



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

**Área de Concentração: Engenharia de Alimentos**



**PROGRAMA DE POS-GRADUAÇÃO EM**  
**ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS**

**CARVÃO ATIVADO: INFLUÊNCIA DAS CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS**  
**DO PRECURSOR DE CARBONO NAS SUAS PROPRIEDADES E APLICAÇÃO**  
**NA IMOBILIZAÇÃO DA PEPSINA**

**Autor:** Mateus Pereira Flores Santos

**Orientadora:** Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cristiane Martins Veloso

**ITAPETINGA – BA**

**FEVEREIRO 2018**

**MATEUS PEREIRA FLORES SANTOS**

**CARVÃO ATIVADO: INFLUÊNCIA DAS CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS  
DO PRECURSOR DE CARBONO NAS SUAS PROPRIEDADES E APLICAÇÃO  
NA IMOBILIZAÇÃO DA PEPSINA**

Dissertação apresentada como requisito para  
obtenção do grau de Mestre em Engenharia e  
Ciência de Alimentos, área de concentração  
em Engenharia de Alimentos, da Universidade  
Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB.

**ORIENTADORA:** Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cristiane Martins Veloso

**CO-ORIENTADORES:** Prof.<sup>o</sup> Dr. Leandro Soares Santos  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Renata Cristina Ferreira Bonomo

**ITAPETINGA – BA**

**FEVEREIRO 2018**



662.62 Santos, Mateus Pereira Flores

S236c

Carvão ativado: influência das características químicas do precursor de carbono nas suas propriedades e aplicação na imobilização da pepsina. / Mateus Pereira Flores Santos. - Itapetinga: UESB, 2018.

94p.

Dissertação apresentada como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos, no Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Sob a orientação da Profª. D.Sc. Cristiane Martins Veloso e coorientação da Profª. D.Sc. Renata Cristina Ferreira Bonomo e Prof. D.Sc. Leandro Soares Santos.

1. Análise Multivariada. 2. Biocatalisador. 3. Resíduos lignocelulósicos. I. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos. II. Veloso, Cristiane Martins. III. Bonomo, Renata Cristina Ferreira. IV. Santos, Leandro Soares. V. Título.

CDD(21): **662.62**

Catálogo na fonte:

Adalice Gustavo da Silva – CRB/5-535

Bibliotecária – UESB – Campus de Itapetinga-BA

Índice Sistemático para Desdobramento por Assunto:

1. Análise Multivariada
2. Biocatalisador
3. Resíduos lignocelulósicos



**Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia**  
Recredenciada pelo decreto estadual nº 16.825 de 04.07.2016  
Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos  
PPG-ECAL / UESB



Áreas de Concentração: Engenharia de Alimentos  
Ciência de Alimentos

### DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO

**Título:** CARVÃO ATIVADO: INFLUÊNCIA DAS CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DO PRECURSOS DE CARBONO NAS SUAS PROPRIEDADES E APLICAÇÃO NA IMOBILIZAÇÃO DE PEPSINA

**Autor (a):** MATEUS PEREIRA FLORES SANTOS

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

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

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

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

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cristiane Martins Veloso (UESB)

Prof. Dr. Rafael da Costa Ilhéu Fontan (UESB)

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Lizzy Ayra Alcântara Veríssimo (UFLA)

Itapetinga-BA, 23 de fevereiro de 2018.

**“ Nada que vale a pena é fácil. Lembre-se disso. ”**

*Nicholas Sparks*

*A Deus.*  
*Aos meus pais.*  
*A minha Avó.*  
*À minha irmã.*

*Dedico!*

## AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida e por se fazer presente em todos os momentos firmes ou incertos da minha vida, me iluminando e abençoando toda a minha trajetória, me guiando pelos melhores caminhos com a segurança necessária para chegar até aqui.

À minha mãe Patrícia, meu pai Mário, minha avó Vera e minha madrinha Maria Lúcia, pessoas a quem tenho um amor imenso. Meus exemplos de fé, honestidade e coragem, além de sempre me incentivarem e me apoiarem e por tudo que sempre fizeram por mim, não medindo esforços para que mais uma etapa da minha vida fosse concluída, sendo os maiores incentivadores e razão dessa conquista.

À toda minha família, pelo carinho, atenção, por sempre acreditarem no meu potencial e vibrarem comigo em todas as conquistas.

À minha orientadora, professora Dr.<sup>a</sup> Cristiane Veloso, pela excelente orientação, ensinamentos, dedicação, compreensão, confiança e pela paciência durante todo o desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos e colegas da faculdade: Acsa Batista, Annie Nolasco, Ayla Riane, Daniele Gomes, Fabíola Nogueira, Cássio Abreu, Grazielly Silva, Marília Borges, Mariana Alves, Poly Cabral e Vandrick Santana, que sempre estiveram presentes, mesmo à distância, mas que sempre torceram por mim.

A todos os meus amigos que deixam os meus dias mais felizes e que mesmo à distância sempre se preocuparam e torceram por mim.

À Josi, pela amizade e companheirismo no laboratório, por ter dividido ao longo de todo o curso as conquistas, as responsabilidades, momentos de descontração e até desespero.

Ao Professor Dr. Rafael Fontan pela atenção, prestatividade e pelos inúmeros conhecimentos passados durante todo o desenvolvimento do experimento.

Ao Professor Dr. Leandro Soares e a Professora Dr. Renata Bonomo, pela co-orientação, e pelas vezes que se disponibilizaram a ajudar, sanar dúvidas e contribuir positivamente para o desenvolvimento do projeto.

A todos os colegas do Laboratório de Engenharia de Processos (LEP) pela companhia, ajuda e momentos de descontração. Em especial a Annie, Claudia Laís, Débora, Izabela, Lucas Silva, Malu e Thaís pela amizade, ajuda e troca de conhecimento.

À “Turma do carvão”, em especial à Mylena, por toda ajuda durante o decorrer do curso.

Aos professores Evaldo e Vanessa, pelos ensinamentos, ajuda e pela amizade.

Aos integrantes do Laboratório de Processamento de Leites, em especial Ben-Hur e Grazi, pela ajuda nas análises de FTIR.

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

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

À Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia e ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos pela oportunidade.

À Fundação de Amparo à Pesquisa (CAPES), pela bolsa concedida.

Ao CETENE pelas análises de caracterização.

À Inaceres, Fermata e Adamantine pela doação dos resíduos agroindustriais.

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

***MUITO OBRIGADO!***

## ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS .....	xiii
LISTA DE TABELAS .....	xiv
RESUMO .....	xv
ABSTRACT .....	xvi
CAPÍTULO 1 .....	17
1. INTRODUÇÃO GERAL .....	18
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	19
2.1. Carvão ativado e materiais precursores empregados em sua síntese.....	19
2.2. Resíduos agroindustriais.....	20
2.2.1. Composição Lignocelulósica dos Resíduos Agroindustriais.....	21
2.2.1.1. Celulose .....	23
2.2.1.2. Hemicelulose .....	24
2.2.1.3. Lignina.....	24
2.2.1.4. Aproveitamento de resíduos agroindustriais .....	26
2.3. Síntese de carvão ativado .....	27
2.3.1. Influência da composição dos materiais lignocelulosicos nas propriedades físico-químicas do carvão ativado .....	28
2.4. Análise Estatística Multivariada.....	30
2.4.1. Análise de Componentes Principais (ACP).....	31
2.4.2. Análise de Correlação Canônica (ACC).....	32
2.5. Aplicação do carvão ativado.....	32
2.6. Enzimas .....	33
2.6.1. Pepsina.....	34
2.7. Imobilização de enzimas .....	34
2.7.1. Imobilização por adsorção.....	36
2.7.2. Imobilização por ligação covalente .....	37
2.7.2.1. Funcionalização dos suportes .....	37
3. OBJETIVO GERAL.....	39
3.1. Objetivos Específicos .....	39
4. REFERÊNCIAS .....	39
<b>CAPÍTULO 2 - Avaliação das características do material precursor nas propriedades do carvão ativado utilizando Análise de Componentes Principais e Correlações Canônicas .....</b>	<b>49</b>
RESUMO .....	50
ABSTRACT .....	50

1. INTRODUÇÃO.....	51
2. METODOLOGIA.....	52
2.1. Materiais e reagentes .....	52
2.1.1. Materiais precursores.....	52
2.2. Síntese dos carvões ativados.....	53
2.2.1. Preparo dos materiais precursores .....	53
2.2.2. Caracterização dos resíduos.....	53
2.2.3. Ativação química com Ácido Fosfórico (H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> ).....	54
2.3. Determinação do rendimento e caracterização dos carvões obtidos .....	54
2.3.1. Rendimento no processo de síntese dos carvões .....	54
2.3.2. Caracterização química dos carvões ativados .....	54
2.3.3. Medida de porosidade e área superficial específica .....	55
2.4. Análises Estatística Multivariada .....	55
2.4.1. Análise de Componentes Principais (ACP).....	55
2.4.2. Análise de Correlação Canônica (ACC).....	56
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	57
3.1. Caracterização dos materiais precursores e carvões ativados .....	57
3.2. Análise Multivariada .....	61
3.2.1. Análise dos Componentes Principais (ACP).....	61
3.2.2. Análise de Correlações Canônica .....	69
4. CONCLUSÃO.....	72
5. REFERÊNCIAS .....	72

**CAPÍTULO 3 - Imobilização de Pepsina em carvão ativado por adsorção e ligação covalente e sua aplicação na hidrólise da caseína bovina .....**

RESUMO .....	77
ABSTRACT .....	77
1. INTRODUÇÃO.....	78
2. METODOLOGIA.....	79
2.1. Funcionalização do carvão ativado.....	79
2.2. Caracterização dos Carvões.....	80
2.2.1. Espectrofotometria de Absorção no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).....	80
2.2.2. pH do ponto de carga zero (pH <sub>PCZ</sub> ) .....	80
2.2.3. Medida de porosidade e área superficial específica .....	81
2.3. Ensaios de imobilização da Pepsina .....	81
2.3.1. Estudo da influência do método de imobilização .....	81
2.3.2. Determinação da atividade enzimática .....	82

2.3.3. Reutilização dos biocatalisadores .....	83
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	83
3.1. Caracterização do material precursor .....	83
3.2. Rendimento do processo de síntese e caracterização do carvão ativado .....	83
3.3. Espectrofotometria de Absorção no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).....	84
3.4. pH do Ponto de Carga Zero (pH <sub>PCZ</sub> ).....	86
3.5. Medida de porosidade e área superficial específica .....	87
3.6. Influência do método de imobilização na atividade da Pepsina.....	89
3.7. Atividade da Pepsina .....	90
4. CONCLUSÕES .....	92
5. REFERÊNCIAS .....	93

## LISTA DE FIGURAS

### CAPITULO 1

Figura 1. Esquema da estrutura Lignocelulósica.....	21
Figura 2. Estrutura química da celulose. ....	23
Figura 3. Estrutura química da hemicelulose .....	24
Figura 4. Estrutura química da lignina. ....	25
Figura 5. Rotas de conversão termoquímica da biomassa.....	26
Figura 6. Classificação quanto ao tamanho do poro do carvão ativado segundo União Internacional de Química Pura e Aplicada. ....	29
Figura 7. Representação tridimensional da Pepsina .....	34
Figura 8. Representação esquemática da funcionalização superficial do carvão ativado (CA) pelo método do glutaraldeído para obtenção do carvão funcionalizado (CF).....	38

### CAPITULO 2

Figura 1. Scree Plot dos autovalores associados aos componentes principais dos materiais precursores. ....	60
Figura 2. Gráfico dos escores das amostras dos materiais precursores em relação ao CP1 e CP2... ..	61
Figura 3. Scree Plot dos autovalores associados aos componentes principais, dos carvões ativados. ....	63
Figura 4. Gráficos dos escores das amostras de carvão ativado em relação ao CP1 e CP2 (A) e CP1 e CP3 (B). ....	64
Figura 5. Correlação do primeiro par de variáveis canônicas, para o material precursor (característica 1) e carvão ativado (composição 1). ....	70

### CAPITULO 3

Figura 1. FTIR do material precursor (MPBLND), do carvão ativado (CABLND) e do carvão funcionalizado (CFBLND). ....	84
Figura 2. Isotermas de adsorção do nitrogênio e distribuição de poros do carvão ativado (CABLND) (A) e do carvão funcionalizado (CFBLND) (B). ....	87
Figura 3. Atividade enzimática para os ciclos de reutilização da Pepsina imobilizada por adsorção (CABLND) e por ligação covalente (CFBLND) no tempo de 60 min. ....	91

## LISTA DE TABELAS

### CAPITULO 1

Tabela 1. Caracterização dos resíduos lignocelulósicos, com potencial de utilização na síntese de carvões ativados. ....	22
--	----

### CAPITULO 2

Tabela 1. Codificação das amostras de precursores e dos carvões ativados obtidos. ....	52
Tabela 2. Tabela resumo dos resultados da caracterização químicas dos materiais precursores. ....	56
Tabela 3. Atribuições das bandas identificadas nos espectros de FTIR para os materiais precursores. ....	58
Tabela 4. Tabela resumo da caracterização dos carvões ativados em relação ao seu rendimento, teor de cinzas, pH do ponto de carga zero (pH <sub>pcz</sub> ), área superficial (S <sub>g</sub> ), diâmetro de poros (D <sub>p</sub> ) e volume de mesoporos (V <sub>meso</sub> ) e microporos (V <sub>micro</sub> ). ....	59
Tabela 5. Atribuições das bandas Atribuições das bandas identificadas nos espectros de FTIR para os carvões ativados. ....	59
Tabela 6. Resultados da caracterização química dos materiais precursores, agrupados de acordo com a ACP. ....	62
Tabela 7. Caracterização dos carvões ativados: rendimento (Rend), área superficial (S <sub>g</sub> ), e volume de microporos (V <sub>micro</sub> ) com base na ACP (CP1xCP2). ....	65
Tabela 8. Caracterização dos carvões ativados: pH do ponto de carga zero (pH <sub>pcz</sub> ), diâmetro de poros (D <sub>p</sub> ) e volume de meso (V <sub>meso</sub> ), com base na ACP (CP1xCP3). ....	67

### CAPITULO 3

Tabela 1. Atribuição das bandas apresentadas nos espectros FTIR para o material precursor e carvões ativados. ....	85
Tabela 2. Propriedades texturais do carvão ativado (CABLND) e funcionalizado (CFBLND).88	
Tabela 3. Massa de Enzima Ligada (MELig), Capacidade de Imobilização (C <sub>Im</sub> ) e Eficiência final (E <sub>fic</sub> ) da imobilização de Pepsina por adsorção (CABLND) e por ligação covalente (CFBLND). ....	88
Tabela 4. Atividade enzimática da Pepsina na forma livre e imobilizada por adsorção (CABLND) ou por ligação covalente (CFBLND) em função do tempo. ....	90

## RESUMO

SANTOS, M. P. F. **Carvão ativado: influência das características químicas do precursor de carbono nas suas propriedades e aplicação na imobilização da pepsina.** Itapetinga – BA: UESB, 2017. 94 p. (Dissertação – Mestrado em Engenharia de Alimentos e Ciência de Alimentos; Área de concentração: Engenharia de Alimentos). \*

Os carvões ativados têm grande versatilidade industrial e podem ser obtidos a partir de resíduos agroindústrias, materiais que apresentam altos teores de lignina e celulose, reduzindo assim os custos de produção. Porém as variações de composição dos resíduos podem estar associadas as características dos carvões obtidos. Diante disto, este trabalho teve como objetivo principal avaliar como as propriedades dos materiais precursores influenciam nas características dos carvões obtidos. E como objetivo específico selecionar uma amostra de carvão com propriedades adequadas para ser empregado no processo de imobilização da pepsina por adsorção e ligação covalente. Todos os materiais precursores e seus respectivos carvões foram caracterizados em relação as suas características físico-químicas. A partir dos resultados de caracterização foram empregadas as análises estatística multivariada de componentes principais (ACP) e de correlações canônicas (ACC), para determinar as relações entre as propriedades dos materiais precursores e dos carvões obtidos. Pode-se observar que precursores com relação celulose/lignina  $> 3,0$  levam a produção de carvões com maior diâmetro de poros e área superficial, enquanto que materiais com relação  $\leq 1,0$  geram carvões com elevado rendimento e baixo volume de poros. Com relação à imobilização pôde-se observar que tanto o carvão ativado quanto o funcionalizado pelo método do glutaraldeído, apresentaram alta eficiência no processo de imobilização ( $> 96\%$ ), porém no teste de atividade o carvão funcionalizado com glutaraldeído apresentou uma maior taxa de hidrólise da caseína. Logo, foi possível comprovar que as características dos materiais lignocelulósicos apresentam relação com as propriedades dos carvões, sendo possível predizer as características dos carvões com apenas os dados de composição dos materiais lignocelulósicos. Por fim, a funcionalização do carvão ativado, pelo método do glutaraldeído, propiciou a modificação da superfície do carvão ativado, pela inserção de grupos amina-aldeído, responsáveis pelas ligações covalentes entre o suporte e a enzima, apresentando maior atividade proteolítica da enzima, quando comparado ao método de imobilização por adsorção.

**Palavras chave:** Análise Multivariada; Biocatalisador; Resíduos lignocelulósicos.

---

\* Orientador(a): DSc. UESB. Cristiane Martins Veloso; Co-orientadores: DSc. UESB. Renata Cristina Ferreira Bonomo; DSc. UESB, Leandro Soares Santos

## ABSTRACT

SANTOS, M. P. F. **Activated carbon: influence of chemical characteristics of carbon precursor in its properties and application for the immobilization of pepsin.** Itapetinga – BA: UESB, 2016. 94 p. (Dissertation – MSc. in Food Engineering and Food Science; Area of concentration: Food Engineering).\*

Activated carbons have great industrial versatility and can be obtained from agroindustrial waste, materials that have high levels of lignin and cellulose, thus reducing production costs. However, variations in the composition of the residues may be associated with the carbons characteristics. In ponto f view, this work had as main objective to evaluate how the properties of the precursor materials influence the characteristics of the obtained carbons. It is a specific objective to select a sample of carbon with suitable properties to be used in the immobilization process of pepsin by adsorption and covalent bond. All precursor materials and their respective carbons were characterized regarding their physico-chemical characteristics. From the characterization results, the multivariate statistical of principal component analysis (PCA) and canonical correlations (CCA) were used to determine the relationships between the properties of the precursor materials and the obtained carbon. It can be observed that precursors with cellulose/lignin ratio  $> 3.0\%$  lead to the production of carbons with higher pore diameters and surface area, while materials with a  $\leq 1.0\%$  ratio generate carbons with high yield and low pore volume. In relation to the immobilization, it is possible to observe that both the activated carbon and the functionalized carbon by the glutaraldehyde method presented high efficiency in the immobilization process ( $> 96\%$ ), but in the activity test the functionalized carbon with glutaraldehyde presented a higher casein hydrolysis rate. Therefore, it was possible to prove that the characteristics of the lignocellulosic materials are related to the properties of the carbons, and it is possible to predict the characteristics of the carbons with only the composition data of the lignocellulosic materials. Finally, the functionalization of the activated carbon by the glutaraldehyde method led to the modification of the surface of the activated carbon, by the insertion of amine-aldehyde groups, responsible for the covalent bonds between the support and the enzyme, increase the hydrolytic activity of the enzyme, when compared to the immobilization method by adsorption.

**Keywords:** Multivariate analysis; Biocatalyst; Lignocellulosic wastes.

---

\* Advisor (a): **DSc.** UESB. Cristiane Martins Veloso; Co-advisors: **DSc.** UESB. Renata Cristina Ferreira Bonomo; **DSc.** UESB, Leandro Soares Santos.

## **CAPÍTULO 1**

---

**Introdução Geral**

**Revisão de Literatura**

**Objetivos**

---

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

O carvão ativado é um material com volume de poros e área superficial elevados, apresentando também alta estabilidade química e vários grupos funcionais superficiais, sendo este constituído em mais de 90% de carbono (LIOU, 2010). Devido à estas características este material é considerado um adsorvente muito versátil, tendo aplicação em diversas áreas, como no tratamento de efluentes (KONG et al., 2013), adsorção de biomoléculas (PEREIRA et al., 2014), como suporte catalítico (GIRALDO e MORENO-PIRAJÁN, 2012) e em processos de purificação e separação de biomoléculas (HU, LU e MEISNER, 2008), entre outros.

Segundo Prahas et al. (2008), os carvões ativados podem ser sintetizados a partir de quaisquer precursores, desde que os mesmos tenham alto teor de carbono e baixo teor de compostos inorgânicos, sendo estas as características de vários resíduos agrícolas.

Os resíduos agroindustriais são considerados fontes ricas em materiais lignocelulósicos, por apresentarem em sua composição altos teores de celulose e lignina. Desta forma, vários estudos têm sido realizados com o objetivo de utilizar esses resíduos na produção de materiais com maior valor agregado, como por exemplo: Carvões ativados (PRADO, 2010), biocombustíveis e produtos químicos como ácidos 1,4-dicarboxílicos (ácido succínico, fumárico e málico), ácido dicarboxílico 2,5-furano, entre outros (GOYAL et al., 2008; BRETHAUER e STUDER, 2015). Como estes resíduos não têm mercado definido para sua comercialização, o reaproveitamento dos mesmos reduz também os possíveis danos ambientais que possam vir a ser causados pelo seu acúmulo no meio ambiente. Devido estes resíduos apresentarem um alto teor de carbono e por serem provenientes de fontes renováveis, proporcionam uma melhor relação custo/benefício na síntese de carvão ativado quando comparado com os materiais precursores convencionais (piche, madeira, carvões fosseis e/ou vegetais, etc.) (BORBA, 2006; PRADO, 2010).

Vários resíduos agroindustriais já foram utilizados na produção de carvão ativado, incluindo: cascas de coco (CAGNON et al., 2009; YANG et al., 2010), cascas de arroz (RAMANI et al., 2012), hastes de bambu (LIU et al., 2013), cascas de cacau e caroços de seriguela (PEREIRA et al., 2014), sementes de uva (OKMAN et al., 2014), grãos defeituosos de café (RAMOS et al., 2009), resíduos de abacaxi (MAHAMAD, ZAINI e ZAKARIA, 2015), caroço de cajá (BRITO et al., 2017), entre outros. No entanto, em nenhum destes estudos foi avaliado como a composição química dos precursores influencia nas propriedades físico-químicas dos carvões produzidos. Os compostos lignocelulósicos (lignina, celulose e hemicelulose) presentes nos precursores de carbono são de fundamental importância para a produção de carvões ativados, pois o alto conteúdo destes compostos quando associados a um

baixo teor de material mineral serão fundamentais para produção de carvões com elevado rendimento, porosidade e área superficial. Dentre estes constituintes, estima-se que materiais com altos teores de celulose levem a produção de carvões com maior área superficial, enquanto materiais ricos em lignina, levem a maiores rendimentos, sendo que a lignina também é responsável pela elevada dureza e durabilidade dos carvões sintetizados (RODRIGUÉZ-REINOSO e SABIO, 2004).

Os carvões ativados, são utilizados principalmente nos processos de tratamento de efluentes e separação e purificação de biomoléculas (GERÇEL et al., 2007; BRITO et al., 2017). Uma outra aplicação promissora para estes materiais é como suporte para imobilização enzimática, pois estes materiais porosos têm certas características que favorecem a imobilização, em comparação com materiais não porosos (MACEDO et al., 2008). Dentre estas características destacam-se: apresentam uma área elevada, maior resistência as condições de imobilização e as enzimas imobilizadas em carvão podem ser reutilizadas, devido a estabilidade química, mecânica e térmica, hidrofiliabilidade e insolubilidade dos carvões (silva et al., 2005).

As enzimas imobilizadas têm as vantagens de utilização múltipla, melhor controle dos processos e estabilidade mecânica, de modo que, o principal interesse em imobilizar uma enzima é obter um biocatalisador com atividade e estabilidade que não sejam afetadas durante o processo, em comparação à sua forma livre (MENDES et al., 2011).

Desse modo, objetivou-se neste trabalho caracterizar diferentes materias precursores de carvão ativado, a fim de investigar como as propriedades químicas dos mesmos irão influenciar as propriedades fisico-químicas dos carvões sintetizados, utilizando análises multivariadas, para analisar os resultados obtido. Além disso, foi avaliada a eficiência de imobilização enzimática em carvão ativado, pelos métodos de adsorção e de ligação covalente.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1. Carvão ativado e materiais precursores empregados em sua síntese**

O carvão ativado (CA) é um material de carbono detentor de uma estrutura porosa altamente desenvolvida, possui uma elevada área superficial específica e podem ser encontrados em sua superfície heteroátomos (O, N e H) ligados aos átomos de carbono. Estes materiais têm capacidade de adsorver gases, líquidos ou impurezas no interior dos seus poros, apresentando um ótimo poder de clarificação, desodorização e purificação de líquidos ou gases (PEREIRA et al., 2014). Este ainda é um material com elevada resistência mecânica, com uma alta estabilidade química e é considerado um material não grafítico, devido seus átomos de carbono estarem dispostos em uma estrutura hexagonal de duas dimensões. Porém, o carvão

ativado não é um material verdadeiramente amorfo, devido a presença de uma estrutura micro cristalina que difere da estrutura do grafite (CUHADAROGLU e UYGUN, 2008).

Segundo Pereira et al. (2014) a superfície do carvão ativado apresenta características químicas ácidas e básicas, as quais estão associadas aos grupos funcionais presentes em suas superfícies, sendo determinados pelo método de síntese e ativação.

Na síntese de carvão ativado podem ser utilizados quaisquer compostos ricos em carbono, como: ossos de animais, serragem, algas, madeiras, resíduos agroindustriais, materiais lignocelulósicos, dentre outros materiais carbonáceos. A escolha do material a ser ativado depende da sua pureza, preço, e seu potencial de ativação, pois as propriedades do carvão ativado irão depender do processo de síntese e das características do material precursor (MASOUD et al., 2012).

## **2.2. Resíduos agroindustriais**

A agroindústria é um dos principais segmentos da economia brasileira, com importância no abastecimento interno e na exportação. Embora o crescimento deste setor favoreça o desenvolvimento agroindustrial, acaba contribuindo para o aumento da geração de resíduos sólidos, em sua grande maioria composto por cascas e caroços, criando um impacto para o meio ambiente e com isso, a necessidade de alternativas de uso e aproveitamento integral destes resíduos (PANDEY et al., 2000).

Os resíduos gerados nestas atividades, por serem materiais ricos em macro e micronutrientes, são potencialmente impactantes ao meio ambiente, se não adequadamente tratados, podendo ocasionar problemas de poluição no solo e em águas superficiais e subterrâneas (ABDEL-RAOUF, AL-HOMAIDAN e IBRAHEEM, 2012). Além da contaminação de maneira direta, os maiores impactos são decorrentes da fermentação destes materiais, com geração de maus odores e redução do oxigênio dissolvido em águas superficiais. A degradação da matéria orgânica é, também, habitat para a proliferação de microrganismos e algumas pragas caso não sejam devidamente tratados. Desta forma, seu reaproveitamento, seja ele para geração de energia, utilização como substrato em bioprocessos ou na obtenção de produtos de maior valor agregado, além de ser economicamente viável, ajuda a resolver problemas ambientais causados por seu acúmulo na natureza, amenizando a degradação ambiental (SPADOTTO e RIBEIRO, 2006; SCHNEIDER et al., 2012).

Com base nos dados da produção de 2016 divulgados pela CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento), o montante estimado de resíduos orgânicos gerados pelas principais atividades agrícolas e das agroindústrias associadas foi de aproximadamente 335 mil toneladas (ROCHA et al., 2017).

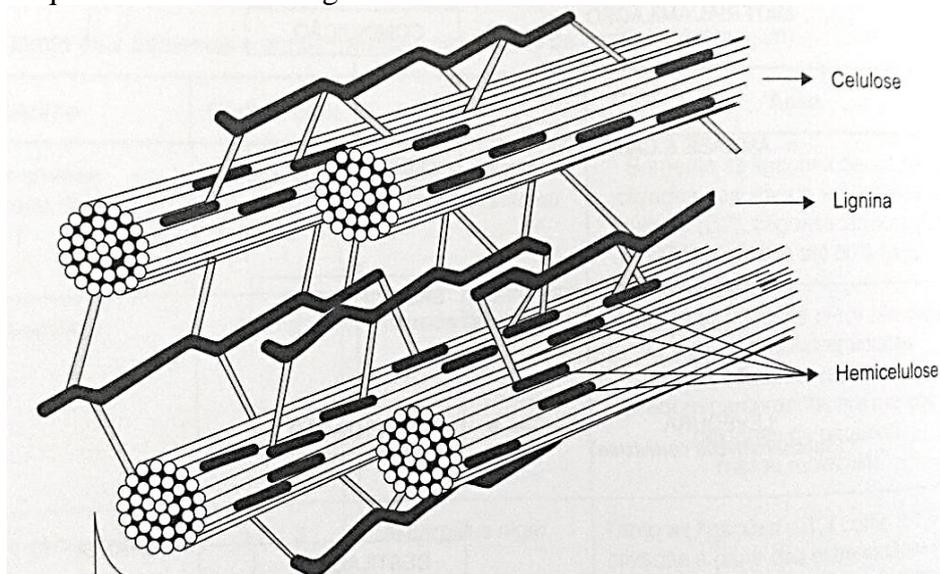
Os resíduos agroindustriais, como cascas e caroços, apresentam altos teores de celulose, lignina e hemicelulose em sua composição. Estudos vem sendo feitos com o objetivo de utilizar estes resíduos lignocelulósicos na produção de materiais com maior valor agregado, já que estes em sua grande maioria não possuem nenhum mercado definido para sua comercialização. Dessa forma, podem ser utilizados na obtenção de diferentes produtos como: carvões ativados, papel e celulose, painéis, aglomerados, compósitos, adsorventes, além de insumos para indústrias químicas e farmacêuticas (DI BERNADO, 2005; PRADO, 2010).

### 2.2.1. Composição Lignocelulósica dos Resíduos Agroindustriais

Os compostos lignocelulósicos são os materiais orgânicos mais abundantes da biosfera, representando aproximadamente 60% da biomassa vegetal. Estes materiais são constituídos por três frações poliméricas principais, unidas entre si por uma rede complexa de ligações covalentes, composta principalmente por: celulose (20 % a 60 %), lignina (10 % a 40 %) e hemicelulose (10 % a 35 %), sendo a concentração de cada um desses elementos variável de acordo com o tipo de matéria-prima em questão, idade e estágio vegetativo (ABIOYE e ANI, 2015).

