



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS
Área de Concentração: Engenharia de Alimentos

**IMOBILIZAÇÃO DE LACASE EM CARVÃO ATIVADO OBTIDO A PARTIR DE RESÍDUO DE
SABUGO DE MILHO SUBMETIDO AO TRATAMENTO HIDROTÉRMICO**

Autor (a): Jéssica Ferreira Borges
Orientadora: Prof.^a Dr.^a Cristiane Martins Veloso

ITAPETINGA – BA
FEVEREIRO- 2022

JÉSSICA FERREIRA BORGES

**IMOBILIZAÇÃO DE LACASE EM CARVÃO ATIVADO OBTIDO A PARTIR DE RESÍDUO DE
SABUGO DE MILHO SUBMETIDO AO TRATAMENTO HIDROTERMICO**

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.^a Dr.^a Cristiane Martins Veloso

CO-ORIENTADORES: Prof.^o Dr. Leandro Soares Santos

Prof.^a Dr.^a Renata Cristina Bonomo

**ITAPETINGA- BA
FEVEREIRO - 2022**

660.634

B732i Borges, Jéssica Ferreira

Imobilização de lacase em carvão ativado obtido a partir de resíduo de sabugo de milho submetido ao tratamento hidrotérmico. / Jéssica Ferreira Borges.

- Itapetinga: UESB, 2022.

90f.

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. Sob a orientação da Prof^a. D. Sc. Cristiane Martins Veloso e coorientação do Prof. D. Sc. Leandro Soares Santos e Prof^a. D. Sc. Renata Cristina Bonomo.

1. Enzima - Imobilização – Carvão ativado - Resíduo agroindustrial. 2. Enzima lacase - Atividade enzimática. 3. Carvão ativado - Sabugo de milho - Carbonização hidrotérmica. I. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Programa de Pós-graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos. II. Veloso, Cristiane Martins. III. Santos, Leandro Soares Santos. IV. Bonomo, Cristiane Martins. V. Título.

CDD(21): 660.634

Catálogo na fonte:

Adalice Gustavo da Silva – CRB/5-535
Bibliotecária – UESB – Campus de Itapetinga-BA

Índice Sistemático para Desdobramento por Assunto:

1. Milho – Sabugo - Atividade enzimática - Carvão ativado
2. Carbonização hidrotérmica – Carvão ativado
3. Resíduo agroindustrial – Carvão ativado

DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO

Título: IMOBILIZAÇÃO DE LACASE EM CARVÃO ATIVADO OBTIDO A PARTIR DE RESÍDUO DE SABUGO DE MILHO SUBMETIDO AO TRATAMENTO HIDROTÉRMICO.

Autor (a): JÉSSICA FERREIRA BORGES

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

Coorientador (a): Prof.^a Dr.^a Renata Cristina Ferreira bonomo
Prof. Dr. Leandro Soares Santos

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



Prof. Dr. Gabriel Ramos Ferreira Gonçalves
Membro Externo - UNIME



Prof. Dr. Dr.^a Nívio Batista Santana
Membro Interno - UESB



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

Itapetinga-BA, 23 de fevereiro de 2022.

“A felicidade não é ausência de conflitos, mas a habilidade para lidar com eles. Uma pessoa feliz não tem o melhor de tudo, ela torna tudo melhor”

(Autor desconhecido)

A Deus.
A minha mãe.
A minha Avó.
Ao meu Namorado.

Dedico!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela proteção, amparo nos momentos difíceis e por mostrar que sou forte o suficiente para vencer qualquer obstáculo.

À minha amada mãe Aurea, pelo amor incondicional, por não medir esforços para me ver feliz e sempre acreditar em mim, mesmo quando nem eu mesma acreditei, sendo a razão dessa conquista.

À minha avó Jovita, minha tia Maria, minha prima Mariuza, meu tio João, pessoas a quem tenho um amor imenso. Por sempre me incentivarem e me apoiarem e por tudo que sempre fizeram por mim.

À Marcondes, pelo amor, carinho, companheirismo, compreensão e incentivo das pequenas às grandes vitórias. Você torna todos os momentos ainda mais especiais!

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

À Priscilla, por se tornar uma amiga/irmã durante esses dois anos. Obrigada pelas boas risadas, pelo companheirismo e bons conselhos. Você foi um porto seguro, te conhecer foi realmente um presente, obrigada por tudo!

A todos os colegas do Laboratório de Engenharia de Processos (LEP) pela companhia, ajuda e momentos de descontração. Em especial a Annie, Lucas Silva, Mateus Flores, Marjorie, Jonathan, Emília e Matheus Jardim pela amizade, ajuda e troca de conhecimento.

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

Aos amigos que mesmo a distância sempre estiveram comigo, me apoiando e torcendo por mim. Em especial, Anny, Hranna e Joyce. A amizade de vocês é um privilégio!

Aos familiares, pelo carinho e preocupação.

Aos integrantes da banca examinadora, por aceitarem fazer parte da avaliação desse trabalho.

Aos integrantes do Laboratório de Processamento de Leites, em especial a Josane Cardim, pela ajuda nas análises de FTIR.

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

À Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB) e ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos pela oportunidade e por fornecerem as condições de trabalho necessárias para que eu me tornasse mestre.

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

A todos que não foram citados, mas contribuíram de forma significativa para a realização desse trabalho.

MUITO OBRIGADA!

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	15
1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1 Biomassa lignocelulósica	14
2.2 Milho: Produção e resíduos	16
2.3 Carbonização hidrotérmica	18
2.3.1 Mecanismo de reação na produção de hydrochar	19
2.3.2 Parâmetros operacionais no processo de CHT	20
2.3.3 Funcionalidades da superfície do hydrochar	21
2.4 Carvão ativado	23
2.5 Aplicação de carvão ativado	25
2.6 Imobilização de enzimas	26
2.6.1 Imobilização por adsorção	28
2.7 Lacase	29
2.7.1 Mecanismo de ação da enzima lacase	32
2.7.2 Aplicação de lacases na indústria de alimentos	32
3.1 Objetivo geral	34
3.2 Objetivos específicos	34
CAPÍTULO 2	47
RESUMO	48
1. INTRODUÇÃO	48
2. MATERIAL E MÉTODOS	50
2.1 Materiais e reagentes	50
2.2 Preparo do material precursor	51
2.2.1 Estudo de otimização da produção de hydrochar	51
2.3 Síntese do hydrochar	52
2.4 Síntese de carvão ativado a partir do hydrochar	52
2.4.1 Estudo do efeito das condições de síntese do carvão ativado	52
2.4.2 Síntese dos carvões ativados	52
2.5 Caracterização química do material precursor, dos hydrochars e do carvão ativado	53
2.6 Ensaio de imobilização de lacase nos carvões ativados obtidos	55
2.6.1 Determinação da atividade enzimática da lacase livre e imobilizada	56
2.7 Análise Estatística Multivariada: Análise de Componentes principais	56

2.8	Efeito do pH na imobilização de lacase e do meio reacional na atividade da lacase.....	58
2.9	Rendimento de imobilização dos carvões	58
2.9.1	Efeito da temperatura na imobilização e na atividade da lacase	59
2.9.2	Estudo de reuso de lacase imobilizada	59
2.9.3	Determinação dos parâmetros cinéticos.....	59
2.9.4	Estabilidade ao tempo de armazenamento	59
3.	RESULTADOS E DISCUSSÕES	60
3.1	Caracterização do material precursor.....	60
3.2	Otimização do processo de carbonização hidrotérmica do resíduo.....	61
3.3	Síntese dos carvões ativados	64
3.4	Caracterização do carvão ativado e hydrochar obtido nas condições de síntese selecionadas.....	67
3.4.1	Caracterização química e rendimento.....	67
3.4.2	Espectrofotometria de absorção no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	69
3.4.3	Análise térmica diferencial e termogravimétrica	71
3.4.4	Morfologia dos materiais carbonáceos determinado por MEV e caracterização textural	72
3.5	Estudo do efeito do pH e temperatura na imobilização da lacase	73
3.6	Efeito do pH e da temperatura do meio reacional na atividade da enzima livre e imobilizada	75
3.7	Estabilidade operacional	77
3.8	Estudo cinético.....	78
3.9	Estabilidade ao tempo de armazenamento.....	80
4.	CONCLUSÃO	81
5.	REFERÊNCIAS	82

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1. Cenário global de produção de milho em toneladas	17
---	----

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Níveis e variáveis estudadas no DCCR para produção do hydrochar	51
Tabela 2. Níveis e variáveis estudadas no DCCR para produção de carvão ativado a partir do hydrochar.	53
Tabela 3. Caracterização química do farelo do sabugo de milho verde.	61
Tabela 4. Quantidade de grupos funcionais oxigenados totais do hydrochar do farelo do sabugo de milho obtido após carbonização hidrotérmica no DCCR utilizado	62
Tabela 5. Análise de variância de regressão do hydrochar para as variáveis codificadas.....	63
Tabela 6. Estimativa dos parâmetros do modelo (dados codificados)	64
Tabela 7. Capacidade de imobilização e atividade enzimática da lacase imobilizada nos carvões sintetizados pelas condições do delineamento experimental	65
Tabela 8. Teor de grupos ácidos dos diferentes carvões sintetizados	68
Tabela 9. Caracterização química e rendimento do hydrochar (HSM) e carvão ativado (CAHSM) produzido nas condições de síntese selecionadas	69
Tabela 10. Propriedades texturais do hydrochar (HSM) e carvão ativado (CAHSM).....	74
Tabela 11. Efeito de diferentes valores de pH na capacidade adsorptiva do carvão ativado e o rendimento de imobilização.....	75
Tabela 12. Efeito da temperatura no processo de imobilização da lacase no carvão ativado.	76
Tabela 13. Parâmetros cinéticos: constante de Michaelis-Menten (K_m) e velocidade máxima (V_{max}) da lacase livre e da lacase imobilizada.....	81

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

- Figura 1.** Estrutura de biomassa lignocelulósica15
- Figura 2.** Variação do teor de GFO com temperatura de tratamento hidrotérmico.....22
- Figura 3.** Estrutura cristalina da lacase de *Trametes versicolor*30
- Figura 4.** Arquitetura molecular do sitio de ligação do cobre em lacases.31

CAPÍTULO 2

- Figura 1.** Superfície de resposta obtida para o modelo de CHT do farelo de sabugo de milho63
- Figura 2.** Gráfico dos escores das amostras de carvões ativados sintetizados em relação a CP1 e CP267
- Figura 3.** FTIR do material precursor (FSM), do hydrochar (HSM) e do carvão ativado (CAHSM)...70
- Figura 4.** Análise termogravimétrica TG (a) e TGA (b) do farelo do sabugo de milho (FSM), do hydrochar (HSM) e do carvão ativado (CAHSM)72
- Figura 3.** Microscopia eletrônica de varredura do hydrochar (a) e carvão ativado (b).73
- Figura 5.** Efeito do pH na atividade da lacase de *Agaricus bisporus* a 25 °C75
- Figura 6.** Efeito da temperatura na atividade da lacase de *Agaricus bisporus* livre e imobilizada em pH (4,0) ótimo.77
- Figura 7.** Atividade enzimática para os ciclos de utilização da lacase imobilizada.78
- Figura 8.** Determinação dos parâmetros cinéticos (K_m e V_{max}) pelo método gráfico Lineweaver-Burk da lacase livre e imobilizada a 25°C e pH 4,0.79
- Figura 9.** Estabilidade ao armazenamento da lacase livre e imobilizada.81

RESUMO

BORGES, J. F. **Imobilização de lacase em carvão ativado obtido a partir de resíduo de sabugo de milho submetido ao tratamento hidrotérmico.** Itapetinga – BA: UESB, 2022. p. 90 (Dissertação em Engenharia e Ciência de Alimentos).

A imobilização é um dos métodos mais utilizados para melhorar a estabilização das enzimas. Entre vários adsorventes, o carvão ativado (CA) tem sido amplamente utilizado como um suporte eficiente, ecológico e econômico, devido suas características essenciais para imobilização, podendo ser sintetizado a partir de resíduos agroindustriais, sendo uma alternativa interessante e de baixo custo para produção desses. Uma técnica promissora empregada para modificar as propriedades do material precursor (resíduo agroindustrial) e melhorar as propriedades finais do carvão ativado, como a maior presença de grupos funcionais oxigenados, é a carbonização hidrotérmica. Diante disso, o objetivo principal deste trabalho foi sintetizar carvão ativado a partir do sabugo de milho, oriundos da colheita para produção grãos, avaliando o efeito da carbonização hidrotérmica na eficiência do carvão para imobilização da enzima lacase. O material precursor foi caracterizado em relação à composição química, apresentando baixo teor de cinzas ($2,44 \pm 0,04$ % m/m) e de grupos funcionais oxigenados (GFO) ($0,31 \pm 0,02$ mEq.g⁻¹). A produção do hydrochar foi otimizada através da utilização de um delineamento composto central rotacional (DCCR), tendo como variável resposta o teor de GFO. Foi possível obter o ponto ótimo de produção do hydrochar para as variáveis tempo e temperatura de carbonização, sendo de 8,2 h e 232,7°C, respectivamente, as condições que proporcionaram um aumento de 100% nos grupos funcionais oxigenados em relação ao material precursor. Na segunda etapa do trabalho foi realizada a escolha das condições de síntese do carvão ativado, utilizando o hydrochar obtido na melhor condição de síntese, para obtenção de um suporte que proporcionasse o melhor desempenho da enzima imobilizada. Através da análise estatística multivariada de componentes principais (ACP) dos carvões sintetizados, foi possível observar uma relação positiva entre o teor de grupos lactônicos dos carvões com a atividade da enzima imobilizada. A atividade do derivado produzido foi determinada em diferentes condições de pH e temperatura na oxidação do substrato 2,2'-Azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolína-6-sulfônico (ABTS)). Avaliou-se também os ciclos de reuso do derivado e estabilidade ao tempo de armazenamento. A condição que proporcionou a melhor atividade enzimática para o derivado ($21,01 \pm 0,61$ U.mg⁻¹) foi encontrada em pH 4,0 e temperatura de 25°C. A enzima imobilizada nas condições ótimas apresentou 50% de sua atividade inicial após 5 ciclos consecutivos de utilização. No estudo de estabilidade ao tempo de armazenamento após 30 dias de estudos a enzima imobilizada ainda apresentou 50% da sua atividade, enquanto a enzima livre perdeu sua atividade completamente no vigésimo primeiro dia de estudo. Os resultados evidenciaram o potencial do tratamento hidrotérmico do resíduo para síntese do carvão ativado e sua aplicação na imobilização de lacase.

Palavras chave: Hydrochar, resíduo agroindustrial, ACP, atividade enzimática.

ABSTRACT

BORGES, J. F. Immobilization of laccase in activated carbon obtained from corn cob residue subjected to hydrothermal treatment. Itapetinga - BA: UESB, 2022. p. 87 (Dissertation in Engineering and Food Science).

Immobilization is one of the most commonly used methods to improve enzyme stabilization. Among several adsorbents, activated carbon (AC) has been widely used as an efficient, ecological and economical support, due to its essential characteristics for immobilization, being able to be synthesized from agroindustrial residues, being an interesting and low cost alternative for production of these. A promising technique employed to modify the properties of the precursor material (agroindustrial residue) to improve the final properties of activated carbon, such as the greater presence of oxygenated functional groups, is hydrothermal carbonization. Therefore, the main objective of this work was to synthesize activated carbon from corn cobs, from harvesting for grain production, evaluating the effect of hydrothermal carbonization on the efficiency of carbon to immobilize the enzyme laccase. The precursor material was characterized in relation to the chemical composition, with low ash content ($2,44 \pm 0,04$ % m/m) and oxygenated functional groups (OFG) ($0,31 \pm 0,02$ meq.g⁻¹). Hydrochar production was optimized through the use of a rotational central composite design (RCCD), with the OFG content as the response variable. It was possible to obtain the optimal point of production of hydrochar for the variables carbonization time and temperature, being 8.2 h and 232.7°C, respectively, the conditions that provided an increase of 100% in the oxygenated functional groups in relation to the precursor material. In the second stage of the study, the selection of conditions for the synthesis of activated carbon was made, using the hydrochar obtained in the best synthesis condition, to obtain a support that would provide the best performance of the immobilized enzyme. Through the multivariate statistical analysis of principal components (PCA) of the synthesized carbons, it was possible to observe a positive relationship between the lactonic group content of the carbons and the activity of the immobilized enzyme. The activity of the derivative produced was determined under different pH and temperature conditions in the oxidation of the substrate 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS). It was also evaluated the cycles of reuse of the derivative and stability to the storage time. The condition that provided the best enzymatic activity for the derivative (21.01 ± 0.61 U.mg⁻¹) was found in pH 4.0 and temperature of 25°C. The enzyme immobilized in optimal conditions presented 50% of its initial activity after 5 consecutive cycles of use. In the study of storage time stability after 30 days of studies, the immobilized enzyme still showed 50% of its activity, while the free enzyme lost its activity completely on the 21st day of the study. The results showed the potential of hydrothermal treatment of the residue for synthesis of activated carbon and its application in laccase immobilization.

Keywords: Hydrochar, agroindustrial waste, PCA, enzymatic activity.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

REFERÊNCIAL TEÓRICO

OBJETIVOS

1. INTRODUÇÃO

As biomassas lignocelulósicas são substratos biotecnologicamente valiosos devido aos atributos químicos dos seus constituintes, sendo os resíduos agroindustriais a fonte mais abundante desse material (SALDARRIAGA-HERNÁNDES et al., 2020). Dentre os resíduos agroindustriais gerados em abundância no Brasil tem-se o sabugo de milho, oriundos da colheita para produção grãos. Estima-se que a cada tonelada de milho processado resulta em aproximadamente 180 kg de sabugo (TORRE et al., 2008; SANTOS-ROCHA et al., 2017). Outro montante também é resultado da colheita de espigas verdes, para consumo imediato, e processamento na indústria de conservas alimentícias (LUZ et al., 2014).

A disposição inadequada dos resíduos resultantes de atividades agrícolas pode causar efeitos adversos no meio ambiente, pois os mesmos são considerados contaminantes no ecossistema, devido sua composição rica em macro e micronutrientes (ABDEL-RAOUF, AL-HOMAIDAN e IBRAHEEM, 2012; YAASHIKAA et al., 2022). Visando evitar seu descarte inadequado e como uma forma de valorização de resíduos agroindústrias, vem se explorando a utilização de tecnologias de conversão para preparação de materiais à base de carbono (DE TUESTA et al., 2021).

A carbonização hidrotérmica (CHT) é uma tecnologia (PATEL et al., 2019; GAETE et al., 2020) proposta atualmente como uma alternativa para agregar valor a estes resíduos, tendo como objetivo a produção de materiais carbonáceos para uma gama de aplicações (SANTOS-ROCHA et al., 2017; HUANG et al., 2019; DE TUESTA et al., 2021; MARTINEZ et al., 2021). É uma técnica de conversão termoquímica onde matérias-primas de alta umidade são convertidas em um produto carbonáceo sólido denominado hydrochar (MARTINEZ et al., 2021).

Dentre as vantagens de utilização da CHT tem-se a utilização de água como solvente, sendo este um reagente de baixo custo, ambientalmente seguro e não tóxico (KNEZ et al., 2015; WANG et al., 2018), temperaturas relativamente baixas entre 180-260 °C e uma recuperação de mais de 45-70% de carbono (SHARMA et al., 2020; KHAN et al., 2021). O hydrochar apresenta grupos funcionais abundantes contendo oxigênio e elevada reatividade química, características atrativas para diversos processos como adsorção, imobilização entre outros (LIMA et al., 2019).

A utilização do hydrochar como suporte nos processos de adsorção e imobilização é limitada devido sua baixa área superficial e porosidade (FANG et al., 2018). Entretanto,

a utilização do hydrochar como precursor para produção de carvão ativado é uma alternativa para sanar os empecilhos relacionados a sua estrutura física. O carvão ativado (CA) apresenta elevada área superficial, estrutura porosa interna desenvolvida, bem como grande número de grupos funcionais oxigenados, estabilidade química, alta resistência mecânica e boa reciclabilidade (GARCÍA, 2018; QUESADA et al., 2020; WANG et al., 2022).

O carvão ativado é amplamente utilizado nas mais diversas vertentes, como no tratamento de águas residuárias, processos de purificação, clarificação, remoção de sabores e odores (SUN et al., 2018; AO et al., 2018). Suas propriedades físico-químicas o torna um suporte catalítico eficiente para ser utilizado processos de imobilização enzimática (PRÉVOTEAU et al., 2016; STREIT et al., 2018; KAUR et al., 2021).

A imobilização da enzima permite melhorar a estabilidade da enzima em relação a amplas faixas de pH e temperatura, permite seu uso sucessivo, podendo evitar a perda de atividade e permitindo a recuperação do biocatalisador no final da reação do meio aquoso (BILAL et al., 2019; TAHERI-KAFRANI et al., 2020). Além disso, a imobilização permite que os processos de conversão ocorram de forma contínua, podendo oferecer possibilidades de aplicações em diferentes campos industriais (GIRELLI et al., 2020).

Diversas enzimas foram imobilizadas com êxito pelo método de adsorção em carvão ativado (BRITO et al., 2017; SANTOS et al., 2019; GONÇALVES et al., 2021). Dentre essas enzimas, vem crescendo o interesse de estudos da imobilização por adsorção da lacase (NAHDI et al., 2017; LI et al., 2018; FERNANDES-SANROMAN et al., 2020). As lacases catalisam a oxidação de um grande número de compostos fenólicos, aminas aromáticas e também compostos não fenólicos na presença de um mediador (ALVARADO-RAMÍREZ et al., 2021).

A habilidade das lacases em catalisar uma ampla gama de compostos aromáticos as tornam atrativas para aplicações industriais, podendo ser um biocatalisador valioso para substituir catalisadores inorgânicos. Sendo utilizada com êxito no tratamento de poluentes ambientais para descoloração (REDA; HASSAN; MOGHZY, 2018), fabricação de biossensores para detecção de compostos fenólicos (MOHTAR et al., 2019) e em diversos setores da indústria de alimentos (BECKES et al., 2021).

Considerando as diversas aplicações promissoras da lacase em processos industriais é de extrema importância o desenvolvimento de suportes sólidos e a utilização de métodos adequados para imobilização da mesma, que combinem baixos custos de produção com

boa estabilidade e fácil reutilização deste biocatalisador. Portanto, este estudo teve como objetivo a valorização do sabugo de milho através de sua utilização para produção de hydrochar usado na síntese de um carvão ativado que proporcionasse bom desempenho para imobilização da enzima lacase.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Biomassa lignocelulósica

A biomassa é uma das fontes de carbono mais amplas e sustentáveis do planeta, sendo definida como qualquer material orgânico oriundo de plantas e animais, seus resíduos e resíduos derivados, podendo ser classificadas como biomassa lignocelulósica e não lignocelulósica (WANG et al., 2018; SARAVANAN et al., 2021). As biomassas não-lignocelulósicas são, por exemplo, o lodo de esgoto e esterco animal. Apresentam em sua composição ácidos graxos, proteínas e uma pequena quantidade de hemicelulose, celulose e lignina (ACHINAS et al., 2017).

