy and Environmental Science*. Royal Society of Chemistry **2013**, pp 426–464.
- (11) Dahiya, S.; Kumar, A. N.; Shanthi Sraavan, J.; Chatterjee, S.; Sarkar, O.; Mohan, S. V. Food Waste Biorefinery: Sustainable Strategy for Circular Bioeconomy. *Bioresource Technology*. Elsevier Ltd January 1, **2018**, pp 2–12.

- (12) Sarkar, O.; Kumar, A. N.; Dahiya, S.; Krishna, K. V.; Yeruva, D. K.; Mohan, S. V. Regulation of Acidogenic Metabolism towards Enhanced Short Chain Fatty Acid Biosynthesis from Waste: Metagenomic Profiling. *RSC Adv* **2016**, 6 (22), 18641–18653.
- (13) Venkata Mohan, S. Harnessing of Biohydrogen from Wastewater Treatment Using Mixed Fermentative Consortia: Process Evaluation towards Optimization. *International Journal of Hydrogen Energy*. September **2009**, pp 7460–7474.
- (14) Tyagi, V. K.; Bhatia, A.; Kubota, K.; Rajpal, A.; Ahmed, B.; Khan, A. A.; Kazmi, A. A.; Kumar, M. Microbial Community Dynamics in Anaerobic Digesters Treating Organic Fraction of Municipal Solid Waste. *Environmental Technology and Innovation*. Elsevier B.V. February 1, **2021**.
- (15) Venkata Mohan, S.; Lalit Babu, V.; Sarma, P. N. Effect of Various Pretreatment Methods on Anaerobic Mixed Microflora to Enhance Biohydrogen Production Utilizing Dairy Wastewater as Substrate. *Bioresour Technol* **2008**, 99 (1), 59–67.
- (16) Alfa, M. I.; Adie, D. B.; Igboro, S. B.; Oranusi, U. S.; Dahunsi, S. O.; Akali, D. M. Assessment of Biofertilizer Quality and Health Implications of Anaerobic Digestion Effluent of Cow Dung and Chicken Droppings. *Renew Energy* **2014**, 63, 681–686.
- (17) Butti, S. K.; Velvizhi, G.; Sulonen, M. L. K.; Haavisto, J. M.; Oguz Koroglu, E.; Yusuf Cetinkaya, A.; Singh, S.; Arya, D.; Annie Modestra, J.; Vamsi Krishna, K.; Verma, A.; Ozkaya, B.; Lakaniemi, A. M.; Puhakka, J. A.; Venkata Mohan, S. Microbial Electrochemical Technologies with the Perspective of Harnessing Bioenergy: Maneuvering towards Upscaling. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. Elsevier Ltd January 1, **2016**, pp 462–476.
- (18) Srikanth, S.; Venkata Mohan, S. Influence of Terminal Electron Acceptor Availability to the Anodic Oxidation on the Electrogenic Activity of Microbial Fuel Cell (MFC). *Bioresour Technol* **2012**, 123, 480–487.

- (19) Papanikolaou, S.; Dimou, A.; Fakas, S.; Diamantopoulou, P.; Philippoussis, A.; Galiotou-Panayotou, M.; Aggelis, G. Biotechnological Conversion of Waste Cooking Olive Oil into Lipid-Rich Biomass Using *Aspergillus* and *Penicillium* Strains. *J Appl Microbiol* **2011**, *110* (5), 1138–1150.
- (20) Yaakob, Z.; Mohammad, M.; Alherbawi, M.; Alam, Z.; Sopian, K. Overview of the Production of Biodiesel from Waste Cooking Oil. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. **2013**, pp 184–193.
- (21) Mahmood, T.; Hussain, S. T. Nanobiotechnology for the Production of Biofuels from Spent Tea. *Afr J Biotechnol* **2010**, *9* (6), 858–868.
- (22) Pleissner, D.; Lam, W. C.; Sun, Z.; Lin, C. S. K. Food Waste as Nutrient Source in Heterotrophic Microalgae Cultivation. *Bioresour Technol* **2013**, *137*, 139–146.
- (23) Huang, H.; Singh, V.; Qureshi, N. Butanol Production from Food Waste: A Novel Process for Producing Sustainable Energy and Reducing Environmental Pollution. *Biotechnol Biofuels* **2015**, *8* (1).
- (24) Stoeberl, M.; Werkmeister, R.; Faulstich, M.; Russ, W. Biobutanol from Food Wastes – Fermentative Production, Use as Biofuel and the Influence on the Emissions. *Procedia Food Sci* **2011**, *1*, 1867–1874.
- (25) Sanchez-Vazquez, S. A.; Hailes, H. C.; Evans, J. R. G. Hydrophobic Polymers from Food Waste: Resources and Synthesis. *Polymer Reviews* **2013**, *53* (4), 627–694.
- (26) Venkateswar Reddy, M.; Venkata Mohan, S. Influence of Aerobic and Anoxic Microenvironments on Polyhydroxyalkanoates (PHA) Production from Food Waste and Acidogenic Effluents Using Aerobic Consortia. *Bioresour Technol* **2012**, *103* (1), 313–321.
- (27) Delbecq, F.; Wang, Y.; Muralidhara, A.; El Ouardi, K. E.; Marlair, G.; Len, C. Hydrolysis of Hemicellulose and Derivatives-a Review of Recent Advances in the Production of Furfural. *Frontiers in Chemistry*. Frontiers Media S. A May 1, **2018**.