É importante ressaltar que estes três componentes (celulose, hemicelulose e lignina), encontram-se associados entre si, constituindo o complexo celular da biomassa vegetal (Figura 1). Na parede celular, celulose, hemicelulose e lignina, organizam-se formando diferentes camadas: parede primária, secundária e as diferentes células encontram-se separadas pela lamela média, que é uma camada fina que mantém as células coesas e é responsável pela integridade estrutural do tecido das plantas (CAI et al., 2017).

**Figura 1.** Esquema da estrutura Lignocelulósica.



Fonte: Adaptado de Shleser (1994).

Além destes três constituintes, a biomassa apresenta também os componentes extrativos e inorgânicos. Os componentes extrativos são formados por: alcalóides, óleos essenciais, gorduras, glicosídeos, gomas, mucilagens, pectinas, compostos fenólicos, proteínas, resinas, saponinas, açúcares simples, amidos, terpenos e ceras, podendo ser extraídos através da utilização de solventes polares (álcool, cloreto de metileno ou água) ou apolares (hexano ou tolueno). Estes componentes funcionam como agentes intermediários durante o metabolismo, reserva energética, além de funcionarem, como agentes de defesa das plantas frente aos ataques microbianos e de insetos. Os componentes inorgânicos (minerais ou cinzas) constituem-se de matéria inorgânica encontrada entre as cadeias carbônicas, apresentando baixa ocorrência em alguns destes materiais. Os principais elementos químicos encontrados nas cinzas destes materiais são: Si, Ca, K, Fe, P, Al, Na e Mg, ocorrendo na forma de óxidos, silicatos, carbonatos, sulfatos, clorestos e fosfatos (MOHAN et al., 2006).

Segundo Yahya et al. (2015), as diferenças de composição entre diferentes tipos de materiais precursores estariam relacionadas com algumas características dos carvões sintetizados, como rendimento, distribuição e tamanho de poros. Na literatura consultada nenhum trabalho teve como foco avaliar a influência da variação dos teores de lignina e celulose nas propriedades dos carvões ativados, sendo encontrado apenas dados sobre a composição destes materiais precursores (Tabela 1).

**Tabela 1.** Caracterização dos resíduos lignocelulósicos, com potencial de utilização na síntese de carvões ativados.

<b>Amostra</b>	<b>Lignina</b>	<b>Celulose</b>	<b>Hemicelulose</b>	<b>Referência</b>
<b>Bainha pupunha</b>	9,53%	30,02%	18,24%	FARIAS <i>et al.</i> 2009
<b>Malte</b>	26,13%	12,29%	23,41%	DRAGONE, 2007
<b>Casca de café</b>	28,30%	43,00%	7,00%	GOUVEA <i>et al.</i> 2012
<b>Caroço de umbu</b>	5,60%	60,70%	22,20%	PEREIRA <i>et al.</i> 2008
<b>Sabugo de milho</b>	16,57%	40,32%	28,66%	JENKINS, 1990
<b>Bagaço de cana</b>	18,16%	41,30%	22,64%	JENKINS, 1990
<b>Caroço de cajá</b>	9,47%	14,87%	8,23%	BRITO <i>et al.</i> 2017
<b>Caroço de seriguela</b>	16,87%	18,87%	9,01%	PEREIRA <i>et al.</i> 2014
<b>Casca de cacau</b>	16,43%	13,24%	10,81%	PEREIRA <i>et al.</i> 2014
<b>Casca de cacau</b>	14,70%	35,40%	37,00%	DAUD <i>et al.</i> 2013
<b>Semente de árvore</b>	25,89%	37,79%	19,10%	DODEVSKI <i>et al.</i> 2017
<b>Bambu</b>	26,00%	34,50%	20,50%	SAIDUR <i>et al.</i> 2011

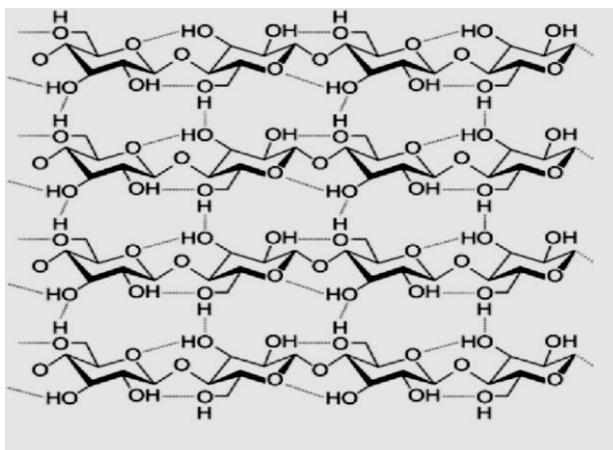
Fonte: Do Autor, 2018.

### 2.2.1.1. Celulose

A celulose ( $C_6H_{10}O_5$ )<sub>n</sub> (Figura 2) corresponde a macromolécula orgânica de maior abundância presente nas paredes celulares das células vegetais (40 % - 45 %). É um polímero natural de unidades repetitivas de D-glucose em cada anel de piranose, observa-se três grupos hidroxila, que podem interagir uns com os outros formando ligações de hidrogênio intra e intermoleculares, dando assim uma estrutura cristalina a celulose, além de conferir propriedades únicas de resistência mecânica e estabilidade química. Os anéis de piranose são ligados entre si por meio das ligações de acetal (-O-, β-1,4-ligação glicosídica) entre C-1 de um anel de piranose e C-4 do anel subsequente. Devido à perda de uma molécula de água nessa ligação, a celulose também pode ser definida como um polissacarídeo de anidro-glicopiranosose (HARMSEN et al., 2010; DHYANI e BHASKAR, 2017).

Segundo Oliveira e Gonçalves (2013) a celulose apresenta diferentes graus de ordenamento: em maior grau de ordenamento sua estrutura apresenta regiões cristalinas e em menor grau de ordenamento regiões amorfas. As regiões cristalinas da celulose são mais resistentes à degradação do que as partes amorfas, portanto, apresentam maior grau de polimerização. O tamanho da cadeia molecular é normalmente especificado como grau de polimerização (DP), ou seja, o número de resíduos de glicose que formam sua cadeia, que por sua vez varia entre 7.000 e 15.000. Na molécula de celulose, as cadeias encontram-se agregadas paralelamente para formar as fibrilas elementares, sendo estas insolúveis em água e apresentam regiões cristalinas e amorfas (OLIVEIRA e GONÇALVES, 2013). As ligações de hidrogênio inter- e intramoleculares são responsáveis pela manutenção das regiões cristalinas, tornando a celulose altamente resistente à hidrólise ácida, alcalina ou enzimática (ARAÚJO *et al.*, 2010).

**Figura 2.** Estrutura química da celulose.

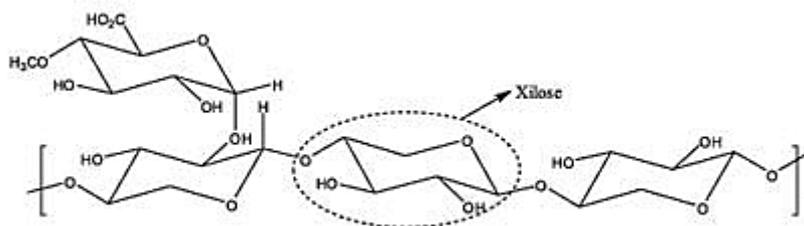


Fonte: Adaptado de Dhyani e Bhaskar (2017).

### 2.2.1.2. Hemicelulose

As hemiceluloses ( $C_5H_8O_4$ )<sub>n</sub> (Figura 3) são carboidratos responsáveis por envolver as fibras de celulose, além de permanecer como um elo de ligação entre a celulose e a lignina. Apresenta estrutura amorfa, sendo considerada um grupo heterogêneo de polissacarídeos ramificados, compostos por diferentes monômeros em sua estrutura, tais como glicose, galactose, manose, xilose, arabinose e ácido glicurônico (DHYANI e BHASKAR, 2017).

**Figura 3.** Estrutura química da hemicelulose



Fonte: Adaptado de Santos et al. (2012).

Este polissacarídeo contém considerável grau de ramificação entre suas cadeias e apresenta um grau de polimerização (DP) variando de 50-200 monômeros, sendo este muito inferior ao da celulose (LAM e SOKHANSANJ, 2014). Devido à combinação de diversos açúcares e por apresentar uma estrutura amorfa as hemiceluloses apresentam baixa resistência física, sendo mais solúveis em água que a celulose e consideradas bastante hidrofílicas, além de sofrerem hidrólise ácida, básica e/ou enzimáticas com maior facilidade (CAI et al., 2017).

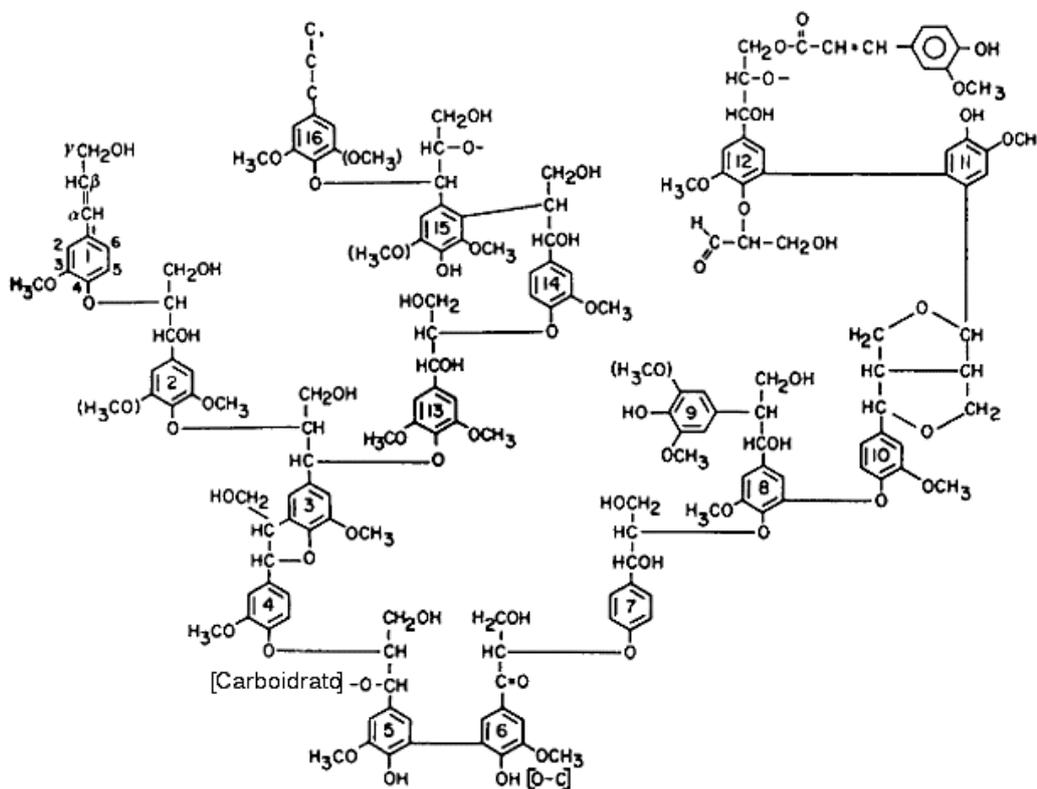
### 2.2.1.3. Lignina

A lignina ( $C_9H_{10}O_2$ ,  $C_{10}H_{12}O_3$ ,  $C_{11}H_{14}O_4$ )<sub>n</sub> (Figura 4) é considerada uma macromolécula amorfa de estrutura tridimensional, hidrofóbica altamente ramificada, sendo classificada como polímero fenólico aromático reticulado, constituído por um arranjo irregular de diversas unidades de fenilpropano, que podem conter grupos hidroxila e metoxila, como substituintes do grupo fenil. Essas unidades de fenilpropano são derivadas dos álcoois hidroxicinâmicos: *p*-cumarílico, coniferílico e sinapílico, podendo ser categorizados como unidades guaiacil, siringil e *p*-hidroxilfenilo (OLIVEIRA, 2015; KAN et al., 2017).

Na lignina suas unidades de fenilpropano encontram-se ligadas entre si por dois tipos de ligações: a maior parte das ligações são ligações éter,  $\beta$ -O-4 e  $\alpha$ -O-4, através do oxigênio do grupo hidroxila do anel fenólico, e através de ligações diretas carbono-carbono (C-C) (BOERJAN et al., 2003). As ligações do tipo éter permitem uma estrutura mais “aberta” à lignina, enquanto as ligações C-C aproximam mais os monômeros entre si, tornando a lignina mais condensada, e a depender do grau de condensação da molécula esta terá uma maior ou

menor reatividade. De um modo geral, a formação da macromolécula de lignina não segue um mecanismo regular devido ao acoplamento irregular e não repetitivo das unidades de fenilpropano, apresentando um acoplamento randômico, que depende da estabilidade dos radicais formados (PRADO, 2010; OLIVEIRA, 2015).

**Figura 4.** Estrutura química da lignina.



Fonte: Adaptado de Kirk e Farrell, 1987.

A lignina está presente principalmente na camada externa das fibras, sendo responsável pela rigidez estrutural, impermeabilidade, retenção das fibras de polissacarídeos e resistência a ataques microbiológicos e mecânicos aos tecidos vegetais. Sua concentração pode variar de acordo com a biomassa de origem e com base nos métodos de extração utilizados (OLIVEIRA e GONÇALVES, 2013). De acordo com Dhyani e Bhaskar (2017), em biomassas lignocelulósicas, tem sido relatado teores de até 40% deste polímero.

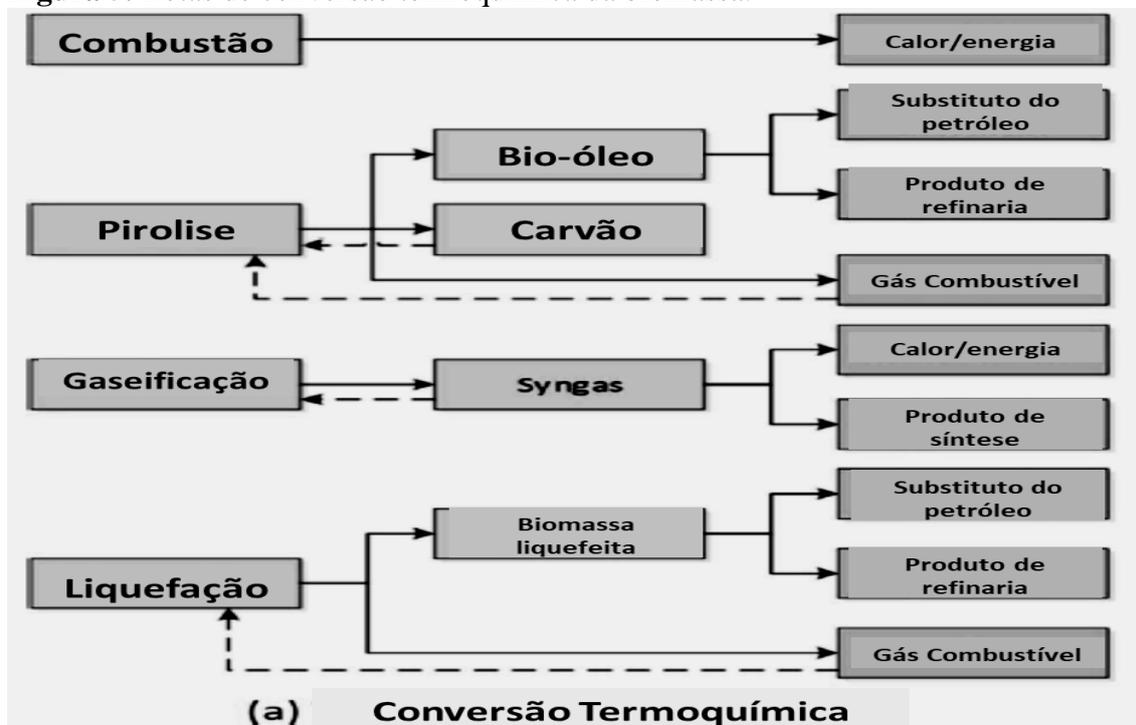
Fisicamente, as microfibrilas de celulose são revestidas com hemicelulose, cujos espaços vazios são preenchidos com lignina, desempenhando um importante papel na parede celular. A massa molar típica de lignina isolada está no intervalo de 800 – 20.000 g/mol, mas o grau de polimerização é difícil de medir, já que a lignina é invariavelmente fragmentada durante a extração e consiste de vários tipos de subestruturas que se repetem aparentemente de maneira casual (DOHERT et al., 2011).

#### 2.2.1.4. Aproveitamento de resíduos agroindustriais

A quantidade de biomassa de resíduos agrícolas gerada em todo o mundo vem crescendo com o aumento das atividades agrícolas/agroindustriais em vários países. Segundo Laufenberg (2003), estes resíduos podem conter muitas substâncias de alto valor agregado, de modo que, empregando uma tecnologia adequada, estes materiais podem ser convertidos em produtos comerciais ou matérias-primas para processos secundários.

Estes resíduos ainda têm sido utilizados como fontes geradoras de energia em caldeiras, além de serem utilizados como fertilizantes. Novas rotas de conversão termoquímica ou bioquímicas para conversão da biomassa lignocelulósica em produtos energéticos tem sido estudada (Figura 5) (ABIOYE e ANI, 2015; CAI et al., 2017).

**Figura 5.** Rotas de conversão termoquímica da biomassa.



Fonte: Adaptado de Cai et al. (2017).

Na última década pesquisas têm sido focadas na busca e desenvolvimento de materiais de carbono a partir de diversos subprodutos agroindustriais, com atenção especial para aqueles que possam ser produzidos a partir da reutilização dos resíduos, gerando assim matérias com baixos custos. Uma vez que, a maior parte dos carvões comerciais ativados utilizados atualmente, são produzidos a partir de combustíveis fósseis, fazendo com que, estes materiais apresentem um custo mais elevado. Portanto, diversos estudos vêm sendo feitos para assegurar menores custos de produção, como a reutilização de materiais precursores provenientes de biomassa (ABIOYE e ANI, 2015).

Entre os tipos de biomassa disponíveis, os resíduos agroindustriais podem ser considerados como um dos melhores materiais para a produção de carvão ativado devido ao seu baixo custo, alto teor de carbono em sua composição, por apresentarem alta disponibilidade, especialmente nos países tropicais, e por serem renováveis, resolvendo assim o problema da elevada geração de resíduos (AHMED, 2016).

Neste sentido, muitas pesquisas têm sido realizadas visando avaliar o potencial desses materiais como precursores de carbono na produção dos carvões ativados, incluindo cascas de coco (CAGNON et al., 2009; YANG et al., 2010), de cacau e caroço de seriguela (PEREIRA et al., 2014), bambu (LIU et al., 2013), bagaço de cana-de-açúcar (SI et al., 2011); casca de amendoim (HE et al., 2013), casca de palmito (ABECHI et al., 2013), entre outros, o que permitirá obter materiais carbonáceos de baixo custo e de alta qualidade para serem empregados, por exemplo, como adsorventes ou suportes catalíticos.

### **2.3. Síntese de carvão ativado**

Uma vez determinada a fonte precursora de carbono, os carvões ativados são obtidos por processos que têm etapas de ativação e carbonização do material precursor para o desenvolvimento dos poros internos. Em alguns processos estas etapas podem ser realizadas simultaneamente.

A ativação do material precursor, é uma etapa de suma importância no processo de síntese, levando ao aumento da porosidade, através do aumento do diâmetro dos poros menores e criação de novos poros no material precursor, conseqüentemente um aumento da área superficial do carvão. A ativação do material pode ser feita por métodos físicos ou químicos. Na ativação física, o precursor é tratado termicamente em atmosfera suavemente reativa, tais como vapor de água ou gás carbônico, ativação e carbonização ocorrendo simultaneamente. Já a ativação química consiste na impregnação prévia do precursor com agentes químicos, tais como: ácido fosfórico ( $H_3PO_4$ ), cloreto de zinco ( $ZnCl_2$ ), hidróxidos de metais alcalinos (hidróxido de potássio, KOH, ou hidróxido de sódio, NaOH) ou ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ), seguida da carbonização em altas temperaturas e em atmosfera inerte (FIERRO et al., 2006). As ativações físicas e químicas podem ser realizadas de forma simultânea e recebe a denominação de ativação fisioquímica, esta utilização conjunta dos dois métodos de ativação, pode produzir carvões ativos com propriedades de superfície específicas (MOHD DIN et al., 2009).

As vantagens da ativação química em relação a ativação física são que a ativação química necessita de uma menor energia, uma vez que neste tipo de ativação a etapa de carbonização geralmente ocorre em temperaturas mais baixas (500°C a 700°C), quando

comparado com a ativação física (800°C a 1000°C). Outra vantagem é que o efeito desidratante proporcionado pela ativação química dificulta a formação de hidrocarbonetos aromáticos (alcatrão) o que leva a um maior rendimento em carvão ativado, além de uma maior área superficial e melhor desenvolvimento da superfície porosa (HADI et al., 2015; ZUBRIK et al., 2016). Como desvantagem tem-se a necessidade de um processo de lavagem adicional, elevando o custo do processo (TSYNTSARSKI et al., 2015).

Dentre os reagentes mais utilizados para a ativação química, destaca-se o ácido fosfórico, que favorece o desenvolvimento de poros intermediários (mesoporos), o que é benéfico para adsorção de moléculas maiores, como proteínas. O ácido fosfórico atua como um agente catalisador, promovendo a ruptura de ligações aril-éter, formando ésteres fosfóricos pela ligação do agente ativante com os grupos hidroxila da lignina na superfície do material precursor, provocando reações que ocasionam o afastamento das cadeias, gerando a expansão e a redistribuição das estruturas de carbono remanescente, ocorrendo a posterior polimerização destes grupos fosfatos com o aumento de temperatura, aumentando o volume de mesoporos (ISMANTO et al., 2010). Estudos demonstram que em processos onde o ácido fosfórico é utilizado como agente de ativação de materiais lignocelulósicos são necessárias temperaturas mais brandas de ativação. Temperaturas na faixa de 150°C a 350°C geram um aumento no volume total de poros e no desenvolvimento de microporos, e com o aumento da temperatura ocorre o desenvolvimento de mesoporos, ocasionados principalmente devido ao alargamento dos microporos já existentes (JAGTOYEN e DERBYSHIRE, 1998). Segundo Julien, Baudu e Mazet (1998), os carvões quimicamente ativados geralmente possuem uma estrutura de poro mais aberta.

### **2.3.1. Influência da composição dos materiais lignocelulosicos nas propriedades físico-químicas do carvão ativado**

Além do método de ativação, a composição química do material lignocelulósico, bem como a proporção dos seus constituintes no material, irão exercer influência no desenvolvimento da porosidade e área superficial dos carvões sintetizados. De acordo com Smith et al. (2017), a distribuição desses polímeros é um fator crítico que controla algumas características dos carvões sintetizados, como a distribuição de poros do produto durante a pirólise e o rendimento do processo.

Materiais precursores com altos teores de lignina são desejáveis para a produção do carvão ativado, sendo a principal responsável pela formação da massa de carbono fixo do carvão, proporcionando maiores rendimentos durante sua síntese, devido ao fato da lignina apresentar uma maior estabilidade durante a etapa de carbonização, sendo degradada em

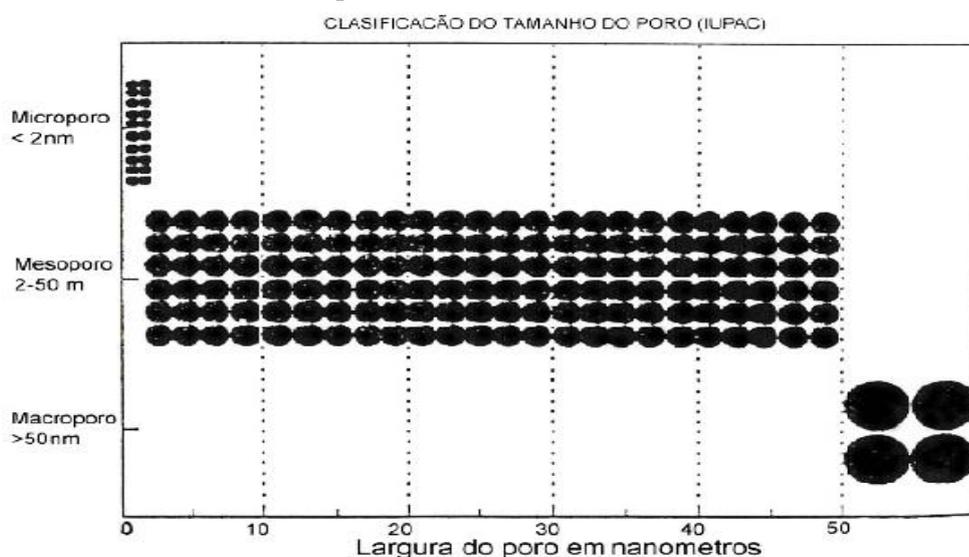
temperaturas de 280 a 500°C, quando comparado com a celulose e a hemicelulose, degradadas nas faixas de 260 a 350°C e 200 a 280°C respectivamente, conferindo assim, dureza e durabilidade ao material, evitando o rompimento das partículas do carvão (RODRIGUÉZ-REINOSO e SABIO, 2004; KHEZAMI et al., 2005; NABAISA et al., 2013).

Materiais precursores, provenientes de resíduos com altos teores de celulose, tendem a produzir carvões com altos valores de área superficial, conforme observado em trabalhos de síntese de carvão ativado a partir de bambu (FUJISHIGE et al., 2017), casca de arroz (CHEN et al., 2013). Já para a hemicelulose, nestes trabalhos não houve relatos da sua importância na síntese dos carvões ativados.

A área superficial específica, também chamada de área de Brunauer-Emmett-Teller (BET), e o volume de poros dos carvões ativados variam de acordo com a matéria-prima, razão de impregnação e as condições de ativação/carbonização, ou seja, as características dos carvões são completamente dependentes dos métodos utilizados para sua síntese. A área BET é determinada pela medição do gás adsorvido ( $N_2$ ) a uma determinada pressão. Carvões ativados, geralmente tem uma área BET variando de 800 a 1500  $m^2/g$  (HENNING e KIENLE, 2010).

Segundo a União Internacional de Química Pura e Aplicada – IUPAC (1982), os poros dos carvões podem ser classificados em função do diâmetro como microporos (poros < 2nm), mesoporos (poros variando de 2 a 50 nm) e macroporos (poros > 50nm), conforme exemplificado na Figura 6. Desta forma, todos os carvões ativados possuem em sua estrutura micro, meso e macroporos, mas a sua quantidade é variável (WANG et al., 2001).

**Figura 6.** Classificação quanto ao tamanho do poro do carvão ativado segundo União Internacional de Química Pura e Aplicada.



Fonte: Adaptado de IUPAC (1982).

Além das características físicas, os grupos funcionais superficiais desempenham um papel importante em processos em que os carvões ativados são empregados, como por exemplo a adsorção química. As descontinuidades nos anéis aromáticos em um carvão ativado, contendo elétrons e valências residuais, são altamente reativos, sendo chamados sítios ativos. Esses sítios ativos podem interagir com diferentes espécies, como oxigênio, hidrogênio, nitrogênio e enxofre. Nos carvões ativados, esses sítios ativos, são responsáveis pela reatividade superficial e reações catalíticas (BANSAL e GOYA, 2005). Embora os carvões ativados sejam de natureza hidrofóbica, a presença de grupos contendo oxigênio na superfície aumenta sua hidrofilicidade, uma vez que as moléculas de água podem formar ligações de hidrogênio com átomos de oxigênio, deste modo, as estruturas químicas superficiais dos carvões ativados determinaram sua interação com outras moléculas (MARSH e RODRIGUEZ-REINOSO, 2006).

Os carvões ativados apresentam três tipos de grupos funcionais em sua superfície contendo oxigênio, são os grupos: ácidos, neutros e básicos (BANSAL e GOYA, 2005). A maioria dos complexos de oxigênio de caráter ácido formam os grupos carbóxilos, lactonas e fenóis, deixando a superfície mais hidrofílica, de caráter polar, adsorvendo espécies iônicas, como os metais pesados. Os grupos de caráter básico têm menor ocorrência e formam estruturas de piranos, já os grupos de oxigênio de superfície neutra são formados pela quimiossorção irreversível de oxigênio nos locais não saturados. A natureza e a concentração dos grupos funcionais da superfície irão depender dos métodos de ativação/carbonização e do material precursor utilizados no processo de síntese do carvão ativado (RODRIGUEZ-REINOSO, 2006).

Pode-se concluir que vários fatores influenciam nas características dos carvões ativados, de modo que, a utilização de técnicas estatísticas multivariadas como a Análise de Componentes Principais (ACP) e Análise de Correlação canônica (ACC), irão auxiliar no entendimento de como as características dos materiais precursores irão influenciar nas características dos carvões ativados.

#### **2.4. Análise Estatística Multivariada**

A análise estatística multivariada consiste em um conjunto de métodos estatísticos, que realizam medidas simultâneas de várias variáveis em cada unidade experimental, ou seja, é o ramo da estatística que tem por objetivo o resumo, a representação, a análise e a interpretação de dados amostrados de populações nas quais para cada unidade experimental são avaliadas diversas variáveis respostas, contínuas ou não. Considerando como multivariada qualquer análise que de forma simultânea trata mais do que duas variáveis de um planejamento experimental. Os métodos de análise de dados multivariados permitem um estudo global dessas

variáveis, colocando em evidência as ligações, semelhanças ou diferenças entre elas, perdendo o mínimo de informação (MINGOTI, 2005; HAIR et al., 2010).

De acordo com Hair et al (2010), as análises multivariadas geram hipóteses e não criam confirmações sobre o conjunto de dados, pois é uma análise exploratória de dados, entretanto em alguns casos pode ser utilizada para confirmação dos eventos.

A proposta da multivariada consiste em agrupar os dados em conjuntos que possuam atributos similares, apresentando os de uma maneira que enfatize os agrupamentos naturais. Quando as distâncias entre as amostras são relativamente pequenas, isto implica que as mesmas são similares; já amostras diferentes serão separadas por distâncias relativamente grandes, de uma forma geral PEREIRA (1999). Desta forma pode-se destacar como objetivos gerais da utilização da análise multivariada:

- Redução de dados sem sacrificar informações valiosas, tornando as interpretações mais simples;
- Ordenação e agrupamento: agrupamento de objetos (tratamentos) ou variáveis similares, baseados em dados amostrais ou experimentais;
- Investigação da dependência entre variáveis: estudos das relações estruturais entre variáveis;
- Predição: relações entre variáveis devem ser determinadas para o propósito de predição de uma ou mais variável com base na observação de outras variáveis;
- Construção e teste de hipóteses.