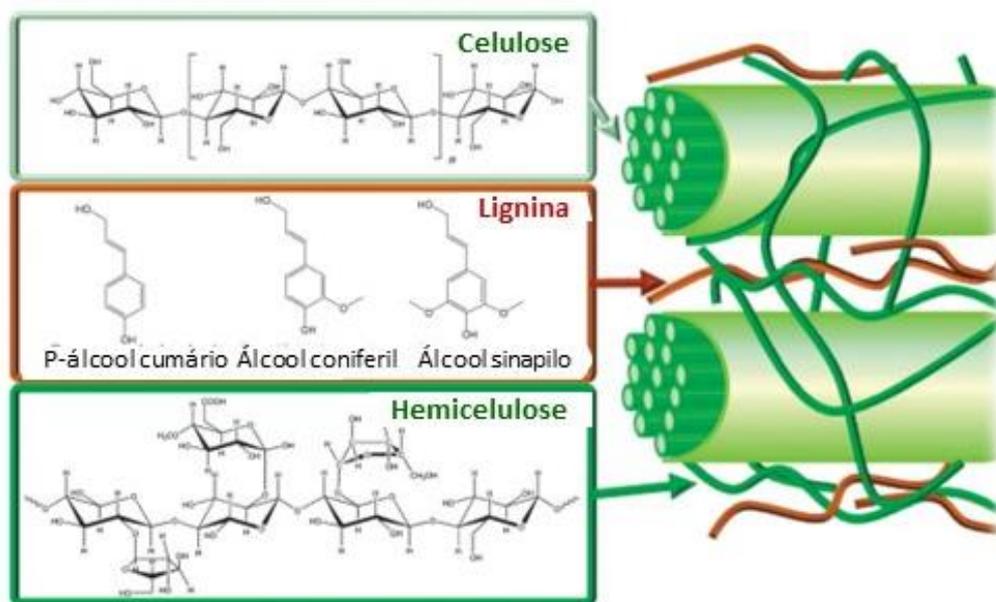
A biomassa lignocelulósica contém predominantemente celulose, hemicelulose e lignina (Figura 1), além de uma pequena quantidade de extrativos e cinzas (ANTERO et al., 2020; KHAN et al., 2021). Apesar da composição da biomassa lignocelulósica variar de acordo ao tipo de matéria-prima, maturação e condições climáticas, em média ela consiste de 40-60% de celulose, 15-30% de hemicelulose e 10-25% de lignina (WANG et al 2017; GULEÇ et al., 2021).

A celulose é um homopolímero que consiste em unidades de β - d-glucopiranosose ligadas por ligações β - (1-4) glicosídicas que formam a estrutura linear e podem ser descompostas em monômeros de glicose (ALONSO et al., 2012). O grau de polimerização da celulose varia de 7.000 a 15.000, suas cadeias são ligadas por ligações de hidrogênio intermolecular que se dispõem de forma paralela, formado os feixes que são conhecidos como microfibrila (SHARMA et al., 2020).

Contrário a celulose, a hemicelulose é amorfa com baixo grau de polimerização e é um polímero com ramificações curtas de cadeias de monossacarídeos. A estrutura da hemicelulose varia dependendo da fonte da biomassa lignocelulósica e os açúcares que formam suas unidades são: xilose, glicose, manose, galactose entre outros (WANG et

AL., 2017; KHAN et al., 2021). O último componente da biomassa lignocelulósica, a lignina, é um polímero fenólico reticulado, que fornece resistência mecânica à biomassa, reforçando as fibras juntas entre a parede celular (ISIKGOR; BECER, 2015).

Figura 1. Estrutura de biomassa lignocelulósica.



Fonte: Alonso et al. (2012)

As biomassas lignocelulósicas são substratos biotecnologicamente valiosos devido aos atributos químicos dos seus constituintes, sendo os resíduos agroindustriais a fonte mais abundante desse material (SALDARRIAGA-HERNÁNDEZ et al., 2020). Os resíduos agroindustriais referem-se a materiais obtidos de atividades agrícolas e indústrias relacionadas com a agricultura (YAASHIKAA et al., 2022). O setor agrícola é um dos principais geradores de resíduos sólidos agroindustriais (DEY et al., 2021). Estão inclusos nesta gama de resíduos as folhas, caules, cascas, raízes, restos de colheita, farelos, bagaço, sementes, etc. (SENTHILKUMAR et al., 2020).

Estima-se que à geração anual de resíduos de biomassa vegetal de origem agrícola e do seu processamento no mundo é de 140 Gt. O Brasil ocupa a terceira posição de maior produtor agrícola do mundo e estima-se que a sua geração de resíduos oriundos deste setor seja de 451 Mt (TRIPATHI et al., 2019). Quando não tratado adequadamente sua disposição no meio ambiente gera efeitos adversos ao meio ambiente com deposição de

contaminantes no ecossistema (ABDEL-RAOUF, AL-HOMAIDAN e IBRAHEEM, 2012; YAASHIKAA et al., 2022).

Deste modo, o processamento destes materiais é uma alternativa benéfica para agregação de valor e minimização de impactos ambientais (MARZO et al., 2019). Agregar valor a esses resíduos gerados em abundância é objetivo de muitas tecnologias propostas atualmente (PATEL et al., 2019; GAETE et al., 2020). Dentre os resíduos agroindustriais que vem sendo estudados com aplicações promissoras estão às biomassas oriundas do processamento de milho, especificamente o sabugo (DUAN et al., 2019; UNUOFIN et al., 2019; CAMPOS et al., 2020).

2.2 Milho: Produção e resíduos

Acredita-se que o milho surgiu na América Central, sendo o México sua região de origem (PATERNIANI et al., 2000). Devido a sua grande capacidade de adaptação pode ser cultivado nos hemisférios norte e sul, ao nível do mar e regiões montanhosas, climas úmidos e regiões secas (SANTOS-ROCHA et al., 2017).

O milho está entre os três cereais mais cultivados no mundo e existem mais de 150 espécies diferentes. O principal destino para esse produto é a indústria de ração animal, com 53% da demanda total, sendo apenas 2% destinado para o consumo humano (FAO, 2018; ABIMILHO, 2020). O Brasil é o terceiro produtor mundial de milho e exportador com 102,5 e 34,5 milhões de toneladas respectivamente, além de possuir autossuficiência para o consumo interno (EMBRAPA, 2015; ABIMILHO, 2020). Segundo a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB) entre 2019/2020 os Estados Unidos, China e Brasil produziram 64% do total de 1,11 bilhão de toneladas, com um aumento estimado de 5,3% para a safra de 2021 (Tabela 1).

O mercado brasileiro de milho está num momento promissor. Mesmo com um período pandêmico as projeções apontam para um aumento da área de produção, sendo esperado que daqui a dez anos a produção nacional possa chegar a 150,8 milhões de toneladas (CONAB, 2020). Na região nordeste do país os estados da Bahia, Maranhão e Piauí são os maiores produtores, e no ranking nacional a região ocupa a nona posição (BRASIL, 2020; CONAB, 2020).

Além da colheita do milho para produção de grãos o cultivo do milho também é realizado para colheita de espigas verdes. Estas apresentam uma atividade alternativa para pequenos e médios produtores, pois apresentam um maior valor de comercialização

quando comparado ao milho para produção de grãos. Com isso a produção de milho verde apresenta potencial de crescimento significativo devido ao baixo capital de investimento e retorno rápido, pelo ciclo curto da cultura (LUZ et al., 2014).

Tabela 1. Cenário global de produção de milho em toneladas

Países	2017/18	2018/19	2019/20	2020/21
Estados Unidos	371.096	364.262	345.894	378.466
China	259.071	257.330	260.770	260.000
Brasil	82.000	101.000	102.000	110.000
União Europeia	62.007	64.362	66.665	66.300
Argentina	32.000	51.000	50.000	50.000
Ucrânia	24.115	35.805	35.887	38.500
Índia	28.753	27.715	28.636	28.000
México	27.569	27.600	25.000	28.000
África do Sul	13.104	11.854	16.250	14.000
Rússia	13.201	11.415	14.275	15.000
Selecionados	912.916	952.313	945.377	988.266
Outros	165.705	171.304	167.460	174.266
Mundo	1.078,62	1.123,92	1.112,84	1.162,38

Fonte: USDA (2020)

As espigas de milho colhidas no estádio verde são comercializadas em todo Brasil para o consumo de espigas cozidas, assadas ou para o processamento, sendo a indústria de conservas alimentícias a principal destinação deste produto (AGRIC, 2020).

O sabugo é um dos subprodutos da indústria do milho gerado após o milho ser debulhado e é caracterizado como a parte mais interna e densa do milho, sendo um resíduo geralmente utilizado para ração animal. Estima-se que a cada tonelada de milho processado resulta em aproximadamente 180 kg de sabugo (TORRE et al., 2008; SANTOS-ROCHA et al., 2017). Mesmo tendo uma grande parte deste subproduto sendo destinada para ração animal, uma grande parte deste é queimada ou disposta de forma inadequada no ambiente (DUAN et al., 2019; ILHEANACHO et al., 2021). Portanto, é necessário estudos que visem o melhor aproveitamento deste resíduo. A carbonização hidrotérmica é uma alternativa para agregar valor a este resíduo, tendo como objetivo a produção de materiais carbonáceos para uma gama de aplicações (SANTOS-ROCHA et al., 2017; HUANG et al., 2019; DE TUESTA et al., 2021; MARTINEZ et al., 2021).

2.3 Carbonização hidrotérmica

Estudos recentes vem explorado o uso da carbonização hidrotérmica (CHT) para conversão de resíduos de biomassa em matérias carbonáceos (HUANG et al., 2019; SHEN et al., 2021; KHAN et al., 2021), devido a simplicidade da técnica para conversão desses materiais e da capacidade de produzir materiais com características para diferentes aplicações, que vão desde o uso desse material de carbono para adsorção à produção de bicomustíveis (REN et al., 2017; ZHANG et al., 2021).

A carbonização hidrotérmica é uma técnica de conversão termoquímica que possui várias vantagens quando comparada a outras tecnologias de conversão térmica como pirólise, gaseificação e incineração (KAMBO; DUTTA, 2015). A CHT pode converter matérias-primas de alta umidade em um produto carbonáceo sólido com rendimentos relativamente altos sem que haja a necessidade de etapas preliminares de desidratação e secagem, o que representa uma economia durante o processo. Pode ser operada em temperaturas relativamente baixas, entre 180-260 °C, e ter uma recuperação de mais de 45-70% do carbono (SHARMA et al., 2020; KHAN et al., 2021) e ainda utilizar a água como solvente, sendo um meio barato, ambientalmente seguro e não tóxico (KNEZ et al., 2015; WANG et al., 2018).

O procedimento típico de carbonização hidrotérmica utiliza um reator de aço-inox (autoclave), um tubo de teflon e um forno mufla (VIEIRA, 2016). O material precursor é disposto na autoclave utilizando a água como solvente e aquecido até a temperatura desejada sob pressão autógena, ou seja, a pressão gerada pelo próprio reator devido a evaporação da água durante o processo de carbonização (JAIN et al., 2016; SHARMA et al., 2020).

No processo de CHT, a biomassa sofre uma reorganização estrutural, degradando-se em produtos sólidos, líquidos e gasosos (LU; SAVAGE, 2015; FANG et al., 2018). O sólido formado recebe o nome de hydrochar e possui composição química e aparência física diferentes da matéria-prima. Embora outros produtos também sejam possíveis de produzir neste processo, o hydrochar é o produto final preferido devido à suas aplicações versáteis e adaptáveis (KHAN et al., 2021).

A diferença na composição química do produto gerado (hydrochar) é atribuída aos mecanismos de reação que ocorrem durante a carbonização hidrotérmica que incluem

hidrólise, desidratação, descarboxilação, aromatização e recondensação (FAKKAEW et al., 2015; GAMGOUM et al., 2016).

2.3.1 Mecanismo de reação na produção de hydrochar

A produção de hydrochar a partir de biomassa lignocelulósica possui um mecanismo de formação complexo devido a presença de três componentes na sua composição (celulose, hemicelulose e lignina) (JAIN et al., 2016; KUMAR et al., 2020). As reações químicas de hidrólise, desidratação, descarboxilação, aromatização e recondensação apesar de geralmente ocorrerem nesta ordem, não operam de maneira sucessiva, podendo apresentar caminhos de reações diferentes e/ou paralelos (SHARMA et al., 2020).

A hidrólise é a reação de iniciação, uma vez que necessita de uma menor energia de ativação. Nesta etapa as moléculas de água quebram a ligação éster e éter da complexa cadeia que constitui a biomassa, gerando polímeros e monômeros de pequena cadeia (FAKKAEW et al., 2015). Durante esse processo as moléculas de água geram hidroxilas (OH^-) e íons hidrônios (H_3O^+) que catalisam a reação de hidrólise. A celulose e a hemicelulose se hidrolisam diretamente em monômeros e oligômeros e a lignina parcialmente em fenólicos (WU et al., 2016; FANG et al., 2018; KUMAR et al., 2020).

As etapas de desidratação e descarboxilação ocorrem de forma simultâneas e contribuem para a maior proporção de carbono (C) e menor de oxigênio (O) que o hydrochar apresenta comparado a biomassa lignocelulósica bruta (PETROVIC et al., 2016; FANG et al., 2018). A desidratação proporciona a remoção da água da matriz da biomassa eliminando os grupos hidroxila, enquanto a descarboxilação elimina grupos carboxila do processo na forma de gás carbônico (CO_2) (GAO et al., 2016). Outra mudança proporcionada por essas reações é a formação de carbono aromático que difere do carbono encontrado na biomassa bruta (HE et al., 2016).

O processo de aromatização ocorre como resultado das reações de desidratação e descarboxilação. Grupos funcionais de ligação dupla como $\text{C}=\text{O}$ e $\text{C}=\text{C}$ substituem os grupos eliminados de hidroxila e carboxila de ligação simples da matriz da biomassa (GAI et al., 2016; KHAN et al., 2021).

Esses processos de conversão que levam a formação do produto final (hydrochar) dependem principalmente das condições de reação como tempo, temperatura, matéria-

prima e razão de água/sólidos. Sendo a temperatura e o tempo os parâmetros mais importantes que influenciam as características do produto final (FUNKE; ZIEGLER, 2010; SHARMA et al., 2020).

2.3.2 Parâmetros operacionais no processo de CHT

As condições de operação durante o processo de CHT possuem um papel fundamental na conversão da biomassa em hydrochar. Os parâmetros operacionais como tempo de residência, temperatura e relação biomassa e água influenciam diretamente nas propriedades físicas e químicas do hydrochar formado, como também do seu rendimento (SHARMA et al., 2020).

A temperatura é um fator crítico no processo de carbonização hidrotérmica, sendo um dos principais determinantes das propriedades físicas da água (SAVAGE, 1999). Em altas temperatura há um aumento da ionização da água que possibilita que as reações de hidrólise, clivagem e condensação iônica da biomassa ocorram, reduzindo a energia de ativação e aumentando o processo geral de carbonização (SHARMA et al., 2020).

Um estudo conduzido por Sabio et al. (2016) verificou que as variáveis temperatura e tempo de residência apresentaram maior influência no rendimento do hydrochar produzido a partir da casca de tomate comparado com a relação de biomassa/água, onde houve redução do rendimento do hydrochar com o aumento da temperatura de carbonização hidrotérmica (FANG et al., 2015; SABIO et al., 2016).

Segundo Liu e Balasubramanian (2014) o aumento da temperatura durante o processo de CHT exibe uma relação linear com o teor de carbono e conseqüentemente com uma redução do rendimento. Esse fato é atribuído aos constituintes da biomassa lignocelulósica (lignina, celulose e hemicelulose) que possuem diferente estabilidade térmica, ocorrendo sua degradação em temperaturas e tempos diferentes (SHARMA et al., 2020). A lignina possui uma estrutura fenólica estável que a torna mais resistente à decomposição em líquido e gases, enquanto a celulose e hemicelulose possuem menor estabilidade térmica, de modo que as biomassas lignocelulósicas com alto teor de lignina tendem a apresentar rendimentos mais elevados de hydrochar (KABAKCI; BARAN, 2019).

Outra característica relacionada com a variável temperatura no processo hidrotérmico é o conteúdo de cinzas do hydrochar, que possui uma relação inversa com

a temperatura do processo devido a desmineralização favorecida de elementos minerais na água sub e supercrítica (JIAN et al., 2018).

Minaret e Dutta (2016) relataram que durante a carbonização hidrotérmica de casca de milho o aumento da pressão levou ao aumento na temperatura, que resultou no aumento da hidrólise e decomposição da biomassa lignocelulósica, proporcionando um efeito positivo no volume de poros e no conteúdo de hidrogênio.

O tempo de residência controla o grau de decomposição da matéria-prima a uma determinada temperatura, que irá refletir na textura do hydrochar após a formação de microesferas. Esse parâmetro governa a agregação das microesferas, sua dispersão e diâmetro (WANG et al., 2018).

O tempo de residência no processo de CHT tem um efeito semelhante a temperatura sobre o processo, mas em um nível menor no quesito de recuperação de produtos sólidos. Quanto menor o tempo de residência maior o teor de sólidos e conseqüente maior rendimento (NOVIANTI et al., 2014; KHAN et al., 2021). Segundo Heidari et al (2019), um longo tempo de residência influencia positivamente a área superficial e a porosidade do hydrochar produzido devido a extensa polimerização de monômeros dissolvidos que levam a um aumento do tamanho de microesferas.

2.3.3 Funcionalidades da superfície do hydrochar

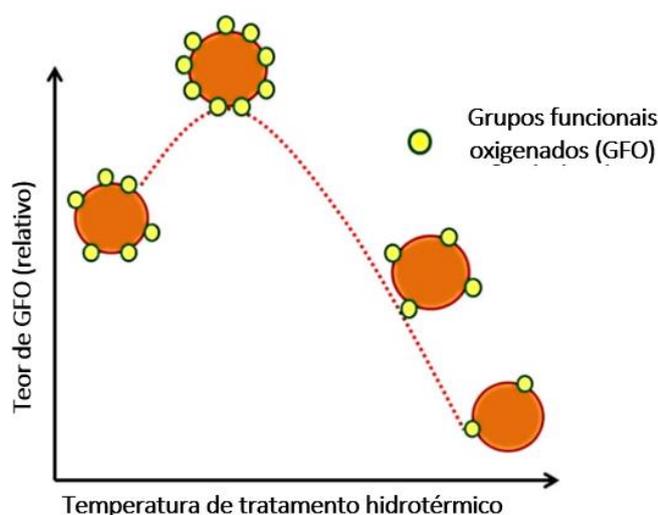
As características estruturais do hydrochar como área superficial, área de microporos e volume total de poros podem variar de acordo ao tipo de matéria-prima utilizada para conversão e das condições do processo. Essas diferenças são influenciadas pela concentração de diferentes elementos, especialmente das frações de H/C e O/C (ZHU et al., 2015; SHEN et al., 2021).

A estrutura do hydrochar geralmente é do tipo núcleo-casca com um diâmetro de 2-10 μm . O núcleo é hidrofóbico, contendo grupos oxigenados estáveis (éter, pirona e quinona) com um invólucro hidrofílico e um grande número de grupos funcionais de oxigênio na superfície (BACH; SKREIBERG, 2016; KUMAR et al., 2020).

Os principais grupos funcionais oxigenados (GFO) presentes no hydrochar incluem -OH, CO, C=O e COO-, que estão intimamente relacionados com a temperatura de carbonização e tempo de residência do processo (SHEN et al., 2021). Jain et al. (2015) investigaram o efeito da temperatura de carbonização hidrotérmica (200, 275, 315 e 350 °C) na formação de GFO em hydrochar à base de casca de coco. Foi observado que,

independentemente da temperatura empregada, houve aumento do teor dos grupos funcionais oxigenados do hydrochar em relação ao precursor. O valor máximo para os GFO foi observado na temperatura de 275 °C, seguido de uma queda para as temperaturas mais elevadas (315°C e 350 °C) (Figura 2). A redução dos grupos funcionais oxigenados foi atribuída à decomposição da matéria orgânica e formação de produtos gasosos em temperaturas mais altas.

Figura 2. Variação do teor de GFO com temperatura de tratamento hidrotérmico.



Fonte: Adaptado de Jain et al. (2016)

As técnicas de espectroscopia de infravermelho com transformado de Fourier (FTIR), espectroscopia de fotoelétrons de raio-X (XPS) são empregadas para analisar os grupos funcionais da superfície do hydrochar e da biomassa bruta (LIU; LIU, 2020; TU et al., 2021). Os espectros de FTIR fornecem uma investigação mecanística da evolução que o hydrochar sofre nas diferentes condições de tratamento hidrotérmico a que pode ser submetido (WANG et al., 2018).

Sevilla et al. (2011) avaliaram as propriedades químicas e estruturais da serragem de eucalipto e palha de cevada submetidos a CHT. Os espectros gerados por FTIR e XPS demonstraram que o hydrochar é rico em grupos oxigenados em sua superfície. Entretanto a proporção dos grupos oxigenados (hidroxila, carbonila e éster) diferiram com base na natureza da biomassa lignocelulósica.

Gao et al. (2016) identificaram por meio de espectro FTIR que resíduos de cascas de eucalipto submetida a CHT diminuem o alongamento de C=O em grupos cetona, amida e carboxílicos devido ao aumento das reações de descarboxilação com o tempo de residência.

Durante a CHT os produtos despolimerizados se depositam na superfície do hydrochar ao final do processo e bloqueiam os poros (FANG et al., 2018), esse fato proporciona ao hydrochar uma baixa área superficial e porosidade, o que limita sua capacidade de utilização como um suporte para adsorção, imobilização entre outras aplicações (LIMA et al., 2019). A presença de grande número de grupos funcionais contendo oxigênio e sua elevada reatividade química fazem do hydrochar um precursor com alto potencial para produção de carvão ativado, sendo esse processo eficiente para melhorar as propriedades dos materiais carbonáceos sintetizados.

2.4 Carvão ativado

O termo carvão ativado (CA) é comumente utilizado para descrever materiais à base de carbono que possuem uma elevada área superficial, estrutura porosa interna desenvolvida, bem como grande número de grupos funcionais oxigenados, estabilidade química, alta resistência mecânica e boa reciclabilidade (GARCÍA, 2018; QUESADA et al., 2020; WANG et al., 2022). Tais características tornam os carvões ativados materiais versáteis como adsorventes, sendo aplicados na remoção de diversos poluentes de fases gasosas, líquidas, purificação de água, aplicações em processos médicos, industriais e farmacêuticos (JOSS et al., 2008; AGBOZU; EMORUWA, 2014) e também como catalisadores e suportes catalíticos (LEWOYEHU, 2021).

As propriedades químicas do carvão ativado são influenciadas principalmente pelos seus grupos funcionais de superfície e presença de heteroátomos. Mais especificamente, os materiais gerados durante a preparação do carvão ativado contêm vários grupos de superfície, como grupos hidroxila, carbonila, carboxila e amino, além de anéis aromáticos. Devido a esses diferentes grupos funcionais, as características químicas da superfície dos carvões podem variar de ácidas a alcalinas, oxidantes, redutoras, hidrofílicas ou hidrofóbicas (BHATNAGAR et al., 2013; PEREIRA et al., 2014; WANG et al., 2022). Tais características influenciam diretamente as propriedades adsorptivas e a reatividade do carvão ativado, que serão determinadas pelo método de síntese e ativação desse material.