- (28) Elayaraja, S.; Velvizhi, T.; Maharani, V.; Mayavu, P.; Vijayalakshmi, S.; Balasubramanian, T. Thermostable α -Amylase Production by *Bacillus Firmus* CAS 7 Using Potato Peel as a Substrate. *Afr J Biotechnol* **2011**, *10* (54), 11235–11238.
- (29) Martínez Sabajanes, M.; Yáñez, R.; Alonso, J. L.; Parajó, J. C. Pectic Oligosaccharides Production from Orange Peel Waste by Enzymatic Hydrolysis. *Int J Food Sci Technol* **2012**, *47* (4), 747–754.
- (30) Jellouli, K.; Bayouhd, A.; Manni, L.; Agrebi, R.; Nasri, M. Purification, Biochemical and Molecular Characterization of a Metalloprotease from *Pseudomonas Aeruginosa* MN7 Grown on Shrimp Wastes. *Appl Microbiol Biotechnol* **2008**, *79* (6), 989–999.
- (31) Alkan, H.; Baysal, Z.; Uyar, F.; Dogru, M. Production of Lipase by *B. Coagulans* 183 Production of Lipase by a Newly Isolated *Bacillus Coagulans* Under Solid-State Fermentation Using Melon Wastes; *Appl Biochem Biotechnol*, **2007**; Vol. 136.
- (32) Rutherford, D. W.; Wershaw, R. L.; Rostad, C. E.; Kelly, C. N. Effect of Formation Conditions on Biochars: Compositional and Structural Properties of Cellulose, Lignin, and Pine Biochars. *Biomass Bioenergy* **2012**, *46*, 693–701.
- (33) Kumar, A.; Schreiter, I. J.; Wefer-Roehl, A.; Tsechansky, L.; Schüth, C.; Graber, E. R. Production and Utilization of Biochar From Organic Wastes for Pollutant Control on Contaminated Sites. In *Environmental Materials and Waste: Resource Recovery and Pollution Prevention*; Elsevier Inc., **2016**; pp 91–116.
- (34) Yukesh Kannah, R.; Merrylin, J.; Poornima Devi, T.; Kavitha, S.; Sivashanmugam, P.; Kumar, G.; Rajesh Banu, J. Food Waste Valorization: Biofuels and Value Added Product Recovery. *Bioresource Technology Reports*. Elsevier Ltd September 1, **2020**.
- (35) Isha, A.; D'Silva, T. C.; Subbarao, P. M. V.; Chandra, R.; Vijay, V. K. Stabilization of Anaerobic Digestion of Kitchen Wastes Using Protein-Rich

- Additives: Study of Process Performance, Kinetic Modelling and Energy Balance. *Bioresour Technol* **2021**, 337.
- (36) Tan, E. C. D.; Lamers, P. Circular Bioeconomy Concepts—A Perspective. *Frontiers in Sustainability* **2021**, 2.
- (37) Carus, M.; Dammer, L. The Circular Bioeconomy - Concepts, Opportunities, and Limitations. *Industrial Biotechnology* **2018**, 14 (2), 83–91.
- (38) Ubando, A. T.; Felix, C. B.; Chen, W. H. Biorefineries in Circular Bioeconomy: A Comprehensive Review. *Bioresource Technology*. Elsevier Ltd March 1, **2020**.
- (39) Rabaçal, M.; Ferreira, A. F.; Silva, C. A. M. *Biorefineries Targeting Energy, High Value Products and Waste Valorisation. Lecture Notes in Energy* 57
- (40) Amulya, K.; Jukuri, S.; Venkata Mohan, S. Sustainable Multistage Process for Enhanced Productivity of Bioplastics from Waste Remediation through Aerobic Dynamic Feeding Strategy: Process Integration for up-Scaling. *Bioresour Technol* **2015**, 188, 231–239.
- (41) Tuula T. Teeri, Crystalline cellulose degradation: new insight into the function of cellobiohydrolases, *Trends in Biotechnology*, Volume 15, Issue 5, **1997**, Pages 160-167, ISSN 0167-7799.
- (42) Illanes, A. Enzyme Biocatalysis : Principles and Applications; **Springer, 2008**.
- (43) Lehninger A. Biochemistry. *Worth Publ Inc*, **1970**, New York, 833 pp
- (44) Ye, P.; Jiang, J.; Xu, Z. K. Adsorption and Activity of Lipase from *Candida Rugosa* on the Chitosan-Modified Poly(Acrylonitrile-Co-Maleic Acid) Membrane Surface. *Colloids Surf B Biointerfaces* **2007**, 60 (1), 62–67.
- (45) Hasan, S. D. M.; Melo, D. N. C.; Rubens, M.; Filho. Simulation and Response Surface Analysis for the Optimization of a Three-Phase Catalytic Slurry Reactor. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification* **2005**, 44 (3), 335–343.