#### **2.4.1. Análise de Componentes Principais (ACP)**

A análise de componentes principais é uma das mais antigas técnicas multivariada, tendo como propósito analisar estruturas de covariâncias e correlações e transformar um conjunto de variáveis correlacionadas em outro grupo de variáveis não correlacionadas de mesma dimensão denominadas de componentes principais, os quais apresentam propriedades importantes: cada componente principal é uma combinação linear de todas as variáveis originais, são independentes entre si e estimados com o propósito de reter, em ordem de estimação, o máximo de informação, em termos da variação total contida nos dados (MOITA, 2004).

Segundo Moita (2004), a técnica de ACP está associada à ideia de redução do volume de dados, com menor perda possível de informação. Procura-se redistribuir a variação observada nos eixos originais de forma a se obter um conjunto de eixos ortogonais não correlacionados. Esta técnica pode ser utilizada para geração de índices e agrupamento de indivíduos, de acordo com sua variação, servindo ainda para a obtenção de combinações

lineares das variáveis originais com variabilidade relativamente grande. Além de ser utilizada como ferramenta para a redução da dimensionalidade dos dados, podendo ser utilizada como um passo intermediário para análises subsequentes dos dados.

#### **2.4.2. Análise de Correlação Canônica (ACC)**

A análise de correlação canônica, consiste é uma técnica exploratória apresentando como finalidade reduzir os vetores de variáveis em um número menor, através da generalização da análise de regressão múltipla. Pode-se dizer que esta análise tem como objetivo principal o estudo das relações lineares existentes entre dois conjuntos de variáveis. A ideia básica é resumir a informação de cada conjunto de variáveis respostas em combinações lineares, sendo que a escolha dos coeficientes dessas combinações é feita tendo-se como critério a maximização da correlação entre os conjuntos de variáveis respostas. As combinações lineares que podem ser construídas são chamadas de variáveis canônicas, enquanto que a correlação entre elas é chamada de correlação canônica. Essa correlação mede basicamente o grau de associação existente entre os dois conjuntos de variáveis para estabelecer poucos pares de variáveis canônicas (FERREIRA, 2011; MINGOTI, 2005; VAINIONPAA et al., 2000).

Segundo Ferreira (2011), a inter-relação entre os conjuntos de variáveis pode propiciar a identificação de possíveis estruturas de dependência entre os diferentes conjuntos que não seriam facilmente identificáveis pela simples inspeção das correlações entre os pares de variáveis originais, de modo que, a ACC determina quais a variáveis mais importantes da análise.

#### **2.5. Aplicação do carvão ativado**

O carvão ativado é utilizado em diversas vertentes, como na purificação de compostos químicos, na clarificação e remoção de sabores e odores de óleos, bebidas alcoólicas, produtos químicos e farmacêuticos e no tratamento de águas residuárias. Ele também é largamente utilizado em escala industrial como adsorvente principalmente na purificação/separação de líquidos e gases e como suporte catalítico (SAHU et al., 2010). A importância e a crescente demanda da utilização dos carvões ativados se devem às propriedades inerentes deste material, tais como suas propriedades física e químicas (ZANELLA, 2015).

Segundo Daud e Sulaiman (2001) os carvões ativados são considerados um dos sólidos adsorventes mais utilizados nos mais diversos setores. Os sistemas de adsorção envolvendo este material tem importância em processos de separação e purificação em escala industrial, e são considerados como uma das melhores tecnologias disponíveis na remoção de contaminantes orgânicos e inorgânicos do meio, sendo utilizado em áreas distintas, como no tratamento de

efluentes, tratamento de água potável, recuperação de solventes, tratamento de emissões aéreas, descoloração, desodorização e processamento de minérios.

Neste sentido, muitas pesquisas vêm sendo realizadas como o objetivo de avaliar a eficiência dos carvões ativados em diferentes processos: imobilização de lipase em carvão ativado (BRITO et al., 2017); adsorção de BSA e  $\alpha$ -lactalbumina utilizando carvão ativado (PEREIRA et al., 2014); imobilização de pancreatina em carvão ativado (SILVA et al., 2005), adsorção de azul de metileno (AHMAD et al., 2007), adsorção de 2,4-diclorofenol (ANISUZZAMAN et al., 2015), imobilização de papaína (DUTTA et al., 2009), entre outros.

Devido às suas propriedades como: elevada área superficial, boa estabilidade química, mecânica e térmica, hidrofobicidade e insolubilidade, os carvões ativados têm sido empregados como suporte catalítico em processos de imobilização de enzimas (SILVA et al., 2005; MENONCIN et al., 2007; BASSAN et al., 2016;).

## 2.6. Enzimas

Segundo Cardoso (2009), as enzimas são biocatalisadores de origem proteica que apresentam a capacidade de reagir com substratos, através de diversos tipos de ligações, como as ligações de hidrogênio, as interações de Van der Waals, interações eletrostáticas, ligações covalentes, entre outras. Estas apresentam elevadas seletividade e especificidade, responsáveis por realizarem uma grande variedade de processos químicos sob diversas condições reacionais. A especificidade das enzimas caracteriza sua atividade biológica particular, a qual baseia-se nas interações entre o sítio ativo da enzima com a molécula do substrato/inibidor, chamados de reação enzima-substrato, ou “chave-fechadura”. Além de apresentarem alta especificidade por um substrato em particular, as enzimas apresentam variações em sua atividade, quando submetidas a variações das condições do meio reacional, como temperatura e pH (GHATTASA et al., 2014).

As enzimas possuem várias aplicações e são utilizadas em diversos segmentos das indústrias alimentícias, têxteis, de papel e na agricultura, resultando assim significativas reduções de custos em diversas aplicações, devido à maior especificidade de atuação e por agirem geralmente sob condições reacionais brandas e com menores volumes de matérias primas (JEGANNATHAN e NIELSEN 2013).

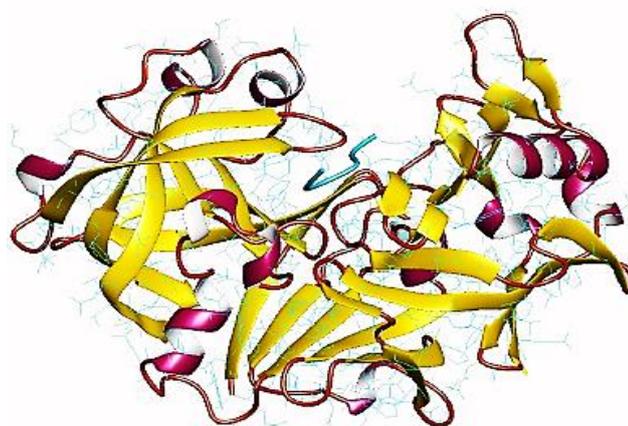
Dentre os vários tipos de enzimas, as proteolíticas têm importância particular na ciência de alimentos, sendo utilizadas na indústria de alimentos no preparo de hidrolisados protéicos. Os hidrolisados apresentam propriedades que os tornam atrativos como fonte de aminoácidos na nutrição humana, sendo fisiologicamente melhores do que as proteínas intactas, uma vez que os oligopeptídeos, principalmente di- e tripeptídeos, são melhores absorvidos pelo organismo e

apresentam melhor balanço de aminoácidos quando comparados a misturas de aminoácidos livres (SOARES et al., 2004).

### 2.6.1. Pepsina

A pepsina (E.C. 3.4.23.1) (Figura 7) é uma endopeptidase encontrada na mucosa do estômago juntamente com a quimotripsina e tripsina, outras enzimas proteolíticas do sistema digestivo. Durante o processo de digestão, cada uma destas enzimas é responsável em clivar tipos particulares de ligações peptídicas, digerindo as proteínas da dieta em seus componentes: peptídeos e aminoácidos, os quais serão absorvidos pela mucosa intestinal (ALTUN e CETINUS, 2007; VOET e VOET, 2011). A pepsina tem um tamanho aproximado de 35 kDa e apresenta seu ponto isoelétrico em pH 1,0. Por ser uma enzima encontrada no sistema digestivo, tem atuação em pH mais ácido, numa faixa variando de 2,0 a 4,0. Devido à esta propriedade é uma das enzimas mais utilizadas para análise de outras proteínas devido à sua eficiência em quebrar ligações envolvendo aminoácidos aromáticos e triptofano. Na indústria de alimentos é utilizada como coagulante de leite para produção de queijos (ALTUN e CETINUS, 2007).

**Figura 7.** Representação tridimensional da Pepsina



Fonte: Adaptado de Melo (2009).

Por apresentarem elevado custo, especialmente aquelas com alto grau de pureza, é necessário desenvolver estratégias que produzirão estabilidade estrutural e funcional nas enzimas, de modo que, a imobilização enzimática, é um método simples que consiste em aprisionar ou ligar a enzima a um suporte, com ou sem maiores perdas da atividade catalítica, podendo reter essa atividade por um maior tempo que as enzimas livres (SILVA et al., 2005).

### 2.7. Imobilização de enzimas

Conforme descrito por Mubarak et al. (2014), a utilização industrial da enzima na sua forma nativa, apresenta baixa estabilidade, sendo assim consideradas como a barreira para o

desenvolvimento de operações e aplicações em larga escala. Contudo, estes problemas podem ser solucionados através da utilização das enzimas na forma imobilizada, uma vez que estas estão fisicamente confinadas em uma região definida do espaço, com retenção de suas atividades catalíticas, podendo utilizá-las repetidamente e continuamente (CARVALHO et al., 2006).

Segundo Motevalizadeh et al. (2015) o principal interesse em imobilizar uma enzima é obter um biocatalisador com atividade e estabilidade que não sejam afetadas durante o processo, em comparação à sua forma livre, nem deverá ocorrer alterações estruturais na enzima, como modificações no sítio ativo, evitando assim problemas dos reatores em batelada que são principalmente: altos custos operacionais; baixa produtividade; problemas de remoção da enzima e variação na qualidade dos produtos. A imobilização possui as seguintes vantagens: Reutilização das enzimas; Os processos químicos podem ser continuamente operados e controlados; Facilidade na separação do produto-substrato; Perdas de enzimas por lixiviação minimizadas; Repetibilidade do processo; Alta estabilidade e baixos custos.

As enzimas podem ser imobilizadas por uma variedade de métodos, tais como encapsulamento (GUPTA, BHATTACHARYA e MURTHY, 2013;) por ligação cruzada (KATO et al., 2011), ligação covalente (MELLO et al., 2006; KHOABI et al., 2014;) ou adsorção (MOTEEVALIZADEH et al., 2015; BRITO et al., 2017).

Os métodos utilizados para a imobilização de enzimas baseiam-se nas ligações químicas (onde ligações covalentes são formadas entre o suporte e a enzima) e físicas (onde existem interações fracas entre o suporte e a enzima, como por exemplo a adsorção) entre a enzima e o suporte. O método de imobilização deve garantir a estabilidade enzimática durante longos períodos de tempo, além de evitar sua lixiviação, torná-la reutilizável e permitir a livre difusão de substratos e produtos da reação (ISPAS et al., 2009).

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

Diferentes estudos têm sido realizados de modo a estudar o comportamento das enzimas quando são utilizadas na forma imobilizadas e na sua forma livre. Mello et al, (2006) ao estudar o comportamento e a atividade enzimática da pepsina na sua forma livre e imobilizada em membranas liofilizadas de quitosanas, observou que na forma imobilizada a enzima apresentou-se mais estável em uma ampla faixa de pH, quando comparada à sua forma nativa e o mesmo foi observado quando avaliado sua atividade enzimática. Altun e Cetinus (2007) estudando a imobilização de pepsina em pérolas de quitosanas observaram que a faixa de pH em estudo não

influenciou na sua atividade ótima, mas quando foi estudado a variação de temperatura, os autores observaram que as enzimas imobilizadas apresentaram uma melhor estabilidade térmica, devido a imobilização reduzir os efeitos de desnaturação enzimática. Os autores ainda afirmam que a estabilidade das enzimas pode ser melhorada quando se utiliza suportes inorgânicos ao invés de polímeros orgânicos.

### **2.7.1. Imobilização por adsorção**

Dentre os métodos de imobilização enzimática utilizadas, o método de adsorção física é um dos mais empregado, pois apresenta poucos efeitos na estrutura conformacional da enzima, uma vez que a enzima é espontaneamente imobilizada em uma orientação que lhe é preferencial e energeticamente favorável, além de apresentar baixo custo e ser de fácil execução. Neste método ocorre a adesão da enzima na superfície do suporte insolúvel, que se encontra em meio aquoso, através de interações de Van der Waals, interações hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e interações específicas (CARVALHO et al., 2006; CARDOSO et al., 2009; KANDASAMY et al., 2010).

Como desvantagens, tem-se a aleatoriedade da interação enzima-suporte e as forças envolvidas no processo de adsorção, onde diferentes parâmetros vão influenciar na quantidade de enzima adsorvida e a força das interações. O pH do meio reacional, assim como do número e a natureza das cargas sustentadas pelo suporte. A variação da temperatura durante o processo, também terá influência na eficiência do processo, uma vez que, com o aumento da temperatura, existe a possibilidade de aumentar o número de ligações hidrofóbicas. Outro fator importante é a concentração de sais nas soluções, pois a depender dos sais e, das suas concentrações utilizadas, seus íons em solução podem ocasionar mudanças na solubilidade da enzima, de acordo com a sua posição na série de Hofmeister, influenciando assim na eficiência do processo adsortivo. Desta forma, a eficiência deste método depende de variáveis tais como pH, força iônica do meio e a natureza do solvente empregado, bem como da relação entre a concentração da enzima e do suporte (DALLA-VECCHIA et al., 2004).

Vários materiais podem ser utilizados como suportes, podendo os mesmos serem orgânicos ou inorgânicos, naturais ou sintéticos. A seleção do suporte depende das propriedades do material como força mecânica, estabilidade física e química, caráter hidrofílico/hidrofóbico, capacidade da enzima de adsorção e o custo. Geralmente o suporte tem de satisfazer dois requisitos principais: possuir uma quantidade suficiente de grupos funcionais na superfície que possam interagir com a enzima; propriedades mecânicas e dimensões que devem permitir seu desempenho estável e a possibilidade de utilização repetida por muitos ciclos, ou aplicação de um processo contínuo (CARVALHO et al., 2006; MATEO et al., 2007). Os principais suportes

utilizados no processo de imobilização: carvão ativado; resinas poliméricas; sílicas e carvões mesoporosos (CAO, 2005; KANDASAMY et al., 2010; MUBARAK et al., 2014).

A maioria dos estudos aponta que as enzimas em suportes inorgânicos são mais estáveis do que em polímeros sintéticos e naturais. Os materiais porosos têm certas características que favorecem a imobilização em comparação com materiais não porosos, devido ao seu tamanho de poro, de sua elevada área de superfície, volume de poros e estruturas abertas (MACEDO et al., 2008).

### **2.7.2. Imobilização por ligação covalente**

Na imobilização por ligação covalente, a enzima é ligada ao suporte inerte mediante ligações químicas covalentes, que são, normalmente, estabelecidas entre os grupos amino, grupos amino residuais, grupos sulfidríla e grupo hidroxila do anel fenólico dos aminoácidos constituintes da enzima com os grupos reativos do suporte. Em geral, para que ocorra estas reações deve ser feita a modificação da superfície, ou funcionalização do suporte (CAO, 2005).

As vantagens desta técnica de imobilização é proporcionar uma maior rigidez na estrutura da enzima, garantindo assim uma maior eficiência de imobilização e estabilidade a agentes desnaturantes; os complexos formados não são tão suscetíveis a variação do pH, força iônica, solventes e temperatura (KHOABI et al., 2014). A formação de múltiplas ligações covalentes reduz a flexibilidade conformacional e as vibrações térmicas e evita o desdobramento e desnaturação da proteína. A desvantagem do método é que ela não ocorre de maneira uniforme, e em alguns casos podem ocorrer a inativação da enzima e/ou redução da atividade catalítica devido à alteração em sua conformação nativa impostas pelas ligações entre as enzimas e os grupos reativos do suporte (CAO, 2005).

Segundo Hanefeld et al. (2009) as enzimas imobilizadas covalentemente podem ser usadas em qualquer meio, devido a maior força de imobilização, enquanto que as enzimas imobilizadas por adsorção, podem apresentar perdas por lixiviação a depender do meio utilizado. Devido a este problema, vem sendo estudado métodos de modificação química dos suportes com o objetivo de torná-los mais adequados para serem empregados na imobilização por formação de ligações covalentes.

#### **2.7.2.1. Funcionalização dos suportes**

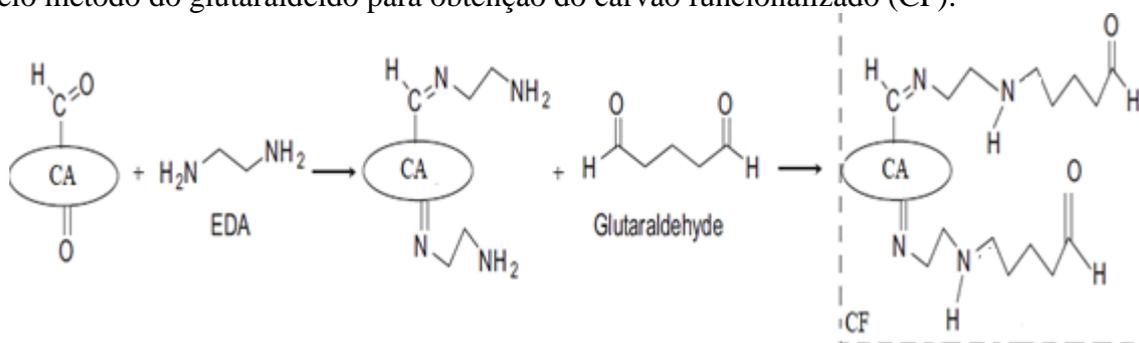
A modificação química da superfície do material é feita pela inserção de grupos reativos, que apresentem uma interação com os grupos amina ( $\text{NH}_2$ ), tiol ( $\text{SH}$ ), hidroxila ( $\text{OH}$ ) entre outros resíduos de aminoácidos das proteínas, formando assim uma ligação covalente bem estável entre a biomolécula e o suporte. Cada método de imobilização apresenta uma diferente

reação química para atingir o máximo de ligação entre as biomoléculas de interesse (SANTOS et al., 2015).

Entre os métodos de modificação disponíveis, o do glutaraldeído por ligação covalente multi-pontual é o método mais eficaz em termos de estabilidade térmica e operacional das enzimas, aumentando sua rigidez e garantindo uma maior resistência à pequenas mudanças conformacionais causadas pela variação de temperatura, utilização de solventes orgânicos, agentes desnaturantes, entre outros. Esta estabilização ocorre devido à formação de ligações covalentes entre grupos de amins da enzima e grupos aldeídos do suporte. (KANDASAMY et al., 2010). Segundo Mendes (2011), o enriquecimento de grupos reativos na superfície da matriz por modificação química pode levar ao aumento da estabilização das enzimas, por permitir ligações covalentes multipontuais de forma mais intensa. Este método tem como desvantagens a polimerização espontânea do glutaraldeído em meio aquoso, podendo acarretar numa perda de grupos aldeídos para interação com as enzimas.

Monsan (1978), demonstrou que é relativamente simples a ativação de suportes através do método do glutaraldeído, sugerindo que, ao se controlar as condições de funcionalização, seria possível a obtenção de uma ou duas moléculas (monômero ou dímero) de glutaraldeído por grupo amino primário. No método do glutaraldeído, o grupo cetona presente na superfície do carvão ativado se liga ao grupo amina, presente na etilenodiamina, formando o carvão ativado com superfície aminada. Em seguida o carvão aminado é ativado com glutaraldeído para introdução dos grupos aldeído na superfície da matriz, sendo o responsável pela interação com os grupamentos amina das moléculas, conforme demonstrado na Figura 8 (RAMANI et al., 2012).

**Figura 8.** Representação esquemática da funcionalização superficial do carvão ativado (CA) pelo método do glutaraldeído para obtenção do carvão funcionalizado (CF).



Fonte: Adaptado de Ramani et al. (2012).

### 3. OBJETIVO GERAL

Estudar a influência das características químicas de diferentes fontes precursoras de carbono (resíduos agroindustriais) nas propriedades físico-químicas dos carvões ativados.

#### 3.1. Objetivos Específicos

- Quantificar o teor de lignina e celulose dos resíduos agroindústrias selecionadas;
- Verificar como a relação entre os teores de celulose/lignina de diferentes materiais precursores irão influenciar nas características dos carvões obtidos, através da utilização de métodos estatísticos multivariados;
- Caracterização morfológica e físico química dos carvões;
- Selecionar uma das amostras de carvões ativados obtidas e utilizá-la como suporte para imobilização da pepsina por adsorção;
- Funcionalizar a superfície do carvão ativado selecionado e utilizá-lo como suporte para imobilização da pepsina por ligação covalente;
- Avaliar a atividade da enzima na forma livre, imobilizada por adsorção e imobilizada por ligação covalente na hidrólise da caseína bovina.

### 4. REFERÊNCIAS

ABDEL-RAOUF, N., AL-HOMAIDAN, A. A., & IBRAHEEM, I. B. M. Microalgae and wastewater treatment. **Saudi Journal of Biological Sciences**. V. 19, 3<sup>ed</sup>, p. 257–275, 2012.

ABIOYE, A. M. and ANI, F. N. Recent development in the production of activated carbon electrodes from agricultural waste biomass for supercapacitors: A review, **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. V. 52, P. 1282–1293. 2015.

ABECHI, S.E., GIMBA, C.E., UZAIRU, A., DALLATU, Y.A., Preparation and Characterization of Activated Carbon from Palm Kernel Shell By Chemical Activation. **Research Journal of Chemical Sciences**; v. 3; p. 54–61; 2013.

AHMAD, A. L., LOH, M. M., & AZIZ, J. A. Preparation And Characterization Of Activated Carbon From Oil Palm Wood And Its Evaluation On Methylene Blue Adsorption, **Dyes and Pigments** v. 75, 2007.

AHMED, M. J. Preparation of activated carbons from date (*Phoenix dactylifera L.*) palm stones and application for wastewater treatments: Review. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 102, p. 168–182, 2016.

ALTUN, G.D.; CETINUS, S.A. Immobilization of pepsin on chitosan beads. **Food Chemistry**, v.100, p.964-971, 2007.

- ANISUZZAMAN, S. M., JOSEPH, C. G., KRISHNAIAH, D., & TAY, V. V. Modification of Commercial Activated Carbon For The Removal of 2,4-Dichlorophenol From Simulated Wastewater. **Journal of King Saud University - Science**, v. 27, ed. 4, p.318–330, 2015.
- ARAÚJO, J.D.P.; GRANDE, C.A.; RODRIGUES, A.E. Vanillin production from lignin oxidation in a batch reactor. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 88, n. 8, p. 1024-1032, 2010.
- BANSAL, R.P., and GOYA, M., Activated Carbon Adsorption. **CRC Press**. Taylor & Francis Group, 2005.
- BANSAL, R.P., and GOYA, M., Activated Carbon Adsorption. **CRC Press**. Taylor & Francis Group, 2005.
- BOERJAN, W.; RALPH, J.; BAUCHER, M. Lignin Biosynthesis. **Annual Review of Plant Biology**, v. 54, p. 519-546, 2003.
- BRITO, M.J.P., VELOSO, C.M., BONOMO, R.C.F., FONTAN, R. DA C.I., SANTOS, L.S. and MONTEIRO, K.A. Activated carbons preparation from yellow mombin fruit stones for lipase immobilization, **Fuel Processing Technology**. V. 156, P. 421–428, 2017.
- BRETHAUER S., STUDER M.H. Biochemical conversion processes of lignocellulosic biomass to fuels and chemicals – a review. **Chimia**; v. 69, p. 572–81, 2015.
- BORBA, C.E. Modelagem da remoção de metais pesados em coluna de adsorção de leito fixo. Campinas. **Dissertação Mestrado. Faculdade de Engenharia Química**, Universidade Estadual de Campinas, 145p, 2006.
- CAGNON, B.; P. Y, X.;GUILLOT, A.;STOECKLI, F.; CHAMBAT, G. Contributions of hemicellulose, cellulose and lignin to the mass and the porous properties of chars and steam activated carbons from various lignocellulosic precursors. **Bioresour Technol**, v.100, p.292–298, 2009.
- CAI, J., HE, Y., YU, X., BANKS, S. W., YANG, Y., ZHANG, X., YU, Y., LIU, R. AND BRIDGWATER, A. V. Review of physicochemical properties and analytical characterization of lignocellulosic biomass, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, V. 76, P. 309–322, 2017.
- CAO, L. Immobilised enzymes: science or art? *Current Opinion in Chemical Biology*. 9: 217–226 p. 2005.
- CARDOSO, C.L.; MORAES, M.C.; CASS, Q.B. Imobilização de enzimas em suportes cromatográficos: uma ferramenta na busca por substâncias bioativas. **Química Nova**, v. 32(1), p. 175-187, 2009.
- CARVALHO, W.; CANILHA, L.; SILVA, S.S. Uso de biocatalisadores imobilizados: uma alternativa para a condução de bioprocessos. **Revista Analytica**, v. 23, p. 60-70, 2006.

- CHEN, Y.-D., CHEN, W.-Q., HUANG, B., HUANG, M.-J. Process optimization of K<sub>2</sub>C<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-activated carbon from kenafcore using Box–Behnken design. **Chem. Eng. Res. Des.** v. 91, p. 1783–1789, 2013.
- CUHADAROGLU, D., UYGUN, O. A. Production and Characterization of Activated Carbon From a Bituminous Coal by Chemical Activation. **African Journal of Biotechnology.** v. 7, ed. 20, p. 3703-3710, 2008.
- DAUD, W.M.A.W., ALI, W.S.W. Comparison on pore development of activated carbon produced from palm shell and coconut shell, **Bioresour. Technol.**, v. 93, p. 63–69, 2004.
- DAUD, W.M.A.W., ALI, W.S.W., SULAIMAN, M.Z. The Effects Of Carbonization Temperature On Pore Development In Palm-Shell-Based Activated Carbon. **Carbon** v. 38, p. 1925–1932, 2001.
- DAUD, Z., KASSIM, A.S.M., ARIPIN, A.M., AWANG, H., HATTA, M. Z. M. Chemical composition and morphological of cocoa pod husks and cassava peels for pulp and paper production. **Aust. J. Basic. Appl. Sci.**;V. 7, P. 406–11, 2013.
- DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. G.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, v.27, p.623-630, 2004.
- DHYANI, V., BHASKAR, T. A comprehensive review on the pyrolysis of lignocellulosic biomass, **Renewable Energy**, 2017.
- DI BERNARDO, L. **Métodos e técnicas de tratamento de água** - 2 V. ABES, 1566 p. 2 ed, 2005.
- DODEVSKI, V., JANKOVIĆ, B., STOJMENOVIĆ, M., KRSTIĆ, S., POPOVIĆ, J., PAGNACCO, M., POPOVIĆ, M., PAŠALIĆ, S. Plane tree seed biomass used for preparation of activated carbons (AC) derived from pyrolysis. Modeling the activation process. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, vol. 522, pp. 83-96, 2017.
- DOHERTY, W. O. S.; MOUSAVIOUN, P.; FELLOWS, C. M. Value-adding to cellulosic ethanol: lignin polymers. **Industrial Crops and Products**, v.33, p. 259-276, 2011.
- DUTTA, S., BHATTACHARYYA, A., DE, P., RAY, P., & BASU, S. Removal of Mercury From its Aqueous Solution Using Charcoal-Immobilized Papain (CIP). **Journal of Hazardous Materials**, v. 172, p. 888–896, 2009.
- DRAGONE, S.I.M. Aproveitamento Integral De Subproduto Da Indústria Cervejeira em Processos Químicos e Biotecnológicos. Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial) – Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, 2007.
- FARIAS, M.A.; FARINA, M.Z.; PEZZIN, A.P.T.; SILVA, D.A.K. Unsaturated Polyester Composites Reinforced With Fiber And Power Of Peach Palm: Mechanical Characterization

And Water Absorption Profile. **Materials Science & Engineering. C: Biomimetic Materials, Sensors and Systems**, v. 29, p. 510-513, 2009.

FERREIRA, D.F. **Estatística multivariada**. Lavras: Editora UFLA, 675p. 2011.

FIERRO, V., TORNÉ-FERNÁNDEZ, V., CELZARD, A. Kraft Lignin as a Precursor For Microporous Activated Carbons Prepared by Impregnation With Ortho- Phosphoric Acid: synthesis and textural characterisation. **Microporous and Mesoporous Materials**. v. 92, p. 243–250. 2006.

FUJISHIGE, M., YOSHIDA, I., TOYA, Y., BANBA, Y., OSHIDA, K., TANAKA, Y., DULYASEREE, P., WONGWIRIYAPAN, W., AND TAKEUCHI, K. Preparation of Activated Carbon from Bamboo-Cellulose Fiber and Its Use for EDLC Electrode Material. **Biochemical Pharmacology**. v. 5, n. 2, p. 1801-1808, 2017.

GHATTASA, N.; FILICEB, M.; ABIDIA, F.; GUISANB, J.M.; SALAH, A.B. Purification and improvement of the functional properties of *Rhizopusoryzae* lipase using immobilization techniques. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.110, p.111–116, 2014.

GERÇEL, Ö., ÖZCAN, A., ÖZCAN, A.S., GERÇEL, H.F. Preparation of activated carbon from a renewable bio-plant of *Euphorbia rigida* by H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> activation and its adsorption behavior in aqueous solutions. **Appl. Surf. Sci.** v. 253, p. 4843–4852, 2007.

GOUVEA, B. M.; TORRES, C.; FRANCA, A. S.; OLIVEIRA, L. S.; OLIVEIRA, E. S. Feasibility of ethanol production from coffee husks. **Biotechnology Letters**, v. 31, p. 1315, 2009.

GOYAL H., SEAL D., SAXENA R. Bio-fuels from thermochemical conversion of renewable resources: a review. **Renew Sustain Energy Rev**; v. 12, p. 504–17, 2008.