Os carvões ativados poder ser sintetizados usando uma variedade de métodos e técnicas diferentes, sendo o processo de carbonização indispensável em todas elas. Já o processo de ativação e os agentes utilizados podem variar com base no precursor usado (ABUELNOOR et al., 2021). Existem basicamente duas etapas para produção de carvões ativados que são a carbonização e ativação. Estas etapas podem ocorrer de forma simultânea ou em momentos distintos (LEWOYEHU, 2021).

O processo de ativação é uma etapa importante na síntese dos carvões ativados, pois leva ao aumento da porosidade, através do aumento do volume de poros de diâmetro menores e na criação de novos poros no material precursor. A ativação do material pode ser realizada por dois métodos: ativação química e ativação física (DUAN et al., 2021). A ativação física consiste em duas etapas térmicas diferentes, onde o precursor é submetido a altas temperaturas na faixa de 700-900°C, sob atmosfera inerte para evitar a combustão do material carbonáceo. Nesta etapa ocorre a remoção de heteroátomos e voláteis, que resulta em carvões com um alto teor de carbono, mas com baixa porosidade. A segunda etapa do processo de ativação física consiste na remoção seletiva dos átomos de carbono mais reativos por meio de reações de gaseificação controladas que irão gerar a porosidade características dos carvões ativados. Os gases mais comumente utilizados são o vapor de água e gás carbônico (ABUELNOOR et al., 2021; DUAN et al., 2021; LEWOYEHU, 2021).

A ativação química mesmo tendo apenas uma etapa térmica, apresenta três diferentes estágios de síntese. O primeiro estágio consiste na impregnação do precursor com o agente ativador. Os agentes de ativação mais comuns são: ácido fosfórico (H_3PO_4), cloreto de zinco ($ZnCl_2$), hidróxido de potássio (KOH) e hidróxido de sódio (NaOH) (SPAHIS et al., 2008; REFFAS et al., 2010). Após a impregnação, ocorre o tratamento térmico em atmosfera inerte em diferentes temperaturas, dependendo do agente ativador escolhido. Nesta etapa ocorrem reações de despolimerização, desidratação e condensação, resultando em maiores rendimentos de carbono do que na ativação física devido à restrição na formação de alcatrões e voláteis. Finalmente, o último estágio envolve a lavagem para remover os agentes ativadores remanescentes e os subprodutos da reação, que obstruem a porosidade recém-formada, e a secagem (LEWOYEHU, 2021).

A ativação química oferece várias vantagens em relação a ativação física, que incluem principalmente temperatura de ativação mais baixa (geralmente <500 °C) em comparação com a temperatura de ativação física (500-900°C) (DELHAES, 2002), etapa

de ativação única, rendimentos mais elevados, melhores características porosas e menores tempos de ativação (HUI; ZAINI, 2015; DUAN et al., 2021).

Independentemente do método de síntese a capacidade de adsorção do carvão ativado pode ser influenciada por diversos fatores, que vão desde suas características físico-químicas, do adsorbato e condições ambientais. As características do adsorvente que determinam seu desempenho são: área superficial específica, estrutura porosa e grupos funcionais superficiais (LEWOYEHU, 2021; WANG et al., 2022). A área superficial específica refere-se à área superficial total do adsorvente por unidade de massa. Esse parâmetro é considerado de grande importância no desempenho de adsorção do carvão ativado, uma vez que, diversos estudos demonstraram que uma capacidade de adsorção elevada está relacionada com uma elevada área superficial (SUN et al., 2016; LIU et al., 2016; AGUAYO-VILLARREAL et al., 2017; MELIKE, 2018).

Após a carbonização e ativação, uma estrutura porosa é formada no carvão ativado, podendo ser de diferentes tipos e tamanho. Foi adotado oficialmente pela União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC) uma classificação convencional para o tamanho de poros de acordo sua largura média, sendo classificados como: macroporos (>50nm), mesoporos (2-50nm) e microporos (<2nm) (SUDARSANAM et al., 2019; DUAN et al., 2021). Os microporos geralmente conferem aos carvões ativados uma maior capacidade de adsorção, pois fornecem os principais locais de adsorção devido à sua grande área superficial, enquanto os mesoporos e macroporos possibilitam a chegada do adsorbato aos poros de menor tamanho, que estão localizados mais profundamente na estrutura do carvão ativado (FISCHER et al., 2017; NG et al., 2018; WANG et al., 2022).

Qualquer material carbonáceo teoricamente pode ser utilizado como precursor na síntese de carvão ativado, mas as propriedades físicas como químicas desse adsorvente variam de acordo com a matéria-prima empregada em conjunto com os métodos de conversão utilizados (LEWOYEHU, 2021). Um bom precursor para síntese de carvão ativado além de possuir um alto teor de carbono deve apresentar longa vida de armazenamento, ser obtido sob baixo custo, satisfazer as necessidades do processo a ser empregado além de alto poder de reutilização (HUANG et al., 2018; DUAN et al., 2021).

2.5 Aplicação de carvão ativado

Segundo uma análise recente de tendência global realizada pela Transparency Market Research, espera-se que a demanda do mercado global para o uso de carvão ativado alcance um montante de aproximadamente 7,3 bilhões de dólares até o final de 2030 (TMR, 2020). Devido às propriedades físicas e funcionais excepcionais do carvão ativado, o crescimento do mercado tem sido impulsionado pela crescente demanda por este material em uma série de setores industriais como farmacêutico, alimentos, bebidas e cosméticos. Outro fator importante é a redução de custos de produção deste material com a utilização de precursores obtidos a partir de resíduos agroindústrias, uma fonte com custo baixo (KAUR et al., 2021).

O carvão ativado tem sido amplamente utilizado nas mais diversas vertentes, como no tratamento de águas residuárias, purificação de compostos químicos, recuperação de solventes, remoção de mercúrio, clarificação e remoção de sabores e odores de óleos e bebidas alcoólicas, em processos químicos e farmacêuticos, na purificação e separação de líquidos e gases, na purificação do ar, captura de CO₂ e até mesmo na dessalinização de águas salobras para remoção de NaCl (SUN et al., 2018; AO et al., 2018; OGUNGBENRO et al., 2018; HAI et al., 2019).

Dentre as muitas pesquisas realizadas e em andamento para avaliar o potencial do carvão ativado como suporte em diferentes processos, uma aplicação que vem mostrando resultados promissores é a sua utilização para imobilização enzimática (SILVA et al., 2005; DUTTA et al., 2009; PEREIRA et al., 2014; BRITO et al., 2017; GONÇALVES et al., 2021). Por apresentar acessibilidade, estabilidade térmica, presença de grupos funcionais em sua superfície e porosidade desenvolvida, o carvão ativado mostra-se eficiente para ser utilizado como suporte catalítico em processos de imobilização enzimática (PRÉVOTEAU et al., 2016; STREIT et al., 2018; KAUR et al., 2021).

2.6 Imobilização de enzimas

As enzimas são biocatalisadores em sua grande parte de origem protéica altamente eficientes e versáteis que catalisam reações bioquímicas e químicas (LIU et al., 2018). Por serem catalisadores que apresentam as vantagens de alta atividade catalítica, seletividade, especificidade e biodegradabilidade, seu uso vem aumentando em diversas aplicações industriais nos últimos anos (KAUR et al., 2021; ZHENG; XU, 2011). A aplicação dos biocatalisadores apresenta um crescimento emergente em indústrias alimentícias (ZHANG et al., 2018), farmacêuticas (NAGHDI et al., 2018), de cosmético

(KHAN; RATHOD, 2015), têxteis (MADHU; CHAKRABORTY, 2017), dentre outras. Apesar dos catalisadores químicos estarem disponíveis a um custo mais baixo, as enzimas são biocatalisadores que apresentam inúmeras vantagens sobre as abordagens sintéticas convencionais, uma vez que, promovem processos ambientalmente verdes e proficientes e não geram subprodutos tóxicos durante a reação (JIANG et al., 2014; GIRELLI et al., 2020).

A utilização de enzimas livres em operações industriais no entanto é frequentemente limitada por fatores relacionados a sua instabilidade em ambientes industriais extremos, capacidade de recuperação do meio aquoso, e custos elevados (GIRELLI et al., 2020; XIE et al., 2022). Uma das estratégias desenvolvidas para superar as limitações de utilização da enzima livre é o processo de imobilização (LIU et al., 2021).

A imobilização da enzima permite melhorar sua estabilidade em relação a amplas faixas de pH e temperatura, possibilitando seu uso sucessivo, evitando sua perda de atividade e podendo ser recuperadas no final da reação do meio aquoso (BILAL et al., 2019; TAHERI-KAFRANI et al., 2020). Além disso, a imobilização permite que os processos de conversão ocorram de forma contínua, podendo oferecer possibilidades de aplicações em diferentes campos industriais (GIRELLI et al., 2020).

O sucesso da imobilização depende fortemente da seleção apropriada do suporte. Um suporte adequado para imobilização enzimática deve apresentar características como: ser inerte, estável, não possuir interações com o sítio da enzima que dificulte sua atuação, possuir resistência mecânica para permitir múltiplos ciclos de uso, ser regenerável, rentável e não apresentar toxicidade (KAUR et al., 2021; XIE et al., 2022). Nos últimos anos diversos materiais orgânicos (alginato, carragenina e quitosana) e inorgânicos (sílica, alumina, silicatos entre outros) têm sido usados como suporte para imobilização de enzimas (HOMAEI et al., 2013; ZUCC et al., 2016; BILAL; IQBAL, 2019; BILAL et al., 2021).

A imobilização da enzima envolve a interação entre a enzima e o material usado como suporte, assim, para que o processo seja eficiente é necessário conhecer as características estruturais e funcionais da superfície do suporte utilizado e da enzima de interesse (LIU et al., 2021). Os parâmetros importantes que devem ser conhecidos da matriz utilizada como suporte para imobilização incluem a área de superfície, porosidade e carga da superfície (BILAL et al., 2019; MORSI et al., 2021).

Devido a característica como alta porosidade, presença de grupos funcionais em sua superfície, acessibilidade, estabilidade térmica, grande área superficial o carvão ativado vem sendo utilizado como um suporte eficiente na imobilização de enzimas como lipase (BRITO et al., 2017; GONÇALVES et al., 2021), pepsina (SANTOS et al., 2019) e tripsina (FERNADEZ-SANROMAN et al., 2020).

O modo de fixação da enzima no suporte pode ocorrer por mecanismos físicos (adsorção e aprisionamento), químicos (ligação covalente) e físico-químicos (microencapsulação) (SNEHA et al., 2019). Diversas estratégias de imobilização têm sido usadas por vários pesquisadores para utilização do carvão ativado como um suporte eficaz para as enzimas. Entre os diversos métodos, um dos mais utilizados para imobilização de enzimas no carvão ativado é a adsorção (BRITO et al., 2017; FERNADEZ-SANROMAN et al., 2020).

2.6.1 Imobilização por adsorção

O método de adsorção física é um dos mais empregados para imobilização, pois gera poucos efeitos na estrutura conformacional da enzima, sendo a enzima espontaneamente imobilizada pela orientação que lhe é preferível e energeticamente favorável (CUI et al., 2018). As principais interações físicas formadas entre o suporte e a enzima durante o processo de imobilização por adsorção compreendem as forças de van der Waals, ligações iônicas e ligações de hidrogênio, que são forças fracas e não alteram a estrutura original da enzima.

Como desvantagem da imobilização por adsorção tem-se o fato de que as interações entre as enzimas e o suporte são fracas, podendo levar a dessorção das enzimas que pode acontecer por vários fatores como pH, força iônica, polaridade do solvente ou temperatura, etc., que influenciam a força de ligação (PARK et al., 2008).

O processo de imobilização enzimática por adsorção usando o carvão ativado é feita pelo contato da solução de enzima com o adsorvente por um período de tempo suficiente para que a enzima seja adsorvida na superfície do material sob condições apropriadas. A afinidade enzima-suporte formada acelera a imobilização da enzima na superfície do carvão (LIU et al., 2021). Quanto maior a porosidade, maior a quantidade de enzima que será adsorvida na superfície e nos poros do carvão ativado. A adsorção da enzima na superfície do suporte é determinada pelo tipo de carvão ativado, grupos funcionais em

sua superfície e tipo de enzima utilizada, além do pH da solução (JESIONOWSKI et al., 2014).

Diversas enzimas foram imobilizadas com êxito pelo método de adsorção em carvão ativado (BRITO et al., 2017; SANTOS et al., 2019; GONÇALVES et al., 2021), apresentando alto rendimento de imobilização, aumento de estabilidade frente ao tempo de armazenamento, pH e temperatura.

Dentre as enzimas imobilizadas por adsorção atualmente, a lacase vem sendo empregada. Taheran et al. (2017) imobilizaram lacase em carvão ativado com poliacrilonitrila por adsorção e o empregaram na remoção do antibiótico clortetraciclina em solução aquosa. Os resultados mostraram que a lacase imobilizada foi estável ao armazenamento, temperatura e pH em comparação com a lacase livre melhorada e reteve mais de 50% de sua atividade após 7 ciclos de uso na oxidação de ABTS (2,2'-Azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)), e ao utilizá-la para degradação de clortetraciclina em modo contínuo exibiu uma eficiência de remoção de 58,3%.

Wu et al. (2019) aplicaram lacase imobilizada pelo método de adsorção em estrutura orgânica de metal magnético funcionalizada com amina. A estabilidade proporcionada pela imobilização da enzima permitiu que a lacase retivesse 89% da sua atividade inicial após armazenamento por 28 dias e quando aplicada na remoção do 2-4-diclorofenol a eficiência de remoção do composto fenólico atingiu 87%, demonstrando grande potencial no tratamento de águas residuais.

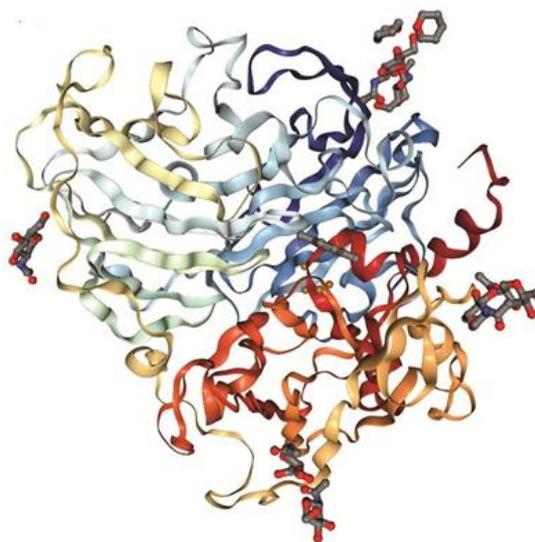
Zhang et al. (2020) relataram a imobilização de lacase por adsorção em carvão ativado para remoção de bisfenol A em água. Os autores obtiveram alto desempenho na remoção do bisfenol A, mantendo 85% da eficiência de remoção mesmo após 7 ciclos de uso repetido, além de apresentar alta estabilidade térmica e tolerância ao pH em comparação com a enzima livre.

2.7 Lacase

As lacases (benzenediol: oxidoreduções de oxigênio, EC 1.10.3.2) (Figura 3) pertencem a uma pequena família de enzimas denominadas oxidases multi-cobre (DARONCH et al., 2020). Estas são glicoproteínas extracelulares constituídas por uma sequência de polipeptídeos contendo cerca de 500 resíduos de aminoácidos com peso molecular na faixa de 50–80 kDa, para lacases de origem fúngicas, 20-80 kDa para

lacases bacterianas (ZERVA et al., 2019) e um conteúdo de até 25% de carboidratos (RAMIREZ et al., 2021).

Figura 3. Estrutura tridimensional da lacase de *Trametes versicolor*



Fonte: Daronch et al. (2020)

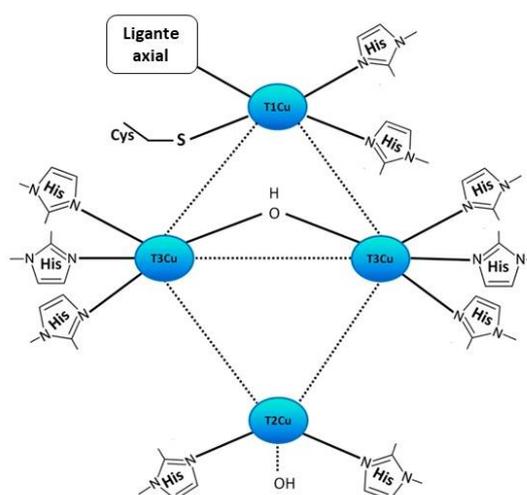
A primeira descoberta das lacases foi relatada por Yoshida (1883) com a observação do rápido endurecimento do látex de árvores de laca japonesa *Rhusvernificifera* na presença de ar, sendo caracterizada como uma oxidase contendo metal em seu sítio ativo (BERTRAND, 1985). A partir de então a atividade da lacase foi encontrada em outras espécies de plantas, certos procariontes e vários insetos, sendo as lacases de origem fúngica as mais biotecnologicamente úteis, uma vez que são mais fáceis de produzir e purificar (LI et al., 2020).

As lacases catalisam a oxidação de um grande número de compostos fenólicos e aminas aromáticas, e também compostos não fenólicos na presença de compostos com baixa massa molecular como mediadores de transferência de elétrons (ALVARADO-RAMÍREZ et al., 2021). Possuem baixa especificidade ao substrato, o que permite a oxidação de substratos como fenóis substituídos com metoxi, benzenotióis, polifenóis e uma ampla gama de outros compostos (DARONCH et al., 2020). Possuem temperatura ótima variando entre 20 a 60 °C e pH de 3 a 9, a depender da fonte de enzima e substrato (CASTROVILLI et al., 2020).

Como membro da família de oxidases multicobres, as lacases são caracterizadas pela presença de átomos de cobre (Cu) dentro do seu núcleo catalítico (CATHERINE et al., 2016). Os átomos de metal Cu, presente na enzima desempenham um papel fundamental na redução do oxigênio para água. O centro catalítico possui quatro íons de cobre (Cu), todos com o mesmo estado de oxidação (Cu^{+2}), sendo um cobre (Cu_1) do tipo 1 (T1), o que confere a cor azul característica a este grupo de enzimas, um do tipo 2 (T2) (Cu_2) e dois do tipo 3 (T3) (Cu_3), dispostos em locais diferentes de ligação ao substrato (BACKES et al., 2021). As classificações dos íons de cobre são baseadas em suas características de ressonância paramagnética de elétrons (EPR) e suas propriedades espectroscópicas (SEKRETARYOVA; JONES; SOLOMON, 2019).

A arquitetura molecular das lacases (Figura 4) está sequencialmente arranjada em três domínios, cada domínio tem uma topologia do tipo β -barril, morfologia comum a diversas cupro-proteínas (RVA et al., 2019; DARONCH et al., 2020). O cobre tipo 1 está localizado no domínio 3, onde está ligado à histidina, cisteína e geralmente a um resíduo de metionina, sendo supostamente o local de oxidação primário. O cobre do tipo 1 e os dois do tipo 3 formam um centro trinuclear no qual o centro está inserido na interface entre os domínios 1 e 3. Estes estão coordenados com histidina, sendo o último local onde ocorre redução do oxigênio molecular (ALVARI-RAMÍREZ et al., 2021).

Figura 4. Arquitetura molecular do sítio de ligação do cobre em lacases.



Fonte: Adaptado Zerva et al. (2019)

2.7.1 Mecanismo de ação da enzima lacase

A reação mediada por lacase se processa de maneira que ao final do ciclo quatro moléculas de substratos são oxidados, resultando na redução do oxigênio molecular à água (BACKES et al., 2021).

O ciclo catalítico se inicia com a oxidação de quatro moléculas do substrato sendo oxidadas pelo CuT_1 , que transfere os elétrons extraídos para o centro trinuclear T2/T3 onde ocorre a conversão da enzima de sua forma nativa com os íons Cu^{+2} para um estado reduzido (Cu^{+1}). Na etapa seguinte, a molécula de oxigênio se liga ao centro trinuclear onde recebe elétrons transferidos dos íons CuT_3 reduzido, formando um intermediário peróxido (O_2^{-2}). Por fim, o peróxido intermediário formado sofre clivagem na ligação O-O, liberando uma molécula de água e decai para um radical oxigênio. O radical oxigênio é reduzido a um novo peróxido pelo íon CuT_2 que libera uma segunda molécula de água e recompõe a enzima ao seu estado original (SOLOMON, 2016).

2.7.2 Aplicação de lacases na indústria de alimentos

A habilidade das lacases em catalisar uma ampla gama de compostos aromáticos as torna atrativas para aplicações industriais. O aumento do interesse de aplicação das lacases em diferentes áreas do processamento de alimentos é explicada por esta enzima se encaixar nos conceitos de sustentabilidade, alta eficiência e processamento ecologicamente correto que são explorados e adotados pela indústria de alimentos (UPADHVAV et al., 2016).

As lacases são catalisadores essencialmente verdes, pois utilizam o oxigênio molecular como aceptor de elétrons final, liberando apenas água como subproduto final das reações de catálise, podendo ser uma alternativa para substituir os catalisadores inorgânicos. Sendo utilizada com êxito no tratamento de poluentes ambientais para descoloração (REDA; HASSAN; MOGHZY, 2018), fabricação de biossensores para detecção de compostos fenólicos (MOHTAR et al., 2019) e em diversos setores da indústria de alimentos (BECKES et al., 2021).

A indústria de panificação utiliza diversas enzimas com o objetivo de melhorar o sabor, textura, volume e frescor em produtos de panificação. As lacases já foram utilizadas na indústria de panificação para melhorar as propriedades elásticas em massas

produzidas com farinha sem glúten, como agente de melhoria de fermentação (MIAO et al., 2015; MANHIVI et al., 2018; BACKES et al., 2021).

Na indústria de bebidas, os compostos polifenóis presentes nas frutas, apesar de seus benefícios nutricionais e terapêuticos, podem interagir com proteínas e formar sedimentos ou turvação, que pode acarretar no aumento de turbidez e alteração de aroma e sabor (AGRAWAL et al., 2018). O uso de lacases vem sendo indicado como agentes estabilizadores, devido a sua capacidade de oxidar a maioria de fenóis de bebidas (GASSARA-CHATTI et al., 2013; YIN et al., 2017). Bezerra et al. (2015) imobilizaram lacase de *Trametes versicolor* em fibras naturais de casca de coco verde e empregaram na clarificação de suco de maçã, reduzindo 61% da cor original do suco e 29% da turbidez.

Na indústria de laticínios a lacase foi utilizada para melhorar as propriedades viscoelásticas do iogurte de leite desnatado por reticulação das proteínas do leite, uma vez que esse produto são sensíveis ao cisalhamento e por isso sofrem perdas estruturais. O uso da lacase proporcionou o melhoramento de todos os parâmetros reológicos e viscosidade de cisalhamento para o iogurte (STRUCH et al., 2016).

As lacases ainda não são largamente utilizadas devido a entraves como o custo do catalisador disponível comercialmente, problemas relacionados à sua instabilidade em condições operacionais com rápida perda de atividade, além de dificuldades na recuperação de enzimas e produtos limitam suas aplicações industriais (ZDARTA et al., 2019). Muitos autores enfatizam que o uso da enzima imobilizada poderia resolver os problemas citados, sendo este um procedimento potencialmente viável para redução operacional de custos (VERRASTRO et al., 2016; NARNOLIYA et al., 2019). Dessa forma, é essencial o desenvolvimento de suportes que possam sanar as dificuldades de aplicação desse biocatalisador por meio da imobilização.

3.1 Objetivo geral

Imobilização da enzima lacase em carvão ativado produzido a partir do sabugo de milho submetido à carbonização hidrotérmica.