- (46) Ramos, M. D. N.; Milessi, T. S.; Candido, R. G.; Mendes, A. A.; Aguiar, A. Enzymatic Catalysis as a Tool in Biofuels Production in Brazil: Current Status and Perspectives. *Energy for Sustainable Development*. Elsevier B.V. June 1, **2022**, pp 103–119.
- (47) Golgeri M, D. B.; Mulla, S. I.; Bagewadi, Z. K.; Tyagi, S.; Hu, A.; Sharma, S.; Bilal, M.; Bharagava, R. N.; Ferreira, L. F. R.; Gurumurthy, D. M.; Nadda, A. K. A Systematic Review on Potential Microbial Carbohydrases: Current and Future Perspectives. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. Taylor and Francis Ltd. **2022**.
- (48) Juturu, V.; Wu, J. C. Microbial Cellulases: Engineering, Production and Applications. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. Elsevier Ltd **2014**, pp 188–203.
- (49) Pandey, Ashok. Enzyme Technology. *Springer*, **2006**.
- (50) Vandersall, A. S.; Cameron, R. G.; Nairn, C. J.; Yelenosky, G.; Wodzinski, R. J. Identification, Characterization, and Partial Purification of Glucoamylase From *Aspergillus Niger* (Syn *A. Ficum*) NRRL 3135. *Prep Biochem* **1995**, 25 (1–2), 29–55.
- (51) Reilly, P. J. Protein Engineering of Glucoamylase to Improve Industrial Performance - A Review. *Starch/Staerke* **1999**, 51 (8–9), 269–274.
- (52) Żymańczyk-Duda, E.; Klimek-Ochab, M.; Brzezińska-Rodak, M.; Duda, M. Biochemistry-Knowledge to Practical Applications-Examples. *Basic Biochemistry* **2016**.
- (53) Sutay Kocabaş, D.; Lyne, J.; Ustunol, Z. Hydrolytic Enzymes in the Dairy Industry: Applications, Market and Future Perspectives. *Trends in Food Science and Technology*. Elsevier Ltd January 1, **2022**, pp 467–475.
- (54) Kubra, K. T.; Ali, S.; Walait, M.; Sundus, H. Potential Applications of Pectinases in Food, Agricultural and Environmental Sectors. *Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences* **2018**, Vol. 6.

- (55) Uenojo, M.; Glauca, E.; Pastore, M. Pectinases: aplicações industriais e perspectivas. *Química Nova* **2007**; Vol. 30.
- (56) Reetz, M. T. Lipases as practical biocatalysts, *Current Opinion in Chemical Biology*, Volume 6, Issue 2, **2002**, Pages 145-150, ISSN 1367- 5931.
- (57) Reis, P.; Holmberg, K.; Watzke, H.; Leser, M. E.; Miller, R. Lipases at Interfaces: A Review. *Advances in Colloid and Interface Science*. March **2009**, pp 237–250.
- (58) Narwal, S. K.; Gupta, R. Biodiesel Production by Transesterification Using Immobilized Lipase. *Biotechnology Letters*. Kluwer Academic Publishers April 1, **2013**, pp 479–490.
- (59) Haki, G. D.; Rakshit, S. K. Developments in Industrially Important Thermostable Enzymes: A Review. *Bioresource Technology*. Elsevier Ltd **2003**, pp 17–34.
- (60) Dulęba, J.; Siódmiak, T.; Marszał, M. P. The Influence of Substrate Systems on the Enantioselective and Lipolytic Activity of Immobilized Amano PS from Burkholderia Cepacia Lipase (APS-BCL). *Process Biochemistry* **2022**, 120, 126–137.
- (61) Jaeger KE, Reetz MT. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Trends Biotechnol.* **1998** Sep;16(9):396-403.
- (62) Sheldon, R. A.; Woodley, J. M. Role of Biocatalysis in Sustainable Chemistry. *Chemical Reviews*. American Chemical Society January 24, **2018**, pp 801–838.
- (63) Reis, C. L. B.; de Sousa, E. Y. A.; de França Serpa, J.; Oliveira, R. C.; Dos Santos, J. C. S. Design of Immobilized Enzyme Biocatalysts: Drawbacks and Opportunities. *Química Nova*. Sociedade Brasileira de Química **2019**, pp 768–783.
- (64) Bolivar, J. M.; Woodley, J. M.; Fernandez-Lafuente, R. Is Enzyme Immobilization a Mature Discipline? Some Critical Considerations to