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

HADI, P., XU, M., NING, C., SZE KI LIN, C., & MCKAY, G. (2015). A critical review on preparation, characterization and utilization of sludge-derived activated carbons for wastewater treatment. **Chemical Engineering Journal**, v. 260, p. 895–906, 2015.

HAIR JR, J. F.; BLACK, W. C.; BABIN, B. J.; ANDERSON, R. E. **Multivariate Data Analysis**. 7.ed. Pearson Prentice Hall, 2010.

HANEFELD, U.; GARDOSI, L.; MAGNER, E. Understanding enzyme immobilisation. **Chemical Society Reviews**, v. 38, n. 2, p. 453-468, 2009.

HENNING, K.-D. and VON KIENLE, H. Carbon, 5. Activated Carbon. **Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry**. 2010.

- HAIMOUR, N. M. and EMEISH, S., Utilization of date stones for production of activated carbon using phosphoric acid. **Waste Manage**, v. 26, p. 651–660, 2006.
- HARMSSEN, P.F.H., HUIJGEN, W., BERMUDEZ, L., BAKKER, R. Literature Review of Physical and Chemical Pretreatment Processes for Lignocellulosic Biomass, **Wageningen UR Food & Biobased Research**, 2010.
- HE, X., LING, P., QIU, J., YU, M., ZHANG, X., YU, C. Efficient Preparation of Biomass-Based Mesoporous Carbons for Supercapacitors With Both High Energy Density and High Power Density. **Journal of Power Sources**. v. 240; p. 109-113, 2013.
- ISMANTO, A.E., WANG, S., SOETAREDJO, F.E., ISMADJI S. Preparation of Capacitor's Electrode From Cassava Peel Waste. **Bioresource Technology**. v.101, p. 3534–40, 2010.
- ISPAS, C.; SOKOLOV, I.; ANDREESCU, S. Enzyme-functionalized mesoporous silica for bioanalytical applications. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 393, n. 2, p. 543-554, Jan 2009.
- IUPAC: União Internacional de Química Pura e Aplicada. **Reporting Physisoption data for gás/solid systems**. v.54, p. 2201-2218, 1982.
- JAGTOYEN, M., DERBYSHIRE, F. Activated Carbons From Yellow Poplar and White Oak by H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> Activation. **Carbon** v. 36, p. 1085–1097, 1998.
- JULIEN, F., BAUDU, M., ans MAZET, M. Relationship between chemical and physical surface properties of activated carbon. **Water Res.**, v. 32, ed. 11, p. 3414–3424, 1998.
- JEGANNATHAN, K.R., NIELSEN, P.H. Environmental assessment of enzyme use in industrial production e a literature review. **J. Clean. Prod.** V. 42, pg. 228 a 240, 2013
- JENKINS, B. M. Fuel Properties for Biomass Materials. In: *International Symposium on Application and Management of Energy in Agriculture: The Role of Biomass Fuels*. May, Delhi, India, p. 21-23, 1990.
- KAN, Y., YUE, Q., LI, D., WU, Y., & GAO, B. Preparation and characterization of activated carbons from waste tea by H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> activation in different atmospheres for oxytetracycline removal. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 71, p. 494–500, 2017.
- KANDASAMYA, R.; KENNEDYB, L.J.; VIDYAA, C.; BOOPATHYA, R.; SEKARANA, G. Immobilization of acidic lipase derived from *Pseudomonas gessardii* onto mesoporous activated carbon for the hydrolysis of olive oil. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.62, p.59–66, 2010.
- KARRA-CHAABOUNIA, M.; BOUAZIZB, I.; BOUFIB, S.; REGOC, A.M.B.; GARGOURI, Y. Physical immobilization of *Rhizopus oryzae* lipase onto cellulose substrate: Activity and stability studies. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.66, p.168–177, 2008.

- KATO, K.; NAKAGAKI, S.; NISHIDA, M.; HIRAO, K. Enzyme encapsulation in silica particles prepared using enzyme-assisted sol-gel reactions in ionic liquids. **J. Ceram. Soc.**, v.119, p.140, 2011.
- KHEZAMI, L.; CHETOUANI, A.; TAOUK, B.; CAPART, R. Production and characterization of activated carbon from wood components in powder: cellulose, lignin, xylan. *Powder Technology*, Lausanne, v. 157, n. 1/3, p. 48-56, 2005.
- KHOABI, M.; MOTEVALIZADEH, S.F.; ASADGOL, Z.; FOROOTANFAR, H.; SHAFIEE, H.; FARAMARZI, M.A. Synthesis of functionalized polyethylenimine-grafted mesoporous silica spheres and the effect of side arms on lipase immobilization and application. **Biochemical Engineering Journal**, v.88, p.131–141, 2014.
- KIRK, T.K.; FARELL, R.L. Enzymatic ‘combustion’: the microbial degradation of lignin. **Annual Review of Microbiology**, v. 41, p. 465-505, 1987.
- LAM P. S., SOKHANSANJ S. Engineering properties of biomass. In: shastri y, Hansen A, rodríguez l, ting kc, editors. **Engineering and science of biomass feedstock production and provision**. New York, NY, p. 17–35, 2014.
- LAUFENBERG, G. Transformation of vegetable waste into added products: (A) the upgrading concept; (B) practical implementations. **Bioresource Technology**, v.87, p.167-198, 2003.
- LIU, L., LIN, Y., LIU, Y., ZHU, H., HE, Q. Removal of methylene blue from aqueous solutions by sewage sludge based granular activated carbon: adsorption equilibrium, kinetics, and thermodynamics. **Journal of Chemical & Engineering Data**, v.58, p.2248–2253, 2013.
- MACEDO, J. S.; OTUBO, L.; FERREIRA, O. P.; GIMENEZ, F. I.; MAZALI, I. O.; BARRETO, L. S. Biomorphic ativado carbonos porosos com microestruturas complexas a partir de resíduos lignocelulósicos. **Microporosa Mesoporous Mater**, v. 107, p.276-285, 2008.
- MAHAMAD, M.N.; ZAINI, M.A.A.; ZAKARIA, Z.A. Preparation and characterization of activated carbon from pineapple waste biomass for dye removal. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.102, p.274-280, 2015.
- MARSH, H. and RODRIGUEZ-REINOSO, F., *Activated Carbon*, **Elsevier Science & Technology**, London, 2006.
- MASOUD, M.S.; EL-SARAF, W.M.; ABDEL - HALIM, A.M.; ALI,A.E.; MOHAMED, E.A.; HASAN, H.M.I. Rice husk and activated carbon for waste water treatment of El-Mex Bay, Alexandria Coast, Egypt. **Arabian Journal of Chemistry**, 2012.
- MATEO, C.; PALOMO, J.M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUISAN, J.M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology**, v.40, p.1451-1463, 2007.

- MELLO, K. G. P. C.; BERNUSSO, L. C.; PITOMBO, R. N. M.; POLAKIEWICZ, B. Synthesis and Physicochemical Characterization of Chemically Modified Chitosan by Succinic Anhydride. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 49, n.1, p. 665-667, 2006.
- MENDES, A. A.; OLIVEIRA, P. C. de; CASTRO, H. F. de; GIORDANO, R. de L. C.. Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. **Química Nova** [online]. vol.34, n.5, pp.831-840. 2011.
- MINGOTI, S. A. **Análise de dados através de métodos de estatística multivariada: uma abordagem aplicada**. Belo Horizonte: Editora UFMG, 297p. 2005.
- MENONCIN, S., DOMINGUES, N. M., FREIRE, D. M. G., OLIVEIRA, J. V., DI LUCCIO, M., TREICHEL, H. AND OLIVEIRA, D. Imobilização de lipases produzidas por fermentação em estado sólido utilizando *Penicillium verrucosum* em suportes hidrofóbicos, **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, ed. 2, p. 440–443, 2009.
- MOHAN D., PITTMAN C. U., STEELE P. H., Pyrolysis of wood/biomass for bio-oil: a critical review, **Energy & Fuels**. V. 20, P. 848-889, 2006.
- MOHD DIN, A.T., HAMEED, B.H., AHMAD, A.L. Batch Adsorption of Phenol Onto Physiochemical-Activated Coconut Shell. **Journal of Hazardous Materials**. v. 161, p. 1522–1529. 2009.
- MOITA, J.M, Neto. **Estatística multivariada: Uma visão didática-metodológica**, 2004.
- MONSAN P. Optimization of glutaraldehyde activation of a support for enzyme immobilization. **J Mol Catal**.v 3:pg. 371–84, 1978.
- MOTEVALIZADEH, S.F.; KHOOBI, M.; SADIGHI, A.; KHALILVAND-SEDAGHEH, M.; PAZHOUHANDEH, M.; RAMAZANI A.; FARAMARZI, M.A.; SHAFIEE, A. Lipase immobilization onto polyethylenimine coated magnetic nanoparticles assisted by divalent metal chelated ions. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.120, p.75–83, 2015.
- MUBARAK, N. M.; WONG, J. R.; TAN, K. W.; SAHU, J. N.; ABDULLAH, C. E.; JAYAKUMAR, N. S.; GANESAN, P. Immobilization of cellulase enzyme on functionalized multiwall carbon nanotubes **Journal of Molecular Catalysis B: Enzimatic**, v.107, p.124-131, 2014.
- NABAISA, J.M.V.; LAGINHAS, C.; CARROTT, M.M.L.R.; CARROTT, P.J.M.; AMOROS, J.E.C.; GISBERT, A.V.N. Surface and porous characterization of activated carbons made from a novel biomass precursor, the esparto grass. **Appl. Surf. Sci.**, v.265, p.919-924, 2013.
- OLIVEIRA, F. C.; GONCALVES, A. R. Evaluation of Oxidized Lignin from Coffee Husk on the Obtainment of Added-Value Low-Molecular Weight Compounds. In: *XXXIV International Conference on Energy, Biomass and Waste Engineering (ICEBWE 2013)*, 2013, Paris. World Academy of Science, Engineering and Technology, v.76. p. 2776-2781, 2013.

- OLIVEIRA, F. de C. Oxidação de lignina proveniente de resíduos lignocelulósicos agroindustriais para obtenção de compostos químicos aromáticos de maior valor agregado. Tese de Doutorado em Ciências. Escola de Engenharia de Lorena, USP, SP 2015.
- OKMAN, I.; KARAGÖZ, S.; TAY, T.; ERDEM, M. Activated Carbons From Grape Seeds By Chemical Activation With Potassium Carbonate And Potassium Hydroxide. **Applied Surface Science**, v.293, p.138–142, 2014.
- PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; BRAND, D.; MOHAN, R.; ROUSSOS, R. Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husk for bioprocesses. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 6, n. 2, p. 153-162, 2000.
- PEREIRA, J.C. **Análise de dados qualitativos: estratégias metodológicas para as ciências da saúde, humanas e sociais**. 2 ed. São Paulo, 156 p. 1999.
- PEREIRA, E.; OLIVEIRA, L. C. A.; VALLONE, A.; SAPAG, K.; PEREIRA, M. Preparação de carvão ativado em baixas temperaturas de carbonização a partir de rejeitos de café: utilização de FeCl<sub>3</sub> como agente ativante. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 6, p. 1296-1300, 2008.
- PEREIRA, R. G., VELOSO, C. M., DA SILVA, N. M., DE SOUSA, L. F., BONOMO, R. C. F., DE SOUZA, A. O., DA GUARDA, M. O & FONTAN, R. D. C. I. Preparation of activated carbons from cocoa shells and siriguela seeds using H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> and ZnCl<sub>2</sub> as activating agents for BSA and  $\alpha$ -lactalbumin adsorption. **Fuel Processing Technology**, 126, 476-486. 2014.
- PRADO, R. G.; Produção de carvão ativado a partir do resíduo de candeia – *Eremanthus erythropappus*: uso como suporte do catalisador H<sub>3</sub>PMo<sub>12</sub>O<sub>40</sub> em reações de esterificação. 117 p. Dissertação (mestrado) – Lavras, UFLA 2010.
- RAMANI, K.; KARTHIKEYAN, S.; BOOPATHY, R.; KENNEDY, L.; MANDAL, A.B.; SEKARAN, G. Mesoporous activated carbon surface functionalized for the immobilization of lipase and its application acidic hydrolysis waste oil prepared: Isotherm and kinetic studies. **Process Biochemistry**, v.47, p.435-445, 2012.
- RAMOS, P.H., GUERREIRO, M.C., RESENDE, E.C., GONÇALVES, M. Production and characterization of activated carbon prepared from PVA defect coffee. **Química Nova**. v. 32, p. 1139–1143, 2009.
- ROCHA, M. S. R. S.; ALMEIDA, R. M. R. G.; CRUZ, A. J. G. Avaliação do potencial energético de resíduos agroindustriais provenientes de diferentes regiões brasileiras. **Engevista (UFF)**, v. 19, p. 217-235, 2017.
- RODRIGUÉZ-REINOSO. F.; SABIO. M. M.; El carbón activado como adsorbente em descontaminacion ambiental. Laboratorio de Materiales Avanzados, Departamento de Química Inorgánica, Universidade de Alicante, España, 2004. In: Rodríguez-Reinoso, F. **Adsorbentes**

**en la solución de algunos problemas ambientales.** Edições CYTED. Madrid, España, p. 37-52. 2004.

SAHU, J.N., ACHARYA, J., MEIKAP, B.C. Optimization Of Production Conditions For Activated Carbons From Tamarind Wood by Zinc Chloride Using Response Surface Methodology. **Bioresource Technology.** v.101, p. 1974-1982, 2010.

SAIDUR, R., ABDELAZIZ, E.A., DEMIRBAS, A., HOSSAIN, M.S., MEKHILEF, S. A review on biomass as a fuel for boilers. **Renewable Sustainable Energy Rev.,** v.15, p.2262–89, 2011.

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

SANTOS, J. C. S. D., BARBOSA, O., ORTIZ, C., BERENQUER-MURCIA, A., RODRIGUES, R. C. AND FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Importance of the Support Properties for Immobilization or Purification of Enzymes. **ChemCatChem,** v. 7: p. 2413–2432, 2015.

SCHNEIDER, V. E., PERESIN, D., TRENTIN, A. C., BORTOLIN, T. A. AND SAMBUICHI, R. H. R. Diagnóstico dos Resíduos Orgânicos do Setor Agrossilvopastoril e Agroindústrias Associadas, Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada – IPEA, p. 134, 2012.

SHLESER, R. Ethanol Production in Hawaii: Processes, Feedstocks, and Current Economic Feasibility of Fuel Grade Ethanol Production in Hawaii. Hawaii State Department of Business, Economic Development & Tourism 1994. Disponível em: <http://www.hawaii.gov> Acessado em março 2016.

SI, W.J., WU, X.Z., XING, W., ZHOU, J., ZHUO, S.P. Bagasse-Based Nanoporous Carbono for Super Capacitor Application. **Journal of Inorganic Materials.** v. 26, p. 107-112, 2011.

SILVA, V. D. M. DE MARCO, L. M.; DELVIVO, F. M. AGUIAR, M. Jb; COELHO, J.V.; SILVESTRE, M.P.C. Emprego da pancreatina imobilizada no preparo de hidrolisados de soro de leite com teor reduzido de fenilalanina. **Alimentos&Nutrição.,** v. 16, n.1, p. 21-31, 2005.

SOARES, R. D. L.; SILVA, V. D. M.; LOPES, D. C. F.; JUNQUEIRA, R. G.; FIGUEIREDO, A. F. S.; SILVESTRE, M. P. C.; Formulações dietéticas para fenilcetonúria à base de hidrolisados enzimáticos de leite em pó desnatado. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences,** Campinas, vol. 40, n. 3, jul./set., p 353-362, 2004.

SMITH, M. W., PECHA, B., HELMS, G., SCUDIERO, L., and GARCIA-PEREZ, M. Chemical and morphological evaluation of chars produced from primary biomass constituents: Cellulose, xylan, and lignin. **Biomass and Bioenergy,** v. 104, p. 17–35, 2017.

- SPADOTTO, C.; RIBEIRO, W. *Gestão de resíduos na agricultura e agroindústria*. São Paulo: FEFAP, 2006.
- TSYNTSARSKI, B., STOYCHEVA, I., TSONCHEVA, T., GENOVA, I., DIMITROV, M., PETROVA, B., PETROV, N. Activated carbons from waste biomass and low rank coals as catalyst supports for hydrogen production by methanol decomposition. **Fuel Processing Technology**, v. 137, p. 139–147, 2015.
- VAINIONPAA, J.; KERVINEN, R.; DE PRADO, M.; LAURILA, E.; KARI, M.; MUSTONEN, L.; AHVANEAINEN, R. Exploration of storage and process tolerance of different potato cultivars using principal component and canonical correlation analyses. **Journal Food Engineering**, v. 44, p. 47-61, 2000.
- VOET, D., VOET, J. *Biochemistry*. 4th ed. Hoboken, NJ: John Wiley and Sons; p. 134, 2011.
- WANG, Z. M.; KANO, H.; KANEKO, K.; LU, G. Q.; DO, D. Structural and surface property changes of macadamia nut-shell char upon activation and high temperature treatment, **Carbon**. v.40, p.1231-1239, 2001.
- YAHYA, M. A., AL-QODAH, Z., & NGAH, C. W. Z. Agricultural bio-waste materials as potential sustainable precursors used for activated carbon production: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 46, p. 218–235, 2015.
- YANG, K., PENG, J., SRINIVASAKANNAN, C., ZHANG, L., XIA, H., DUAN, X. Preparation of high surface area activated carbon from coconut shells using microwave heating. **Bioresour. Technol.** v.101, p.6163–6169, 2010.
- YANG, J.; QIU, K. Development of high surface area mesoporous activated carbons from herb residues, **Chemical Engineering Journal**, v.167, p.148-154, 2011.
- ZANELLA, O.; TESSARO, I. C.; FERIS, L. A. Desorption and Decomposition Based Techniques for the Regeneration Of Activated Carbon - A Review. **Chemical Engineering & Technology**, v. 37, p. 1447-1459, 2014.
- ZUBRIK, A., MATIK, M., HREDZÁK, S., LOVÁS, M., DANKOVÁ, Z., KOVÁČOVÁ, M., & BRIANČIN, J. Preparation of chemically activated carbon from waste biomass by single-stage and two-stage pyrolysis. **Journal of Cleaner Production**, v. 143, p. 643–653, 2016.

## **CAPÍTULO 2**

---

### **ARTIGO**

**Avaliação das características do material precursor nas propriedades do carvão ativado utilizando Análise de Componentes Principais e Correlações Canônicas**

---

## RESUMO

Os resíduos agroindustriais são precursores de carbono que vem sendo utilizados na produção de carvões ativados devido ao seu baixo custo, além de serem provenientes de fontes renováveis e serem ricos em materiais lignocelulósicos, que são de fundamental importância para a produção de carvões ativados. Estes materiais por apresentarem altos teores de lignina e celulose possuem elevado conteúdo carbono, favorável para a síntese de carvão ativado. Variações nos teores destes constituintes influenciam nas propriedades dos carvões ativados obtidos. Desta forma, tem-se a necessidade de estudos mais aprofundados sobre como a variação dos compostos lignocelulósicos podem influenciar nas propriedades dos carvões ativados. Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo a caracterização físico-química de diferentes materiais precursores e dos carvões ativados, e a partir dos dados gerados empregar as análises multivariada para obter relações entre as principais características dos materiais precursores e dos carvões ativados. Na síntese dos carvões ativados os materiais precursores foram submetidos a ativação química com ácido fosfórico ( $H_3PO_4$ ). Após as caracterizações dos materiais precursores (lignina, celulose, hemicelulose, cinzas e FTIR) e seus respectivos carvões ativados (rendimento,  $pH_{PCZ}$ , área superficial específica, volume e diâmetros de poros e FTIR), fez-se as análises estatística multivariada de componentes principais (ACP) e de correlações canônicas (ACC). A partir dos resultados obtidos, pode-se agrupar os materiais precursores e os carvões ativados com características similares. Observou-se com os resultados de ACP e ACC que diferenças na composição do precursor influenciam nas propriedades dos carvões obtidos. Materiais com relação celulose/lignina  $> 3,0$ , levaram a produção de carvões com maiores diâmetros de poros e área superficial, enquanto que materiais com relação  $\leq 1,0$ , levaram a rendimentos do processo de síntese elevados e carvões com baixo volume de poros. Logo, a partir das análises ACP e ACC foi possível comprovar que as características dos materiais lignocelulósicos apresentam relação com as propriedades dos carvões ativados, sendo possível prever as características dos carvões com apenas os dados de composição dos constituintes lignocelulósicos.

**Palavras-chave:** Análise estatística multivariada; Caracterização Físico-química; Resíduos Lignocelulósicos;

## ABSTRACT

The agroindustrial residues are precursors of carbon that are being used in the production of activated carbons due to their low cost, besides being derived from renewable sources and rich in lignocellulosic materials, which are of fundamental importance for the production of active carbons. These materials due to the high contents of lignin and cellulose have high carbon content, favorable for the synthesis of activated carbon. Variations in the contents of these constituents influence the properties of the activated carbons obtained. Therefore, it is necessary to study in more depth how the variation of the lignocellulosic compounds can influence the properties of the activated carbon. In view of the above, this work had the objective the physical-chemical characterization of different precursor materials and activated carbons, and from the data generated use the multivariate analysis to obtain relations between the main characteristics of the precursor materials and the activated carbons. In the synthesis of the activated carbons the precursor materials were subjected to chemical activation with phosphoric acid ( $H_3PO_4$ ). After characterization of the precursor materials (lignin, cellulose, hemicellulose, ash and FTIR) and their respective activated carbons (yield,  $pH_{PCZ}$ , specific surface area, volume and pore diameters and FTIR), multivariate statistical of principal component analysis (PCA) and canonical correlations (CCA). From the results obtained, one can group the precursor materials and activated carbons with similar characteristics. It was observed with the

results of PCA and CCA that differences in the composition of the precursor influence the properties of the obtained carbons. Materials with cellulose / lignin ratio  $> 3.0$ , led to the production of carbons with higher pore diameters and surface area, while materials with  $\leq 1.0$  ratio, led to high synthesis process yields and low volume of pores. Therefore, it was possible to verify that the characteristics of the lignocellulosic materials are related to the properties of the activated carbons, and it is possible to predict the carbon characteristics with only the composition data of the lignocellulosic constituents.

**Keywords:** Multivariate statistical analysis; Physical-chemical characterization; Lignocellulosic Residues;

## 1. INTRODUÇÃO

O carvão ativado é um material com volume de poros e área superficial elevados, apresentando também alta estabilidade química e vários grupos funcionais superficiais, sendo este constituído em mais de 90% de carbono (LIOU, 2010). Devido à estas características este material é considerado um adsorvente muito versátil, tendo aplicação em diversas áreas, como no tratamento de efluentes (KONG et al., 2013), adsorção de biomoléculas (PEREIRA et al., 2014), como suporte catalítico (GIRALDO e MORENO-PIRAJÁN, 2012) e em processos de purificação e separação de biomoléculas (HU, LU e MEISNER, 2008), entre outros.

Segundo Prahas et al. (2008), os carvões ativados podem ser sintetizados a partir de quaisquer precursores, desde que os mesmos tenham alto teor de carbono e baixo teor de compostos inorgânicos, sendo estas as características de vários resíduos agrícolas. Os resíduos agrícolas são materiais lignocelulósicos constituídos por três principais frações poliméricas: celulose, lignina e hemicelulose, que são unidas entre si por ligações covalentes, formando uma rede complexa, sendo responsáveis pelo elevado teor de carbono destes materiais (SMITH et al., 2017). Além desta característica estes resíduos são considerados matérias primas de baixo custo e renováveis (DJILANI et al., 2015).

De acordo com Jain e Tripathi (2014) os constituintes dos materiais lignocelulósicos têm influência nas propriedades dos carvões, pois cada um deles apresenta comportamento diferente durante as etapas de ativação e pirólise. Dentre estes componentes a hemicelulose é o primeiro composto a ser degradado, tendo suas ligações quebradas em temperaturas variando de 200 °C-280 °C, posteriormente a celulose é degradada, de modo que sua quebra ocorre na faixa de temperatura de 260 °C-350 °C, e pôr fim, tem-se a lignina, que tem a maior resistência à degradação térmica dos três componentes principais, sendo quebrada a temperaturas de 280 °C-500 °C. Devido a este comportamento faz-se necessário a realização de estudos mais aprofundados sobre o efeito da composição de diferentes materiais precursores nas propriedades físico-químicas dos carvões ativados.

Os estudos realizados até o presente momento levam em consideração a avaliação ou correlação entre um único componente do material precursor com uma propriedade do carvão produzido. Entretanto, as propriedades do carvão são resultado conjunto de sua composição e entender como estas variáveis estão relacionadas, assim como, determinar se há um componente e qual componente (hemicelulose, celulose ou lignina) é o principal responsável pelas propriedades de interesse do carvão como diâmetro de poros, área superficial e volume de poros. Nesse sentido, a utilização de técnicas multivariadas como a Análise de Componentes Principais (ACP) e a de Correlação Canônica (ACC) pode ter muita utilidade.

A Análise de Componentes Principais é uma das técnicas multivariadas mais importantes e utilizadas, já que ela tem como principal característica a transformação do conjunto original de variáveis em outro, os componentes principais (CP), por meio das combinações lineares das variáveis originais. Dessa forma, a partir da análise de componentes principais, ocorre a redução da dimensionalidade, descarte de variáveis redundantes e o agrupamento de amostras similares, mediante exames visuais em dispersões gráficas, utilizando o espaço bi ou tridimensional, de fácil interpretação. Já a análise de correlações canônicas é uma técnica exploratória que tem como objetivo principal o estudo das relações lineares existentes entre dois conjuntos de variáveis, que no caso específico a que esse trabalho se propõe, representa as variáveis associadas à composição dos materiais precursores e outro conjunto, as propriedades dos carvões produzidos a partir desses mesmos materiais (PEREIRA e PEREIRA, 2004).

Levando em consideração a necessidade de expressar claramente a influência dos componentes principais dos materiais lignocelulósicos na síntese de carvão ativado, este trabalho teve como objetivo realizar a caracterização de diferentes materiais precursores utilizados na síntese dos carvões ativados, a síntese dos carvões, a determinação das propriedades dos carvões e a análise dos mesmos utilizando as técnicas de ACP e ACC.

## **2. METODOLOGIA**

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

Neste trabalho foram utilizados reagentes de grau analítico PA-ACS. Para a síntese dos carvões ativados foram utilizados resíduos de agroindústrias como material precursor de carbono.

#### **2.1.1. Materiais precursores**

A escolha dos materiais precursores foi baseada nas diferenças de composição dos resíduos, como o teor de fibras, lignina e celulose, com o objetivo de determinar a influência

da composição destes materiais nas propriedades dos carvões obtidos. Os materiais precursores utilizados estão listados na Tabela 1. Todos os resíduos foram gentilmente doados por agroindústrias da região Sul e Sudoeste da Bahia.

**Tabela 1.** Codificação das amostras de precursores e dos carvões ativados obtidos.

<b>Material Precursor</b>	<b>Código (<i>in natura</i>)</b>	<b>Código (Carvão ativado)</b>
1ª bainha da pupunha	<b>MP-P1</b>	<b>CA-P1</b>
2ª bainha da pupunha	<b>MP-P2</b>	<b>CA-P2</b>
3ª bainha da pupunha	<b>MP-P3</b>	<b>CA-P3</b>
Blend das bainhas de pupunha (1:1:1)	<b>MP-BD</b>	<b>CA-BD</b>
Caroço de umbu	<b>MP-UB</b>	<b>CA-UB</b>
Casca de tamarindo	<b>MP-TM</b>	<b>CA-TM</b>
Bagaço de cana de açúcar	<b>MP-CN</b>	<b>CA-CN</b>
Caroço de tamarindo	<b>MP-CT</b>	<b>CA-CT</b>
Casca de cupuaçu	<b>MP-CP</b>	<b>CA-CP</b>
Casca de café	<b>MP-CF</b>	<b>CA-CF</b>
Caroço de cajá	<b>MP-CJ</b>	<b>CA-CJ</b>
Sabugo de milho	<b>MP-SM</b>	<b>CA-SM</b>
Blend do resíduo da produção de Chopp	<b>MP-CP</b>	<b>CA-CP</b>
Resíduo de malte	<b>MP-MT</b>	<b>CA-MT</b>

## **2.2. Síntese dos carvões ativados**

### **2.2.1. Preparo dos materiais precursores**

Os resíduos foram secos em estufa a 105 °C por 24 h e após este período foram triturados em moinho de faca, peneirados até a granulometria desejada (20 mesh), obtendo desta forma partículas mais homogêneas.

### **2.2.2. Caracterização dos resíduos**

Os materiais precursores utilizados na síntese dos carvões ativados foram caracterizados em relação ao teor de cinzas e umidade através das metodologias 920.03 e 925.45, respectivamente, descritas pela AOAC (1995). Para os teores de lignina, celulose e hemicelulose, utilizou-se a metodologia de fibra detergente neutra e fibra detergente ácida (FDN e FDA) descrita por Van Soest et al (1991).

Os grupos funcionais dos materiais precursores foram avaliados por Espectrofotometria no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR). As amostras avaliadas foram analisadas de forma direta utilizando a técnica de refletância total atenuada (ATR) na região infravermelha de 4000-500  $\text{cm}^{-1}$  em espectrofotômetro Agilent, Cary 360 FTIR.

### 2.2.3. Ativação química com Ácido Fosfórico ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ )

Os carvões ativados foram preparados utilizando a metodologia de ativação química utilizando ácido fosfórico como agente ativante. Os materiais precursores foram impregnados com ácido fosfórico (VETEC 85% P.A.) na razão de impregnação de 1,5:1 (massa de ativante/massa do precursor) e secos em estufa a 105 °C por 48 h. Após este período os mesmos foram carbonizados a 500 °C (taxa de aquecimento de 5°C.min<sup>-1</sup>), sob fluxo de nitrogênio (50 mL.min<sup>-1</sup>) durante 1 h. Após a carbonização os carvões ativos foram lavados com água, à temperatura aproximada de 60°C, até à neutralização. As amostras lavadas foram secas a 105 °C durante 24 h e acondicionadas em embalagens herméticas.

Os carvões obtidos foram codificados de acordo com os precursores utilizados na síntese (Tabela 1).

## 2.3. Determinação do rendimento e caracterização dos carvões obtidos

### 2.3.1. Rendimento no processo de síntese dos carvões

O rendimento do processo de síntese dos carvões foi calculado através da Equação 1.

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

Sendo:  $R_c$  o rendimento em carvão ativado (%),  $m_c$  massa do carvão obtido (g) e  $m_p$  massa do farelo do precursor (g).