3.2 Objetivos específicos

- Caracterização físico química do precursor submetido ao tratamento hidrotérmico (farelo do sabugo de milho verde);
- Otimização das condições da carbonização hidrotérmica (tempo, temperatura e concentração) do resíduo sabugo de milho para a obtenção de um material com maior teor de grupos funcionais oxigenados;
- Caracterização morfológica e físico química do hydrochar;
- Síntese de carvões ativados pelo método da ativação química com ácido fosfórico do resíduo após a carbonização hidrotérmica;
- Caracterização textural, química e morfológica do carvão obtido;
- Imobilização de Lacase por adsorção física utilizando como suporte o carvão ativado sintetizado;
- Avaliação da atividade da enzima na forma livre e imobilizada na oxidação do ABTS;
- Avaliação da influência do pH e temperatura na imobilização e do meio reacional da enzima livre e imobilizada.

4. REFERÊNCIAS

- ABIMILHO – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DO MILHO. Estatísticas. Disponível em: <http://www.abimilho.com.br/estatisticas>. Acesso em: 11 nov. 2021.
- ABUELNOOR, N.; ALHAJAJ, A.; KHALEEL, M.; VEGA, L. F.; ABU-ZAHRA, M. R. M. Activated carbons from biomass-based for CO₂ capture applications. **Chemosphere**, v. 282:131111, 2021.
- ACHINAS, S.; ACHINAS, V.; EUVERINK, G. J. W. A technological overview of biogas production from biowaste. **Engineering**, v. 3, p. 299-307, 2017.
- AGBOZU, I. E.; EMORUWA, F. O. Batch adsorption of heavy metals (Cu, Pb, Fe, Cr, and Cd) from aqueous solution using coconut husk. **Africa Journal Environmental Science Technology**, v. 4, p. 239-246, 2014.
- AGRAWAL, K.; CHATURVEDI, V.; VERMA, P. Fungal laccase discovered but yet um discovered. **Bioresource Bioprocess**, v. 5, p. 4–16, 2018.
- AGRIC. Colheita do milho verde. Disponível em: https://www.agric.com.br/como_citar.html. Acesso em: 31/01/2022.
- AGUAYO-VILLARREAL, I. A.; MONTES-MORÁN, M. A.; HERNÁNDES-MONTOYA, V.; BONILLA-PETRICIOLET, A.; CONCHESO, A.; ROJAS-MAYORGA, C. K.; GONZÁLEZ, J. Importance of iron oxides on the carbons surface vc the specific surface for VOCs adsorption. **Ecologic Engineering**, v. 106, p. 400-408, 2017.
- ALDRICH, S.R.; SCOTT, W.O.; LENG, E.R. Modern corn production. 2.ed. Champaign: A & L Publication, p. 371, 1982.
- ALONSO, D.; WETTSTEIN, S. G.; DUMESIC, J. A. Bimetallic catalysts for upgrading of biomass to fuels and chemicals. **Chemical Society Reviews**, v. 41, p. 8075-8098 2012.
- ALVARADO-RAMÍREZ, L.; ROSTRO-ALANIS, M.; RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, J.; CASTILLO-ZACARÍAS, C.; SOSA-HERNÁNDEZ, J. E.; BARCELÓ, D.; IQBAL, H. M. N.; PARRA-SALDÍVAR, R. Exploring current tendencies in techniques and materials for immobilization of laccases- A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 181, p. 683-696, 2021.
- ANTERO, R. V. P.; ALVES, A. C. F.; OLIVEIRA, S. B.; OJALA, S. A.; BRUM, S. S. Challenges and alternatives for the adequacy of hydrothermal carbonization of lignocellulosic biomass in cleaner production systems: A review. **Journal of Cleaner Production**, v. 252:119899, 2020.
- AO, W.; FU, J.; MAO, X.; KAG, Q.; RAN, C.; LIU, Y.; ZHANG, H.; GAO, Z.; LI, J.; LIU, G. Microwave assisted preparation of activated carbon from biomass: a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 91, p. 958-979, 2018.
- BACH, QV.; SHREIBERG, O. Upgrading biomass fuels via wet torrefaction: A review and comparison with dry torrefaction. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 54, p. 665-677, 2016.
- BACKES, E.; KATO-SCHWARTZ, C. G.; CORRÊA, R. C. G.; MOREIRA, R. F. P.; PERALTA, R. A.; BARROS, L.; FERREIRA, I. CFR.; ZANIN, G. M.; BRACHT, A.; PERALTA, R. M. Laccases in food processing: Current status, bottlenecks and perspectives. **Trends in Food Science & Technology**, 2021.

BERTRAND, G. Sur La laccase et sur le pouvoir oxydant de cette diastase. *Comptes Rendus l'Académie des Sciences*, v. 120, p. 266-269, 1985.

BEZERRA, T. M. S.; BASSAN, J. C.; SANTOS, V. T. O.; FERRAZ, A.; MONTI, R. Covalent immobilization of laccase in green coconut fiber and use in clarification of apple juice. *Process Biochemistry*, v. 50, p. 417-423, 2015.

BHATNAGAR, A. et al. An overview of the modification methods of activated carbon for its water treatment applications. *Chemical Engineering Journal*, v. 219, p. 499-511, 2013.

BILAL, M.; ASGHER, M.; CHENG, H.; YAN, Y.; IQBAL, HMN. Multi-point enzyme immobilization, surface chemistry, and novel platforms: a paradigm shift biocatalyst design. *Critical Reviews in Biotechnology*, v. 39, p.202-219, 2019.

BILAL, M.; IQBAL, H. M. N. Lignin peroxidase immobilization on Ca-alginate beads and its dye degradation performance in a packed bed reactor system. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 20:101205, 2019.

BILAL, M.; HUSSAIN, N.; AMÉRICO-PINHEIRO, J. H.; ALMULAIKY, Y. Q.; IQBAL, H. M. N. Multi-enzyme co-immobilized nano-assemblies: Bringing enzymes together for expanding bio-catalysis scope to meet biotechnological challenges. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 186, p. 735-749, 2021.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Projeções do Agronegócio, 2019/2020 a 2029/2030. Disponível em: https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/politica-agricola/todas-publicacoes-de-politica-agricola/projecoes-do-agronegocio/projecoesdo-agronegocio_2019_20-a-2029_30.pdf/view. Acesso em: 02 nov. 2021.

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

CAMPOS, N. F.; GUEDES, G. A. C.; OLIVEIRA, L. P. S.; GAMA, B. M. V.; SALES, D. C. S.; RODRÍGUEZ-DÍAZ, J. M.; BARBOSA, C. M. B. M.; DUARTE, M. M. M. B. Competitive adsorption between Cu^{2+} and Ni^{2+} on corn cob activated carbon and the difference of thermal effects on mono and bicomponent systems. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, v. 8:104232, 2020.

CASTROVILLI, M. C.; BOLOGNESI, P.; CHIARINELLI, J.; AVALDI, L.; CALANDRA, P.; TEMPESTA, E.; GIARDI, M. T.; ANTONACCI, A.; ARDUINI, F.; SCOGNAMIGLIO, V. Electrospray deposition as a smart technique for laccase immobilization on carbon black-nanomodified screen-printed electrodes. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 163: 112299, 2020.

CATHERINE, H., PENNINCKX, M., FRÉDÉRIC, D. Product formation from phenolic compounds removal by laccases: A review. *Environmental Technology & Innovation*. 5, p. 250–266, 2016.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Perspectivas para a agropecuária, safra 2020/21, Edição grãos, volume 8, Brasília, 2020. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/perspectivas-para-a-agropecuaria>. Acesso em: 01 set. 2021.

CUI, J.; REN, S.; SUN, B.; JIA, S. Optimization protocols and improved strategies for metal-organic frameworks for immobilizing enzymes: Current development and future challenges. *Coordination Chemistry Reviews*, v. 370, p. 22-41, 2018.

DARONCH, N. A.; KELBERT, M.; PEREIRA, C. S.; ARAÚJO, P. H. H.; OLIVEIRA, D. Elucidating the choice for a precise matrix for laccase immobilization: A review. **Chemical Engineering Journal**, v. 397, 125506, 2020.

DE CAMPOS, T.; CANÉCHIO, V. F. Principais culturas - II. 2. ed. Campinas: Instituto Campineiro de Ensino Agrícola, 1973.

DE TUESTA, J. L. D.; SAVIOTTI, M. C.; ROMAN, F. F.; PANTUZZA, G. F.; SARTORI, H. J. F.; SHINIBEKOVA, A.; KALMAKHANOVA, M. S.; MASSALIMOVA, B. K.; PIETROBELLI, J. M. T.A.; LENZI, G. G.; GOMES, H. T. Assisted hydrothermal carbonization of agroindustrial by products as effect ivestep in the production of activated carbono catalysts with peroxide oxidation of micro-pollutants. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 9:105004, 2021.

DELHAES, P. Chemical vapor deposition and in filtration processes of carbono materials. *Carbon*, v. 40, p. 641-657, 2002.

DEY, T.; BHATTACHARJEE, T.; NAG, P.; GHATI, A.; KUILA, A. Valorization of agro-waste into value added products for sustainable development. **Bioresource Technology Reports**, v. 12:100834, 2021.

DUAN, D.; CHEN, D.; HUANG, L.; ZHANG, Y.; ZHANG, Y.; WANG, Q.; XIAO, G.; ZHANG, W.; LEI, H.; RUAN, R. Activated carbono from lignocellulosic biomass as catalyst: A review of the applications in fast pyrolysis process. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 158:105246, 2021.

DUAN, XL.; YUAN, CG.; JING, TT.; YUAN, XD. Removal of elemental mercury using large surface area micro-porous corn cob activated carbon by zinc chloride activation. **Fuel**, v. 239, p. 830-840, 2019.

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.

EMBRAPA. Milho em números (safra 2013/2014). Londrina, 2015. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/milho/cultivos/milho1/dados-economicos>>. Acesso em: 23 jul. 2021.

FAKKAEW, K.; KOOTTATEP, T.; POLPRASERT, C. Effects of hydrolysis and carbonization reactions on hydrochar production. *Bioresource Technology*, v. 192, p. 328-334, 2015.

FANG, J.; GAO, B.; CHEN, J.; ZIMMERMAN, A. R. Hydrochars derived from plant biomass under various conditions: Characterization and potential applications and impacts. **Chemical Engineering Journal**, v. 267, p. 253-259, 2015.

FANG, J.; ZHAN, L.; OK, Y. S.; GAO, B. Mini review of potential applications of hydrochar derived from hydrothermal carbonization of biomass. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 57, p. 15-21, 2018.

FAO. Food and agriculture data: production: crops. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>>. Acesso em: 3 jul. 2021.

FERNADEZ-SANROMAN, A.; ACEVEDO-GARCÍA, V.; PAZOS, M.; SANROMÁN, M. A.; ROSALES, E. Removal of sulfamethoxazole and methylparaben using hydrocolloid and fiber industry wastes: Comparison with biochar and laccase-biocomposite. **Journal of Cleaner Production**, v. 271:122436, 2020.

- FISCHER, C.; OSCHATZ, M.; NICKEL, W.; LEISTENSCHNEIDER, D.; KASKEL, S.; BRUNNER, E. Bioinspired carbide-derived carbons with hierarchical pore structure for the adsorptive removal of mercury from aqueous solution. *Chemical Communications*, v. 53, p. 4845-4848, 2017.
- FUNKE, A.; ZIEGLER, F. Hydrothermal carbonization of biomass: A summary and discussion of chemical mechanisms for process engineering. ***Biofuels, Bioproducts and Biorefining***, v.4, p. 160-177, 2010.
- GAETE, A. V.; TEODORO, C. E. S.; MARTINAZO, A. P. Use of agro-industrial waste for cellulase production: a review. ***Research, Society and Development***, v. 9, p. 57-85, 2020.
- GAI, C.; GUO, Y.; LIU, T.; PENG, N.; LIU, Z. Hydrogen-rich gas production by steam gasification of hydrochar derived from sewage sludge. ***International Journal of Hydrogen Energy***, v. 41, p. 3363-3372, 2016.
- GAMGOUM, R.; DUTTA, A.; SANTOS, R. M.; CHIANG, Y. W. Hydrothermal conversion of neutral sulfite semi-chemical red liquor into hydrochar. ***Energies***, v. 9, n. 6, p. 435, 2016.
- GAO, A. Y. Z. P.; MENG, F.; ZHANG, Y.; LIU, Z.; ZHANG, W.; XUE, G. Preparation and characterization of hydrochar from waste Eucalyptus bark by hydrothermal carbonization. ***Energy***, v. 97, p. 8, 2016.
- GARCÍA, P. G. Activated carbon from lignocellulosics precursors: A review of these methods, characterization techniques and applications. ***Renewable and Sustainable Energy Reviews***, v. 82, p. 1393-1414, 2018.
- GASSARA-CHATTI, F.; BRAR, S. K.; AJILA, C. M.; VERMA, M.; TYAGI, R. D.; VALERO, J. R. Encapsulation of lignolytic enzymes and its application in clarification of juice. ***Food Chemistry***, v.137, p. 18–24, 2013.
- GIRELLI, A. M.; ASTOLFI, M. L.; SCUTO, F. R. Agro-industrial wastes as potential carriers for enzyme immobilization: A review. ***Chemosphere***, v. 244:125368, 2020.
- GONÇALVES, G. R. F.; GANDOLFI, O. R. R.; BRITO, M. J. P.; BONOMO, C. F.; FONTAN, R. C. I.; VELOSO, C. M. Immobilization of porcine pancreatic lipase on activated carbon by adsorption and covalent bonding and its application in the synthesis of butyl butyrate. ***Process Biochemistry***, v. 111, p. 114-123, 2021.
- GULEÇ, F.; RIESCO, L. M. G.; WILLIAMS, O.; KOSTAS, E. T.; SAMSON, A.; LESTER, E. Hydrothermal conversion of different lignocellulosic biomass feeds: Effect of the process conditions on hydrochar structures, v. 302, p. 121-166, 2021.
- HE, C.; ZHAO, J.; YANG, Y.; WANG, JY. Multiscale characteristics dynamics of hydrochar from hydrothermal conversion of sewage sludge under sub- and near-critical water. ***Bioresource Technology***, v. 211, p. 486-493, 2016.
- HEIDARI, M.; DUTTA, A.; ACHARYA, B.; MAHMUD, S. A review of the current knowledge and challenges of hydrothermal carbonization for biomass conversion. ***Journal of the Energy Institute***, v. 92, p. 1779-1799, 2019.
- HOURE, M.; RIVERO, B. I.; CACICEDO, M.L.; CASTRO, G.R. Microbial production and recovery of hybrid biopolymers from wastes for industrial applications- a review. ***Bioresource Technology***, v. 340:125671, 2021.
- HUANG, G.; WANG, Y.; ZHANG, T.; WU, X.; CAI, J. High-performance hierarchical N-doped porous carbons from hydrothermally carbonized bamboo shoot shells for symmetric

supercapacitors. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2018.12.024>

HUANG, G.; WANG, Y.; ZHANG, T.; ZHANG, T.; WU, X.; CAI, J. High-performance hierarchical N-doped porous carbons from hydrothermal lcarbonized bamboo shoot shells for symmetric supercapacitors. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 96, p. 672-680, 2019.

HUI, T. S.; ZAINI, M. A. A. Potassium hydroxide activation of activated carbono: a commentary. **Carbon Letters**, v. 16, p. 275-280, 2015.

ILHEANACHO, O. C.; NWABANNE, J. T.; OBI, C. C.; ONU, C. E. Packed bed column adsorption of phenol onto corncob activated carbono: linear and nonlinear kinectics modeling. **South African Journal of Chemical Engineering**, v. 36, p. 80-93, 2021.

ISIKGOR, F. H.; BECER, C. R. Lignocellulosic biomass a sustainable platform for the production of bio-based chemicals and polymers. **Polymeros Chemicals**. v. 6, p. 4497-559, 2015.

JAIN, A.; BALASUBRAMANIAN, R.; SRINIVASAN, M. P. Hydrothermal conversion of biomass waste to activated carbon with high porosity: A review. **Chemical Engineering Journal**, v. 283, p. 789-805, 2016.

JAIN, A.; BALASUBRAMANIAN, R.; SRINIVASAN, M. P. Tuning hydrochar properties for enhanced mesopore development in activated carbono by hydrothermal carbonization. **Microporous Mesoporous Materials**, v. 203, p. 178-185, 2015.

JESIONOWSKI, J.; ZDARTA, B.; KRAJEWSKA. Enzyme immobilization by adsorption: a review. *Adsorption*, v. 20, p. 801-821, 2014.

JIAN, X.; ZHUANG, X.; LoniI, B.; XU, X.; WEI, Z.; SONG, Y.; JIANG, E. Compararison of characterization and adsorption of biochars produced from hydrothermal carbonization and pyrolysis. **Environmental Technology & Innovation**, v. 10, p. 27-35, 2018.

JOSS, A.; SIEGRIST, H.; TERNES, T. A. Are we about to upgrade waste water treatment for removing organic micropollutants? *Water Science Technology*, v. 57, p. 251-255, 2008.

KABAKCI, S. B.; BARAN, S. S. Hydrothermal carbonization of various lignocellulosics: Fuel characteristics of hydrochars and surface characteristics of activated hdrochars. **Waste Management**, v. 100, p. 259-268, 2019.

KAMBO, H. S.; DUTTA, A. A comparative review of biochar and hydrochar in terms of production, physico-chemical properties and applications. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 45, p. 359-378, 2015.

KAUR, N.; BHARDWAJ, P.; SINGH, G.; ARYA, S. K. Applicative insights on nascent role of biochar production, tailoring and immobilization in enzyme industry- A review. **Process Biochemistry**, v. 107, p. 153-163, 2021.

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

KHAN, N.; MOHAN, S.; DINESHA, P. Regimes of hydrochar yield from hydrothermal degradation of various lignocellulosic biomass: A review. *Journal of Cleaner Production*, v. 288, 2021.

- KNEZ, Z.; MARKOCIC, E.; KNEZ HRNCIC, M.; RAVBER, M.; SKERGET, M. High pressure water reforming of biomass for energy and chemicals: A short review. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 96, p. 46-52, 2015.
- KUMAR, A.; SAINI, K.; BHASKAR, T. Hydrochar and biochar: Production, physico chemical properties and techno economic analysis. **Bioresource Technology**, v. 310:123442,2020.
- LEWOYEHU, M. Comprehensive review on synthesis and application of activated carbon from agriculture residues for their mediation of venomous pollutants in wastewater. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 159:105279, 2021.
- LI, N.; XIA, Q.; NIU, M.; PING, Q.; XIAO, H. Immobilizing laccase on different species wood biochar to remove the chlorinated biphenyl in wastewater, **Science Reports**, v. 8:13947, 2018.
- LI, X.; LI, S.; LIANG, X.; MCCLEMENTS, D. J.; LIU, X.; LIU, F. Applications of oxidases in modification of food molecules and colloidal systems: Laccase, peroxidase and tyrosinase. **Trends in Food Science & Technology**, v. 103, p. 78-93, 2020.
- LIMA, H. H. C.; MANIEZZO, R. S.; LLOP, M. E. G.; KUPFER, V. L.; ARROYO, P. A.; GUILHERME, M. R.; RUBIRA, A. F.; GIROTTO, E. M.; RINALDI, A. W. Synthesis and characterization of pecan nutshell-based adsorbent with high specific área and high methylene blue adsorption capacity. **Journal of Molecular Liquids**, v. 276, p. 570-576, 2019.
- LIU, H. B.; YANG, B.; XUE, N. D. Enhanced adsorption of benzene vapor on granular activated carbon under humid conditions due to shifts in hydrophobicity and total micropore volume. **Journal of Hazardous Materials**, v. 318, p. 425-432, 2016.
- LIU, S.; BILAL, M.; RIZWAN, K.; GUL, I.; RASHEED, T.; IQBAL, HM. N. Smart chemistry of enzyme immobilization using various support matrices – A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 190, p. 396-408, 2021.
- LIU, Z.; BALASUBRAMANIAN, R. Preparation and characterization of fuel pellets from wood biomass, agro-residues and their corresponding hydrochars, **Applied Energy**, v. 113, p. 1315-1322, 2014.
- LIU, Z.; LIU, Z. Comparison of hydrochar- and pyrochar-based solid acid catalysts from cornstalk: Physio chemical properties, catalytic activity and deactivation behavior. **Bioresource Technology**, v. 297, 122477, 2020.
- LONAPPAN, L.; LIU, Y.; ROUISSI, T.; POURCEL, F.; BRAR, S. K.; VERMA, M.; SURAMPALLI, R. Y. Covalent immobilization of laccase on citric acid functionalized micro-biochars derived from different feedstock and removal of diclofenac. **Chemical Engineering Journal**, v. 351, p. 985-994, 2018.
- LU, Y.; SAVAGE, PE. Supercritical water gasification of lipid-extracted hydrochar to recover energy and nutrients. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 99, p. 88-94, 2015.
- LUZ, J. M. Q.; CAMILO, J. S.; BARBIERI, V. H. B.; RANGEL, R. M.; OLIVEIRA, R. C. Produtividade de genótipos de milho doce e milho verde em função de intervalos de colheita. **Horticultura Brasileira**, Brasília, DF, v. 32, 2014. AGRIC
- MADHU, A.; CHAKRABORTY, J. N. Developments in application of enzymes for textile processing. **Journal of Cleaner Production**, v. 145, p. 114-133, 2017.
- MAHANNA, B.; SEGLAR, B.; OWENS, F.; DENNIS, S.; NEWELL, R. **Silage zone manual**. Dupont Pioneer, Johnston, IA, 2014.

MARTINEZ, C. L. M.; SERMYAGINA, E.; SAARI, J.; DE JESUS, M. S.; CARDOSO, M.; DE ALMEIDA, G. M.; VAKKILAINEM, E. Hydrothermal carbonization of lignocellulosic agro-forest based biomass residues. **Biomass and Bioenergy**, v. 147:106004, 2021.

MARZO, C.; DÍAZ, A. B.; CARO, I.; BLANDINO, A. Valorização de resíduos agroindustriais para produção de enzimas hidrolíticas por fermentação em estado sólido de fungos. **Waste Management & Research**, v. 37, p. 149-156, 2019.

MELIKE, D. O.; EVAN, F.; VAIDYA, U. K.; LUNGU, C. T. Applicability of industrial sisal fiber waste derived activated carbon for the adsorption of volatile organic compounds (VOCs). **Fibers and Polymers**, v. 19, p. 805-811, 2018.

MINARET, J.; DUTTA, A. Comparison of liquid and vapor hydrothermal carbonization of cornhusk for the use as a solid fuel. **Bioresource Technology**, v. 200, p. 804-811, 2016.

MOHTAR, L.G.; ARANDA, P.; MESSINA, G. A.; NAZARENO, M. A.; PEREIRA, S. V.; RABA, J.; BERTOLINO, F. A. Amperometric biosensor based on laccase immobilized onto a nanostructured screen-printed electrode for determination of polyphenols in propolis. **Microchemical Journal**, v. 144, p. 13-18, 2019.

MORSI, R.; AL-MAQDI, K. A.; BILAL, M.; IQBAL, H. M. N.; KHALEEL, A.; SHAH, L.; ASHRAF, S. Immobilized Soybean Peroxidase Hybrid Biocatalysts for Efficient Degradation of Various Emerging Pollutants. **Biomolecules**, v.11:904, 2021.