Capitalize on the Benefits of Immobilization. *Chemical Society Reviews*. Royal Society of Chemistry July 15, **2022**, pp 6251–6290.

- (65) Macario, A.; Moliner, M.; Corma, A.; Giordano, G. Increasing Stability and Productivity of Lipase Enzyme by Encapsulation in a Porous Organic-Inorganic System. *Microporous and Mesoporous Materials* **2009**, *118* (1–3), 334–340.
- (66) Girelli, A. M.; Astolfi, M. L.; Scuto, F. R. Agro-Industrial Wastes as Potential Carriers for Enzyme Immobilization: A Review. *Chemosphere*. Elsevier Ltd April 1, **2020**.
- (67) Pandey, D.; Daverey, A.; Arunachalam, K. Biochar: Production, Properties and Emerging Role as a Support for Enzyme Immobilization. *Journal of Cleaner Production*. Elsevier Ltd May 10, **2020**.
- (68) Adamian, Y.; Lonappan, L.; Alokpa, K.; Agathos, S. N.; Cabana, H. Recent Developments in the Immobilization of Laccase on Carbonaceous Supports for Environmental Applications - A Critical Review. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. Frontiers Media S.A. December 6, **2021**.
- (69) Kumar, M.; Dutta, S.; You, S.; Luo, G.; Zhang, S.; Show, P. L.; Sawarkar, A. D.; Singh, L.; Tsang, D. C. W. A Critical Review on Biochar for Enhancing Biogas Production from Anaerobic Digestion of Food Waste and Sludge. *Journal of Cleaner Production*. Elsevier Ltd July 10, **2021**.
- (70) Zhang, M.; Gao, B.; Varnoosfaderani, S.; Hebard, A.; Yao, Y.; Inyang, M. Preparation and Characterization of a Novel Magnetic Biochar for Arsenic Removal. *Bioresour Technol* **2013**, *130*, 457–462.
- (71) Chang, J. I.; Chen, Y. J. Effects of Bulking Agents on Food Waste Composting. *Bioresour Technol* **2010**, *101* (15), 5917–5924.
- (72) Rodrigues, R. M.; Souza, A. D. M.; Bezerra, I. N.; Pereira, R. A.; Yokoo, E. M.; Sichieri, R. Most Consumed Foods in Brazil: Evolution between 2008-2009 and 2017-2018. *Rev Saude Publica* **2021**, *55*.