### 2.3.2. Caracterização química dos carvões ativados

Os carvões ativados obtidos foram caracterizados com relação ao seu teor de cinzas segundo a metodologia 920.03, proposta pela AOAC (1995).

Os grupos funcionais dos carvões ativados foram avaliados por espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier seguindo a metodologia descrita no item 2.2.2.

O pH do ponto de carga zero ( $\text{pH}_{\text{PCZ}}$ ), que define qual o pH em que a superfície do carvão possui carga neutra, foi determinado pela metodologia denominada “Experimento dos 11 Pontos” (REGALBUTO e ROBLES, 2004). O procedimento consistiu em colocar 50 mg da amostra de cada carvão em contato com 50,0 mL de solução de cloreto de sódio 0,10 mol.L<sup>-1</sup> em diferentes valores de pH (1-11) e deixá-los sobre agitação constante durante 24 h. O pH de cada solução foi ajustado com solução de ácido clorídrico 0,50 mol.L<sup>-1</sup> ou hidróxido de sódio

0,50 mol.L<sup>-1</sup>. Ao final de 24 h o pH foi medido e plotado o gráfico do pH final versus pH inicial. O pH<sub>PCZ</sub> corresponde à faixa onde o pH final se mantém igual pH inicial, ou seja, a superfície comporta-se como um tampão.

### 2.3.3. Medida de porosidade e área superficial específica

As isotermas de adsorção e dessorção dos carvões ativados foram obtidas em um equipamento Micromeritics modelo ASAP 2420, utilizando aproximadamente 0,20 g de amostra. Antes das medidas as amostras foram submetidas a uma etapa de pré-tratamento, que consistiu no aquecimento a 120 °C. Em seguida as amostras foram submetidas a uma evacuação a 30 °C por 30 min, seguida de um aquecimento, com taxa de aquecimento de 10°C.min<sup>-1</sup>, até 200 °C, permanecendo nesta temperatura por 300 min. Posteriormente foram obtidas isotermas de adsorção e dessorção de nitrogênio a 77 K. A área superficial específica foi determinada pela equação de BET (BRUNAUER, 1938). A distribuição de poros foi obtida a partir da isoterma de dessorção utilizando o método BJH (BARRET, 1951), enquanto que o volume dos microporos foi determinado pela análise t-plot a partir da isoterma de adsorção (LIPPENS, 1964).

## 2.4. Análises Estatística Multivariada

### 2.4.1. Análise de Componentes Principais (ACP)

A Análise de Componentes Principais foi dividida em duas etapas: a primeira teve como objetivo verificar a presença de materiais precursores com características similares em termos de composição química dos mesmos e a segundo a similaridade quanto as propriedades dos carvões ativados produzidos.

Na primeira etapa utilizou-se os dados de absorbâncias dos principais picos do FTIR dos materiais precursores e os teores de lignina, celulose e hemicelulose correspondente. Já na segunda etapa foram utilizados os valores obtidos na caracterização textural dos carvões (área superficial, diâmetro de poros, volume de mesoporos e microporos) e os valores de absorbância dos principais picos do FTIR.

A partir destes dados foi obtida as matrizes de variância e covariância (S), a qual foi fatorada numa matriz diagonal, cujos elementos são iguais a  $a_{ii} < \lambda_i$ ,  $i = 1, 2, \dots n$ . A matriz diagonal foi obtida resolvendo a equação característica da matriz S (Equação 2) contendo autovalores com  $\lambda_1 > \lambda_2 > \dots \lambda_n$ .

$$|S - \lambda I| = 0 \quad (2)$$

Onde:  $S$  corresponde à matriz de variância e covariância;  $\lambda_i$ : autovalor e  $I$ : Matriz Identidade. Para cada autovalor ( $\lambda_i$ ) foi determinado um autovetor  $\alpha_i$  a partir da solução da Equação 3.

$$|S - \lambda I| \alpha_i = \emptyset \quad (3)$$

Onde:  $\alpha_i$ : o autovetor e  $\emptyset$ : conjunto vazio ou 0.

Os autovetores obtidos foram normalizados ( $\alpha_i$ ) por meio da Equação 4.

$$\alpha_i = \frac{1}{\sqrt{\alpha_{i1}^2 + \alpha_{i2}^2 + \dots + \alpha_{in}^2}} \begin{bmatrix} \alpha_{i1} \\ \alpha_{i2} \\ \vdots \\ \alpha_{in} \end{bmatrix} = \frac{\alpha_{i*}}{\alpha_i} \quad (4)$$

Onde:  $\alpha_i$ : autovetor normalizado;  $\alpha_{i1}, \alpha_{i2}, \dots, \alpha_{in}$ , autovetores normalizados correspondentes aos grupos estudados;  $\alpha_{i1}, \alpha_{i2}, \dots, \alpha_{in}$ , autovetores não normalizados correspondentes aos grupos estudados.

Tomando-se os elementos do vetor  $\alpha_i$  determinados como os coeficientes  $CP_i$ , o  $i$ -ésimo CP é obtido pela Equação 5.

$$CP_i = \alpha_{i1}z_1 + \alpha_{i2}z_2 + \dots + \alpha_{in}z_n \quad (5)$$

Onde:  $i = 1, 2, \dots, n$ , em que:  $CP_i$ :  $i$ -ésimo componente principal;  $\alpha_{i1}, \alpha_{i2}, \alpha_{in}$  elementos do  $i$ -ésimo autovetor ( $\alpha_i$ ) normalizado, associado ao  $i$ -ésimo autovalor ( $\lambda_i$ ) do  $i$ -ésimo componente principal ( $CP_i$ ).

A escolha do número de componentes principais (CP) foi considerada com base no critério de Kaiser, que mostra a quantidade necessária de componentes principais a partir de autovalores  $> 1$ , e pelo critério dos fatores interpretáveis que considera a soma acumulada dos autovalores  $> 70\%$ , ou seja mostra quais componentes principais que retêm juntos a maior proporção de variância dos atributos originais.

Após a obtenção do número de componentes principais foram plotados gráficos de dispersão dos coeficientes de correlação entre as variáveis e os CP, com o objetivo de verificar a formação de agrupamentos de amostras similares mediante exames visuais. Foram utilizados os programas SAS Studio e Sigma Plot 11.0, para desenvolvimento da ACP e plotagem dos gráficos, respectivamente.

#### 2.4.2. Análise de Correlação Canônica (ACC)

A análise de correlação canônica foi realizada com o intuito de observar as relações lineares entre os vetores das variáveis do material precursor (MP) e do carvão ativado (CA) objetivando avaliar a influência dos teores de lignina, celulose, hemicelulose e relação entre celulose/lignina do material precursor nos valores de área superficial, diâmetro de poros e volume de micro e mesoporos dos carvões ativados.

Uma combinação linear foi desenvolvida em cada um dos pares de variáveis canônicas dos conjuntos de amostras, para que a correlação entre os dois fosse maximizada e, desta forma, considerou-se as combinações lineares do primeiro par como U (material precursor) e V (carvão ativado) expressas por:

$$U_k = a'_k X \quad \text{e} \quad V_k = b'_k Y$$

Tal que o valor da correlação (Equação 6) seja a maior possível, ou seja,  $\max \text{Corr}(U,V)$ , que expressa a máxima associação entre as funções lineares dos dois grupos de variáveis (JOHNSON e WICHERN, 1999).

$$\text{Corr}(U_k, V_k) = \frac{a'_k \Sigma_{xy} b_k}{\sqrt{a'_k \Sigma_{xx} a_k} \sqrt{b'_k \Sigma_{yy} b_k}} \quad (6)$$

Após a obtenção das correlações canônicas foi realizado o teste estatístico F ( $p < 0,10$ ), cuja hipótese de nulidade foi que não há correlação entre os conjuntos de dados para testar a significância dos resultados. Já as cargas canônicas, que se referem às associações entre cada variável original e a correspondente variável canônica, foram obtidas através das correlações estruturais. Foi calculada, ainda, a proporção da variância total que é explicada por cada par de variáveis canônicas e isto permitiu avaliar a relevância deste par no conjunto total dos dados.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Caracterização dos materiais precursores e carvões ativados

A partir dos resultados das análises de caracterização dos teores de lignina, celulose, hemicelulose, da relação entre celulose e lignina e o teor de cinzas dos materiais precursores foi possível chegar aos resultados apresentados na Tabela 2, representando os valores de máximo, mínimo, média e desvio padrão das caracterizações feitas. Observa-se um alto desvio entre as características dos materiais precursores, principalmente em relação a composição de celulose e lignina, pois optou-se por trabalhar com materiais provenientes de diferentes fontes.

**Tabela 2.** Tabela resumo dos resultados da caracterização químicas dos materiais precursores.

Variáveis	Máximo	Mínimo	Média	Desvio
Lignina (%)	33,07	11,06	24,88	7,27
Celulose (%)	52,21	18,83	43,14	7,76
Hemicelulose (%)	19,02	5,18	12,14	3,81
Cel./Lig.	4,24	0,75	1,86	1,09
Cinzas (%)	6,16	1,13	2,80	1,32

Além da determinação da concentração dos componentes lignocelulósicos e cinzas foi realizada a análise dos resultados de FTIR, utilizado o método de identificação direta de grupos funcionais presentes nas superfícies dos materiais, sendo identificados 23 picos de absorção (Tabela 3). Observa-se que os materiais precursores utilizados apresentam diversos grupos funcionais como ésteres, éteres, álcoois, aldeídos, cetonas, fenóis e ácidos carboxílicos. Destaque deve ser dado para as bandas pronunciadas em 3314 e 3303  $\text{cm}^{-1}$ , que podem ser atribuídos ao estiramento das vibrações características do grupo hidroxila (-OH) pertencente à estrutura de celulose, o pico no comprimento de onda 1438  $\text{cm}^{-1}$ , atribuído as vibrações do anel aromático de lignina e o pico pronunciado em 1028  $\text{cm}^{-1}$ , referente ao estiramento C-O da celulose, hemicelulose e lignina, características de materiais lignocelulósicos (BRUM et al., 2008; PEREIRA et al., 2014).

A partir da análise dos resultados obtidos do rendimento e da caracterização físico-química dos carvões ativados foi obtido os valores apresentados na Tabela 4. Observa-se que foi possível obter carvões com diferentes características, apresentado um alto desvio em relação aos valores de área superficial e rendimento, demonstrando que as diferenças na composição dos precursores podem estar relacionadas a diferentes características dos carvões obtidos.

Através da análise dos espectros de FTIR das amostras de carvões ativados foram identificados 14 picos de absorção e seus respectivos grupos funcionais associados a cada pico (Tabela 5). Pode-se observar para os grupos funcionais de superfície que após a ativação dos materiais com  $\text{H}_3\text{PO}_4$  os carvões ativados apresentam a redução de diversos grupos, cujos picos estavam relacionados com os grupos: O-H,  $\text{CH}_3\text{O}$ , C-H, C=O, C-C e C-O, devido a decomposição da matéria orgânica presente nos materiais precursores (KAN et al., 2017). Observa-se também que o processo de síntese foi responsável por provocar essas mudanças na estrutura química nos materiais precursores, de forma que alguns picos de maior intensidade deixaram de existir e novos picos foram identificados, destacando os picos em 1550 e 1560  $\text{cm}^{-1}$ , responsáveis pelas vibrações do esqueleto carbônico, atribuídas ao estiramento simétrico da ligação C=C de anéis aromáticos, típicos de material carbonáceo, e o picos 1190 e 1065  $\text{cm}^{-1}$ , atribuídos aos alongamentos das vibrações P=O, referentes a ativação química com ácido fosfórico (ACEVEDO e BARRIOCANAL, 2015; PRAHAS et al., 2008).

**Tabela 3.** Atribuições das bandas identificadas nos espectros de FTIR para os materiais precursores.

<b>Comprimento de onda (cm<sup>-1</sup>)</b>	<b>Atribuição</b>	<b>Referência</b>
<b>3314 e 3303</b>	Atribuído ao estiramento das vibrações características do grupo hidroxila (OH) pertencente à estrutura de celulose;	(PEREIRA <i>et al.</i> 2014)
<b>2920</b>	Grupo metileno (CH <sub>2</sub> );	(AHMAD <i>et al.</i> 2007)
<b>2896 e 2888</b>	Estiramento vibracional simétrico das ligações C-H;	(GUNASEKARAN <i>et al.</i> 2009)
<b>2852</b>	Grupos assimétricos de -C-H;	(SUN <i>et al.</i> 2016)
<b>2363</b>	Alongamento alifático C-H;	(YAKOUT e SHARAF, 2012)
<b>2092</b>	Bandas correspondentes a C=O;	(YAKOUT e SHARAF, 2012)
<b>1733</b>	As vibrações de C=O das cetonas, aldeídos, lactonas ou grupos carboxílicos;	(BRUM <i>et al.</i> 2008)
<b>1624</b>	Atribuídos ao C=O no carboximetil celulose;	(KAN <i>et al.</i> 2017)
<b>1602</b>	Vibrações simétricas e assimétricas do alongamento das ligações C-C;	(GUNASEKARAN <i>et al.</i> 2009)
<b>1520</b>	Vibrações de esqueletos aromáticos;	(KAN <i>et al.</i> 2017)
<b>1438</b>	Vibrações do anel aromático de lignina e são específicas de anéis do tipo guaiacílicos;	(BRUM <i>et al.</i> 2008)
<b>1370</b>	Ligações C-H do grupo do acetil (CH <sub>3</sub> );	(BRUM <i>et al.</i> 2008)
<b>1315</b>	Atribuído as vibrações do estiramento C-O;	(SUN <i>et al.</i> 2016)
<b>1262</b>	Atribuído ao estiramento vibracional C-C;	(GUNASEKARAN <i>et al.</i> 2009)
<b>1235</b>	Vibração dos anéis guaiacílicos;	(BRUM <i>et al.</i> , 2008)
<b>1210</b>	Relacionado aos anéis benzeno;	(GUNASEKARAN <i>et al.</i> , 2009)
<b>1160</b>	Vibrações de C-O em álcoois terciários;	(PEREIRA <i>et al.</i> 2014)
<b>1028</b>	Estiramentos do grupo C-O ou C-O-C da celulose, hemiceluloses e lignina;	(BRUM <i>et al.</i> 2008)
<b>786; 806 e 831</b>	Deformação para fora do plano de C-H para diferentes derivados de anéis de benzeno;	(ELMOUWAHIDI <i>et al.</i> 2017)

Com base nos resultados obtidos foi feita a análise estatística com o objetivo de tentar correlacionar os dados obtidos para os materiais precursores com os dos carvões ativados.

**Tabela 4.** Resultados médios da caracterização dos carvões ativados em relação ao seu rendimento, teor de cinzas, pH do ponto de carga zero ( $\text{pH}_{\text{pcz}}$ ), área superficial ( $S_g$ ), diâmetro de poros ( $D_p$ ) e volume de mesoporos ( $V_{\text{meso}}$ ) e microporos ( $V_{\text{micro}}$ ).

Variáveis	Máximo	Mínimo	Média	Desvio
Rendimento (%)	50,94	34,42	39,66	3,95
Cinzas (%)	10,19	5,61	7,57	1,16
$\text{pH}_{\text{PCZ}}$	5,83	4,11	5,21	0,55
$S_g$ ( $\text{m}^2/\text{g}$ )	1243	726	1051	125,14
$D_p$ (nm) <sup>a</sup>	6,15	4,06	4,73	0,57
$V_{\text{Meso}}$ ( $\text{cm}^3/\text{g}$ )	0,69	0,38	0,50	0,08
$V_{\text{Micro}}$ ( $\text{cm}^3/\text{g}$ )	0,15	0,09	0,12	0,01

<sup>a</sup> Máximo da distribuição de tamanho de poros;

**Tabela 5.** Atribuições das bandas Atribuições das bandas identificadas nos espectros de FTIR para os carvões ativados.

Comprimento de onda ( $\text{cm}^{-1}$ )	Atribuição	Referência
2660	Característica do grupo metilo (C-H);	(PEREIRA <i>et al.</i> 2014)
2335 e 2345	Atribuída ao grupo metil (C-H);	(PEREIRA <i>et al.</i> 2014)
2115	Estiramento do grupo carbono-oxigênio;	(PEREIRA <i>et al.</i> 2014)
1995	Atribuída ao estiramento de grupos simétricos e assimétricos para o ácido carboxílico derivado de anidridos (C=O; C-O-C);	(OLIVEIRA <i>et al.</i> 2017)
1850 e 1860	Alongamento das vibrações do grupo carbonila (C=O);	(SEGNEANU <i>et al.</i> 2012)
1560	Corresponde aos modos de alongamento C=O e C=C. Comuns em superfícies de carbono;	(ACEVEDO e BARRIOCANAL, 2015)
1550	Vibração do estiramento da banda C=C do anel aromático ou ligação conjugada C=C;	(SUN <i>et al.</i> 2016)
1190	Atribuído ao alongamento das vibrações P=O, atribuídos ao fosfato e óxidos de fosfina;	(PRAHAS <i>et al.</i> 2008)
1136	Vibrações de C-O em álcoois terciários;	(PEREIRA <i>et al.</i> 2014)
1065	Atribuído a ligação iônica $\text{P}^+-\text{O}^-$ em ésteres de fosfato; Vibração na cadeia de P-O-P;	(PRAHAS <i>et al.</i> 2008)
1050	Geralmente é encontrado carbono oxidados, atribuído ao alongamento C-O em ácidos, álcoois, fenóis, éteres e/ou grupos ésteres;	(YAKOUT e SHARAF, 2012)
875	Corresponde ao grupo C-H em aldeídos, compostos de piranose e derivados de benzeno;	(AHMAD, LOH, e AZIZ, 2007)

## 3.2. Análise Multivariada

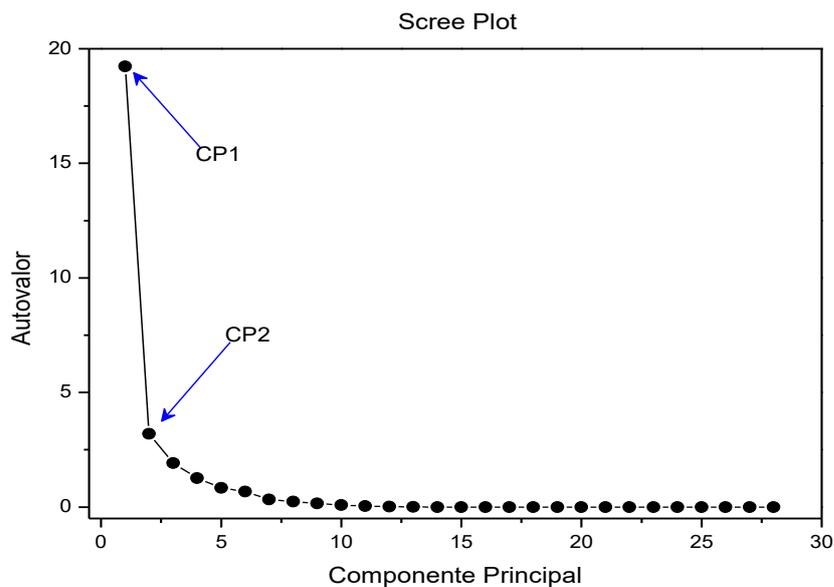
### 3.2.1. Análise dos Componentes Principais (ACP)

A utilização da técnica de Análise de Componentes Principais (ACP) teve como propósito reduzir a dimensionalidade dos dados, preservando simultaneamente a sua variância e substituindo um conjunto de variáveis que se correlacionem entre si, por um novo conjunto de variáveis não correlacionadas entre si, denominadas como componentes principais (CP), funcionando com uma análise introdutória para as demais análises.

O comportamento das propriedades das amostras dos materiais precursores e dos carvões ativados foi avaliado por meio da comparação entre suas principais características. Através do critério de Kaiser, dos fatores interpretáveis e da observação do *Scree Plot* (Figura 1), foi possível concluir que são necessários apenas dois componentes principais para explicar a variabilidade dos dados para os materiais precursores. Juntos estes dois componentes explicam 82,70% da variabilidade dos dados. Para os carvões ativados foram necessários três componentes principais, que explicam cerca de 87,00 % a variabilidade dos dados.

A partir dos gráficos de *Scree Plot* (Figura 1) pode-se observar que a curva dos componentes principais se estabiliza a partir do terceiro componente principal, dessa forma, os autovalores anteriores ao ponto de estabilização (CP1 e CP2), que explicam 68,3% e 12,1% dos resultados respectivamente, foram os escolhidos para representar a variância dos dados nos materiais precursores.

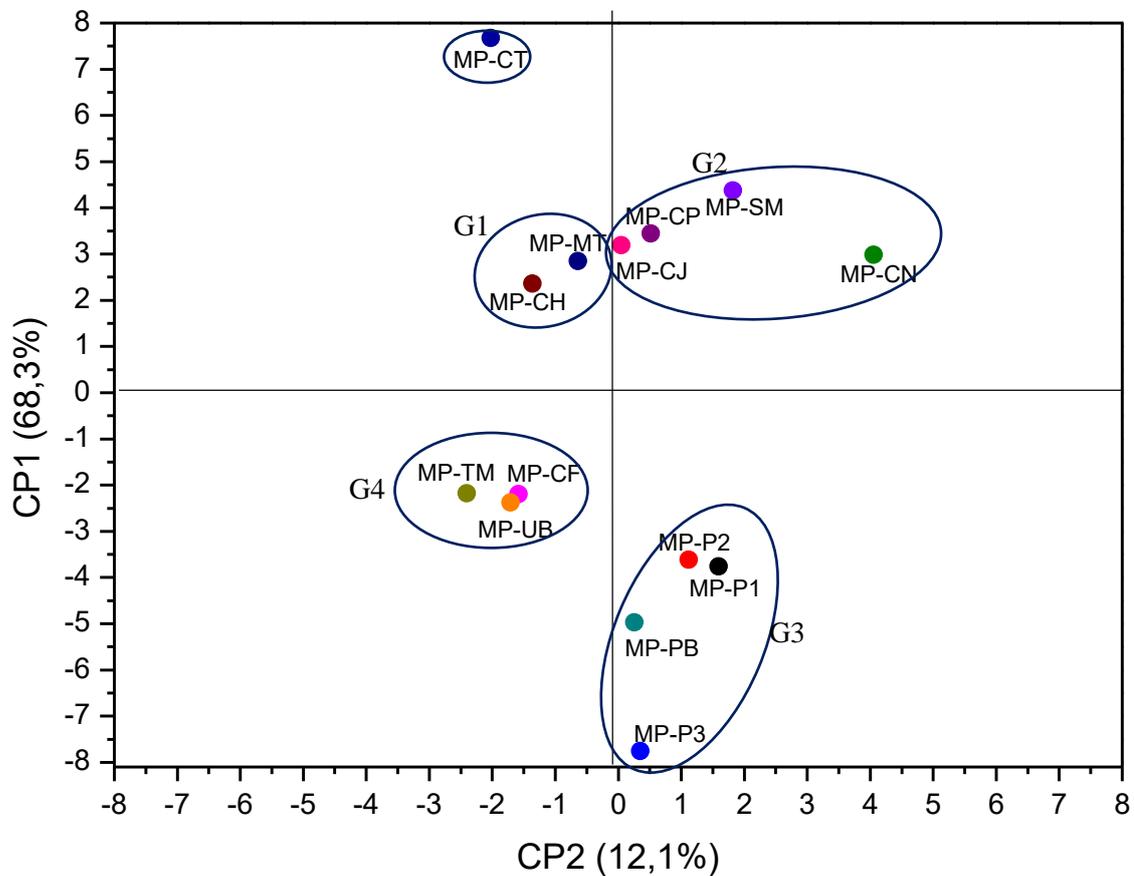
**Figura 1.** *Scree Plot* dos autovalores associados aos componentes principais dos materiais precursores.



Com base nos coeficientes de correlação de Pearson e na significância da correlação ( $p > 0,05$ ), o primeiro componente principal (CP1) apresentou alta correlação com todas as

variáveis correspondentes referentes aos principais picos do FTIR utilizados na análise (Tabela 3). Já o segundo componente principal (CP2) foi capaz de explicar os teores de lignina, hemicelulose e a relação entre os teores de lignina/celulose. Em razão de não estar relacionado com os principais componentes escolhidos para explicar a variabilidade das amostras, é possível concluir que o teor de celulose apresenta baixa influência no agrupamento das amostras, sendo inclusive essa variável passível de descarte. A partir dos escores dos componentes principais (CP1 e CP2) foi realizada a ACP por meio do gráfico de dispersão das amostras do material precursor (Figura 2), tendo o bagaço de cana (CN) como o ponto mais afastado, podendo considerá-lo como *outlier*.

**Figura 2.** Gráfico dos escores das amostras dos materiais precursores em relação ao CP1 e CP2.



Analisando o gráfico de ACP, pode-se observar a formação de 4 grupos e um material outlier (Tabela 6), sendo que materiais dispostos no mesmo grupo apresentam características similares, tanto para FTIR (CP 1), quanto para caracterização das amostras (CP 2). Materiais precursores do Grupos 1 apresentam valores de lignina iguais e/ou superiores aos de celulose e conseqüentemente menor relação entre eles ( $\leq 1,0$ ). O material precursor MP-CT apresenta-se como outlie, pois apesar do mesmo apresentar caraterísticas similares de composição com os materiais do Grupo 1, a intensidade das bandas de FTIR para os comprimentos de onda em

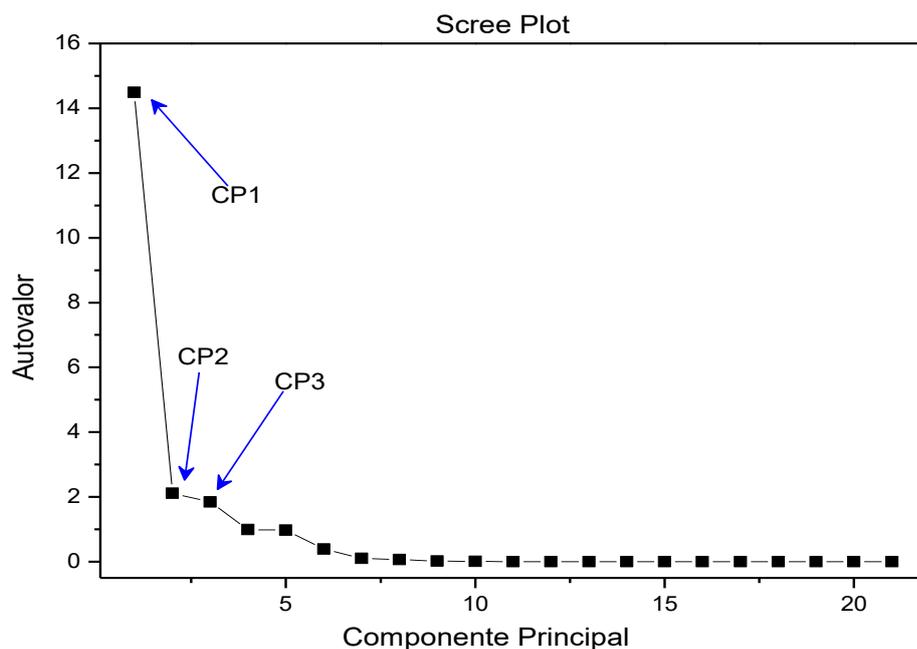
estudo deste material foram diferentes. As amostras presentes no Grupo 2, apresentam características de absorvência similares do Grupo 1, uma vez que se encontram na mesma linha de latitude no gráfico, apresentando diferenças na composição química do material, como uma maior relação de entre a celulose e lignina ( $> 1,37$ ). O Grupo 3, formado pelos materiais obtidos das bainhas das pupunhas, apresentam em sua composição os menores valores de lignina ( $< 14\%$ ) e, conseqüentemente, os mais altos valores para relação cel/lig ( $> 3,4$ ) além de apresentarem uma menor absorvência para os comprimentos de onda no espectro de FTIR. No Grupo 4, pode-se observar valores intermediários de composição dos materiais, que se assemelham ao Grupo 2, tendo como diferença os baixos teores de hemicelulose ( $> 10\%$ ) e a menor presença de grupos funcionais em sua superfície.

**Tabela 6.** Resultados da caracterização química dos materiais precursores, agrupados de acordo com a ACP.

<b>CÓDIGO</b>	<b>CINZAS</b>	<b>LIGNINA</b>	<b>CELULOSE</b>	<b>CEL/LIG</b>	<b>HEMICELULOSE</b>
<b><i>Outlier</i></b>					
<b>MP-CT</b>	2,00 %	33,07 %	33,31 %	1,01	10,07 %
<b>Grupo 1</b>					
<b>MP-CH</b>	2,32 %	25,78 %	20,58 %	0,80	11,95 %
<b>MP-MT</b>	2,34 %	24,89 %	18,83 %	0,76	19,02 %
<b>Grupo 2</b>					
<b>MP-SM</b>	2,12 %	24,88 %	47,49 %	1,91	13,60 %
<b>MP-CP</b>	4,10 %	30,69 %	43,13 %	1,41	8,20 %
<b>MP-CJ</b>	1,96 %	30,96 %	42,27 %	1,37	11,99 %
<b>MP-CN</b>	2,33 %	14,60 %	35,70 %	2,45	21,90 %
<b>Grupo 3</b>					
<b>MP-P1</b>	5,96 %	11,06 %	46,88 %	4,24	18,31 %
<b>MP-PB</b>	4,49 %	12,72 %	47,29 %	3,72	12,29 %
<b>MP-P2</b>	6,16 %	11,92 %	43,15 %	3,62	16,70 %
<b>MP-P3</b>	3,26 %	14,09 %	48,63 %	3,45	17,98 %
<b>Grupo 4</b>					
<b>MP-UB</b>	0,74 %	19,76 %	52,21 %	2,64	9,90 %
<b>MP-CF</b>	4,83 %	27,02 %	48,66 %	1,80	9,41 %
<b>MP-TM</b>	3,81 %	30,86 %	35,43 %	1,15	5,18 %

A partir da ACP dos carvões ativados e com base nos gráficos de Scree Plot (Figura 3), pode-se observar que a curva dos componentes principais se estabiliza a partir do quarto autovalor, dessa forma, os autovalores anteriores ao ponto de estabilização, CP1, CP2 e CP3, que explicam respectivamente 68,9 %, 10,0 % e 8,8 %, foram os escolhidos para representar a variância dos dados nos carvões ativados. Os três componentes principais juntos representaram 87,8 % da variância dos dados.