NAGHDI, M.; TAHERAN, M.; BRAR, S. K.; KERMANSHI-POUR, A.; VERMA, M.; SURAMPALLI, R. Y. Immobilized laccase on oxygen functionalized nanobiochars through mineral acids treatment for removal of carbamazepine. **Science of The Total Environment**, v. 584-585, p. 393-401, 2017.

NAGHDI, M.; TAHERAN, M.; BRAR, S. K.; KERMANSHAHI-POUR, A.; VERMA, M.; SURAMPALLI, R. Y. Removal of pharmaceutical compounds in water and wastewater using fungal oxidoreductase enzymes. **Environmental Pollution**, v. 234, p. 190-213, 2018.

NARNOLIYA, L. K.; AGARWAL, N.; PATEL, S. N.; SINGH, S. P. Kinetic characterization of laccase from *Bacillus atrophaeus*, and its potential in juice clarification in free and immobilized forms. **Journal of Microbiology**, v. 57, p. 900-909, 2019.

NG, S. W. L.; YILMAS, G.; ONG, W. L.; HO, G. W. One-step activation towards spontaneous etching of hollow and hierarchical porous carbon nanospheres for enhanced pollutant adsorption and energy storage. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 220, p. 533-541, 2018.

NOVIANTI, S.; BIDDINIKA, M. K.; PRAWISUDHA, P.; YOSHIKAWA, K. Upgrading of palm oil empty fruit bunch employing hydrothermal treatment in lab-scale and pilot scale. **Procedia Environmental Science**, v. 20, p. 46-54, 2014.

PARK, H. J.; PARK, Y.K.; KIM, J. S. Influence of reaction conditions and the char separation system on the production of bio-oil from radiata pine sawdust by fast pyrolysis. **Fuel Processing Technology**, v. 89, p. 797-802, 2008.

PATEL, A.; SINGHANIA, R.; SIM, S.; PANDEY, A. Thermostable cellulases: current status and perspectives. **Bioresource Technology**, v. 279, p. 385 – 392, 2019.

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 coco shells and siriguelas eeds using H₃PO₄ and ZnCl₂ as activating agents for BSA and α -lactalbumin adsorption. **Fuel Processing Technology**, v. 126, p. 476-486. 2014

PETROVIC, J.; PERISIC, N.; MAKSIMOVIC, J. D.; MAKSIMOVIC, V.; KRAGOVIC, M.; STOJANOVIC, M.; LAUSEVIC, M.; MIHAJLOVIC, M. Hydrothermal conversion of grape pomace: Detailed characterization of obtained hydrochar and liquid phase. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 118, p. 267-277, 2016.

PRÉVOTEAU, A.; RONSSE, F.; CID, I.; BOECKX, P.; RABAEY, K. The electron donating capacity of biochars is dramatically underestimated. **Scientific Reports**, v. 6:32870, 2016.

QUESADA, H. B.; DE ARAÚJO, T. P.; VARESCHINI, D. T.; DE BARROS, M. A. S. D.; GOMES, R. G.; BERGAMASCO, R. Chitosan, alginate and other macromolecules as activated carbon immobilizing agents: A review on composite adsorbents for the removal of water contaminants. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 164, p. 2535-2549, 2020.

RAKIC, V.; RAC, V.; KMAR, M.; OTMAN, O.; AUROUX, A. The adsorption of pharmaceutically active compounds from aqueous solutions onto activated carbons. **Journal of Hazardous Materials**, v. 282, p. 141-149, 2015.

RAMÍREZ, L. A.; ALANIS, M. R.; RODRÍGUEZ, J. R.; ZACARÍAS, C. C.; HERNÁNDEZ, J. E. S.; BARCELÓ, D.; IQBAL, H. MN.; SALDÍVAR, R. P. Exploring current tendencies in techniques and materials for immobilization of laccases – A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 181, p. 683-696, 2021.

REDA, M.; HASSAN, N. S.; EL-MOGHAZY, A. Decolorization of synthetic by free and immobilized laccases from newly isolated strain *Brevibacteriumhalotolerans*N11 (KY883983). **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 15, p. 138 – 145, 2018.

REFFAS, A.; BERNARDET, V.; DAVID, B.; REINERT, L.; LEHOCINE, B. M.; DUBOIS, M.; BATISSE, N.; DUCLAUX, L. Carbons prepared from coffee grounds by H₃PO₄ activation: characterization and adsorption of methylene blue and Nylos and Red N-2RBL. **Journal of Hazardous Materials**, v. 175, p. 779-788, 2010.

REN, J.; WANG, F.; ZHAI, Y.; ZHU, Y.; PENG, C.; WANG, T.; LI, C.; ZENG, G. Effect of sewage sludge hydrochar on soil properties and Cd immobilization in a contaminated soil. **Chemosphere**, v. 189, p. 627-633, 2017.

SABIO, E.; ÁLVAREZ-MURILLO, A.; ROMÁN, S.; LEDESMA, B. Conversion of tomato-peel waste into solid fuel by hydrothermal carbonization: Influence of the processing variables. **Waste Management**, v. 47, p. 122-132, 2016.

SALDARRIAGA-HERNÁNDEZ, S.; VEASCO-ALA, C.; FLORES, P. L-I.; ROSTRO-ALANIS, M. J.; PARRA-SALDIVAR, R.; IQBAL, H. MN.; CARRILO-NIEVES, D. Biotransformation of lignocellulosic biomass into industrially relevant products with the aid of fungi-derived lignocellulolytic enzymes. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 161, p. 1099-1116, 2020.

SANTOS, M. P. F.; BRITO, M. J. P.; JUNIOR, E. C. S.; BONOMO, R. C. F.; VELOSO, C. M. Pepsin immobilization on biochar by adsorption and covalent binding, and its application for hydrolysis of bovine casein. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 94, p. 1982-1990, 2019.

SANTOS-ROCHA, M. S. R.; SOUZA, R. B. A.; SILVA, G. M.; CRUZ, A. J. G.; ALMEIDA, R. M.; ALMEIDA, R. G. Hydrothermal pretreatment of corn residues for second Generation ethanol production. **Scientia Plena**, v. 13:034202, 2017.

- SANTOS, M. P. F.; PORFÍRIO, M. C. P.; JUNIOR, E. C. S.; BONOMO, R. C. F.; VELOSO, C. M. Pepsin immobilization: Influence of carbon support functionalization. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 203, p. 67-79, 2022.
- SARAVANAN, A.; KUMAR, P. S.; JEEVANANTHAM, S.; KARISHMA, S.; DAI-VIET, N. V. Recent advances and sustainable development of biofuels production from lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, 2021.
- SAVAGE, P. E. Organic Chemical Reactions in Supercritical Water. **Chemical Reviews**, v. 2, p. 603-622, 1999.
- SEKRETARYOVA, S.M. JONES, E.I. Solomon O₂ reduction to water by high potential multicopper oxidases: Contributions of the T1 copper site potential and the local environment of the trinuclear copper cluster. **Journal of the American Chemical Society**, v. 141, p. 11304-11314, 2019.
- SENTHILKUMAR, K.; KUMAR, M. N.; DEVI, V. C.; SARAVANAN, K.; EASWARAMOORTHY, S. Agro-industrial waste valorization to energy and value-added products for environmental sustainability. Biomass Valorization to Bioenergy, **Springer**, p. 1-9, 2020.
- SEVILLA, M.; MACIÁ-AGULLÓ, J.A.; FUERTES, A. B. Hydrothermal carbonization of biomass as a route for the sequestration of CO₂: Chemical and structural properties of the carbonized products. **Biomass-Bionergy**, v. 35, p. 3152-3159, 2011.
- SHARMA, H. B.; SARMAH, A. K.; DUBEY, B. Hydrothermal carbonization of renewable waste biomass for solid biofuel production: A discussion on process mechanism, the influence of process parameters, environmental performance and fuel properties of hydrochar. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 123, 2020.
- SHEN, R.; LU, J.; YAO, Z.; ZHAO, L.; WU, Y. The hydrochar activation and biocrude upgrading from hydrothermal treatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 342, 2021.
- 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, p. 21-31, 2005.
- SNEHA H. P.; BEULAH, K. C.; MUTHY, P. S. Enzyme immobilization methods and applications in the food industry. *Enzymes in Food Biotechnology*, p. 645-658, 2019.
- SOLOMON, E. I. Dioxygen Binding, Activation, and Reduction to H₂O by Cu enzymes. **Inorganic Chemistry**, v. 13, p. 6364-6375, 2016.
- SPAHS, N.; ADDOUN, A.; MAHMOUDI, H.; GHAF FOUR, N. Purification of activated carbon prepared from olive stones. **Desalination**, v. 222, p. 519-527, 2008.
- STR, J.; MEYER, A. S.; JESIONOWSKI, T.; PINELO, M. Multi-faceted strategy based on enzyme immobilization with reactant adsorption and membrane technology for biocatalytic removal of pollutants: a critical review. **Biotechnology Advances**, v. 37, 107401, 2019.
- STRUCH, M.; KRAHE, N.K.; LINKE, D.; MOKOONLALL, A.; HINRICHS, J.; BERGER, R. G. Dose dependent effects of a milk ion tolerant laccase on yoghurt structure. **LWT – Food Science and Technology**, v. 65, p. 1144-1152, 2016.
- SUN, K.; HUANG, Q.; ALI, M.; CHI, Y.; YAN, J. Producing aromatic-enriched oil from mixed plastics using activated biochar as catalyst. **Energy Fuels**, v. 32, p. 5471-5479, 2018.

SUN, M. H.; HUANG, S. Z.; CHEN, L. H.; LI, Y.; YANG, X. Y.; YUAN, Z. Y.; SU, B. L. Applications of hierarchically structured porous materials from energy storage and conversion, catalysis, photocatalysis, adsorption, separation and sensing to biomedicine. **Chemical Society Reviews**, v. 45, p. 3479-3563, 2016.

SUSARSANAM, P.; PEETERS, E.; MAKSHINA, E. V.; PARVULESCU, V. I.; SELS, B. F. Advances in porous and nanoscale catalysts for viable biomass conversion. **Chemical Society Reviews**, v. 48, p. 2366-2421, 2019.

TAHERI-KAFRANI, A.; KHARAZMI, S.; NASROLLAHZADEH, M.; SOOZANJPOUR, A.; EJEIAN, F.; ETEDALI, P.; MANSOURI-TEHRANI, HA.; RAZMJOU, A.; YEK, SM.; VARMA, RS: Recent developments in enzyme immobilization technology for high-throughput processing in food industries. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, p. 1-37, 2020.

TEHERAN, M.; NAGHDI, M.; BRAR, S. K.; KNYSTAUTAS, E. J.; VERMA, M.; SURAMPALLI, R. Y. Degradation of chlortetracycline using immobilized laccase on polyacrylonitrile-biochar composite nanofibrous membrane. **Science of The Total Environment**, v. 605-606, p. 315-321, 2017.

TMR, 2020. Activated Carbon Market to Reach Valuation of US\$ 7.3 BN by 2030: Transparency Market Research <<https://transparencymarketresearch.com/pressrelease/activated-carbon-market.htm>> Acesso em: 17 de set. 21.

TORRE, P.; ALIAKBARIAN, B.; RIVAS, B.; DOMÍNGUEZ, J. M.; CONVERTI, A. Release of ferulic acid from corn cobs by alkaline hydrolysis. **Biochemical Engineering Journal**, v. 40, p. 500-506, 2008.

TRIPATHI, N.; HILLS, C. D.; SINGH, R. S.; ATKINSON, C. J. Biomass waste utilization in low-carbon products: harnessing a major potential resource. *Nature NPJ / Climate and Atmospheric Science*, n. 35, 2019.

TU, W.; LIU, Y.; XIE, Z.; CHEN, M.; MA, L.; DU, G.; ZHU, M. A novel activation-hydrochar via hydrothermal carbonization and KOH activation of sewage sludge and coconut shell for biomass wastes: Preparation, characterization and adsorption properties. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 593, p. 390-407, 2021.

UNUOFIN, J. O.; OKOH, A. I.; NWODO, U. U. Maize stover as a feedstock for enhanced laccase production by two gamma proteobacteria: A solution to agroindustrial waste stockpiling, v. 129, p. 611-623, 2019.

UPADHYAY, P.; SHRIVASTAVA, R.; AGRAWAL, P. K. Bioprospecting and biotechnological applications of fungal laccase. **Biotech**, v. 6, p. 15-27, 2016.

VERRASTRO, M.; CINCCO, N.; CRISPO, F.; MORONE, A.; DINESCU, M.; DUMITRU, M.; FAVATI, F.; CENTONZE, D. Amperometric biosensor based on Laccase immobilized onto a screen-printed electrode by Matrix Assisted Pulsed Laser Evaporation. **Talanta**, v. 154, p. 438-445, 2016

VIEIRA, L. H. S. **Preparação e caracterização de materiais híbridos ferro-carbono e avaliação de suas propriedades catalíticas**. 2016. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-CE.

W. STREIT, J. CHOW, K.-E. JAEGER, N. KATZKE, R. KOCH, M. BORCHERT, M. BJØRNVAD, M. ROGGENBUCK, F. LIPPOLD, P. GOLYSHIN, O. GOLYSHINA, H. TRAN, M. FERRER, R. DANIEL, J. HOLLENSTEINER, A metagenomic collection of novel and highly efficient biocatalysts for industrial biotechnology. **Impact**, v.5, p. 82-84, 2018.

- WANG, S.; DAI, G.; YANG, H.; LUO, Z. Lignocellulosic biomass pyrolysis mechanism: a state-of-the-art review. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 62, p. 33-86, 2017.
- WANG, T.; ZHAI, Y.; ZHU, Y.; LI, C.; ZENG, G. A review of the hydrothermal carbonization of biomass waste for hydrochar formation: Process conditions, fundamentals, and physicochemical properties. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 90, p. 223-247, 2018.
- WANG, X.; CHENG, H.; YE, G.; FAN, J.; YAO, F.; WANG, Y.; JIAO, Y.; ZHU, W.; HUANG, H.; YE, D. Key factors and primary modification of activated carbon and their application in adsorption of carbon-based gases: A review. **Chemosphere**, v. 287:131995, 2022.
- WU, E.; LI, Y.; HUANG, Q.; YANG, Z.; WEI, Y.; HU, Q. Laccase immobilization on amino-functionalized magnetic metal organic framework for phenolic compound removal. **Chemosphere**, v. 233, p. 327-335, 2019.
- WU, L. M.; TONG, D. S.; LI, C. S.; JI, S. F.; LIN, C. X.; YANG, H. M.; ZHONG, Z. K.; XU, C. Y.; YU, W. H.; ZHOU, C. H. Insight into formation of montmorillonite-hydrochar nanocomposite under hydrothermal conditions. **Applied Clay Science**, v. 119, p. 116-125, 2016.
- XIE, J.; ZHANG, YI.; SIMPSON, B. Food enzymes immobilization: novel carriers, techniques and applications. **Current Opinion in Food Science**, v. 43, p. 27-35, 2022.
- YAASHIKAA, P. R.; KUMAR, P. S.; VARJANI, S. Valorization of agro-industrial wastes for biorefinery process and circular bioeconomy: A critical review. **Bioresource Technology**, v. 343, p. ,2022.
- YIN, L.; YE, J.; KUANG, S.; GUAN, Y.; YOU, R. Induction, purification, and characterization of a thermo and pH stable laccase from *Abortiporus biennis* J2 and its application on the clarification of litchi juice. **Bioscience, Biotechnology & Biochemistry**, v. 81, p. 1033-1040, 2017.
- YOSHIDA, H. LXII. — química da laca (Urushi). Parte I. comunicação da sociedade química de Tokio. **Journal of the Chemical Society**, v. 43, p. 472 – 486, 1883.
- YUSHKOVA, E. D.; NAZAROVA, E. A.; MATYUHINA, A. V.; NOSKOVA, A. O, SHAVRONSKAYA, D. O, VINOGRADOV, V. V.; SKVORTSOVA, N. N.; KRIVOSHAPKINA, E. F. Application of Immobilized enzymes in food industry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 67, p. 11553-11567, 2019.
- ZHANG, Y.; LEI, H.; YANG, Z.; QIAN, K.; VILLOTA, E. Renewable high-purity monophenol production from catalytic microwave-induced pyrolysis of cellulose over biomass-derived activated carbon catalyst, ACS Sustain. **Chemical Engineering**, v. 6, p. 5349-5357, 2018.
- ZHANG, Y.; PIAO, M.; HE, L.; YAO, L.; PIAO, T.; LIU, Z.; PIAO, Y. Immobilization of laccase on magnetically separable biochar for highly efficient removal of bisphenol A in water. **RSC Advances**, v. 10, p. 4795-4804, 2020.
- ZHANG, Z.; YANG, J.; QIAN J.; ZHAO, Y.; WANG, T.; ZHAI, Y. Biowaste hydrothermal carbonization for hydrochar valorization: Skeleton structure, conversion path ways and clean biofuel applications. **Bioresource Technology**, v. 324, 2021.
- ZHENG, G. W.; XU, J. H. New opportunities for biocatalysis: driving the synthesis of chiral chemicals. **Current Opinion in Biotechnology**, v.22, p. 784-792, 2011.

ZHU, X.; LIU, Y.; QIAN, F.; ZHOU, C.; ZHANG, S.; CHEN, J. Role of hydrochar properties on the porosity of hydrochar- based porous carbon for their sustainable application. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v., 2015.

CAPÍTULO 2

ARTIGO 1

Imobilização da lacase em carvão ativado obtido a partir da carbonização hidrotérmica do sabugo de milho

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo imobilizar lacase em carvão ativado produzido a partir do sabugo de milho submetido a carbonização hidrotérmica. O ponto ótimo de síntese do hydrochar para as variáveis tempo e temperatura de carbonização foi determinado utilizando como ferramenta estatística o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), tendo como variável resposta o teor de grupos funcionais oxigenados, quantificados pelo método titulométrico descrito por Boehm. Sendo as condições determinadas de 8,2 h e 232,7°C, para tempo e temperatura, respectivamente. O teor de GFO obtido nas condições ótimas foi de $0,62 \pm 0,02 \text{ mEq.g}^{-1}$, resultando em um aumento de 100% nos grupos funcionais do precursor. Foi realizado um estudo das condições de síntese do carvão ativado que proporcionasse o melhor desempenho de imobilização e atividade enzimática da enzima lacase. Os carvões foram caracterizados em relação ao teor de GFO e foi utilizado análise estatística multivariada de componentes principais (ACP) com o objetivo de correlacionar o teor de GFO (carboxílicos, lactônicos e fenólicos) dos suportes com a capacidade de imobilização e atividade enzimática dos derivados. Através da ACP foi possível obter uma correlação positiva entre a atividade enzimática da enzima imobilizada com o teor de grupos lactônicos. O carvão ativado obtido nas melhores condições de síntese apresentou um ponto de carga zero de $4,68 \pm 0,20$, baixo teor de cinzas ($3,71 \pm 0,02 \text{ % m/m}$) com estrutura porosa bem desenvolvida, quando comparada ao hydrochar, apresentando uma área superficial de $719 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$. O efeito do pH e temperatura no processo de imobilização e do pH do meio reacional, reuso e estabilidade ao tempo de armazenamento do derivado foram avaliados. O pH 4,0 e temperatura de 25°C foram as condições que levaram a maior eficiência do processo de imobilização ($99,60 \pm 0,05 \text{ %}$) e atividade ($22,54 \pm 1,65 \text{ U.mg}^{-1}$). O derivado obtido nas condições ótimas apresentou 50% de sua atividade inicial após 5 ciclos consecutivos de utilização e reteve 50% de sua atividade após 30 dias de armazenamento, resultado superior à encontrados em outros estudos para diferentes suportes. Os resultados evidenciaram o uso promissor do carvão ativado obtido como suporte catalítico para imobilização de lacase.

Palavras-chave: Hydrochar; grupos funcionais oxigenados; suporte; PCA.

1. INTRODUÇÃO

Estima-se que à geração anual de resíduos de biomassa vegetal de origem agrícola e do seu processamento no mundo é de 140 Gt. O Brasil ocupa a terceira posição como maior produtor agrícola do mundo e estima-se que a geração de resíduos oriundos deste setor seja de 451 Mt (TRIPATHI et al., 2019). Visando evitar seu descarte, diversas tecnologias de conversão termoquímica vêm sendo exploradas para a valorização de resíduos agroindustriais, incluindo a preparação de materiais à base de carbono, com destaque para produção de hydrochar por meio da carbonização hidrotérmica (WANG et al., 2018).

A carbonização hidrotérmica (CHT) é um processo de conversão termoquímica relativamente recente que possui uma eficiência de conversão de carbono que pode chegar a 100% quando comparada a outros processos de conversão (SHARMA et al., 2020), além de ser o mais vantajoso em termos de requisitos de energia por dispensar processos de secagem da matéria-prima. O produto formado no final do processo de carbonização hidrotérmica, o hydrochar, pode ser utilizado para uma variedade de aplicações que vai desde seu uso como combustível, adsorvente e como condicionador de solo (KHAN et al., 2021). Entretanto, apresentam baixa área superficial e volume de poros devido ao depósito de produtos despolimerizados durante o processo de CHT em sua superfície, limitando sua utilização em processos de absorção (FANG et al., 2018; LIMA et al., 2019). Porém, a presença de grande número de grupos funcionais contendo oxigênio, elevada reatividade química e baixo conteúdo de cinzas fazem do hydrochar um precursor com potencial para produção de carvão ativado, sendo esse processo eficiente para melhorar as propriedades estruturais dos materiais carbonáceos sintetizados (FANG et al., 2018).

O carvão ativado (CA) é um material à base de carbono que possui elevada área superficial, estrutura porosa interna desenvolvida, bem como grande número de grupos funcionais oxigenados, estabilidade química, alta resistência mecânica e boa reciclabilidade (GARCÍA, 2018; QUESADA et al., 2020; WANG et al., 2022). Devido a essas características o CA vem sendo utilizado como um suporte eficiente na imobilização de diversas enzimas (BRITO et al., 2017; GONÇALVES et al., 2021; GARCÍA-DELGADO et al., 2018; FERNANDEZ-SANROMAN et al., 2020; SANTOS et al., 2019; FERNANDEZ-SANROMAN et al., 2020).

A imobilização da enzima permite melhorar sua estabilidade em relação a amplas faixas de pH e temperatura, possibilitando seu uso sucessivo, evitando sua perda de atividade e podendo ser recuperada no final da reação do meio aquoso (BILAL et al., 2019; TAHERI-KAFRANI et al., 2020). Além disso, a imobilização permite que os processos de conversão ocorram de forma contínua, podendo oferecer possibilidades de aplicações em diferentes campos industriais (GIRELLI et al., 2020). Diversas enzimas foram imobilizadas com êxito pelo método de adsorção em carvão ativado (BRITO et al., 2017; SANTOS et al., 2019; GONÇALVES et al., 2021, SANTOS et al., 2022). Dentre essas enzimas, vem crescendo o interesse de estudos da imobilização por adsorção da lacase (NAHDI et al., 2017; LI et al., 2018; FERNANDES-SANROMAN et al., 2020).