- (73) Oliveira, M. A. De; Lorini, I.; Mandarino, J. M. G.; Benassi, V. T.; França-Neto, J. B.; Henning, A. A.; Krzyzanowski, F. C.; Henning, F. A.; Hirakuri, M. H.; Leite, R. S.; Ostapechen, C. F.; Santos, L. E. G. Determinação do índice de acidez titulável dos grãos de soja colhidos nas safras 2014/2015 e 2015/16 no Brasil. *Resumos expandidos da XXXVI Reunião de Pesquisa de Soja - 2017* - Londrina/PR
- (74) Hochscheidt, B. D.; Possamai, E. S.; da Silva, M. P. M.; Dieter, J.; da Silva, F. R.; Sequinel, R. Neutralization or Esterification as Input Improvement Techniques for Biodiesel Production. *Revista Virtual de Química* **2020**, 12 (2), 325–334.
- (75) Dörr de Quadros, P.; Cerqueira, V. S.; Cazarolli, J. C.; Peralba, M. do C. R.; Camargo, F. A. O.; Giongo, A.; Bento, F. M. Oily Sludge Stimulates Microbial Activity and Changes Microbial Structure in a Landfarming Soil. *Int Biodeterior Biodegradation* **2016**, 115, 90–101.
- (76) Fraga, I. M.; Penha, B. F.; Jacobina, M. C. M. Estudo comparativo de três diferentes equações empregadas no cálculo da massa molecular de óleos e gorduras. *54º CBQ*, **2014**, Natal. Resumo em anal de congresso. ISBN 978-85-85905-10-1
- (77) Osawa, C. C.; Ap Guaraldo Gonçalves, L.; Ragazzi, S. Titulação potenciométrica aplicada na determinação de ácidos graxos livres de óleos e gorduras comestíveis. *Quim. Nova*, Vol. 29, No. 3, 593-599, **2006**
- (78) Do, R.; Silva, N.; Monteiro, V. N.; D'arc, J.; Alcanfor, X.; Assis, E. M.; Asquieri, E. R. Comparação de métodos para a determinação de açúcares redutores e totais em mel. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, 23(3): 337-341, set.-dez. **2003**
- (79) Gonçalves, C.; Rodriguez-Jasso, R. M.; Gomes, N.; Teixeira, J. A.; Belo, I. Adaptation of Dinitrosalicylic Acid Method to Microtiter Plates. *Analytical Methods* **2010**, 2 (12), 2046–2048.
- (80) Moura De Vasconcelos, N.; Adolfo, G.; Pinto, S.; Antônio, F.; Aragão, S. Determinação de Açúcares Redutores Pelo Ácido 3,5-Dinitrosalicílico:

Histórico Do Desenvolvimento Do Método e Estabelecimento de Um Protocolo Para o Laboratório de Bioprocessos. *Boletim de pesquisa e desenvolvimento* **88** **2013**, Embrapa Agroindústria Tropical, ISSN 1679-6543; 88.

- (81) Thue, P. S.; dos Reis, G. S.; Lima, E. C.; Sieliechi, J. M.; Dotto, G. L.; Wamba, A. G. N.; Dias, S. L. P.; Pavan, F. A. Activated Carbon Obtained from Sapelli Wood Sawdust by Microwave Heating for O-Cresol Adsorption. *Research on Chemical Intermediates* **2017**, *43*(2), 1063–1087.
- (82) Thue, P. S.; Lima, D. R.; Lima, E. C.; Teixeira, R. A.; Dos Reis, G. S.; Dias, S. L. P.; Machado, F. M. Comparative Studies of Physicochemical and Adsorptive Properties of Biochar Materials from Biomass Using Different Zinc Salts as Activating Agents. *J Environ Chem Eng* **2022**, *10*(3).
- (83) Thue, P. S.; Lima, E. C.; Sieliechi, J. M.; Saucier, C.; Dias, S. L. P.; Vaghetti, J. C. P.; Rodembusch, F. S.; Pavan, F. A. Effects of First-Row Transition Metals and Impregnation Ratios on the Physicochemical Properties of Microwave-Assisted Activated Carbons from Wood Biomass. *J Colloid Interface Sci* **2017**, *486*, 163–175.
- (84) Brunauer, S.; Emmett, P. H.; Teller, E. *Journal of the American Chemical Society* **1938** *60*(2), 309-319
- (85) Prola, L. D. T.; Acayanka, E.; Lima, E. C.; Umpierrez, C. S.; Vaghetti, J. C. P.; Santos, W. O.; Laminsi, S.; Djifon, P. T. Comparison of Jatropha Curcas Shells in Natural Form and Treated by Non-Thermal Plasma as Biosorbents for Removal of Reactive Red 120 Textile Dye from Aqueous Solution. *Ind Crops Prod* **2013**, *46*, 328–340.
- (86) Ribas, M. C.; Adebayo, M. A.; Prola, L. D. T.; Lima, E. C.; Cataluña, R.; Feris, L. A.; Puchana-Rosero, M. J.; Machado, F. M.; Pavan, F. A.; Calvete, T. Comparison of a Homemade Cocoa Shell Activated Carbon with Commercial Activated Carbon for the Removal of Reactive Violet 5 Dye from Aqueous Solutions. *Chemical Engineering Journal* **2014**, *248*, 315–326.

- (87) 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*, **1976**; 248-254, Vol. 72.
- (88) da Cunha-Pereira, F.; Hickert, L. R.; Sehnem, N. T.; de Souza-Cruz, P. B.; Rosa, C. A.; Ayub, M. A. Z. Conversion of Sugars Present in Rice Hull Hydrolysates into Ethanol by *Spathaspora Arborariae*, *Saccharomyces Cerevisiae*, and Their Co-Fermentations. *Bioresour Technol* **2011**, 102 (5), 4218–4225.