**Figura 3.** *Scree Plot* dos autovalores associados aos componentes principais, dos carvões ativados.



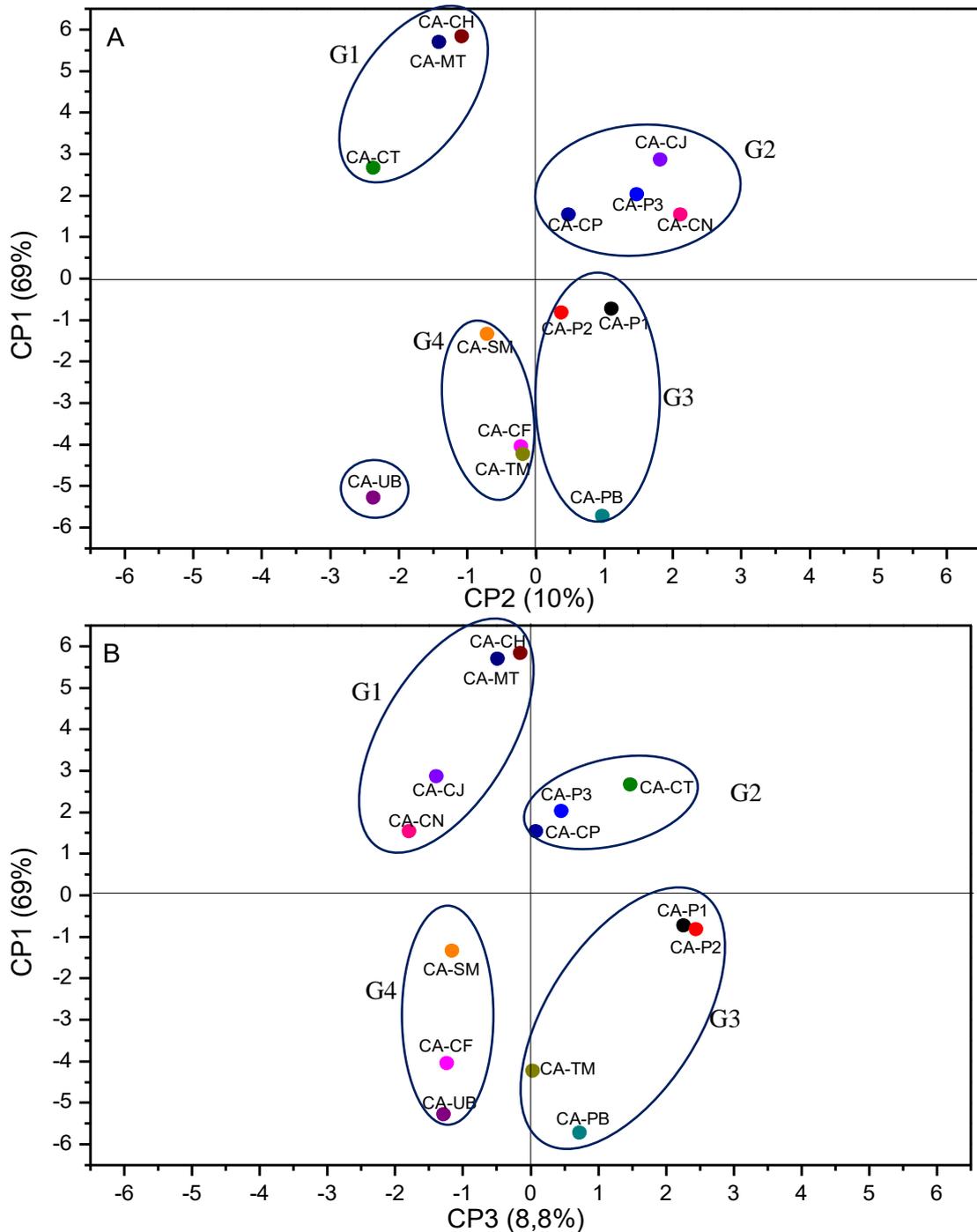
O primeiro componente principal (CP1) apresentou alta correlação com todas as variáveis referentes aos principais picos do FTIR, bem como correlação com o volume de mesoporos. Já o segundo componente principal (CP2) apresentou maior correlação com o rendimento, área superficial e volume de microporos. Por fim o terceiro componente principal (CP3) se correlacionou com o diâmetro de poros, volume de microporos, pH<sub>pcz</sub> e volume de mesoporos.

Os componentes principais CP2 e CP3 apresentam valores próximos de variação, explicando as seguintes características dos carvões ativados: área superficial e diâmetro de poros, explicadas por CP2 e CP3, respectivamente. Estas duas características são importantes e estão relacionadas à aplicação do carvão, sendo assim necessário a utilização de ambos os componentes. A partir dos escores dos componentes principais, foi realizada a análise por meio do gráfico de dispersão das amostras dos carvões ativos CP1xCP2 (Figura 4A) e CP1xCP3 (Figura 4B), sendo possível observar que agrupamentos de carvões com características similares.

Com base no gráfico de ACP entre os Componentes Principais 1 (FTIR e volume de mesoporos) e 2 (Rendimento, área superficial e volume de microporos), pode-se observar que os carvões ativados tiveram a tendência de se agruparem de maneira similar aos seus materiais precursores de origem, tendo as apenas três amostras dispersas: CA-P3, CA-UB e CA-SM. Como a maioria das amostras de carvão permaneceram agrupadas como seus materiais de origem, pode-se afirmar que o tipo de material precursor tem influência direta nas

características dos carvões obtidos, ou seja, materiais precursores com composição similares geram carvões com características similares. A caracterização completa dos carvões ativados, com base no agrupamento feito pelo CP1 e CP2, está apresentada na Tabela 7.

**Figura 4.** Gráficos dos escores das amostras de carvão ativado em relação ao CP1 e CP2 (A) e cp1 e cp 3 (B).



No Grupo 1 tem os carvões com rendimentos mais elevados e em contrapartida menores volume de microporos e área superficial, tais características estão relacionadas as características

dos materiais precursores, pois estes carvões foram sintetizados a partir de materiais precursores com os mais altos teores de lignina, e conseqüentemente menores relações de celulose/lignina ( $< 1$ ). Nos Grupos 2 e 3 estão agrupados os carvões que apresentaram os menores rendimentos e elevada área superficial, sendo que os carvões do Grupo 3 apresentaram maiores volumes de microporos e área superficial, visto que o mesmo foi sintetizado a partir de materiais com alta relação de celulose e lignina ( $> 3$ ). Outra diferença é que os carvões presentes neste grupo apresentaram uma menor intensidade nas bandas, quando comparados com o Grupo 2. No Grupo 4 tem-se carvões com características intermediárias, e quando observando as propriedades dos precursores, nota-se que os mesmos também possuem teores intermediários dos compostos lignocelulósicos. Observa-se ainda que o carvão CA-UB, se apresenta como outlier, pois diferente do Grupo 4 este apresenta um maior rendimento e baixa área superficial, além de apresentar intensidades de algumas bandas no espectro de FTIR menores.

**Tabela 7.** Caracterização dos carvões ativados: rendimento (Rend), área superficial ( $S_g$ ), e volume de microporos ( $V_{micro}$ ) com base na ACP (CP1xCP2).

<b>CÓDIGO</b>	<b>Rend. (%)</b>	<b>Sg (m<sup>2</sup>/g)</b>	<b>Vmicro (cm<sup>3</sup>/g)</b>
<b>Grupo 1</b>			
<b>CA-CH</b>	42,7	726	0,111
<b>CA-MT</b>	46,6	836	0,123
<b>CA-CT</b>	50,9	1049	0,166
<b>Grupo 2</b>			
<b>CA-CJ</b>	34,4	1243	0,102
<b>CA-P3</b>	38,1	1209	0,120
<b>CA-CP</b>	37,9	1053	0,130
<b>CA-CN</b>	31,9	982	0,087
<b>Grupo 3</b>			
<b>CA-PB</b>	37,8	1226	0,132
<b>CA-P1</b>	37,2	1020	0,134
<b>CA-P2</b>	38,1	998	0,149
<b>Grupo 4</b>			
<b>CA-CF</b>	41,2	1209	0,123
<b>CA-SM</b>	43,2	1135	0,115
<b>CA-TM</b>	42,8	1116	0,127
<b>Outlier</b>			
<b>CA-UB</b>	43,4	837	0,128

A partir do agrupamento realizado com base na composição química dos resíduos, torna-se possível comprovar que a utilização de diferentes resíduos resulta em carvões com diferentes características. O rendimento do carvão ativado está relacionado com a variação dos teores de lignina, hemicelulose, celulose e extrativos da biomassa, sendo que as espécies com alto teores de lignina proporcionariam os maiores rendimentos, enquanto que para materiais com teores

mais altos de celulose espera-se altos valores de área superficial (ANTAL e MOK, 1990). Este mesmo comportamento foi observado em trabalhos de síntese de carvão ativado a partir de bambu (FUJISHIGE et al., 2017) e casca de arroz (CHEN et al., 2013).

As variações de porosidade dos carvões estão relacionadas a decomposição dos componentes lignocelulósicos durante a etapa de carbonização, tendo a celulose como o componente que apresenta uma alta taxa de decomposição, conseqüentemente os carvões sintetizados a partir destes materiais, irão apresentar maior diâmetro e volume de poros (RODRIGUEZ-CORREA et al., 2017). Em contraste os materiais sintetizados a partir de fontes ricas em lignina, que devido as menores taxas de decomposição, irão apresentar uma maior produção de carbono, ou seja, um alto rendimento, conseqüentemente menor diâmetros e volume de poros.

De maneira geral o rendimento do processo de síntese em carvões ativados foi superior a 30 %, sendo considerado alto, demonstrando a viabilidade de produção de carvões a partir dos materiais precursores estudados e empregando a ativação química com ácido fosfórico. Os carvões ativados sintetizados a partir de materiais com teores de lignina maiores ou iguais aos teores de celulose (Grupo 1 da Tabela 6), apresentaram os maiores valores de rendimento, em contrapartida materiais com valores mais baixos de lignina apresentaram menores rendimentos, já que a lignina apresenta uma maior resistência a degradação. Estes resultados estão de acordo aos encontrados por Fierro et al. (2010), que ao estudarem a síntese de carvão ativado a partir de palha de arroz, observaram que quando os materiais precursores apresentam frações de lignina inferior a 20 %, são obtidos baixos rendimentos em carbono, mesmo quando submetidos a ativação por ácido fosfórico.

Com base no gráfico de ACP entre os componentes principais 1 e 3 (Figura 4B), foi possível agrupar os carvões de forma diferente (Tabela 8), pois o CP3, diferente do CP2, tem maior correlação com o diâmetro de poros dos carvões. Nota-se ainda que quando comparados este agrupamento com o agrupamento entre o CP1xCP2, tem-se uma maior mudança entre as posições das amostras quando se correlaciona com o ACP dos materiais precursores. Estas mudanças podem estar relacionadas ao método de ativação química empregado neste trabalho, que tem influência em propriedades como o  $pH_{PCZ}$  e o diâmetro dos poros. Segundo Brito et al. (2017) a ativação com  $H_3PO_4$  envolve a formação de estruturas com ligação cruzada sob a forma de éster fosfato, estando diretamente relacionados com o desenvolvimento dos mesoporos do carvão e com os grupos funcionais presentes na superfície dos carvões.

Observa-se uma alteração no agrupamento dos carvões ativados a partir do gráfico dos componentes principais CP1 x CP3 em relação ao do CP1xCP2. Isto acontece em virtude do fato de que o CP3 explica características que o CP2 não explica, como o ponto de carga zero,

diâmetro de poros e o volume de mesoporos dos carvões. Desta forma, tem-se o Grupo 1, com carvões ativados com menores valores de diâmetros de poros e volume de mesoporos. Estes carvões foram obtidos a partir de materiais precursores que apresentaram em sua composição uma baixa relação entre a celulose/lignina, o que explica estas características. Estes materiais também apresentaram baixos valores para o pH do ponto de carga zero. Os grupos 2 e 3 apresentaram carvões com características intermediárias, devido a valores intermediários de lignina e celulose dos materiais precursores, bem como a relação entre eles, tendo como diferença uma menor intensidade das bandas obtidas no espectro de FTIR. O Grupo 4 é formado por carvões ativados com maiores valores para o diâmetro de poros e volume de mesoporos, além de apresentarem  $pH_{PCZ} > 5,6$ .

**Tabela 8.** Caracterização dos carvões ativados: pH do ponto de carga zero ( $pH_{pcz}$ ), diâmetro de poros ( $D_p$ ) e volume de meso ( $V_{meso}$ ), com base na ACP (CP1xCP3).

CÓDIGO	pH <sub>pcz</sub>	D <sub>p</sub> (nm) <sup>a</sup>	V <sub>meso</sub> (cm <sup>3</sup> /g)
<b>Grupo 1</b>			
CA-CH	4,37	4,88	0,409
CA-MT	4,11	4,07	0,375
CA-CN	5,24	4,06	0,392
CA-CJ	5,19	3,78	0,438
<b>Grupo 2</b>			
CA-CT	4,64	4,88	0,452
CA-P3	5,62	4,58	0,535
CA-CP	5,28	4,55	0,446
<b>Grupo 3</b>			
CA-UB	4,46	5,18	0,479
CA-CF	4,43	4,42	0,544
CA-SM	4,46	4,35	0,586
<b>Grupo 4</b>			
CA-P2	5,69	6,15	0,563
CA-P1	5,62	6,12	0,622
CA-TM	5,83	5,20	0,512
CA-PB	5,81	5,32	0,688

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

O  $pH_{PCZ}$  dos carvões produzidos estão relacionados com a composição lignocelulósica dos materiais precursores, pois, de acordo com CAI et al. (2017), dentre os constituintes presentes nos materiais precursores a hemicelulose e lignina apresentam maior susceptibilidade a hidrólise ácida, formando ésteres de fosfato em sua estrutura, sendo assim materiais com maiores valores destes constituintes irão apresentar valores mais baixos de pH, e consequentemente irão apresentar bandas dos grupos funcionais referentes ao agente ativante (ácido fosfórico) com maior intensidade, conforme observado nos grupos 1 e 3, referentes a ACP, estes apresentam os valores mais baixos do ponto de carga zero, apresentado a maior intensidade dos grupos funcionais com caráter ácido, destacando os os grupos: C-O-C (1995

cm<sup>-1</sup>), C=O (1560 cm<sup>-1</sup>), P=O (1190 cm<sup>-1</sup>) e P-O-P (1065 cm<sup>-1</sup>), diferentes dos materiais presentes nos grupos 2 e 4, que apresentem uma menor intensidade de banda relacionadas à estes grupos funcionais.

Segundo Yuso et al. (2014) o pH<sub>PCZ</sub> dos carvões está diretamente relacionado com o tipo de agente ativante, temperatura de carbonização e atmosfera presente durante este processo. A utilização de atmosferas inertes, como a de nitrogênio, propicia um aumento do pH<sub>PCZ</sub>, devido a menor formação de grupos oxigenado durante o processo de carbonização. Com relação ao agente ativante utilizado, o autor constata que agentes ativantes ácidos geram carvões ativados com valores mais baixos de pH<sub>PCZ</sub>, devido a formação de grupos ácidos na superfície do material (AL-LAGTAH et al., 2016). Observa-se que houve poucas mudanças dos grupos originados do ACP dos materiais precursores para o ACP dos carvões ativados, mostrando assim que as características dos materiais precursores têm influência nas características dos carvões sintetizados.

Além do método de ativação, o alto teor de lignina nos materiais precursores também gera influência na porosidade e conseqüentemente na área dos carvões ativados. Como a lignina apresenta maior resistência a degradação térmica, não ocorrerá a quebra de sua estrutura de maneira tão acentuada como ocorre com a hemicelulose e a celulose, resultando assim menores áreas. Observa-se que quando os valores de relação celulose/lignina foram superiores a > 3,5 %, que compreendem a baixos teores de lignina e altos teores de celulose, obteve-se os carvões ativados com os maiores diâmetros, volumes de poros e áreas, e os precursores com valores desta relação ≤ 1% apresentaram carvões com menores áreas superfícies, já os carvões com características intermediárias de porosidade, área e rendimento foram sintetizados a partir de materiais precursores com valores da relação celulose/lignina de aproximadamente 2%. Confirmando assim que a relação entre os teores de celulose e lignina, tem influência direta nas características do carvão. Tendo os materiais ricos em lignina como fontes de carvões alto rendimento e menores área e diâmetro de poros, podendo ser utilizado na adsorção de moléculas pequenas como corantes têxteis. Os materiais com baixos teores de lignina e altos índices de celulose, responsáveis por maior diâmetro e volume de poros com maior área superficial, podem ser utilizados, por exemplo, em processos adsorptivos de macromoléculas.

### **3.2.2. Análise de Correlações Canônica**

Foram realizadas análises de correlação canônica para verificar as associações existentes entre um primeiro grupo de composição químicas (lignina, celulose, hemicelulose e relação entre os teores de celulose/lignina) dos materiais lignocelulósicos utilizados como materiais precursores, com um segundo grupo formado pelas características dos carvões

synthesized (yield, surface area, pore diameter and volume of micro and mesopores), verifying thus, which characteristics of the precursor materials will influence the properties of the charcoal.

The results obtained for the samples led to the obtaining of four pairs of correlations. Of these pairs obtained only the first was considered significant at a level of significance of 10%, due to the greater diversity of the samples used, for 5 different statistical tests (F-test, Willks' Lambda, Pillais's Trace, Hotelling-Lawley Trace, Roy's Greatest Root). In addition to being the only pair of significant correlation, the first correlation has 84.3% of explanation of the variation of the data and has a correlation of approximately 0.97. Due to this high correlation, it can be affirmed that the characteristics of the precursor materials influence the properties of the charcoals. The canonical correlation analysis provides still a and graphical representation of the canonical correlation (Figure 5) and Equations 7 and 8, responsible for generating this result.

$$Y_{comp\ 1} = 0,1114 \times LIG - 0,0658 \times CEL - 0,1032 \times HEM + 1,9526 \times Cel/Lig \quad (7)$$

Where: Lig, represents the lignin content (%); Cel, the cellulose content (%); Hem, the hemicellulose content (%) and Cel/Lig, which represents the relationship between the lignin and cellulose contents of the precursor material.

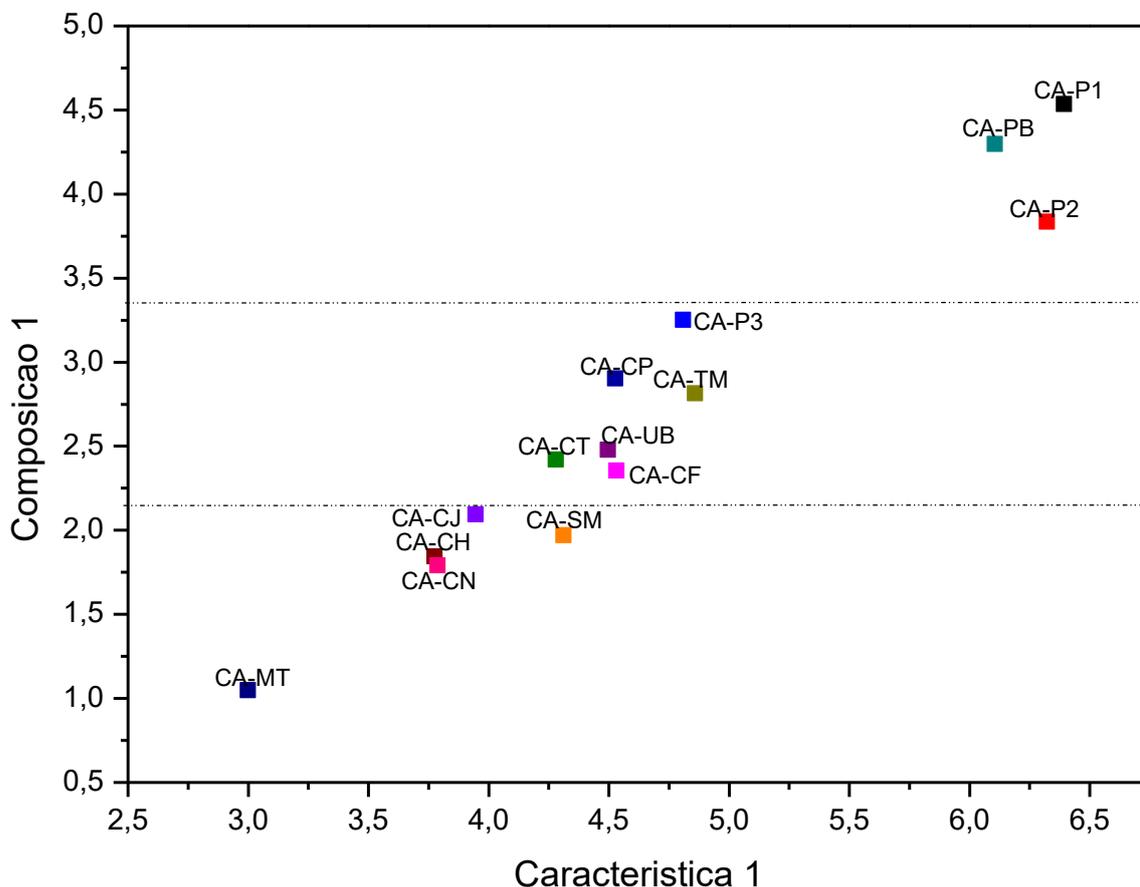
$$Y_{caract\ 1} = -0,0772 \times Rend + 0,0007 \times Area + 0,7346 \times Diam + 3,5736 \times V_{meso} + 13,7794 \times V_{micro} \quad (8)$$

Where: Rend, represents the yield in percentage of the charcoal synthesis; Area, the value of the BET surface area of the charcoal; Diam, the value of the maximum diameter reached by the pores and  $V_{meso}$  and  $V_{micro}$ , which correspond to the values for the volumes of meso and micropores, respectively.

The high correlation obtained indicates that there is an association between the lignocellulosic components of the precursor material and the physical characteristics of the charcoals obtained, or in other words, it is possible with the composition of the precursor material (Equation 7) to predict which characteristics the activated charcoal will present, thus facilitating the selection of the type of precursor material based on the application of the charcoal that is desired. For example, materials that present a higher cellulose/lignin ratio lead to the production of activated charcoals with a higher pore diameter, mesopore volume, micropore volume and surface area. On the other hand, with the increase of this ratio, the yield of these charcoals is reduced. As for the increase of lignin content in the precursor material, the opposite effect occurs, it is possible to obtain higher yields and lower porosities and surface area. Based on the canonical correlation analysis it was possible to observe that hemicellulose has little influence on the characteristics of the

carvões sintetizados. Esse comportamento pode ser explicado por que dentre os compostos lignocelulósicos a hemicelulose é a primeira a ser degradada durante o processo de carbonização (JAIN e TRIPATHI, 2014).

**Figura 5.** Correlação do primeiro par de variáveis canônicas, para o material precursor (característica 1) e carvão ativado (composição 1).



Analisando os resultados apresentados na Figura 5 pode-se observar que materiais precursores com valores de índice de composição superiores a 3,3 irão gerar carvões com os maiores diâmetros de poros, sendo estes superiores a 5,3 nm, e volume de mesoporos superiores a 0,563 cm<sup>3</sup>/g, os quais podem ser aplicados, por exemplo, em processos de adsorção de moléculas maiores. Valores de composição do precursor inferiores a 2,25 levaram a obtenção de carvões com menores diâmetros de poros (< 4,88 nm) e baixo volume de mesoporos, podendo assim serem utilizados, por exemplo, para adsorção de moléculas pequenas. Materiais precursores com composição intermediária variando de 2,2 a 3,3, irão produzir carvões também com características intermediárias com diâmetro de poros variando de 4,4 a 5,2 nm e volume de mesoporos (0,40 a 0,56 cm<sup>3</sup>/g).

Desta forma, conhecendo a composição lignocelulósica do precursor será possível determinar, através da Equação 7, o índice de Composição 1 e através do gráfico da Figura 5

prever as características do carvão. Sendo possível então escolher o material precursor a ser utilizado na sua produção de carvão, com base nas características de interesse para o carvão desejado, simplificando os estudos sobre produção de carvão ativado.

Os resultados da correlação canônica estão em acordo com as discussões apresentadas na Análise de Componentes Principais.

#### 4. CONCLUSÃO

Observou-se que os resíduos lignocelulósicos apresentam grande potencial para serem utilizados como material precursor de carbono na produção de carvão ativado, levando a rendimentos satisfatórios. A ativação dos materiais precursores com ácido fosfórico levou a formação de novos grupos de superfície, além de propiciar baixos valores de pH para o ponto de carga zero dos carvões sintetizados.

A análise de componentes principais (ACP) possibilitou o agrupamento de materiais precursores e dos carvões ativados com propriedades similares entre si, demonstrando que as características dos materiais precursores têm influência nas características dos carvões. Já a Análise de Correlações Canônicas (ACC) permitiu concluir que a relação entre os teores de celulose/lignina, bem como o teor de lignina, são as características do material precursor responsáveis pelas características dos carvões ativados. Permitindo estabelecer uma relação matemática entre as propriedades do material precursor e as do carvão ativado.

Desta forma, a partir da utilização das equações obtidas empregando a Análise Estatística Multivariada, será possível prever as características dos carvões ativados com base na caracterização dos precursores facilitando processo futuros de síntese de carvões e aplicação do carvão a ser produzido.

#### 5. REFERÊNCIAS

- ACEVEDO, B., e BARRIOCANAL, C. Texture and surface chemistry of activated carbons obtained from tyre wastes. **Fuel Processing Technology**, v. 134, p. 275–283, 2015.
- AHMAD, A. L., LOH, M. M., & AZIZ, J. A. Preparation And Characterization Of Activated Carbon From Oil Palm Wood And Its Evaluation On Methylene Blue Adsorption, **Dyes and Pigments** v. 75, 2007.
- AL-LAGTAH, N.M.A., AL-MUHTASEB, A.H., AHMAD, M.N.M. and SALAMEH, Y. Chemical and physical characteristics of optimal synthesised activated carbons from grass-derived sulfonated lignin versus commercial activated carbons, **Microporous and Mesoporous Materials**. V. 225, P. 504–514, 2016.

- ANTAL, M.J., MOK, W.S.L. Review of Methods for Improving the Yield of Charcoal from Biomass. **Energy e fuels an american chemical society journal**. v. 4, n. 3, p. 0-4, 1990.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemistry). **Official methods of analysis**. 16<sup>ed</sup>. Arlington: AOAC International, 1995.
- BARRET, E. P., JOYNER, L. G., HALENDA, P. P., The determination of pore volume and area distributions in porous substances. I. Computations from nitrogen isotherms, **Journal of The American Chemical Society**, v.73, 373-380, 1951.
- BRITO, M.J.P., VELOSO, C.M., BONOMO, R.C.F., FONTAN, R. DA C.I., SANTOS, L.S. and MONTEIRO, K.A. Activated carbons preparation from yellow mombin fruit stones for lipase immobilization, **Fuel Processing Technology**. V. 156, P. 421–428, 2017.
- BRUM, S.S., BIANCHI, M.L., DA SILVA, V.L., GONÇALVES, M., GUERREIRO, M.C. and DE OLIVEIRA, L.C.A. Preparação e caracterização de carvão ativado produzido a partir de resíduos do beneficiamento do café, **Química Nova**, V. 31(n. 5), P. 1048–1052, 2008.
- BRUNAUER, S., EMMET, P. H., TELLER, E., Adsorption of Gases in multimolecular layers, *Journal of The American Chemical Society*, v.60, 309-319, 1938.
- CHEN, Y.-D., CHEN, W.-Q., HUANG, B., HUANG, M.-J. Process optimization of K<sub>2</sub>C<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-activated carbon from kenafcore using Box–Behnken design. **Chem. Eng. Res. Des.** v. 91, p. 1783–1789, 2013.
- DJILANI, C.; ZAGHDOUDI, R.; DJAZI, F.; BOUCHEKIMA, B.; LALLAM, A.; MODARRESSI, A.; ROGALSKI, M. Adsorption of dyes on activated carbon prepared from apricot stones and commercial activated carbon. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v.53, p.112–121, 2015.
- ELMOUWAHIDI, A., GARCÍA, E.B., CADENAS, A.F.P, HÓDAR, F.J.M., and MARÍN, F.C. Activated Carbons from KOH and H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> - Activation of Olive Residues and Its Application as Supercapacitor Electrodes, **Electrochimica Acta**, v. 229, p.219-28, 2017.
- FIERRO, V., TORNÉ-FERNÁNDEZ, V., CELZARD, A. Kraft Lignin as a Precursor for Microporous Activated Carbons Prepared by Impregnation With Ortho- Phosphoric Acid: synthesis and textural characterisation. **Microporous and Mesoporous Materials**. v. 92, p. 243–250. 2006.
- FUJISHIGE, M., YOSHIDA, I., TOYA, Y., BANBA, Y., OSHIDA, K., TANAKA, Y., DULYASEREE, P., WONGWIRIYAPAN, W., AND TAKEUCHI, K. Preparation of Activated Carbon from Bamboo-Cellulose Fiber and Its Use for EDLC Electrode Material. **Biochemical Pharmacology**. v. 5, n. 2, p. 1801-1808, 2017.