A lacase (EC 1.10.3.2) é uma enzima oxidoreductase que pode catalisar a oxidação de compostos fenólicos com redução de oxigênio em água. A arquitetura molecular das lacases está sequencialmente arranjada em três domínios, cada domínio tem uma topologia do tipo β -barril, morfologia comum a diversas cupro-proteínas (RVA et al., 2019; DARONCH et al., 2020). O cobre tipo 1 está localizado no domínio 3, onde está ligado à histidina, cisteína e geralmente a um resíduo de metionina, sendo supostamente o local de oxidação primário. O cobre do tipo 1 e os dois do tipo 3 formam um centro trinuclear no qual o centro está inserido na interface entre os domínios 1 e 3. Estes estão coordenados com histidina, sendo o último local onde ocorre redução do oxigênio molecular (ALVARI-RAMÍREZ et al., 2021). É uma enzima versátil que têm sido cada vez mais utilizadas em inúmeras indústrias, incluindo indústrias alimentícias, farmacêuticas, têxteis e de papel, bem como na biodegradação de poluentes ambientais (NAGHDI et al., 2018; BACKES et al., 2021). No entanto, o maior uso de lacases na indústria é geralmente dificultado por seus altos custos de produção, sua instabilidade em ambientes industriais extremos e baixa capacidade de recuperação do meio aquoso (GIRELLI et al., 2020; XIE et al., 2022). Uma das estratégias desenvolvidas para superar as limitações de utilização da enzima livre é o processo de imobilização (LIU et al., 2021).

Para tornar o processo de imobilização da lacase economicamente favorável torna-se necessário sintetizar suportes a partir de fontes renováveis e de baixo custo e com características favoráveis ao processo, tais como: elevada área superficial, distribuição uniforme de poros e presença de grupos funcionais superficiais. Além disso, a determinação de condições de imobilização e reacionais pode contribuir para preencher lacunas de conhecimento significativas sobre a estabilidade e reciclabilidade da enzima imobilizada em carvão ativado. Diante do exposto, o objetivo principal deste trabalho foi sintetizar carvão ativado a partir do sabugo de milho, oriundos da colheita para produção grãos, avaliando o efeito da carbonização hidrotérmica na eficiência do carvão para imobilização da enzima lacase e a estabilidade do derivado frente a diferença de pH, temperatura, uso sucessivo e armazenamento.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Materiais e reagentes

O resíduo utilizado como material precursor na produção do carvão ativado foi o sabugo de milho verde (*Zea mays* L.) adquirido no município de Vitória da Conquista-BA em uma empresa de fabricação de produtos à base de milho. Foi utilizada a lacase de *Agaricus bisporus*

(Atividade específica ≥ 4 U/mg, CAS number: 80498-15-3, Sigma Aldrich, USA). Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico PA-ACS.

2.2 Preparo do material precursor

O resíduo foi seco por convecção natural por um período de 7 dias, sendo exposto ao sol diariamente por 9 h. Após a secagem foi triturado em moinho de facas e peneirado em peneira de 20 mesh.

2.2.1 Estudo de otimização da produção de hydrochar

Foi utilizado um delineamento composto central rotacional (DCCR) para verificar as melhores condições de síntese de hydrochar, utilizando como variável resposta o teor de grupos funcionais oxigenados. As variáveis independentes avaliadas foram a temperatura de carbonização, tempo de carbonização e concentração de soluto. Foram realizados 17 ensaios, sendo 8 fatoriais (combinação entre os níveis -1 e +1), 6 axiais e 1 central com 3 repetições, conforme apresentado na Tabela 1.

Tabela 1. Níveis e variáveis estudadas no DCCR para produção de hydrochar.

Variáveis	Níveis				
	-1,68	-1	0	+1	+1,68
Tempo (h) (X_1)	2,00	4,03	7,00	9,97	12,00
Temperatura (C°) (X_2)	180,00	204,3	240,00	275,7	300,00
Concentração de soluto (%m/m) (X_3)	10,0	18,1	30,00	41,9	50,00

Os resultados obtidos para os diferentes tratamentos foram submetidos à análise de regressão linear múltipla, adotando-se o modelo adequado ao delineamento em questão (Equação 1).

$$\hat{Y} = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_4 X_1^2 + \beta_5 X_2^2 + \beta_6 X_3^2 + \beta_7 X_1 X_2 + \beta_8 X_1 X_3 + \beta_9 X_2 X_3 \quad (1)$$

Onde: Y é a variável resposta (quantidade de grupos funcionais oxigenados, mEq.g^{-1}), β_0 é o intercepto do modelo, β_1 , β_2 e β_3 são os coeficientes lineares, β_4 , β_5 e β_6 são os coeficientes quadráticos, β_7 , β_8 e β_9 são os coeficientes de interação e X_1 , X_2 e X_3 são as variáveis independentes estudadas.

2.3 Síntese do hydrochar

Para carbonização hidrotérmica do resíduo utilizou-se a metodologia proposta por Taget al. (2018), com adaptações. Inicialmente 10 g do farelo de sabugo de milho foram colocados em uma cápsula de teflon e adicionou-se água em diferentes proporções, de acordo com delineamento experimental apresentado na Tabela 1. As cápsulas de teflon foram fechadas e colocadas em autoclaves de aço inoxidável. Posteriormente, as autoclaves foram aquecidas em forno mufla com taxa de $5\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ até as temperaturas e tempos estudados. Após esta etapa as mesmas foram resfriadas rapidamente em banho de gelo e o hydrochar obtido foi filtrado, lavado com água destilada e seco em estufa a 105°C por 12 h.

2.4 Síntese de carvão ativado a partir do hydrochar

Para produção dos carvões ativados foi utilizado o hydrochar do farelo do sabugo de milho nas condições experimentais de ponto ótimo, ou seja, aquele que levou a obtenção de um hydrochar com maior teor de grupos funcionais oxigenados. No estudo da síntese do carvão ativado foi realizado um delineamento composto central rotacional (DCCR).

2.4.1 Estudo do efeito das condições de síntese do carvão ativado

Utilizou-se um delineamento composto central rotacional (DCCR) para avaliar as condições de síntese do carvão ativado que resultassem num material com melhor capacidade adsorptiva e que levasse a maior atividade enzimática da lacase imobilizada. As variáveis independentes avaliadas foram a temperatura de carbonização, tempo de carbonização e razão de impregnação (precursor/agente ativante). Foram realizados 17 ensaios, sendo 8 fatoriais (combinação entre os níveis -1 e +1), 6 axiais e 1 central com 3 repetições, conforme apresentado na Tabela 2.

2.4.2 Síntese dos carvões ativados

Inicialmente 10 g do hydrochar foram impregnadas com ácido fosfórico (85% P.A-ACS, Synth, Diadema, São Paulo), nas diferentes razões de impregnação, de acordo o delineamento experimental, e secos em estufa a 105°C por 24 h. Após a carbonização os carvões ativados 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.

Tabela 2. Níveis e variáveis estudadas no DCCR para produção de carvão ativado a partir do hydrochar.

Variáveis	Níveis				
	-1,68	-1	0	+1	+1,68
Tempo (min)	30,00	48,00	75,00	102,00	120,00
Temperatura (C°)	400	461	550	639	700
Razão de impregnação	0,5	1,00	1,75	2,5	3,00

2.5 Caracterização química do material precursor, dos hydrochars e do carvão ativado

O farelo obtido a partir do sabugo de milho (precursor) foi caracterizado em relação aos teores de cinzas e umidade através das metodologias propostas pela AOAC (1995). Para os teores de lignina, celulose e hemicelulose utilizou-se a metodologia de fibra detergente neutra (FDN) e fibra detergente ácida (FDA), descrita por Van Soestet al. (1991).

Os grupos funcionais totais do material precursor, dos hydrochar e do carvão ativado foram avaliados por Espectrofotometria no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR). As amostras foram analisadas de forma direta utilizando a técnica de reflectância total atenuada (ATR), detector de sulfato de triglicina deuterado (DTGS), na região infravermelha de 4000-500 cm^{-1} em espectrofotômetro Infravermelho médio Cary 360 FTIR (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA), utilizando o AgilentMicroLab PC software.

O teor de grupos funcionais oxigenados totais foi determinado no farelo, nos hydrochars e nos carvões ativados sintetizados utilizando a metodologia titulométrica descrita por Boehm (1966), que consiste na neutralização de grupos carboxílicos, lactônicos e fenólicos por utilização de uma solução 0,1 mol.L^{-1} de hidróxido de sódio (NaOH). A quantidade dos grupos ácidos totais (mEq) foi determinada a partir da diferença do volume de solução gasta de NaOH na titulação da amostra e na titulação do branco. A Equação 2 foi utilizada para obtenção da quantidade de grupos ácidos presentes nos materiais.

$$mEq = V_T \cdot N_b (V_{am} - V_b) / V_{al} \quad (2)$$

Onde: V_b e V_{am} = volume de solução padrão de NaOH gasto nas titulações do volume do branco e do volume de amostra (mL); V_T = volume total da solução de NaOH (mL); V_{al} = volume da alíquota do filtrado (mL); N_b = concentração da solução de NaOH (Eq.g/L).

O teor dos grupos ácidos (carboxílicos, lactônicos e fenólicos) individuais também foi quantificado para os carvões sintetizados a partir da diferença do volume de solução de NaOH gasto na titulação dos ensaios realizados com as soluções de hidróxido de sódio, bicarbonato de sódio, carbonato de sódio e o branco. A quantidade de grupos carboxílicos foi determinada apenas com o ensaio de bicarbonato de sódio. Os grupos lactônicos foram determinados a partir da diferença entre o volume gasto com a amostra de carbonato de sódio e de bicarbonato de sódio, e os grupos fenólicos a partir da diferença entre o volume gasto no ensaio com hidróxido e o carbonato de sódio.

O pH do ponto de carga zero (pH_{PCZ}), que define qual o pH em que a superfície do material carbonáceo possui carga neutra, foi determinado pela metodologia descrita por Kuśmierk et al. (2016). 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⁻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 mol.L⁻¹ ou hidróxido de sódio 0,50 mol.L⁻¹. Ao final de 24 h o pH foi medido e plotado o gráfico do pH final versus pH inicial. O pH_{PCZ} corresponde à faixa onde o pH final se mantém igual pH inicial, ou seja, a superfície comporta-se como um tampão.

O rendimento de síntese dos carvões a partir do hydrochar foi calculado através da Equação 3.

$$R_c(\%) = \left(\frac{m_c}{m_h} \right) \times 100 \quad (3)$$

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

O carvão sintetizado nas melhores condições foi caracterizado em relação ao teor de cinzas segundo metodologia proposta pela AOAC (1995).

O hydrochar e o carvão ativado produzidos na melhores condições segundo o delineamento experimental foram submetidos a análise térmica diferencial (DTA) e termogravimetria (TG) em um Analisador térmico (Linseis, Modelo STA PT1000, Selb, Alemanha) na faixa de temperatura de 50°C a 750°C (taxa de aquecimento de 10 °C min⁻¹) sob fluxo de nitrogênio (10 mL.min⁻¹). Para melhor conhecimento da estrutura do hydrochar e do carvão ativado sintetizados nas melhores condições de síntese, os mesmos foram submetidos a uma análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV) (Carl Zeiss, Modelo DSM940, Oberkochen, Alemanha).

A área superficial específica do hydrochar e carvão ativado 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). As isotermas de adsorção e dessorção utilizadas foram determinadas em um equipamento Micromeritics modelo ASAP 2420 (Micromeritics Instrument Corporation, Norcross, GA, USA), utilizando aproximadamente 0,20 g de amostra a 77 K.

2.6 Ensaios de imobilização de lacase nos carvões ativados obtidos

A capacidade de imobilização dos carvões sintetizados foi determinada através da metodologia de Ramírez-Montoya et al. (2015) com adaptações. A imobilização foi realizada partindo-se de uma solução de lacase com concentração inicial de 1 mg.mL⁻¹, solubilizada em tampão acetato de sódio/ ácido acético 100mM em pH 4,0, pois de acordo com Othman et al. (2021) neste pH a lacase apresenta sua máxima atividade. Alíquotas de 2,5 mL da solução enzimática foram adicionados em tubos contendo 25 mg do suporte. Os tubos foram mantidos sob agitação constante a 20 rpm em um agitador orbital em câmara BOD a 25°C. Após 24 h os tubos foram centrifugados por 15 min a 3500 rpm e o sobrenadante foi retirado para quantificação de proteínas não adsorvidas pelo método de Bradford (1976). Posteriormente, foram realizadas lavagens sucessivas nas amostras com o objetivo de remover as enzimas não imobilizadas. Para isso, 2,5 mL do tampão foi adicionado as amostras que foram agitadas a 20 rpm por 10 min, seguidos de uma nova centrifugação e tendo novamente o sobrenadante retirado e quantificado. O equilíbrio do processo foi atingido quando os valores da concentração de proteína 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 de atividade.

A capacidade de imobilização de carvão foi determinada pela diferença entre a quantidade inicial e final de proteínas, segundo a Equação 4.

$$C_{Im} = \frac{V(C_{in}-C)}{m_s} \quad (4)$$

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

2.6.1 Determinação da atividade enzimática da lacase livre e imobilizada

A atividade enzimática, tanto para a enzima na sua forma livre quando para as enzimas imobilizadas, foi determinada seguindo a metodologia de Othman et al. (2021) com alterações, através da quantificação da oxidação enzimática do substrato (2,2'-Azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)) ABTS para ABTS⁺. Para determinar a atividade catalítica da lacase em sua forma livre, utilizou-se como substrato 3,0 mL de ABTS em uma concentração de 0,58 mM em tampão citrato de sódio (100 mM, pH 4,5) a 25 °C e 0,2 mL de solução de lacase na concentração de 1mg.mL⁻¹ dissolvida em tampão acetato 100 mM (pH 4,0). A solução enzimática foi adicionada à cubeta contendo a solução de substrato e a reação foi monitorada durante 1 min através do monitoramento da mudança de absorvância em espectrofotômetro (UV-Vis Quimis, Q898UV2, SP, Brasil) a 436 nm ($\epsilon = 29.300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Uma unidade de lacase (U) foi definida como a quantidade de lacase capaz de oxidar 1 μmol de ABTS por minuto.

Na determinação da atividade da enzima imobilizada, foi adicionado 3,0 mL da solução de ABTS (0,58Mm, pH 4,5) em tubos de centrifuga contendo 25 mg do derivado e agitado a 50 rpm por 4 min a 25°C, sendo monitorada a mudança de absorvância no tempo 0 e tempo 4 min. A atividade enzimática da enzima imobilizada foi calculada por meio da aplicação da Equação 5, onde uma unidade (U) é definida como a quantidade de lacase capaz de oxidar 1 μm de ABTS por minutos por mg.

$$\text{Atividade Lacase } \left(\frac{\text{U}}{\text{mg}} \right) = \frac{\Delta A \times V_t \times 10^6}{\Delta t \times l \times \epsilon \times m_s \times 1000} \quad (5)$$

Onde : ΔA é a mudança na absorvância; V_t é o volume total do ensaio (mL), 10^6 é o fator de troca de concentração de M para μM , Δt é o tempo de incubação (min); l é o diâmetro da cubeta (cm), ϵ é o coeficiente de absorção molar ABTS ($\epsilon_{436} = 29.300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), e m_s é a massa da enzima imobilizada (mg).

2.7 Análise Estatística Multivariada: Análise de Componentes principais

O emprego da análise de componentes principais (ACP) teve como objetivo verificar os ensaios com características similares em termos de grupos funcionais oxigenados (carboxílicos, lactônicos e fenólicos) que apresentaram melhor capacidade de imobilização e atividade da enzima imobilizada. Para isso, utilizou-se a concentração de grupos funcionais oxigenados

encontrado para cada carvão sintetizado e seus respectivos valores de capacidade adsorptiva e atividade enzimática.

A partir destes dados foram obtidas as matrizes de variância e covariância (S), as quais foram fatoradas 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 6) contendo autovalores com $\lambda_1 > \lambda_2 > \dots > \lambda_n$.

$$|S - \lambda I| = 0 \quad (6)$$

Onde: S corresponde à matriz de variância e covariância; λ_i : autovalor e I: Matriz Identidade. Para cada autovalor (λ_i) foi determinado um autovetor α_i a partir da solução da Equação 7.

$$|S - \lambda_i| \alpha_i = \emptyset \quad (7)$$

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

Os autovetores obtidos foram normalizados (α_i) por meio da Equação 8.

$$\alpha_i = \frac{1}{\sqrt{\alpha_{i1}^2 + \alpha_{i2}^2 + \dots + \alpha_{in}^2}} \begin{bmatrix} \alpha_{i1}^* \\ \alpha_{i2}^* \\ \vdots \\ \alpha_{in}^* \end{bmatrix} = \frac{\alpha_{i1}^*}{\alpha_i} \quad (8)$$

Onde: α_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 α_i determinados como os coeficientes CP_i , o i -ésimo CP é obtido pela Equação 9.

$$CP_i = \alpha_{i1}Z_1 + \alpha_{i2}Z_2 + \dots + \alpha_{in}Z_n \quad (9)$$

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 (α_i) normalizado, associado ao i -ésimo autovalor (λ_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 Origin, para desenvolvimento da ACP e plotagem dos gráficos, respectivamente

2.8 Efeito do pH na imobilização de lacase e do meio reacional na atividade da lacase

O efeito do pH da solução enzimática sobre a imobilização da lacase e do meio reacional na atividade da livre e do derivado foi avaliado nos valores de pH 3,0, 4,0, 5,0, 7,0 e 9,0 a 25 °C. Os tampões utilizados neste estudo foram acetato de sódio 100 mM (pH 3,0; 4,0 e 5,0) e tampão fosfato de sódio (pH 7,0 e 9,0) com a concentração de 100 mM. Os ensaios para imobilização nos diferentes valores de pH foram realizados conforme o item 2.6. A determinação da atividade da enzima livre e imobilizada foi realizada conforme o procedimento descrito da seção 2.6.1. O resultado foi expresso em atividade relativa e o maior valor considerado como 100%. Para a análise estatística dos resultados, utilizou-se a análise de variância (ANOVA) com teste F e teste de Tukey para comparação entre médias, ao nível de 5% de significância.

2.9 Rendimento de imobilização dos carvões

As soluções da filtração e lavagem dos carvões obtidos no procedimento de imobilização descrito na seção 2.6.1 foram usados para avaliar o rendimento do processo de imobilização. Os rendimentos de imobilização foram estimados calculando a atividade das enzimas removidas do sobrenadante em comparação com a atividade da enzima livre utilizando a Equação 10.

$$\text{Rendimento de imobilização (\%)} = \frac{(A_i - A_f)}{A_i} \times 100 \quad (10)$$

Sendo: A_i : atividade inicial da enzima livre; A_f : atividade de lacase dosada na solução de filtração e das soluções de lavagem.

2.9.1 Efeito da temperatura na imobilização e na atividade da lacase

O efeito da temperatura no processo de imobilização e do meio reacional na atividade enzimática para a lacase livre e imobilizada foi avaliado nas temperaturas de 25 °C, 40 °C e 60 °C no valor de pH em que a enzima apresentou o melhor desempenho. O processo de imobilização foi realizado como descrito no item 2.6. A determinação da atividade enzimática da enzima livre e imobilizada foi realizado conforme o procedimento descrito da seção 2.6.1. O resultado foi expresso em atividade relativa e o maior valor considerado como 100%. Para a análise estatística dos resultados, utilizou-se a análise de variância (ANOVA) com teste F e teste de Tukey para comparação entre médias, ao nível de 5% de significância.

2.9.2 Estudo de reuso de lacase imobilizada

A reutilização da lacase imobilizada foi avaliada determinando a atividade enzimática conforme descrito no item 2.6 por 5 ciclos de reação de oxidação. Sendo que após cada ciclo de oxidação do substrato foram adicionados 5 ml do tampão acetato de sódio/ácido acético 100 mM em pH 4,0 nos tubos contendo o derivado, os quais passaram por um processo de agitação por 5 min a 20 rpm e centrifugação por 10 min a 3500 rpm, para retirar quaisquer resíduos de ABTS presente no meio, deixando o derivado apto para um novo ciclo.

2.9.3 Determinação dos parâmetros cinéticos

Os parâmetros cinéticos foram determinados para lacase livre e lacase imobilizada segundo metodologia proposta por Minter (2011). Para determinar os parâmetros cinéticos, a atividade foi medida variando a concentração do substrato ABTS de 0,1 a 2,0 mM. Os ensaios foram realizados em tampão acetato 100 mM (pH 4,0) a 25 °C. As constantes cinéticas de velocidade máxima (V_{max}) e a constante de Michaelis – Mentem (K_m) foram estimadas por regressão não linear de acordo com o modelo de Lineweaver-Burk apresentado na Equação 11.

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{max} + [S]_0} + \frac{1}{V_{max}} \quad (11)$$

Onde, V_0 é a taxa de reação, V_{max} é a velocidade máxima de reação, K_m é a constante de Michaelis e S a concentração de substrato (ABTS).

2.9.4 Estabilidade ao tempo de armazenamento

Com o intuito de avaliar a estabilidade da lacase imobilizada no carvão em relação ao

tempo de armazenamento, a mesma foi armazenada em tampão acetato (100 mM) em pH 4,0, por um período máximo de 30 dias em uma temperatura de aproximadamente 6 °C. A atividade enzimática foi determinada em diferentes tempos de armazenamento (1, 7, 14, 21 e 30 dias) nas condições ótimas de cada variável determinada anteriormente (pH 4,0 e temperatura de 25°C), utilizando procedimento descrito no item 2.6.1. Para a análise estatística dos resultados, utilizou-se a análise de variância (ANOVA) com teste F e teste de Tukey para comparação entre médias, ao nível de 5% de significância.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 Caracterização do material precursor

Na Tabela 3 são apresentados os resultados de caracterização química do farelo do sabugo de milho verde. A composição química dos resíduos lignocelulósicos dependem fortemente do seu estado de maturação e das condições climáticas, variando de matéria-prima para matéria-prima (KUMAR et al., 2020) e são de fundamental importância na produção dos materiais carbonáceos. Dentre os constituintes presentes no material precursor, a celulose e lignina apresentam maior influência nas propriedades que são atribuídas ao carvão ativado (SANTOS, et al., 2019).

Tabela 3. Caracterização química do farelo de sabugo de milho verde.

Amostra	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)	Cinzas (%)	GFO (mEq.g ⁻¹)
Sabugo de milho	36,78 ± 2,36	26,66±1,24	3,05±0,49	2,44±0,04	0,31±0,02

O farelo de sabugo de milho verde apresentou alto teor de celulose. Altos teores deste constituinte levam a produção de carvões ativados com maior área superficial e influencia positivamente a porosidade do material (JAIN et al., 2016; ABUELNOOR et al., 2021).

O rendimento de materiais carbonáceos produzidos a partir de resíduos agroindustriais possui uma relação direta com a composição lignocelulósica desses precursores, sendo a lignina um dos constituintes que mais influenciam no rendimento, uma vez que sua temperatura de decomposição é maior que dos demais constituintes (200 a 250°C), tendo uma maior estabilidade térmica, o que leva a produtos com maior rendimento. O percentual de lignina

encontrado para o resíduo em estudo foi inferior à média relatado na maioria de estudos da literatura para biomassas lignocelulósicas que varia de 9 a 29% (SHEN et al., 2021). Tal fato pode ser atribuído a fatores relacionados com a variedade, estágio de maturação, envelhecimento do milho após colheita, além das condições de clima e cultivo (ZUBIOLLO et al., 2021). O conteúdo de lignina é afetado ligeiramente pela carbonização hidrotérmica, dessa forma, mesmo com baixo teor de lignina o material pode apresentar alto rendimento após o processo de carbonização (KUMAR et al., 2020).