- GIRALDO, L.; MORENO-PIRAJÁN, J.C. Lipase supported on mesoporous materials as a catalyst in the synthesis of biodiesel from *Persea americana* mill oil. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.77, p.32–38, 2012.
- GUNASEKARAN, S., SAILATHA, E., SESHADRI, S., & KUMARESAN, S. FTIR, FT Raman spectra and molecular structural confirmation of isoniazid. **Indian Journal of Pure and Applied Physics**. v. 47(1), p. 12–18, 2009.
- HU, Q.; LU, Y.; MEISNER, G.P. Preparation of nanoporous carbon particles and their cryogenic hydrogen storage capacities. **J Phys Chem C**, v.12, p.1516-1523, 2008.
- IUPAC: União Internacional de Química Pura e Aplicada. **Reporting Physisoption data for gás/solid systems**. v.54, p. 2201-2218, 1982.
- JAIN, A. and TRIPATHI, S. K. Fabrication and characterization of energy storing supercapacitor devices using coconut shell based activated charcoal electrode, **Materials Science and Engineering B: Solid-State Materials for Advanced Technology**. V. 183(n. 1), P. 54–60, 2014.
- KAN, T., STREZOV, V., EVANS, T. J. Lignocellulosic biomass pyrolysis: a review of product properties and effects of pyrolysis parameters. **Renew Sustain Energy Reviews**. V.57, P.1126–1140, 2017.
- KONG, J., YUE, Q., WANG, B., HUANG, L., GAO, B., WANG, Y., and LI, Q. Preparation and characterization of activated carbon from leather waste microwave-induced pyrophosphoric acid activation. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**. v. 104, p. 710–713, 2013.
- JOHNSON, R.A.; WICHERN, D.W. **Applied multivariate statistical analysis**. New Jersey: Prentice-Hall, 1999.816p.
- LIU, T. H. Development of mesoporous structure and high adsorption capacity of biomass-based activated carbon by phosphoric acid and zinc chloride activation. **Chemical Engineering Journal**, v. 158(2), p. 129–142, 2010.
- LIPPENS, B. C., LINSEN, B. G., BÔER, J. H., Studies on pore systems in catalysts I. The adsorption of nitrogen; apparatus and calculation, **Journal of Catalysis**, v.3, 32-37, 1964.
- OLIVEIRA, G.F., ANDRADE, R.C., TRINDADE, M.A.G., ANDRADE, H.M.C. E CARVALHO, C.T. Thermogravimetric And Spectroscopic Study (TG-DTA/FTIR) Of Activated Carbon From The Renewable Biomass Source Babassu. *Quimica Nova*, v. 40, ed. 3, p. 284-292, 2017.
- PEREIRA, E. B. B.; PEREIRA, M. B. Um critério para o descarte de variáveis na análise de componentes principais. **Revista Universidade Rural, Série Ciências Exatas e da Terra**. v.23, n. 1-2, p. 1-7, 2004.

- PEREIRA, R. G., VELOSO, C. M., DA SILVA, N. M., DE SOUSA, L. F., BONOMO, R. C. F., DE SOUZA, A. O., DA GUARDA, M. O & FONTAN, R. D. C. I. Preparation of activated carbons from cocoa shells and siriguela seeds using  $H_3PO_4$  and  $ZnCl_2$  as activating agents for BSA and  $\alpha$ -lactalbumin adsorption. **Fuel Processing Technology**, 126, 476-486. 2014.
- PRAHAS, D., KARTIKA, Y., INDRASWATI, N., and ISMADJI, S. Activated Carbon from Jackfruit Peel Waste by  $H_3PO_4$  Chemical Activation: Pore Structure and Surface Chemistry Characterization, **Chemical Engineering Journal**, v. 140, p.32–42, 2008.
- REGALBUTO, J. R.; ROBLES, J. **The engineering of Pt/Carbon Catalyst Preparation**, University of Illinois: Chicago, 2004.
- RODRIGUEZ-CORREA, C., OTTO, T., & KRUSE, A. Influence of the biomass components on the pore formation of activated carbon. **Biomass and Bioenergy**, v. 97, p. 53–64, 2017.
- SEGNEANU, A.E., GOZESCU, I., DABICI, A., SFIRLOAGA, P., SZABADAI, Z. Organic Compounds FT-IR Spectroscopy. in Macro to Nano Spectroscopy, J. UDDIN (Ed.), **InTech**, v. 145, 2012.
- SMITH, M. W., PECHA, B., HELMS, G., SCUDIERO, L., and GARCIA-PEREZ, M. Chemical and morphological evaluation of chars produced from primary biomass constituents: Cellulose, xylan, and lignin. **Biomass and Bioenergy**, v. 104, p. 17–35, 2017.
- SUN, Y., LI, H., LI, G., GAO, B., YUE, Q., & LI, X. Characterization and ciprofloxacin adsorption properties of activated carbons prepared from biomass wastes by  $H_3PO_4$  activation. **Bioresource Technology**, v. 217, p. 239–244, 2016.
- VAN SOEST, P.J., ROBERTSON, J.B., LEWIS, B.A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. **Journal of Dairy Science**. V. 74, p. 3583–3597, 1991.
- YAKOUT, S. M., & SHARAF, G.E.D. Characterization of activated carbon prepared by phosphoric acid activation of olive stones. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 9, p. 1155-1162, 2016.

## **CAPÍTULO 3**

---

### **ARTIGO**

**Imobilização de Pepsina em carvão ativado por adsorção e ligação covalente e sua aplicação na hidrólise da caseína bovina**

---

## RESUMO

A imobilização enzimática permite reduzir os custos operacionais, pois é possível a recuperação mais eficiente da enzima do meio reacional, além de possibilitar a reutilização da enzima e proporcionar um controle mais eficiente de processos em grande escala. Vários métodos de imobilização de enzimas são conhecidos, sendo os métodos de imobilização por adsorção e formação de ligações covalentes os mais utilizados. O carvão ativado destaca-se como suporte para estes processos de imobilização devido a sua estrutura porosa definida, bem como sua elevada área superficial, características essenciais para a imobilização por adsorção. Estas características ainda são eficazes para que ocorra a imobilização por ligação covalente, pois aumentam a quantidade de braços espaçadores inseridos durante a etapa de funcionalização da superfície. Neste processo, grupos funcionais específicos são inseridos na superfície do suporte, e podem se ligar as enzimas, formando assim ligações covalente entre o suporte e a enzima. Este trabalho teve como objetivo comparar a eficiência dos processos de imobilização da pepsina por adsorção e por ligação covalente em carvão ativado e avaliar a atividade da enzima imobilizada na hidrólise da caseína bovina. O carvão ativado foi obtido a partir da balsa de pupunha (resíduo agroindustrial), utilizando o método da ativação química, sendo posteriormente caracterizado e funcionalizado pelo método do glutaraldeído, para a inserção de braços espaçadores. Tanto o carvão ativado, quando o funcionalizado apresentou alta eficiência no processo de imobilização (> 95%) e capacidade de ligação enzima-suporte (> 96 mg/g). Durante os testes de atividade observou-se que o carvão funcionalizado apresentou uma maior taxa de hidrólise da caseína em relação a enzima imobilizada por adsorção. Em relação à enzima na sua forma livre a atividade da enzima imobilizada por ligação covalente foi aproximadamente 95% desta, no tempo de 60 min. A funcionalização do carvão ativado, pelo método do glutaraldeído, propiciou a modificação da superfície do carvão ativado, pela inserção de grupos amina-aldeído, sendo responsáveis pela formação de ligação covalente entre o suporte e a enzima, responsáveis por proporcionar uma maior atividade proteolítica quando comparado com a imobilização por adsorção, sendo que as enzimas imobilizadas foram capazes de manter sua atividade proteolítica por mais de 4 ciclos de reutilização.

**Palavras-chave:** Pepsina; Imobilização; Biocatalisador; Funcionalização;

## ABSTRACT

The enzymatic immobilization allows to reduce the operational costs, because it is possible to recover more efficiently the enzyme of the reaction medium, besides allowing the reutilization of the enzyme and to provide a more efficient control of large scale processes. Several methods of immobilization of enzymes are known, with the most commonly used methods of immobilization by adsorption and covalent bonds. The activated carbons stands out as support for these immobilization processes due to its defined porous structure, as well as its high surface area, essential characteristics for immobilization by adsorption. These characteristics are still effective for immobilization by covalent bonding, as they increase the amount of spacing arms inserted during the surface functionalization step. In this process specific functional groups are inserted into the surface of the support, and the enzymes can be bound, thus forming covalent bonds between the support and the enzyme. The objective of this work was to compare the efficiency of the immobilization processes of pepsin by adsorption and by formation of covalent bond in activated carbon and to evaluate the activity of the enzyme immobilized in the hydrolysis of bovine casein. Activated carbon was obtained from the pupunha sheath (agroindustrial residue), using the chemical activation method, and later characterized and functionalized by the glutaraldehyde method, for the insertion of spacer arms. Activated carbon, when functionalized, showed high efficiency in the immobilization process (> 95%) and ability to bind enzyme-support (> 96 mg/g). During the activity tests it was observed that the functionalized carbon presented a higher casein hydrolysis rate in relation to the enzyme

immobilized by adsorption. In relation to the enzyme in its free form the activity of the enzyme immobilized by covalent binding was approximately 95% of this enzyme, in the time of 60 min. The functionalization of the activated carbon by the glutaraldehyde method led to the modification of the surface of the activated carbon by the insertion of amine-aldehyde groups, being responsible for the formation of covalent bond between the support and the enzyme, responsible for providing a greater hydrolytic activity when compared to immobilization by adsorption, and the immobilized enzymes were able to maintain their hydrolytic activity for more than 4 cycles of reuse.

**Keywords:** Pepsin; Immobilization; Biocatalyst; Functionalization;

## 1. INTRODUÇÃO

A pepsina (E.C. 3.4.23.1) tem como principal função a hidrólise seletiva de resíduos específicos de proteínas, clivando preferencialmente no lado carboxilo da fenilalanina, leucina, ácido glutâmico e tirosina, sendo utilizada na produção de alimentos e medicamentos. O seu emprego em processos industriais é limitado, pois quando esta se encontra em solução tem uma taxa de hidrólise mais lenta e, em alguns casos até ineficiente, além deste empecilho recuperá-la do sistema reacional é uma tarefa difícil (SUN et al., 2017). Devido as dificuldades de utilização em sua forma livre, vem sendo estudado diferentes materiais e técnicas de imobilização enzimática para melhorar o desempenho desta enzima, objetivando: manutenção ou aumento de atividade; aumento da estabilidade térmica e operacional em maiores faixas de pH e temperatura; aumento da seletividade da enzima pelo substrato; além de promover a sua reutilização (DATTA et al., 2017).

Desde a segunda metade do século passado (XX), esforços vem sendo feitos no sentido de desenvolver suportes para a imobilização de enzima, possibilitando assim a utilização das mesmas em processos contínuos. O emprego da enzima imobilizada permite reduzir os custos operacionais, pois é possível a recuperação mais eficiente da enzima do meio reacional por meio de filtração; além de possibilitar a reutilização da enzima e proporcionar um controle mais eficiente de processos em grande escala (AHN-JARVIS et al., 2017).

Vários métodos de imobilização de enzimas são conhecidos, sendo os métodos por adsorção e formação de ligações covalentes os mais utilizados (NONGONIERMA, O'KEEFFE e FITZGERALD, 2016). O método de imobilização por adsorção é o método mais simples e mais utilizado, e ocorre pelo contato entre a enzima e o suporte, através de ligações fracas, como as forças de Van der Waals, interações iônicas, adsorção física ou interações hidrofóbicas entre os grupos constituintes da enzima e a superfície do suporte. Devido aos tipos de forças envolvidas neste processo de imobilização, parâmetros como pH, força iônica e temperatura devem ser controlados, pois variações neste podem interferir na eficiência adsortiva dos materiais. As características do material sólido empregado como suporte também influenciam

a eficiência do processo de imobilização. Desta forma é necessário utilizar suportes com diâmetro de poros maiores, elevada área superficial, boa estabilidade química, mecânica e térmica, hidrofiliabilidade e insolubilidade (ÍSPIRLI-DOĞAÇ et al., 2017). Shuai et al. (2017), destaca a utilização do carvão ativado como suporte para imobilização enzimática por adsorção, devido a sua estrutura porosa definida, bem como sua elevada área superficial, resistência durante os processos de imobilização e por apresentar uma superfície com grupos funcionais hidrofílicos, facilitando assim a imobilização enzimática.

Na técnica de imobilização por formação de ligações covalentes a enzima é ligada ao suporte inerte mediante ligações químicas covalentes, que são, normalmente, estabelecidas entre os grupos amino, grupos amino residuais, grupos sulfidril e grupo hidroxila do anel fenólico da enzima com os grupos reativos do suporte. Por ser uma ligação mais forte, este tipo de imobilização apresenta certas vantagens quando comparado com o método da adsorção, uma vez que, neste método as perdas das enzimas por lixiviação da matriz são minimizadas, assim como durante os processos de imobilização as condições do meio reacional irão ter pouca influência na eficiência de imobilização (KHOABI et al., 2014). Para que ocorra a imobilização por ligação covalente em alguns tipos de matrizes sólidas como o carvão ativado, é necessário que estes materiais sejam submetidos a um processo de modificação da sua superfície, através da inserção de monômeros específicos. Dentre os métodos utilizados, a modificação utilizando o glutaraldeído tem sido amplamente empregado, quando se trata de imobilização enzimática, devido à facilidade de execução e, em alguns casos, levando a um aumento da atividade enzimática. Este processo de funcionalização é mais indicado em materiais com elevada porosidade, área e que sejam resistentes ao processo de funcionalização, que em alguns casos utilizam altas temperaturas (RAMANI et al., 2012; UYGUN et al., 2015).

Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo comparar a eficiência dos processos de imobilização da pepsina por adsorção e por formação de ligações covalentes em carvão ativado e empregar a enzima imobilizada na hidrólise da caseína bovina.

## **2. METODOLOGIA**

### **2.1. Funcionalização do carvão ativado**

Após a caracterização dos carvões obtidos e as análises estatísticas dos componentes principais (ACP) e correlação canônica (ACC), foi então selecionado o carvão ativado sintetizado a partir do blend da bainha da pupunha (CABLND), uma vez que, este carvão apresentou as melhores características, entre elas: maior diâmetro de poros e elevada área superficial, características favoráveis para a funcionalização.

A modificação da superfície foi feita utilizando o método do glutaraldeído sugerido por Ramani et al. (2012), com modificações. Primeiramente foi preparada uma solução de amina (2,5% v/v) através da mistura de 0,85 mL de etilenodiamina (99 % P.S - CAS: 107-15-3) em 32,5 mL de acetona (P.A - CAS: 67-64-1). Após o preparo da solução foi adicionado 10,0 g do carvão ativado seco, pesado em balança analítica (Mettler Toledo, modelo: ME204), deixando a mistura sob agitação manual por 10 min. Após este período o carvão foi deixado em repouso na solução por 24 h. Obtendo-se então o carvão com a superfície aminofuncionalizada.

Em seguida o carvão aminofuncionalizado foi ativado com o grupo aldeído por adição de glutaraldeído, de modo a facilitar a imobilização de enzima através de formação de ligações covalente. A solução de aldeído foi preparada por mistura de 33,5 mL de glutaraldeído (25%, P.S – CAS: 111-30-8) em 33,5 mL de acetona (P.A - CAS: 67-64-1) e, em seguida, a mistura foi adicionada ao carvão sob agitação suave durante 30 min utilizando um agitador magnético. O material foi seco a 150 °C durante 24 h. Após a evaporação do solvente o carvão funcionalizado foi lavado com água destilada para remover os produtos químicos não ligados e seco a 110 °C durante 6 h em estufa (TECNAL, modelo: 393/1). Em seguida o carvão funcionalizado (CFBLN) foi peneirado (40 mesh) e armazenado em recipiente hermético.

## **2.2. Caracterização dos Carvões**

### **2.2.1. Espectrofotometria de Absorção no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)**

Os grupos funcionais dos carvões ativados, antes e após a funcionalização, foram avaliados por FTIR. As amostras foram analisadas de forma direta utilizando a técnica de refletância total atenuada (ATR) na região infravermelha de 4000-500  $\text{cm}^{-1}$  em espectrofotômetro Agilent Cary 360 FTIR.

### **2.2.2. pH do ponto de carga zero ( $\text{pH}_{\text{PCZ}}$ )**

O pH do ponto de carga zero é definido como o pH em que a superfície do carvão possui carga neutra. A metodologia empregada para sua determinação é denominada “Experimento dos 11 Pontos” (REGALBUTO e ROBLES, 2004). O procedimento consistiu em colocar 50 mg da amostra em contato com 50,0 mL de soluções de cloreto de sódio (CAS: 7647-14-5) 0,10  $\text{mol.L}^{-1}$  em diferentes valores de pH (1-11) e deixá-los sobre agitação constante durante 24 h. O pH de cada solução foi ajustado com solução de ácido clorídrico 0,50  $\text{mol.L}^{-1}$  (CAS: 7647-01-0) ou hidróxido de sódio (CAS: 1310-73-2) 0,50  $\text{mol.L}^{-1}$ . Ao final de 24 h o pH foi medido e plotado o gráfico do pH final versus o pH inicial. O  $\text{pH}_{\text{PCZ}}$  corresponde à faixa onde o pH

final se mantém constante independentemente do pH inicial, ou seja, a superfície comporta-se como um tampão.

### **2.2.3. Medida de porosidade e área superficial específica**

As isotermas de adsorção e dessorção dos carvões ativados foram obtidas em um equipamento Micromeritics modelo ASAP 2420, utilizando aproximadamente 0,20 g de amostra. Antes das medidas as amostras foram submetidas a uma etapa de pré-tratamento que consistiu no aquecimento a 120 °C. Em seguida as amostras foram submetidas a uma evacuação a 30 °C por 30 min, seguida de um aquecimento com taxa de 10 °C.min<sup>-1</sup>, até 200 °C, permanecendo nesta temperatura por 300 min. Posteriormente foram obtidas isotermas de adsorção e dessorção de nitrogênio a 77 K. A área superficial específica foi determinada pela equação de BET (BRUNAUER, 1938). A distribuição de poros foi obtida a partir da isoterma de dessorção utilizando o método BJH (BARRET, 1951), enquanto que o volume dos microporos foi determinado pela análise t-plot a partir da isoterma de adsorção (LIPPENS, 1964).

## **2.3. Ensaios de imobilização da Pepsina**

### **2.3.1. Estudo da influência do método de imobilização**

Foram avaliados dois métodos de imobilização da pepsina (*Pepsin from porcine gastric mucosa*, Sigma; 87% de proteína, 3,200 - 4,500 U/mg, CAS: 9001-75-6): o método de adsorção; e o método de ligação covalente, utilizando o carvão ativado funcionalizado.

Em ambos os métodos de imobilização utilizou-se uma solução enzimática com concentração inicial de 2 mg.mL<sup>-1</sup> solubilizada em tampão ácido láctico/lactato de sódio 0,05 mol.L<sup>-1</sup> em pH 3,0, pois de acordo com Cirillo (2014) neste pH a pepsina apresenta sua máxima atividade de hidrólise. Alíquotas de 5,0 mL da solução enzimática foram adicionados em tubos contendo 0,1 g de cada suporte. Os tubos foram mantidos sob agitação constante (20 rpm) em um agitador orbital à temperatura ambiente (25 °C). Após 2 h os tubos foram centrifugados a 3500 rpm por 10 min, tendo seu sobrenadante totalmente retirado, para ser feita a quantificação de proteínas não adsorvidas utilizando o método de Bradford (1976). Em seguida foram feitas lavagens sucessivas nas amostras com a finalidade de remover as enzimas não imobilizadas. Para isto adicionou-se 5 mL do tampão (ácido láctico/lactato de sódio) as amostras, que foram deixadas sob agitação a 20 rpm por 10 min, seguidos de uma centrifugação a 3500 rpm por 10min, tendo novamente o sobrenadante retirado e quantificado. O equilíbrio do processo foi atingido quando os valores da concentração da solução sobrenadante foram nulos. A enzima

imobilizada nos suportes em estudo foi armazenada em solução tampão sob refrigeração a 4 °C até o momento da análise da sua atividade.

A partir da diferença entre a quantidade inicial e final de proteínas determinou-se a capacidade de imobilização de cada um dos carvões utilizando-se a Equação 1.

$$C_{Im} = \frac{V(C_{in} - C)}{m_S} \quad (1)$$

Em que:  $C_{Im}$  é a capacidade de imobilização ( $\text{mg.g}^{-1}$ );  $V$  é o volume de solução (mL);  $C_{in}$  concentração inicial da solução ( $\text{mg.L}^{-1}$ );  $C$  é a concentração da solução ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) no equilíbrio;  $m_S$  é a massa do suporte (g).

### 2.3.2. Determinação da atividade enzimática

A atividade enzimática, tanto para a enzima na sua forma livre quanto para as enzimas imobilizadas, foi determinada seguindo a metodologia descrita por Yu et al. (2014), com alterações, através da quantificação da concentração de tirosina produzida pela enzima após a hidrólise da caseína, proveniente do leite bovino. Para determinar a atividade da protease na sua forma livre, utilizou-se uma solução de 1,5% da caseína bovina (casein from bovine milk - CAS 9000-71-9) como substrato para a pepsina, preparada em tampão ácido láctico/lactato de sódio  $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$  em pH 3,0. Em um tubo de centrifuga 5 mL do substrato e 1 mL de solução enzimática foram incubadas a 37 °C durante os tempos de 10, 30 e 60 min, após este período, adicionou-se 2 mL de ácido tricloroacético (6,5%, m/v) para encerrar a reação, após a agitação dos tubos, os mesmos foram centrifugados a 6000 rpm durante 6 min a 4°C. Após esta etapa, retirou-se 1 mL do sobrenadante e misturou em uma solução de 5 mL de carbonato de sódio (4% m/v) e em 1 mL de solução de Folin-Ciocalteu (20%, v/v), a mistura ficou a uma temperatura de 37°C durante 20 min, em seguida foi feita sua leitura de absorvância em espectrofotômetro (UV-Vis Quimis) a 660 nm.

Para a determinação da atividade da enzima na forma imobilizada, seguiu-se a metodologia anterior com pequenas modificações. Foram adicionados 5 mL da solução de caseína (1,5% m/v) nos tubos de centrifuga contendo 100 mg dos biocatalisadores. Os mesmos foram encubados a 37°C por tempo pré determinado anteriormente, após esta etapa foram submetidos a uma centrifugação (3000 rpm/3min), em seguida todo o sobrenadante foi transferido para outro tubo de centrífuga contendo 2 mL de ácido tricloroacético (6,5%, m/v), sendo estes agitados e centrifugados a 6000 rpm durante 6 min a 4°C. Após esta etapa, retirou-se 1 mL do sobrenadante e adicionou a 5 mL de uma solução de carbonato de sódio (4% m/v) e 1 mL de solução de Folin-Ciocalteu (20%, v/v), a mistura ficou a uma temperatura de 37°C

durante 20 min, sendo feita a leitura em 660nm. Uma unidade de atividade de protease foi definida como 100 µg de equivalente de tirosina liberado pela enzima.

### **2.3.3. Reutilização dos biocatalisadores**

Após a escolha do tempo de hidrólise com maior atividade das enzimas imobilizadas, neste estudo, foram feitos ciclos de reutilização da mesma com a finalidade de observar se as enzimas manteriam sua atividade por 4 ciclos de hidrólise. Para isto seguiu-se a metodologia descrita no item 2.3.2, para a enzima imobilizada. Sendo que após cada ciclo de hidrólise foram adicionados 5 ml do tampão ácido láctico/lactato de sódio 0,05 mol.L<sup>-1</sup> em pH 3,0 nos tubos contendo os biocatalisadores, os quais passaram por um processo de agitação (20rpm/5min) e centrifugação (3000 rpm/3min), para retirar quaisquer resíduos de caseína presente no meio, deixando os biocatalisadores aptos para uma nova hidrólise.

## **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **3.1. Caracterização do material precursor**

O resíduo obtido da bainha de pupunha apresentou teores de celulose de 47,29 %, lignina 12,72 %, hemicelulose 12,29 %, relação entre os teores de celulose e lignina de 4,64 % e cinzas de 4,49 %. A composição química do resíduo tem influência direta no rendimento do processo de síntese do carvão ativado, assim como nas suas características físico-químicas. Antal e Mok (1990) afirmaram que o rendimento do carvão ativado está relacionado com a variação dos teores de lignina, hemicelulose, celulose e extrativos da biomassa, sendo que as espécies com alto teores de lignina levariam à maiores rendimentos e materiais com teores mais elevados de materiais inorgânicos levariam a baixos rendimentos, devido à redução de compostos carbonáceos na sua estrutura. Fujishige et al. (2017), que estudaram a obtenção de carvão ativado a partir de resíduos de bambu, relataram que materiais com altos teores de celuloses levaram a carvões com maiores valores de área superficial.

### **3.2. Rendimento do processo de síntese e caracterização do carvão ativado**

O processo de síntese de carvão a partir da bainha de pupunha levou a um rendimento em carvão ativado de 37,78 %, que está relacionado aos componentes lignocelulósica do material precursor. Uma vez que a bainha de pupunha apresenta um alto teor (72,23 %) destes compostos em sua estrutura, o rendimento em carvão é elevado devido a ordem sistemática de quebras durante o processo de carbonização: hemicelulose (200-280 °C), celulose (260-350 °C) e a lignina (280-500°C), respectivamente (JAIN & TRIPATHI, 2014).

Segundo Yahya et al. (2015) rendimentos de síntese elevados, além de estarem relacionados ao componente lignocelulósicos, estão relacionados ao tipo de ativação e ao agente ativante utilizado. A ativação química utilizando ácido fosfórico apresenta rendimentos mais elevados, já que o ácido promove a despolimerização, desidratação e redistribuição dos biopolímeros constituintes, favorecendo também a conversão de compostos alifáticos em compostos aromáticos. Além disso, o mesmo interage com a biomassa formando as ligações de fosfato entre os fragmentos presentes na biomassa, aumentando assim o rendimento final do processo. Entre as etapas reacionais promovidos pelo ácido fosfórico, tem-se como destaque as reações de clivagem de ligações do constituinte dos biopolímeros e a formação de novo grupos fosfato, propiciando ligações cruzadas dentro da estrutura precursora, gerando uma matriz interna que restringe o encolhimento dos materiais precursores e as perdas de material volátil durante o aquecimento (BRITO et al., 2017).

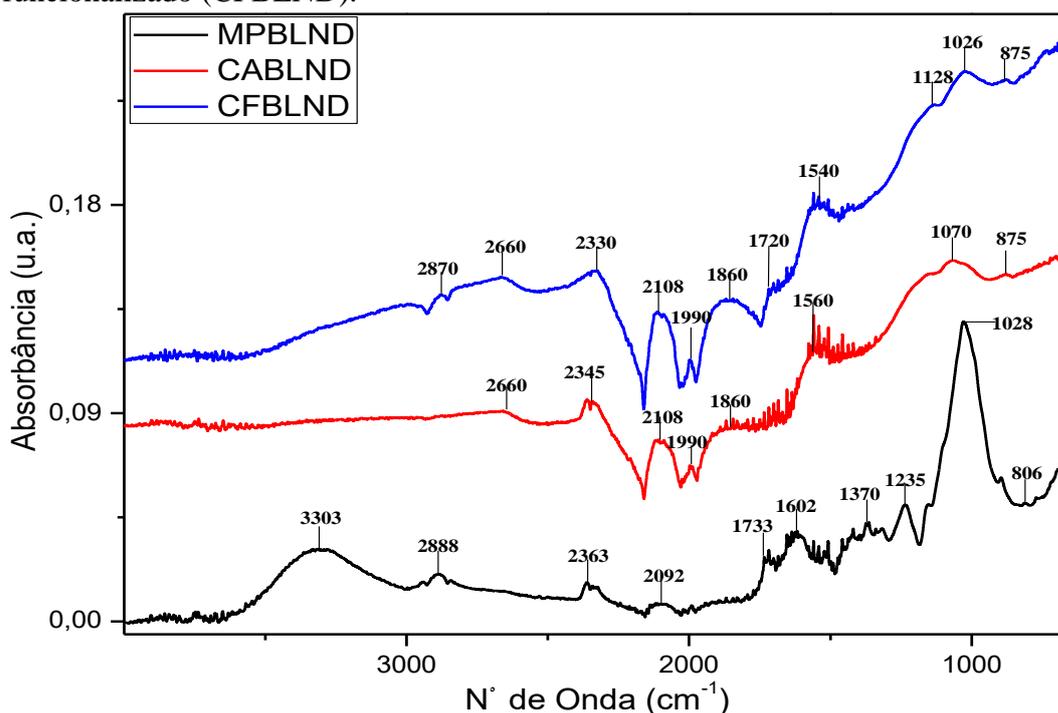
Com relação ao teor de cinzas, o carvão ativado apresentou um valor de 8,8 %. De acordo com Mahamad et al. (2015) o teor de cinzas do carvão ativado deve variar entre 1,0 % a 12 %, sendo composto principalmente por aditivos minerais não carbônicos, provenientes do material precursor, além de componentes derivados dos agentes ativantes, que podem ficar retidos, ou ligados ao material carbonáceo após o processo de pirólise, não sendo lixiviados no processo de lavagem. Teores mais elevados são indesejáveis nos carvões ativados, por prejudicar, por exemplo, o processo de adsorção, propiciando uma maior hidrofobicidade nos carvões.

### **3.3. Espectrofotometria de Absorção no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)**

Analisando o espectro de FTIR (Figura 1) pode-se observar as mudanças ocorridas no material precursor quando submetido ao processo de ativação e no carvão ativado obtido após a etapa de funcionalização.

Analisando as bandas do espectro para o material precursor (Tabela 1), observa-se, que como esperado, o material precursor (*in natura*) apresenta diversos grupos funcionais como ésteres, éteres, álcoois, aldeídos, cetonas, fenóis e ácidos carboxílicos, característicos dos materiais lignocelulósicos (PEREIRA et al., 2014; KAN et al., 2017; SUN et al., 2016). Sendo os comprimentos de onda característicos dos compostos lignocelulósica do material: pico em  $3303\text{ cm}^{-1}$ , atribuído ao estiramento das vibrações características do grupo hidroxila (-OH); e  $1028\text{ cm}^{-1}$ , referente aos estiramentos do grupo C-O, das estruturas de lignina, ceulose e hemicelulose.

**Figura 1.** FTIR do material precursor (MPBLND), do carvão ativado (CABLND) e do carvão funcionalizado (CFBLND).



Após o processo de ativação química e carbonização o carvão ativado apresentou a redução de diversos grupos de maior intensidade em relação ao material precursor, principalmente aqueles referentes a composição lignocelulósica, cujos picos estavam relacionados com os grupos: O-H, CH<sub>3</sub>O, C-H, C=O, C-C e C-O, devido a decomposição da matéria orgânica presente no precursor, e formação de novos grupos (Figura 1). Dentre os picos identificados pode-se destacar os centrados nos comprimentos de onda: 1860 cm<sup>-1</sup> e 1560 cm<sup>-1</sup>, referentes ao alongamento C=O e C=C presentes em matérias carbonáceas; e em 1070 cm<sup>-1</sup>, que pode ser atribuído as ligações de ésteres de fosfatos, causado pela ativação química com ácido fosfórico, que também estão relacionadas ao aumento do teor de cinzas e rendimentos dos materiais, já que o ácido promove a despolimerização, desidratação e redistribuição dos biopolímeros constituintes, favorecendo também a conversão de compostos alifáticos em compostos aromáticos, além de interagir com a biomassa formando as ligações de fosfato entre os fragmentos presentes na biomassa, aumentando o teor de materiais inorgânicos (PRAHAS et al., 2008; PEREIRA *et al.*, 2014; LIU et al., 2018).

Comparado os espectros obtidos para o carvão ativado (CABLND) e o funcionalizado (CFBLND), observa-se um aumento da intensidade dos picos formados anteriormente e a formação de novos grupos na superfície. Entre os novos grupos formados destacam-se os localizados nos comprimentos de ondas de 1720 cm<sup>-1</sup>, referente as vibrações do grupo aldeído (C=O) e 1128 cm<sup>-1</sup>, que pode estar associado ao grupo amina (C-N) oriundos dos compostos

utilizados no processo de funcionalização, mostrando assim que ocorreu a modificação química da superfície do carvão ativado, através do método do glutaraldeído, originando assim o carvão funcionalizado (RAMANI et al., 2012; SEGNEANU *et al.*, 2012).

**Tabela 1.** Atribuição das bandas apresentadas nos espectros FTIR para o material precursor e carvões ativados.

Nº onda (cm <sup>-1</sup> )	Atribuição
3303	Hidroxila (-OH) pertencente à estrutura de celulose;
2888	Grupo -C-H;
2660	Característica da banda do grupo metilo (C-H);
2345	Atribuída ao grupo metil (C-H);
2108	Estiramento do grupo carbono-oxigênio, derivados do grupo cetona;
1990	Estiramento de grupos simétricos e assimétricos para o ácido carboxílico derivado de anidridos (C=O; C-O-C);
1860	Alongamento das vibrações do grupo carbonila (C=O);
1733	As vibrações C=O das cetonas, aldeídos, lactonas ou grupos carboxílicos;
1602	Atribuídos ao C=O no carboximetil celulose;
1560	Alongamento C=O e C=C, comuns em superfícies de carbono;
1370	Observam-se as ligações C-H do grupo do acetil (CH <sub>3</sub> );
1235	Vibração dos anéis guaiacílicos;
1070	Pode ser atribuído a ligação iônica P <sup>+</sup> -O <sup>-</sup> em ésteres de fosfato; Vibração simétrica na cadeia de P-O-P;
1028	Estiramentos do grupo C-O ou C-O-C da Lignina, celulose e hemicelulose;
875	Corresponde ao grupo C-H fora do plano em -CHO aldeídos, compostos de piranose e outros derivados de benzeno;
806	Deformação de C-H para diferentes derivados de anéis de benzeno;

### 3.4. pH do Ponto de Carga Zero (pH<sub>PCZ</sub>)

A carga superficial dos carvões sintetizados foi avaliada pela determinação do pH de ponto de carga zero (pH<sub>PCZ</sub>). Os resultados demonstraram que os carvões apresentaram ponto de carga zero em pH 5,81 e pH 5,32, para o CABLND e CFBLND, respectivamente. O ponto de carga zero é definido como o pH em que a superfície do carvão apresenta uma carga neutra, ou seja, é a condição quando a densidade de cargas elétricas numa superfície é zero, e foi determinado para os carvões com o objetivo de verificar as faixas de valores de pH onde as cargas da superfície do carvão variam de positiva para negativa. Portanto, quando o material entra em contato com uma solução com pH inferior ao pH<sub>pcz</sub> a superfície do carvão é carregada positivamente, gerando uma maior eficiência adsortiva para remoção de materiais aniônicos. Quando a solução apresenta valor superior ao do pH<sub>pcz</sub>, a superfície é carregada negativamente, adsorvendo preferencialmente compostos catiônicos (BRITO et al., 2017). De acordo com

Yuso et al. (2014), o  $pH_{PCZ}$  dos carvões está diretamente relacionado com o tipo de agente ativante, temperatura de carbonização e atmosfera empregados na síntese.

Os carvões produzidos apresentaram sua neutralidade em valores de pH inferiores a 7,0, isso ocorreu devido a utilização do ácido fosfórico, como agente ativante. Observa-se ainda que o processo de funcionalização foi responsável por propiciar uma redução branda no  $pH_{pcz}$ , que pode estar associada ao grupo aldeído (C=O), e ao alongamento do grupo carbonila em  $1860\text{ cm}^{-1}$ , conforme demonstrado no espectro do FTIR, que apresentam caráter ácido, responsáveis pelas alterações no  $pH_{pcz}$ .

### 3.5. Medida de porosidade e área superficial específica

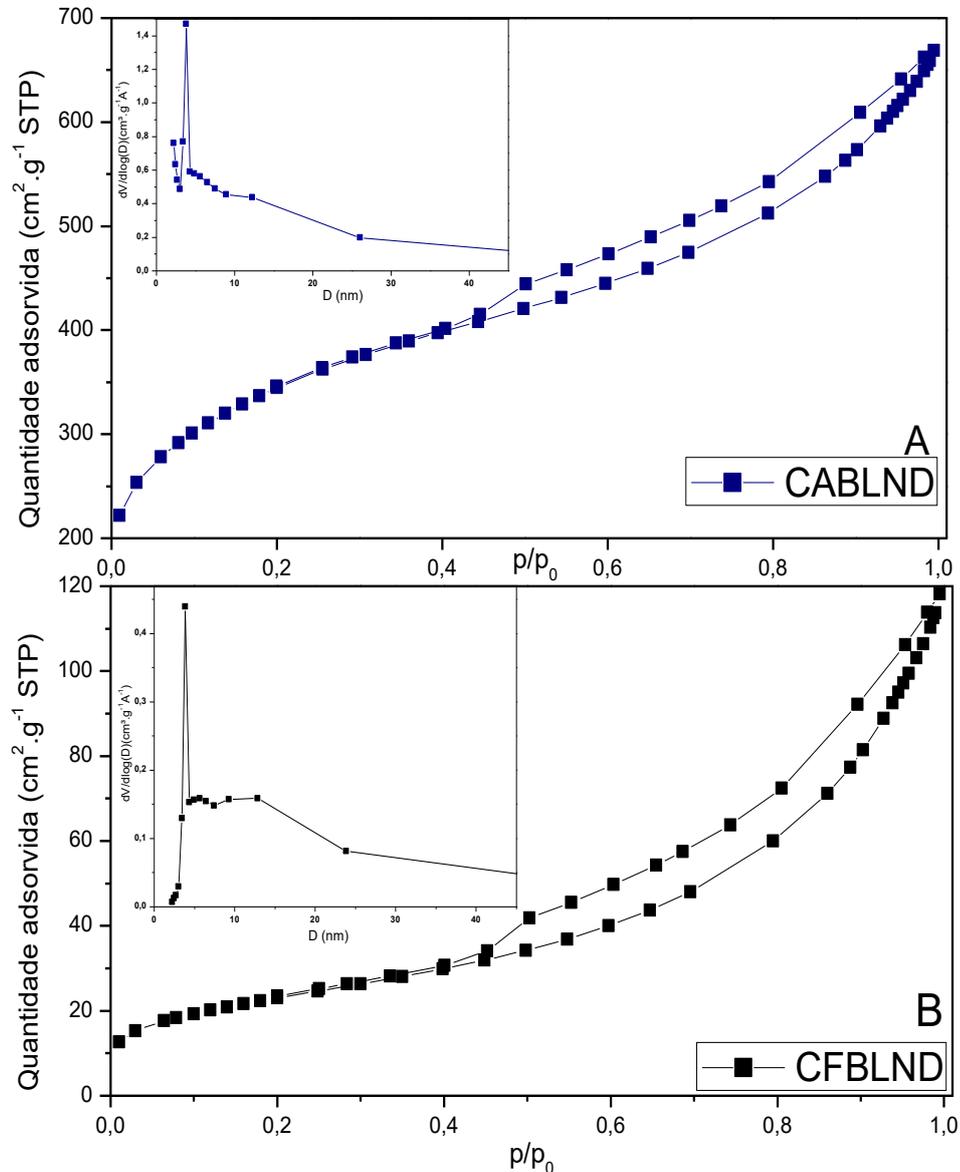
As isotermas de adsorção/dessorção de nitrogênio para o carvão ativado e funcionalizado estão apresentadas na Figura 2. De acordo com a forma, e em conformidade com a classificação IUPAC (1982), as isotermas de adsorção/dessorção neste estudo podem ser classificadas como isotermas do tipo IV, característica de materiais mesoporosos. Tal isoterma exibe uma região, na qual com uma pequena variação da pressão relativa ao volume adsorvido aumenta bruscamente. Este comportamento está associado com o processo secundário de condensação capilar, provocando o loop de histerese, ou seja, as curvas de adsorção são diferentes das curvas de dessorção, não existindo a reversibilidade no processo, trazendo como resultado o preenchimento completo dos mesoporos em pressão relativa menor que 1 ( $p/p_0$ ), de modo que quanto menor sua inclinação mais homogênea é a distribuição de tamanho de poros.

Conforme classificação revisada de Sing et al. (1985) a histerese Tipo I é frequentemente associado a materiais porosos que consistem em aglomerados ou compactados de estrutura regular com distribuição estreita de tamanho de poros, apresentando uma curva de histerese mais próxima da curva de adsorção, tais como observado para todos os carvões sintetizados.

Analisando a distribuição dos poros nos carvões obtidos (Figura 2), pode-se observar a redução do volume de poros do carvão funcionalizado em relação ao carvão não funcionalizado, principalmente na faixa de 0 a 5 nm. Ainda com relação a distribuição de poros do CABLND, observa-se um maior volume de poros entre 4 e 6 nm e uma tendência de formação de poros menores que 2 nm, fazendo com que o material seja classificado como micro-mesoporoso. Já para o CFBLND, observa-se que além da redução deste volume de poros o mesmo não apresenta tendência a formação de microporos, apresentando apenas mesoporos em sua superfície. Ramani et al. (2012) ao estudarem a funcionalização de carvões ativados observaram que após o processo de funcionalização os mesmos apresentaram uma redução bastante elevada

da sua área superficial, em consequência da obstrução dos poros do material, causados pelos braços espaçadores amino-aldeídos (Am-Al), dispostos no material.

**Figura 2.** Isotermas de adsorção do nitrogênio e distribuição de poros do carvão ativado (CABLND) (A) e do carvão funcionalizado (CFBLND) (B).



Na Tabela 2 são apresentados os resultados das propriedades texturais dos carvões. Observa-se que, o carvão não funcionalizado (CABLND), apresentou em sua estrutura um alto diâmetro de poros e elevada área superficial, características estas, de carvões sintetizados a partir de materiais precursores com altos teores de celulose e baixos valores de lignina em sua composição. Devido a celulose não apresentar alta resistência durante a pirólise, aumentado assim a formação e o diâmetro de poros. Observa-se ainda, que após a funcionalização o mesmo teve uma redução acentuada da sua área superficial, confirmado assim que foi possível a inserção dos braços espaçadores. Essa redução da área superficial está relacionada com o volume dos micros e mesoporos no material. Após a funcionalização os micros e mesoporos do

carvão ativado foram obstruídos pelos braços espaçadores. Como consequência da obstrução destes poros e a inserção dos braços espaçadores, observou um aumento no seu diâmetro de poros, podendo estar relacionado com a distância entres os espaçadores inseridos. Comparando os resultados da área superficial com as isotermas, observa-se que devido a menor área superficial o carvão funcionalizado adsorveu uma menor quantidade de N<sub>2</sub>, ficando em torno de 120 cm<sup>2</sup>.g, enquanto o carvão ativado teve uma maior capacidade de adsorção, cerca de 650 cm<sup>2</sup>.g., devido à sua maior área superficial.

**Tabela 2.** Propriedades texturais do carvão ativado (CABLND) e funcionalizado (CFBLND).

Amostra	Sg (m <sup>2</sup> /g)	Dp (nm) <sup>a</sup>	V <sub>meso</sub> (cm <sup>3</sup> /g)	V <sub>micro</sub> (cm <sup>3</sup> /g)
CABLND	1226	5,32	0,688	0,1320
CFBLND	84	7,58	0,180	0,0000

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

### 3.6. Influência do método de imobilização na atividade da Pepsina

Para avaliar a influência do método de imobilização duas técnicas de imobilização da pepsina foram avaliadas. A primeira por adsorção, utilizando o carvão ativado, e a segunda por ligação covalente, utilizando o carvão funcionalizado. Após a imobilização foram feitas sucessivas lavagens com intuito de remover as enzimas não ligadas (Tabela 3), sendo possível observar que durante as lavagens ocorreu pouca remoção destas enzimas, principalmente da enzima imobilizada por ligação covalente, que requereu menos etapas de lavagens, devido a maior força de ligação associada ao processo de imobilização.

Analisando a capacidade de imobilização de ambos os materiais (Tabela 3), observa-se que para os dois carvões em estudo, foi possível obter uma elevada capacidade de imobilização.

**Tabela 3.** Massa de Enzima Ligada (M<sub>Lig</sub>), Capacidade de Imobilização (C<sub>Im</sub>) e Eficiência de imobilização (Efic) da Pepsina por adsorção (CABLND) e por ligação covalente (CFBLND).

Amostra	M <sub>Lig</sub> (mg)	C <sub>Im</sub> (mg/g)	Efic (%)
CABLND	9,61	93,47 ± 0,41	93,61%
CFBLND	9,68	94,83 ± 1,04	94,93%

A alta capacidade de imobilização do carvão ativado, está relacionado com sua porosidade e diâmetro de poros, uma vez que a enzima em estudo tem baixa massa molecular (35 kDa), o que facilitou a imobilização por adsorção. Outro fator que pode ter levado à alta eficiência por adsorção foi o pH em estudo, já que os processos de imobilização por adsorção são sujeitos a interferência deste parâmetro. O pH determina a carga líquida da proteína,

determinando assim as contribuições das interações eletrostáticas sobre a interação enzima/carvão ativado associado ao processo da adsorção. O CABLND apresentou um  $pH_{PCZ}$  próximo de 6,0, enquanto que a pepsina possui ponto isoelétrico (pI) próximo 1,0 (VOET e VOET, 2011). Em valores de pH acima do pI a enzima apresenta maior densidade de cargas negativas em sua superfície, e quando estiver em soluções com pH abaixo do seu ponto isoelétrico, sua superfície irá apresentar um maior número de cargas positivas, bem como ocorre com o carvão ativado quando se encontra em meios com pH abaixo ou acima do seu ponto de carga zero. Como a imobilização foi conduzida em meio ácido (pH 3,0), a superfície do carvão apresentou cargas superficiais positivas enquanto que a enzima apresentou cargas negativas em sua superfície, favorecendo o processo de imobilização, através da atração de cargas opostas, podendo destacar que a interação tenha sido governada por interações eletrostáticas.

Assim como o carvão ativado, o carvão funcionalizado apresentou elevada eficiência no processo de imobilização, de modo que a modificação da superfície, através da incorporação dos grupos reativos, tais como o grupo amina e aldeído, foram responsáveis por facilitar a interação covalente entre a enzima e o suporte. Observa-se ainda que o CFBLND não apresenta microporos em sua estrutura, além de apresentar baixo volume de mesoporos e área superficial, porém o mesmo apresentou uma alta capacidade de imobilização, comprovando assim que a imobilização realizada se deu preferencialmente através das ligações covalente, entre os braços espaçadores. Saranya, Ranjitha e Sekaran (2015) concluíram que suportes ativados com glutaraldeído são responsáveis por propiciar uma imobilização de forma mais rápida, devido a afinidade dos grupos de superfície da enzima e os grupos aldeídos no suporte, formando assim uma ligação covalente entre eles.

### **3.7. Atividade da Pepsina**

Os resultados da atividade da enzima para diferentes tempos de hidrólise, tanto na sua forma livre em solução, quanto imobilizada nos carvões, podem ser observados na Tabela 4.

A enzima na sua forma livre apresentou maiores valores de atividade, permanecendo praticamente constante com o tempo, pois quando em solução a enzima tem uma maior mobilidade facilitando o contato com todo o substrato. As enzimas imobilizadas apresentaram um aumento da sua atividade com o aumento do tempo de hidrólise. Quando a enzima se encontra na forma imobilizada, o substrato deve ser transferido (por convecção e/ou por difusão) do seio da solução até os sítios catalíticos, devendo, por conseguinte, atravessar um filme líquido estacionário que envolve a superfície do suporte e, se este é poroso, o substrato deve difundir-se nos poros até alcançar o sítio ativo das enzimas. Como consequência, os mecanismos difusionais irão governar a transferência de massa. Porém os mesmos podem ser

minimizados tanto pelo aumento da agitação, quanto pelo aumento do tempo de contato do substrato com o biocatalisador, como observado.

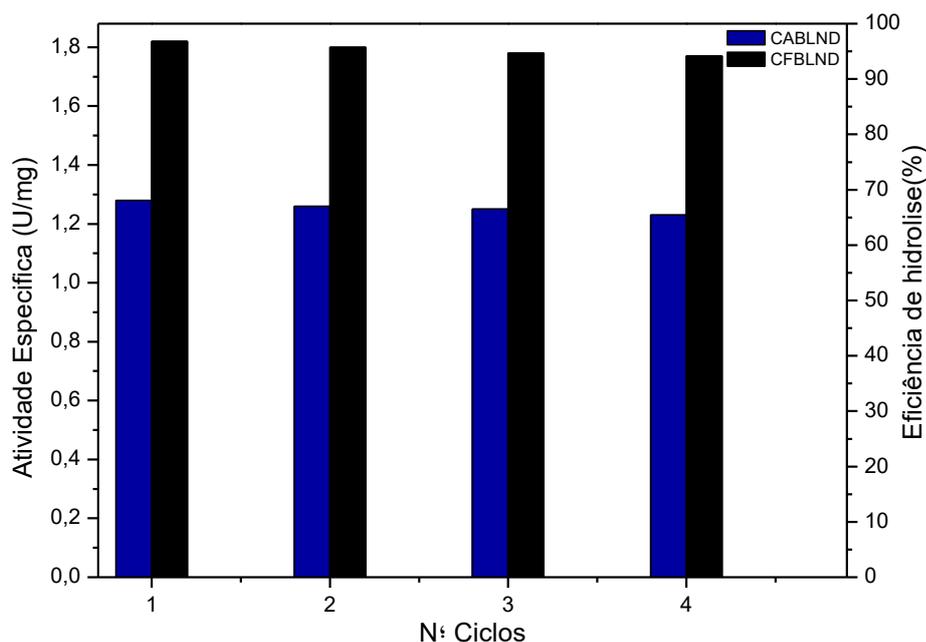
**Tabela 4.** Atividade específica da Pepsina na forma nativa e imobilizada por adsorção (CABLND) ou por ligação covalente (CFBLND) em função do tempo.

Amostra	Atividade Específica (U/mg)		
	10 min	30 min	60 min
<b>Pepsina (em solução)</b>	1,85 ± 0,04	2,02 ± 0,001	1,95 ± 0,005
<b>Pepsina Imobilizada</b>			
<b>CABLND</b>	0,36 ± 0,11	0,96 ± 0,008	1,26 ± 0,005
<b>CFBLND</b>	0,63 ± 0,13	1,16 ± 0,004	1,78 ± 0,002

A atividade proteolítica para as enzimas imobilizadas no tempo de 10 min foi muito inferior à da enzima na forma livre, sendo que a atividade da enzima imobilizada por ligação covalente foi aproximadamente 2 vezes maior que a da enzima imobilizada por adsorção. Este comportamento pode ser explicado pelo fato de que as enzimas imobilizadas no carvão funcionalizado se encontram na superfície do suporte, ligadas pelos braços espaçadores, deixando o seu sítio catalítico mais disponível, facilitando seu acesso ao substrato. Já na imobilização por adsorção as enzimas ficam confinadas no interior dos poros e na superfície, dificultando o contato com as moléculas do substrato. Com o aumento do tempo de hidrólise observa-se um aumento da atividade das enzimas imobilizadas, sendo que no tempo de 60 min, a atividade da enzima imobilizada por ligação covalente alcançou valores superiores a enzima imobilizada por adsorção, e valores próximos ao da enzima livre. Desta forma, comprova-se que o método de imobilização por ligação covalente foi o mais eficiente.

Os resultados da atividade em diferentes ciclos de reutilização (Figura 3) mostram que a perda de atividade para a enzima imobilizada ao longo dos ciclos por ligação covalente foi reduzida, pois as enzimas estão ligadas de forma mais forte, não tendo perdas por lixiviação, além de manterem a mesma atividade hidrolítica por mais de 4 ciclos, de modo que sua atividade hidrolítica foi de aproximadamente 95 % da atividade da enzima na forma livre, no tempo de 60 min, e levando em consideração a possibilidade de reutilização do biocatalisador, os custos de produção da enzima imobilizada podem ser compensados por longo período uso e reutilização (CIRILLO et al., 2014).

**Figura 3.** Atividade enzimática para os ciclos de reutilização da Pepsina imobilizada por adsorção (CABLND) e por ligação covalente (CFBLND) no tempo de 60 min.



#### 4. CONCLUSÕES

Observou-se que o resíduo da pupunha apresentou grande potencial para ser utilizado como material precursor de carbono na produção de carvão ativado, pois o carvão produzido apresentou uma elevada área superficial e diâmetro e volume de poros, devido ao seu alto conteúdo de celulose. A funcionalização do carvão ativado, pelo método do glutaraldeído, propiciou a modificação da superfície do carvão ativado pela inserção de grupos amina-aldeído, os quais foram confirmados na superfície do carvão, através do FTIR, observados também através da redução da porosidade e área superficial do material de origem.

Observou-se ainda, que tanto o carvão ativado quanto o carvão funcionalizado, apresentaram alta capacidade de imobilização, mas em relação a atividade proteolítica, a pepsina imobilizada por ligação covalente apresentou maior atividade que a imobilizada por adsorção. Indicando assim que a imobilização por ligação covalente nas condições do estudo foi mais eficiente que a imobilização por adsorção. Com o aumento do tempo de contato dos biocatalisadores com a solução de caseína, ocorreu um aumento na atividade dos mesmos, sendo que a imobilização por ligação covalente apresentou valores próximos aos da enzima livre. Desta forma, o carvão funcionalizado pode ser considerado como um suporte em potencial para imobilização de enzimas, podendo o biocatalisador obtido ser reutilizada por mais de 4 vezes, sem perdas significativas de atividade, apresentando potencial para ser empregado em ampla gama de processos industriais.

## 5. REFERÊNCIAS

- AHN-JARVIS, J.H., TEEGARDEN, M.D., SCHWARTZ, S.J., LEE, K., VODOVOTZ, Y., Modulating conversion of isoflavone glycosides to aglycones using crude beta-glycosidase extracts from almonds and processed soy. **Food Chemistry**. V. 237, p. 685-692, 2017.
- ANTAL, M.J., MOK, W.S.L. Review of Methods for Improving the Yield of Charcoal from Biomass. *Energy e fuels an american chemical society journal*. v. 4, n. 3, p. 0-4, 1990.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemistry). **Official methods of analysis**. 16<sup>ed</sup>. Arlington: AOAC International, 1995.
- BARRET, E. P., JOYNER, L. G., HALENDA, P. P., The determination of pore volume and area distributions in porous substances. I. Computations from nitrogen isotherms, **Journal of The American Chemical Society**, v.73, 373-380, 1951.
- BRADFORD, M. M. A. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BRITO, M.J.P., VELOSO, C.M., BONOMO, R.C.F., FONTAN, R. DA C.I., SANTOS, L.S. and MONTEIRO, K.A. Activated carbons preparation from yellow mombin fruit stones for lipase immobilization, **Fuel Processing Technology**. V. 156, P. 421–428, 2017.
- BRUNAUER, S., EMMET, P. H., TELLER, E., Adsorption of Gases in multimolecular layers, *Journal of The American Chemical Society*, v.60, 309-319, 1938.
- CIRILLO, G., NICOLETTA, F. P., CURCIO, M., SPIZZIRRI, U. G., PICCI, N., and IEMMA, F. Enzyme immobilization on smart polymers: Catalysis on demand. **Reactive and Functional Polymers**, v. 83, p. 62–69, 2014.
- DATTA, R.; ANAND, S.; MOULICK, A.; BARANIYA, D.; PATHAN, S.I.; REJSEK, K.; VARNOVA, V.; SHARMA, M.; SHARMA, D.; KELKAR, A.; How enzymes are adsorbed on soil solid phase and factors limiting its activity: A Review. **Int. Agrophys**. v. 31, p. 287–302, 2017.
- FUJISHIGE, M., YOSHIDA, I., TOYA, Y., BANBA, Y., OSHIDA, K., TANAKA, Y., DULYASEREE, P., WONGWIRIYAPAN, W., AND TAKEUCHI, K. Preparation of Activated Carbon from Bamboo-Cellulose Fiber and Its Use for EDLC Electrode Material. **Biochemical Pharmacology**. v. 5, n. 2, p. 1801-1808, 2017.
- İSPIRLI-DOĞAÇ, Y., DEVECI, İ., MERCİMEK, B., & TEKE, M. A comparative study for lipase immobilization onto alginate based composite electrospun nanofibers with effective and enhanced stability. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 96, p. 302–311, 2017.

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

JAIN, A. and TRIPATHI, S. K. Fabrication and characterization of energy storing supercapacitor devices using coconut shell based activated charcoal electrode, **Materials Science and Engineering B: Solid-State Materials for Advanced Technology**. V. 183(n. 1), P. 54–60, 2014.

KAN, Y., YUE, Q., LI, D., WU, Y., & GAO, B. Preparation and characterization of activated carbons from waste tea by  $H_3PO_4$  activation in different atmospheres for oxytetracycline removal. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 71, p. 494–500, 2017.

KHOABI, M.; MOTEVALIZADEH, S.F.; ASADGOL, Z.; FOROOTANFAR, H.; SHAFIEE, H.; FARAMARZI, M.A. Synthesis of functionalized polyethylenimine-grafted mesoporous silica spheres and the effect of side arms on lipase immobilization and application. **Biochemical Engineering Journal**, v.88, p.131–141, 2014.

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

LIU, X., HE, C., YU, X., BAI, Y., YE, L., WANG, B., & ZHANG, L. Net-like porous activated carbon materials from shrimp shell by solution-processed carbonization and  $H_3PO_4$  activation for methylene blue adsorption. **Powder Technology**, v. 326, p. 181-189, 2018.

MAHAMAD, M.N.; ZAINI, M.A.A.; ZAKARIA, Z.A. Preparation and characterization of activated carbon from pineapple waste biomass for dye removal. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v.102, p.274-280, 2015.

NONGONIERMA, A.B., O'KEEFFE, M.B., FITZGERALD, R.J. Milk protein hydrolysates and bioactive peptides. In: Sweeney MC, O'Mahony JA, editors. *Advanced dairy chemistry 1b: proteins*. 4th ed. New York (NY): Springer. p. 417–482, 2016.

PEREIRA, R. G., VELOSO, C. M., DA SILVA, N. M., DE SOUSA, L. F., BONOMO, R. C. F., DE SOUZA, A. O., DA GUARDA, M. O & FONTAN, R. D. C. I. Preparation of activated carbons from cocoa shells and siriguela seeds using  $H_3PO_4$  and  $ZnCl_2$  as activating agents for BSA and  $\alpha$ -lactalbumin adsorption. **Fuel Processing Technology**, 126, 476-486. 2014.

PRAHAS, D., KARTIKA, Y., INDRASWATI, N., and ISMADJI, S. Activated Carbon from Jackfruit Peel Waste by  $H_3PO_4$  Chemical Activation: Pore Structure and Surface Chemistry Characterization, **Chemical Engineering Journal**, v. 140, p.32–42, 2008.

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

- REGALBUTO, J. R.; ROBLES, J. **The engineering of Pt/Carbon Catalyst Preparation**, University of Illinois: Chicago, 2004.
- SARANYA, P., RANJITHA, S. and SEKARAN, G. Immobilization of thermotolerant intracellular enzymes on functionalized nanoporous activated carbon and application to degradation of an endocrine disruptor: kinetics, isotherm and thermodynamics studies. **The Royal Society of Chemistry**. V. 5, p. 66239–66259, 2015.
- SEGNEANU A.E., GOZESCU I., DABICI A., SFIRLOAGA P., SZABADAI Z. Organic Compounds FT-IR Spectroscopy. In Macro To Nano Spectroscopy, J. UDDIN (Ed.), **InTech**, v. 145, 2012.
- SHUAI, W., DAS, R.K., NAGHDI, M., BRAR, S.K., VERMA, M. A review on the important aspects of lipase immobilization on nanomaterials. **Biotech. Appl. Biochem.** V. 64, p. 496-508, 2017.
- SING, K.S.W., EVERETT, D.H., HAUL, R.A.W., MOSCOU, L., PIEROTTI, R.A., ROUQUEROL, J., SIEMIENIEWSKA, T. Reporting Physisorption Data For Gas/Solid Systems With Special Reference to the Determination of Surface Area And Porosity. **Pure and Applied Chemistry**. v. 57. ed. 4, p. 603-619, 1985.
- SUN, Y., LI, H., LI, G., GAO, B., YUE, Q., & LI, X. Characterization and ciprofloxacin adsorption properties of activated carbons prepared from biomass wastes by H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> activation. **Bioresource Technology**, v. 217, p. 239–244, 2016.
- UYGUN, M.; UYGUN, D. A.; Ö ÇALIŞKAN, E.; AKGÖL, S.; DENI LI, A. Concanavalin A immobilized poly(ethylene glycol dimethacrylate) based affinity cryogel matrix and usability of invertase immobilization. **Journal of Chromatography B**, v. 887–888, p. 73-78, 2015.
- VAN SOEST, P.J., ROBERTSON, J.B., LEWIS, B.A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. **Journal of Dairy Science**. V. 74, p. 3583–3597, 1991.
- VOET, D., VOET, J. *Biochemistry*. 4th ed. Hoboken, NJ: John Wiley and Sons; p. 134, 2011.
- YAHYA, M. A., AL-QODAH, Z., & NGAH, C. W. Z. Agricultural bio-waste materials as potential sustainable precursors used for activated carbon production: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 46, p. 218–235, 2015.
- YU, Z. L., ZENG, W. C., ZHANG, W. H., LIAO, X. P., & SHI, B. Effect of ultrasound on the activity and conformation of  $\alpha$ -amylase, papain and pepsin. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 21, 3<sup>ed</sup>, p. 930–936, 2014.
- YUSO, A.M., RUBIO, B. AND IZQUIERDO, M. T. Influence of activation atmosphere used in the chemical activation of almond shell on the characteristics and adsorption performance of activated carbons, **Fuel Processing Technology**. V. 119, P. 74–80, 2014.