Os materiais lignocelulósicos possuem um teor de cinzas que varia de 0,8-15% (ZENG et al., 2019), que equivalem ao material mineral presente na biomassa. Observa-se que o material precursor apresentou um baixo teor de cinzas, que é influenciado também pelas condições de cultivo. O baixo teor de cinzas pode favorecer a melhoria das propriedades texturais (área superficial e porosidade) do hydrochar e do carvão ativado (SMITH et al., 2016).

O farelo do sabugo de milho verde apresenta baixo teor de grupos funcionais oxigenados (GFO) quando comparado a outros resíduos (SEVILLA; FUERTES, 2009; HE et al., 2016; BRANDÃO et al., 2020). Porém, a carbonização hidrotérmica tem como vantagem a produção de um material com elevado teor de GFO (LENG; HUANG, 2018).

3.2 Otimização do processo de carbonização hidrotérmica do resíduo

A variável resposta escolhida para o delineamento experimental (DCCR) foi o teor de grupos funcionais oxigenados dos hydrochars obtidos após a carbonização hidrotérmica do farelo do sabugo de milho nas condições experimentais estudadas (Tabela 4).

Os resultados obtidos para os grupos funcionais oxigenados (GFO) foram submetidos à análise de variância (ANOVA) ($p < 0,05$) e a significância do modelo foi verificada pelo teste F. Para isso, as variáveis independentes foram submetidas à análise de regressão utilizando seus valores codificados. Todos os parâmetros que não foram significativos foram agrupados ao erro e um novo modelo reduzido foi obtido. Os resultados da análise estão apresentados na Tabela 5.

Observa-se que o modelo de regressão foi significativo e a falta de ajuste significativa. As significâncias dos parâmetros do modelo gerado são apresentadas na Tabela 6. Verifica-se que nenhum parâmetro contendo a variável concentração (% m/m) apresentou efeito sobre os grupos oxigenados totais a 5% de significância, sendo retirados do modelo. A temperatura e o tempo apresentaram efeito quadrático para os grupos funcionais oxigenados totais.

Tabela 4. Quantidade de grupos funcionais oxigenados totais preditos pelo modelo das variáveis decodificadas dos hydrochars do farelo do sabugo de milho obtidos após carbonização hidrotérmica no DCCR utilizado.

Ensaio	Tempo (h)	Temperatura (°C)	Conc. Solvente (%)	GFO-T (mEq/g)
1	-1 (4,03)	-1 (204,03)	-1(18,10)	0,5221
2	-1 (4,03)	-1 (204,03)	1 (41,90)	0,5251
3	-1 (4,03)	1 (275,07)	-1 (18,10)	0,4149
4	-1 (4,03)	1 (275,07)	1 (41,90)	0,4149
5	1 (9,97)	-1 (204,03)	-1 (18,10)	0,7038
6	1 (9,97)	-1 (204,03)	1 (41,90)	0,7038
7	1 (9,97)	1 (275,07)	-1 (18,10)	0,5967
8	1 (9,97)	1 (275,07)	1 (41,90)	0,5967
9	-1,68 (2,00)	0 (240,00)	0 (30,00)	0,3316
10	1,68 (12,00)	0 (240,00)	0 (30,00)	0,6375
11	0 (7,00)	-1,68 (180,00)	0 (30,00)	0,5222
12	0 (7,00)	1,68 (300,00)	0 (30,00)	0,3422
13	0 (7,00)	0 (240,00)	-1,68 (10,00)	0,8030
14	0 (7,00)	0 (240,00)	1,68 (50,00)	0,8030
15	0 (7,00)	0 (240,00)	0 (30,00)	0,8030
16	0 (7,00)	0 (240,00)	0 (30,00)	0,8030
17	0 (7,00)	0 (240,00)	0 (30,00)	0,8030

* Os números em parênteses representam os valores das variáveis não codificadas

Tabela 5. Análise de variância da regressão do estudo do emprego do farelo de sabugo de milho para as variáveis codificadas.

FV	GL	SQ	QM	F	Prob.
Regressão	4	0,9045	0,2261	106,78	<0,0001
Falta de ajuste	12	0,6148	0,0512	24,19	<0,0001
Resíduo	17	0,0360	0,0021		
Total	33	1,5553			

A temperatura e tempo de residência do processo de CHT influenciam diretamente na incorporação das propriedades físico-químicas do hydrochar formado (JAIN et al., 2016). Isso ocorre porque a decomposição dos constituintes presentes na biomassa, a formação e a transformação de compostos intermediários, remoção de compostos voláteis e a funcionalidade da superfície dependem da temperatura (KUMAR et al., 2020). O tempo de residência

desempenha um papel importante no rendimento, distribuição, composição e qualidade dos produtos gerados (WANG et al., 2018).

Tabela 6. Estimativa dos parâmetros do modelo (dados codificados).

Parâmetro	Estimativa	Valor -p
β_0 (intercepto)	0,8028	<0,0001
$\beta_1 (X_1)$	0,0907	0,0036
$\beta_2 (X_2)$	-0,0535	0,007
$\beta_3 (X_1^2)$	-0,1126	0,0008
$\beta_4 (X_2^2)$	-0,1312	0,0002

X_1 = tempo (min); X_2 = temperatura (°C).

Para melhor compreensão do efeito das variáveis independentes sobre a variável resposta GFO, o modelo para as variáveis decodificadas foi determinado (Equação 10).

$$\text{GFO-T} = -5,60819 + 0,20895t + 0,04794T - 0,0127t^2 - 0,000103T^2 \quad (10)$$

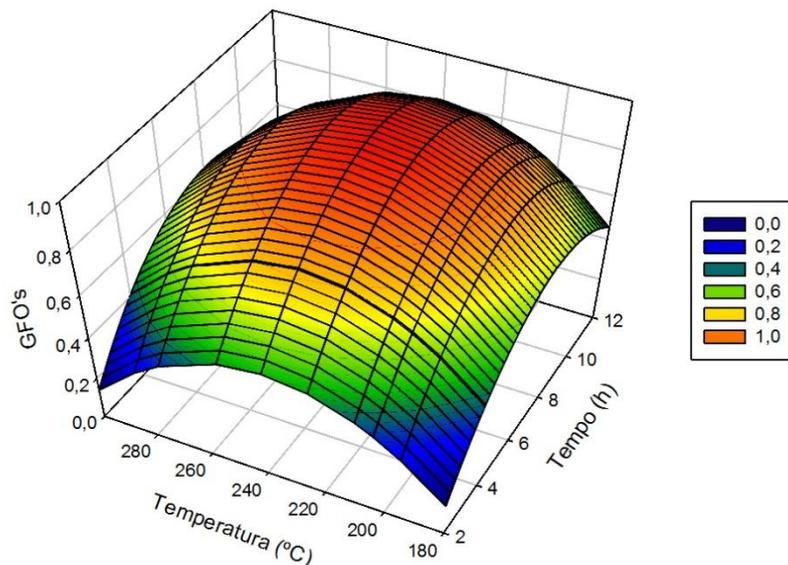
$$R^2 = 0,6700$$

Onde: GFO-T é a quantidade de grupos funcionais oxigenados (mEq.g^{-1}); t é o tempo (h) e T é a temperatura (°C).

Posteriormente, a partir da Equação 10 foi gerado um gráfico de superfície de resposta para melhor visualização do efeito das variáveis (Figura 1). A partir da derivada da equação das variáveis decodificadas e análise do gráfico de superfície de resposta foi possível obter os valores para temperatura e tempo de carbonização hidrotérmica do farelo de sabugo de milho para o ponto de máximo do teor de GFO, sendo o tempo de 8,2 h e a temperatura de 232,7 °C. A concentração apesar de não apresentar efeito significativo a 5% de probabilidade foi fixada em 30%, pois, verificando a Tabela 4, nessa região de concentração foram obtidos os maiores valores para os GFO, sendo as condições de tempo e temperatura próximas ao ponto ótimo.

O teor de grupos funcionais oxigenados quantificados experimentalmente para o hydrochar nas condições ótimas foi de $0,62 \pm 0,02 \text{ mEq.g}^{-1}$, indicando que o modelo obtido é adequado e as condições definidas pelo mesmo (232,7 °C e 8,2 h) está em concordância com o valor experimental. Comparando o valor obtido de GFO do farelo de sabugo de milho ($0,31 \pm 0,02 \text{ mEq.g}^{-1}$), com o valor do hydrochar nas condições ótimas, verifica-se que o tratamento hidrotérmico foi eficiente para aumentar o teor de grupos funcionais em 100%.

Figura 1. Superfície de resposta obtida para o modelo de CHT do farelo de sabugo de milho .



3.3 Síntese dos carvões ativados

Na Tabela 7 são apresentados os resultados de capacidade de imobilização e atividade enzimática da enzima lacase imobilizada nos diferentes carvões sintetizados. É possível observar que para todos ensaios foi obtido uma capacidade adsortiva superior a 95%, evidenciando grande potencial de utilização dos suportes para imobilização enzimática, mesmo em diferentes condições de síntese. O desempenho do carvão ativado em diferentes condições de síntese como suporte para imobilização de lacase é um resultado favorável, uma vez que, poderá ser produzido em baixas temperaturas, menor tempo de carbonização e com utilização de baixa quantidade de agente ativante, representando uma economia no processo.

3.3.1 Análise dos Componentes Principais (ACP)

A utilização da técnica de Análise de Componentes principais teve como objetivo encontrar uma correlação entre a capacidade de imobilização e atividade enzimática com os teores de grupos funcionais oxigenados (carboxílicos, fenólicos e lactônicos), presentes nos carvões sintetizados (Tabela 8). Através do critério de Kaiser, dos fatores interpretáveis e da observação do *ScreePlot*, foi possível determinar que são necessários três componentes principais para explicar a variabilidade dos dados para a capacidade de imobilização e atividade enzimática. Juntos esses três componentes explicam 74% da variabilidade dos dados.

Tabela 7. Capacidade de imobilização e atividade enzimática da lacase imobilizada nos carvões sintetizados pelas condições do delineamento experimental.

Ensaio	Tempo (min)	Temperatura (°C)	Razão de impregnação (g.g⁻¹)	Capacidade adsortiva (mg.g⁻¹)	Atividade da lacase imobilizada (U.mg⁻¹)
1	48	461	1,00	99,41±0,28	2,45±0,14
2	48	461	2,5	99,40±0,28	1,87±0,10
3	48	639	1,00	99,21±0,55	1,26±0,34
4	48	639	2,5	99,40±0,27	1,47±0,02
5	102	461	1,00	99,00±0,05	0,93±0,02
6	102	461	2,5	99,40±0,28	0,43±0,08
7	102	639	1,00	99,01±0,23	0,46±0,21
8	102	639	2,5	98,27±0,07	0,94±0,09
9	30	550	1,75	99,60±0,56	0,58±0,03
10	120	550	1,75	99,00±0,09	0,69±0,17
11	75	400	1,75	99,21±0,28	0,59±0,01
12	75	700	1,75	99,80±0,32	1,32±0,05
13	75	550	0,5	98,79±0,16	0,89±0,09
14	75	550	3,00	99,88±0,35	0,64±0,03
15	75	550	1,75	97,50±0,91	0,40±0,06
16	75	550	1,75	98,82±0,15	0,55±0,04
17	75	550	1,75	98,49±0,28	0,64±0,12

Os componentes CP1 e CP2 foram escolhidos para explicar a variância dos dados, uma vez, que explicam 36,31% e 21,89% dos resultados. De acordo com os coeficientes de Pearson e na significância da correlação ($p > 0,05$), o componente principal (CP1) apresentou alta correlação com todas as variáveis correspondentes aos grupos funcionais oxigenados, já o segundo componente principal (CP2) explicou a relação de capacidade adsortiva e atividade enzimática dos carvões. A partir dos escores dos componentes principais (CP1 e CP2) foi

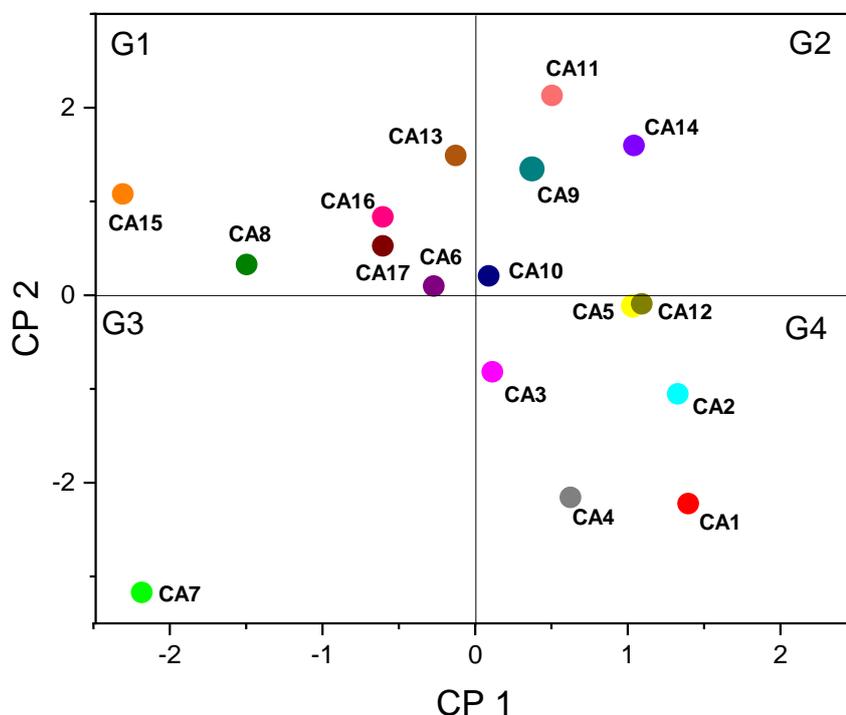
realizada a ACP por meio do gráfico de dispersão dos resultados das amostras dos carvões (Figura 2), tendo o ensaio (CA7) como o ponto mais afastado, podendo considerá-lo como *outlier*.

Tabela 8. Teor de grupos ácidos dos diferentes carvões sintetizados

Ensaio	Grupos ácidos (mEq.g ⁻¹)		
	Carboxílicos	Lactônicos	Fenólicos
1	0,06±0,04	0,45±0,08	0,62±0,06
2	0,15±0,06	0,36±0,02	0,51±0,10
3	0,09±0,08	0,32±0,02	0,59±0,08
4	0,07±0,02	0,27±0,13	0,41±0,06
5	0,13±0,59	0,00±0,00	0,78±0,11
6	0,15±0,13	0,00±0,00	0,83±0,04
7	0,15±0,02	0,49±0,06	0,24±0,08
8	0,9±0,04	0,00±0,00	0,44±0,04
9	0,75±0,06	0,00±0,00	0,65±0,02
10	0,76±0,02	0,00±0,00	0,3±0,02
11	0,79±0,07	0,00±0,00	0,95±0,08
12	0,51±0,15	0,30±0,12	0,62±0,11
13	0,94±0,04	0,00±0,00	0,72±0,21
14	0,73±0,34	0,06±0,15	0,71±0,02
15	0,33±0,23	0,00±0,00	0,53±0,02
16	0,63±0,19	0,35±0,04	0,66±0,13
17	0,25±0,23	0,05±0,02	0,65±0,02

Ao analisar o gráfico obtido pela ACP, pode-se observar a formação de 4 grupos e um ponto outlier, sendo os carvões pertencentes ao mesmo grupo com características similares para teor de grupos funcionais (carboxílicos, fenólicos e lactônicos) (CP1) e para capacidade de imobilização e atividade enzimática (CP2). Pela análise qualitativa dos componentes principais o grupo G2 apresentou uma relação positiva para os teores de grupos carboxílicos e fenólicos, negativa para lactônicos e positiva para capacidade de imobilização da enzima lacase. Enquanto o grupo G4 apresenta os maiores valores de atividade enzimática (>0,93 U.mg⁻¹), maiores valores de grupos lactônicos (<0,09 mEq.g⁻¹) e menores teores de grupos carboxílicos e fenólicos (<0,62 mEq.g⁻¹).

Figura 2. Gráfico dos escores das amostras de carvões ativados sintetizados em relação a CP1 e CP2



Pela análise qualitativa de componentes principais o ensaio CA1 presente no grupo G4 (sintetizado nas condições de tempo de 48 min, temperatura de 461 °C e uma razão de impregnação 1:1) apresentou a melhor relação positiva com a atividade enzimática e por isso foi selecionado para ser utilizado nos estudos posteriores.

3.4 Caracterização do carvão ativado e hydrochar obtido nas condições de síntese selecionadas

3.4.1 Caracterização química e rendimento

Na Tabela 9 são apresentados os resultados de caracterização do hydrochar e do carvão ativado sintetizado a partir do mesmo. O rendimento em hydrochar obtido nas condições ótimas definidas (232,7 °C, 8,2 h e 30% m.m⁻¹) foi de aproximadamente 53%. Mesmo não possuindo um alto teor de lignina em sua estrutura, o que proporciona altos rendimento devido a sua degradação ocorrer em temperaturas superiores a 220 °C, e a degradação da celulose e hemicelulose ocorrer em temperaturas em cerca de 160°C- 200°C, o rendimento em hydrochar foi considerado satisfatório. O aumento no teor de GFO e o rendimento do hydrochar indicam que o farelo do sabugo de milho é um resíduo lignocelulósico promissor para produção de carvão ativado (HEIDARI et al. 2019).

O rendimento de todo o processo para obtenção do carvão ativado produzido a partir do farelo do sabugo de milho foi de 33,43 %. O rendimento obtido foi próximo ao encontrado por Inheanacho et al. (2021) (34%) quando sintetizaram carvão ativado a partir do sabugo de milho com ativação com ácido fosfórico. Um fator importante no rendimento de materiais carbonáceos é o agente de ativação química empregado. Quando utilizado como agente de ativação química o ácido fosfórico obtém-se melhores rendimentos do processo de síntese em comparação com outros agentes como o NaOH. Um melhor rendimento se dá pelo fato de que o ácido fosfórico promove a formação de ligações ésteres de fosfato entre os polímeros presentes nas estruturas lignocelulósicas, formando uma matriz rígida na estrutura interna dos poros, evitando a queima excessiva do precursor e perdas de voláteis durante o aquecimento (BRITO et al., 2017).

Tabela 9. Caracterização química e rendimento do hydrochar (HSM) e do carvão ativado (CAHSM) produzido nas condições de síntese selecionadas.

Caracterização	HSM	CAHSM
Rendimento (%)	53,00	33,43
GFO (mEq/g)	0,62± 0,02	1,04 ± 0,02
Teor de cinzas (%m/m)		3,71± 0,02
pH_{PCZ}	5,57± 0,32	4,68 ± 0,20

O rendimento obtido considerando apenas a massa de hydrochar utilizada no processo de síntese do carvão ativado foi de 47,13%, evidenciando que a carbonização hidrotérmica influenciou positivamente no rendimento do processo. O tratamento hidrotérmico do farelo de sabugo de milho proporcionou a exposição dos grupos funcionais oxigenados, sem que afetasse o rendimento do carvão, uma vez que não houve uma degradação efetiva dos compostos lignocelulósicos devido as baixas temperaturas de carbonização.

Para os carvões ativados o teor de cinzas deve variar entre 1,0 a 12%, o aumento no conteúdo de cinzas do carvão ativado em relação ao material precursor pode ser explicado pela formação de compostos fosfatados que não foram eliminados durante o processo de carbonização. Altos teores de cinzas afetam o desempenho adsorptivo do carvão ativado, devido ao bloqueio dos poros gerados pelo material mineral (JAWAD et al., 2020). O conteúdo de cinzas no carvão ativado também pode ser relacionado à temperatura do processo de carbonização, uma vez que, a maior volatilização dos elementos minerais ocorre a temperaturas mais altas de produção (JIAN et al., 2018).

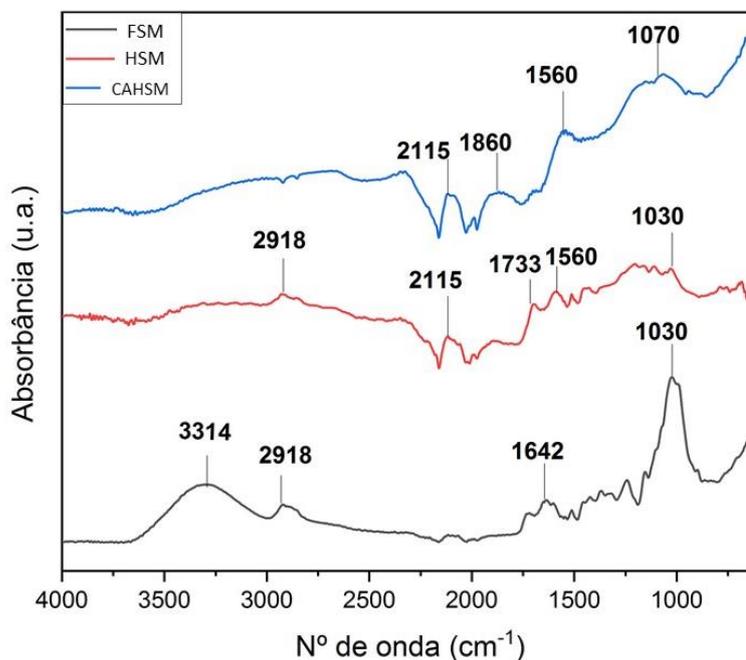
Observa-se um aumento de 59,6% do teor de grupos funcionais oxigenados (GFO) no carvão ativado em relação ao hydrochar utilizado na sua síntese. As características químicas da superfície do carvão ativado podem variar de ácidas a alcalinas, oxidantes, redutoras, hidrofóbicas ou hidrofílicas devido aos diferentes grupos funcionais presentes no material. O carvão ativado obtido apresenta características ácidas, que é confirmada pelo seu valor de ponto de carga zero, atribuída ao teor de grupos funcionais oxigenados gerados durante o processo de síntese (SHEN et al., 2008; WANG et al., 2022).

O pH_{PCZ} determina a carga superficial do adsorvente e é definido como o pH onde a superfície do material possui a densidade de cargas elétricas superficiais nulas, ou seja, apresentando o número de cargas positivas e cargas negativas equivalentes (iguais). É possível observar que o pH_{PCZ} do hydrochar e do carvão ativado estão na faixa de pH ácido, sendo atribuído aos grupos ácidos formados durante a carbonização hidrotérmica. O carvão apresentou ponto de carga zero em pH 4,68, dessa forma em soluções com um pH inferior ao pH_{PCZ} , a superfície do carvão é carregada positivamente, apresentando uma eficiência adsortiva para remoção de materiais aniônicos. O comportamento oposto ocorre para soluções com pH acima do pH_{PCZ} , favorecendo a adsorção de compostos catiônicos (BRITO et al., 2017; SANTOS et al., 2019). O ponto de carga zero sofre influência do tipo de agente ativante utilizado, atmosfera empregada na síntese, além do teor de grupos funcionais oxigenados. A ativação com ácido fosfórico proporcionou a formação de um maior número de grupos funcionais ácidos, que contribuíram para o caráter ácido do carvão sintetizado

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

Analisando as bandas do espectro do material precursor (FSM) (Figura 3), foi possível observar comprimentos característicos dos compostos lignocelulósicos do material: uma banda em 3314 cm^{-1} atribuído ao estiramento das vibrações características do grupo hidroxila (OH), pertencente estrutura de celulose (PEREIRA et al., 2014); banda em 2918 cm^{-1} , resultante da deformação axial de ligações C-H característico de celulose, hemicelulose e lignina; bandas em 1624 cm^{-1} atribuída ao C=O no carboximetil da celulose e 1030 cm^{-1} referente ao estiramento do grupo C-O ou C-O-C da lignina, celulose e hemicelulose (BRUM et al., 2008; KAN et al., 2017).

Figura 3. FTIR do material precursor (FSM), do hydrochar (HSM) e do carvão ativado (CAHSM).



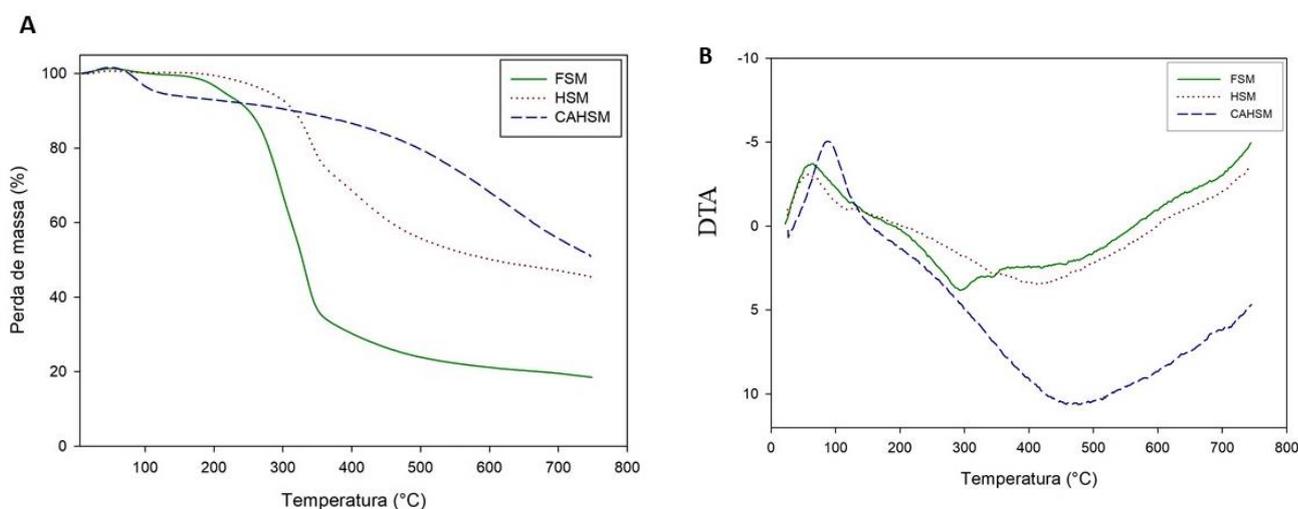
Para o espectro do hydrochar (HSM), verifica-se que após a carbonização hidrotérmica houve o surgimento de novas bandas e redução de intensidade e desaparecimento de bandas existente no material precursor. A banda em 3314 cm^{-1} , referente a hidroxila (OH) presente na estrutura da celulose desapareceu; houve redução da intensidade da banda em 2918 cm^{-1} atribuído a ligação C-H característica de celulose, hemicelulose e lignina; surgimento da banda em 2115 cm^{-1} , referente ao estiramento do grupo carbonó-oxigênio derivados do grupo cetona e também da banda em 1733 cm^{-1} , atribuída as vibrações C=O de grupos carboxílicos e lactonas, evidenciando o efeito da carbonização hidrotérmica sobre os grupos funcionais; banda em 1560 cm^{-1} corresponde aos modos de alongamento C=O e C=C, comuns em superfícies de carbono e redução de intensidade do pico em 1030 cm^{-1} , referente aos estiramentos do grupo C-O das estruturas de lignina, celulose e hemicelulose (ACEVEDO; BARRIOCANAL, 2015; PEREIRA et al., 2014).

Para o espectro do carvão ativado (CAHSM) produzido a partir do hydrochar foi possível identificar bandas em 1860 cm^{-1} e 1560 cm^{-1} , que são referentes ao alongamento das ligações C=O e C=C presentes nos materiais carbonáceos e a banda em 1070 cm^{-1} , que pode ser atribuída as ligações de ésteres de fosfatos, originados pela ativação química com ácido fosfórico (PEREIRA et al., 2014; LIU et al., 2018).

3.4.3 Análise térmica diferencial e termogravimétrica

Na Figura 4 são apresentadas as curvas de TG e DTA para o farelo do sabugo de milho, o hydrochar e carvão ativado. A resposta à análise termogravimétrica de um material lignocelulósico pode ser interpretada como a destruição de biopolímeros vegetais com diferentes estabilidades estruturais (SANTANA et al., 2020). Pode-se observar que as perdas de massa durante a pirólise dos materiais são diferentes entre eles, chegando ao final da análise com perdas de 81,54 %, 54,72 % e 49,08 % para o farelo do sabugo de milho, hydrochar e carvão ativado, respectivamente. O farelo do sabugo de milho apresentou a maior perda de massa, por ser o precursor e apresentar maior conteúdo de matéria orgânica passível de degradação.

Figura 4. Curvas de TG (a) e DTA (b) do farelo de sabugo de milho (FSM), hydrochar (HSM) e carvão ativado (CAHSM).



Foi observado dois estágios principais de perda de massa para os materiais. Para o farelo do sabugo de milho verde a primeira etapa ocorreu numa temperatura variando de 20°C a 180°C, com um pico pronunciado em 64°C, podendo ser atribuído a perda de umidade do material. Na faixa de temperatura de 195°C a 300°C ocorre uma perda de massa devido a decomposição dos componentes lignocelulósicos (celulose, hemicelulose e lignina) (GAO et al., 2016).

No perfil de decomposição térmica dos materiais foi possível observar um evento endotérmico e um exotérmico. O primeiro pico endotérmico em temperaturas abaixo de 100°C pode ser atribuído à dessorção da água. O evento exotérmico que pode ser observado para o farelo de milho verde e hydrochar entre 300°C a 500°C pode ser atribuído a polimerização dos

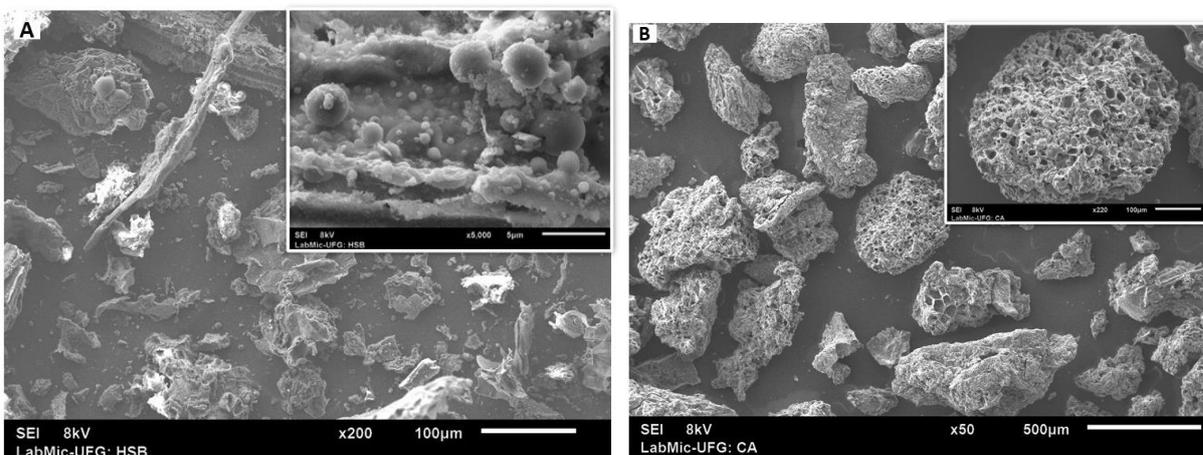
monômeros dos produtos lignocelulósicos devido as temperaturas utilizadas serem superiores a carbonização hidrotérmica (WANG et al., 2018). Para o carvão ativado há um pico de decomposição térmica exotérmica a partir da temperatura de 400°C que se refere a reação de oxidação de carbono fixo (SANTANA et al., 2020).

A perda de massa do hydrochar é mais discreta, apresentado um ombro em temperatura superior a 400 °C, pois a maioria dos seus constituintes já sofreram decomposição, enquanto a redução de perda de massa do carvão ativado é atribuída aos processos térmicos que o mesmo já foi submetido, onde houve uma decomposição parcial dos compostos voláteis.

3.4.4 Morfologia dos matérias carbonáceos determinado por MEV e caracterização textural

Na Figura 5 são apresentadas as imagens de microscopia eletrônica de varredura do hydrochar e do carvão ativado. Observa-se que o hydrochar (Fig. 5a) não possui uma estrutura de poros desenvolvida, que é devido a persistência dos produtos de decomposição da carbonização hidrotérmica que causa o bloqueio dos poros na superfície do hydrochar (FANG et al., 2018). É possível observar a presença de microesferas carbonáceas no hydrochar. Essa estrutura é formada devido ao alto teor de celulose e hemicelulose que o precursor apresentava. O alto teor desses compostos lignocelulósicos combinados à carbonização hidrotérmica promove o rompimento da estrutura em pequenos fragmentos, favorecendo o aumento da presença de microesferas carbonáceas, ésteres e grupos hidroxila na sua superfície (MARTINEZ et al., 2021).

Figura 5. Microscopia eletrônica de varredura do hydrochar (A) e carvão ativado (B).



A morfologia da superfície do carvão ativado sintetizado na condição escolhida utilizando o ACP (Fig. 5b) exibe uma estrutura porosa com cavidades visíveis e desenvolvidas. É possível

observar a formação de poros de diferentes tamanhos, sendo possível verificar a presença de microporos e mesoporos na estrutura. A adsorção é um fenômeno de superfície e depende principalmente das propriedades de superfície do material.

As propriedades texturais do hydrochar e do carvão ativado sintetizado são apresentadas na Tabela 10. Verifica-se que o CAHSM apresentou maiores valores de área superficial, volume de mesoporos e volume de microporos em relação ao hydrochar (HSM). A baixa área superficial e volume de poros encontrado para o HSM pode ser atribuída aos produtos despolimerizados na carbonização hidrotérmica que se depositam na superfície do hydrochar ao final do processo de síntese e causam o bloqueio dos poros e consequente redução de seu volume (FANG et al., 2018; KUMAR et al., 2020). Os maiores valores de área superficial e volume de poros do carvão ativado resultam em uma maior acessibilidade do material a ser adsorvido no interior dos poros. A área superficial do carvão ativado é uma das propriedades mais importantes para o desempenho da adsorção, pois ela limita a quantidade de material que pode ser adsorvido pela matriz (WANG et al., 2022) e sua estrutura de poros limita as dimensões das moléculas a serem adsorvidas (PEREIRA et al., 2014). Outro fator que contribui para melhores resultados das propriedades texturais do carvão ativado é o processo de ativação química, que leva ao aumento da porosidade através do aumento do volume de microporos e criação de novos poros no material precursor, consequentemente um aumento da área superficial do carvão (SANTOS et al., 2019). Chen et al. (2017) ao ativar hydrochar produzido por espiga de milho com ácido fosfórico observou um aumento na área superficial de 380 vezes em comparação com a área superficial do hydrochar sem ativação. Portanto, a estrutura de poros, área superficial e presença de grupos funcionais proporciona propriedades desejáveis para o emprego do carvão ativado obtido como suporte para imobilização enzimática

Tabela 10. Propriedades texturais do hydrochar (HSM) e carvão ativado (CAHSM)

Amostra	Sg (m²/g)	Dp (nm)^a	V_{meso}(cm³/g)	V_{micro}(cm³/g)
HSM	4	19,72	0,0184	0,000
CAHSM	719	2,59	0,0801	0,1960

Sg: área superficial BET; Dp: Diâmetro médio dos poros; V_{meso}: volume de mesoporos; V_{micro}: volume de microporos.

3.5 Estudo do efeito do pH e temperatura na imobilização da lacase

Na Tabela 11 é possível observar os resultados obtidos para o estudo do efeito do pH sobre a capacidade de imobilização do carvão. O resultado para o teste F na Análise de variância (ANOVA) indicou diferença significativa ($P > 0,05$) do pH na capacidade adsortiva e rendimento de imobilização. Sendo assim, realizou-se a avaliação por teste de comparação entre médias utilizando o teste de Tukey (Tabela 10).

Tabela 11. Efeito de diferentes valores de pH na capacidade adsortiva (q^a) do carvão ativado e o rendimento de imobilização (R^I). CV de 4,48% e 7,07% para q^a e R^I , respectivamente.

Amostra	pH	q^a (mg.g ⁻¹)	R^I (%)
CAHT	3	95,02 ± 1,26 ^a	98,55±0,02 ^a
	4	98,95 ± 0,04 ^a	99,60±0,05 ^a
	5	97,61 ± 0,26 ^a	81,19±0,03 ^b
	7	82,95 ± 0,85 ^b	14,76±0,07 ^c
	9	78,58 ± 2,76 ^c	2,46± 0,50 ^d

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Os valores mais elevados de capacidade adsortiva e rendimento de imobilização foram obtidos na faixa de pH ácido. Os valores de capacidade adsortiva em pH 3,0 e 4,0 não diferem entre si no teste de média. O mesmo resultado foi obtido para o teste de média para o rendimento de imobilização, sendo escolhido para os testes posteriores o pH 4,0. Outros estudos utilizando materiais carbonáceos para imobilização de lacase relataram a mesma faixa ótima de pH para imobilização. Esse comportamento foi atribuído à influência do microambiente nas interações eletrostáticas entre suporte e enzima (BAYRAMOGLU et al., 2010; LIU et al., 2012; NAGHDI et al., 2018). A lacase fúngica possui um ponto isoelétrico em pH ácido (pI), variando de 3,0 a 7,0, principalmente, em torno de pH 4,0 (BEBEC et al., 2020). O carvão possui um ponto de carga zero de 4,68, apresentando em sua superfície cargas positivas quando o ensaio foi conduzido em pH 3,0 e 4,0, e tendo a enzima um ponto isoelétrico em torno de 4,0, pode-se inferir que o processo de imobilização foi governado por interações hidrofóbicas e eletrostáticas. Mesmo apresentando valores de capacidade adsortiva consideráveis em todas as faixas de pH estudada, o rendimento de imobilização diminuiu à medida que o pH aumenta, evidenciando que mesmo o suporte tendo condições favoráveis para comportar a enzima, sua atividade é fortemente influenciada pelo pH do meio, devido a repulsão eletrostática.

A capacidade adsortiva e o rendimento de imobilização apresentaram valores superiores a 80% nas temperaturas avaliadas (Tabela 12), evidenciando a estabilidade da enzima frente a diferentes condições de temperatura. Sendo a temperatura de 40°C a que proporcionou a maior

capacidade de imobilização e rendimento. O aumento da temperatura pode favorecer a mobilidade da enzima em solução levando a melhores resultados de capacidade adsorptiva devido a menor resistência a difusão.

Pode-se observar que o menor rendimento de imobilização ocorreu na maior temperatura de estudo. Esse comportamento pode ser atribuído à desnaturação e perturbação da conformação tridimensional da enzima, resultando na perda de atividade (BILAL et al., 2016). O resultado para o teste F na Análise de variância (ANOVA) indicou diferença significativa ($P < 0,05$) entre as temperaturas na capacidade adsorptiva e diferença não significativa ($P > 0,05$) para o rendimento de imobilização.

Tabela 12. Efeito da temperatura na capacidade adsorptiva (q^a) e rendimento (R^I) de imobilização da lacase no carvão ativado. CV igual a 1,75%, 4,48% para q^a e R^I , respectivamente.

Temperatura (°C)	q^a (mg.g ⁻¹)	R^I (%)
25	89,02±0,32 ^a	92,60±0,07 ^a
40	99,96±1,15 ^b	97,00±0,04 ^a
60	91,81 ±0,02 ^{ab}	84,50±0,06 ^a

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

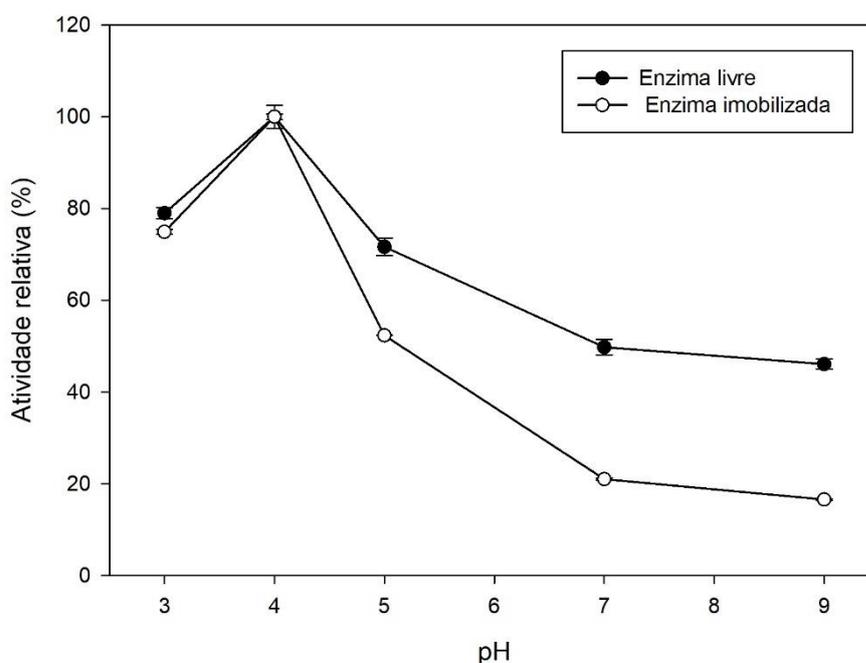
3.6 Efeito do pH e da temperatura do meio reacional na atividade da enzima livre e imobilizada

As atividades relativas em função do pH do meio reacional para lacase na forma livre e imobilizada são apresentadas na Figura 6. O pH ótimo de oxidação do substrato ABTS para lacase na forma livre e imobilizada foi o pH 4,0 (pH ácido), com a atividade diminuindo à medida que o pH aumenta.

As lacases de origem fúngica apresentam atividade ótima numa faixa de pH ácido variando de 3,0 a 5,0. Na faixa de pH neutro ou ligeiramente básico (6-8) sua atividade catalítica é fortemente reduzida. Esse fato ocorre devido a inibição enzimática causada pela ligação de íon hidróxido (OH⁻) aos íons de cobre (Cu) do tipo 1 (CuT₁) e 2 (CuT₂) presentes no sitio catalítico da enzima. Essa ligação interrompe o fluxo interno de elétrons do centro CuT₁ para os centros CuT₂ e CuT₃ (ARICOV et al., 2020). Os maiores valores para a atividade da lacase livre e imobilizada foram obtidos em pH 4,0, sendo de 30,01±1,27 U.mg⁻¹ para a solução de enzima livre e 21,01±0,61 U.mg⁻¹ para enzima imobilizada. Tais valores foram considerados

como 100% de atividade relativa e os demais valores foram calculados a partir desses valores de referência. Outros estudos utilizando matérias carbonáceas para imobilização de lacase relataram a mesma faixa ótima de pH na atividade enzimática. Esse comportamento foi atribuído pelos autores à influência do microambiente do suporte na interação eletrostática, concluindo que a atividade da enzima imobilizada é significativamente influenciada pelas características do suporte e pela ligação entre a enzima e o suporte (BAYRAMOGLU et al., 2010; LIU et al., 2012; NAGHDI et al., 2018). A redução mais acentuada dos valores de atividade para enzima imobilizada pode ser atribuída ao impedimento estérico causado pelo suporte microporoso, que limita a flexibilidade da enzima e a difusão de substrato/produto (RAMÍREZ-MONTOYA et al., 2015).

Figura 6. Efeito do pH na atividade da lacase de *Agaricusbisporus* a 25 °C



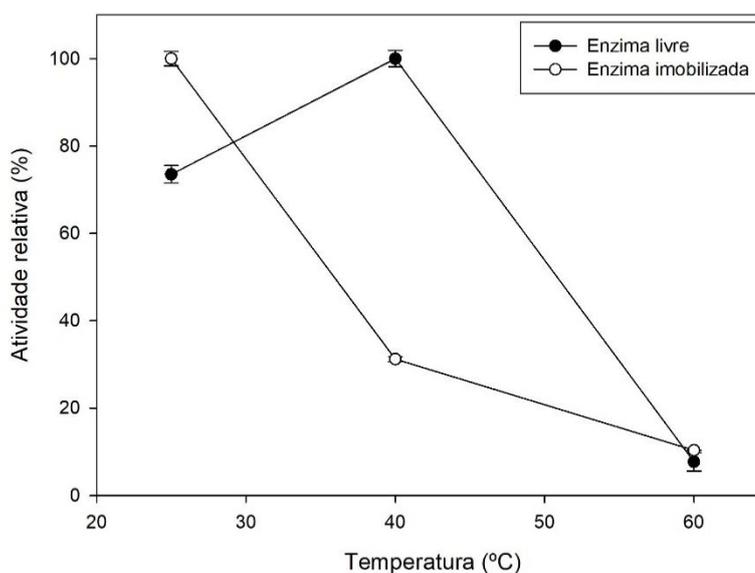
Na Figura 7 são apresentados os resultados do efeito da temperatura do meio reacional na atividade da enzima livre e imobilizada. Foi possível observar que a atividade máxima para enzima livre foi obtida em 40 °C ($32,00 \pm 1,54 \text{ U.mg}^{-1}$) e para enzima imobilizada a atividade máxima foi alcançada na temperatura de 25°C ($22,54 \pm 1,65 \text{ U.mg}^{-1}$). O aumento da atividade da enzima livre na temperatura de 40°C pode ser atribuído ao aumento da mobilidade da enzima em solução, levando a um melhor desempenho da atividade. Quando a mesma se encontra ligada ao suporte esse fenômeno não foi observado, o que pode indicar uma necessidade de mais energia de ativação pela enzima imobilizada. Em estudo realizado por Lettera et al. (2016)

foi relatado que a maior resposta da enzima livre em uma faixa de temperatura mais extensa é atribuível à redução da flexibilidade da enzima imobilizada. A flexibilidade da enzima imobilizada é necessária para que haja a ligação do seu sítio ativo com o substrato e para que ocorra difusão entre substrato e produto de forma que permita sua entrada e saída de suporte (POPOVIĆ et al., 2021).

Na temperatura de 60°C ocorreu uma redução brusca da atividade tanto para enzima na forma livre quanto imobilizada ($2,67 \pm 0,29 \text{ U.mg}^{-1}$ e $0,39 \pm 10,30 \text{ U.mg}^{-1}$). Tal redução pode ser atribuída a possível desnaturação da proteína e perturbação da conformação tridimensional, com consequente perda de sua atividade (BILAL et al., 2016).

Determinar a temperatura ótima para alcançar a atividade máxima da enzima é muito importante, pois pode indicar a eficiência máxima de um sistema biocatalítico. A imobilização da enzima altera o seu perfil de atividade dentro de sua faixa de temperatura de trabalho e pode mudar a sua temperatura ótima e afetar a estabilidade em altas temperaturas, limitando suas mudanças conformacionais. Um bom desempenho da enzima imobilizada a temperaturas mais baixas é uma vantagem em termos de energia do sistema (CRISTOVÃO et al., 2012; MISRA et al., 2014).

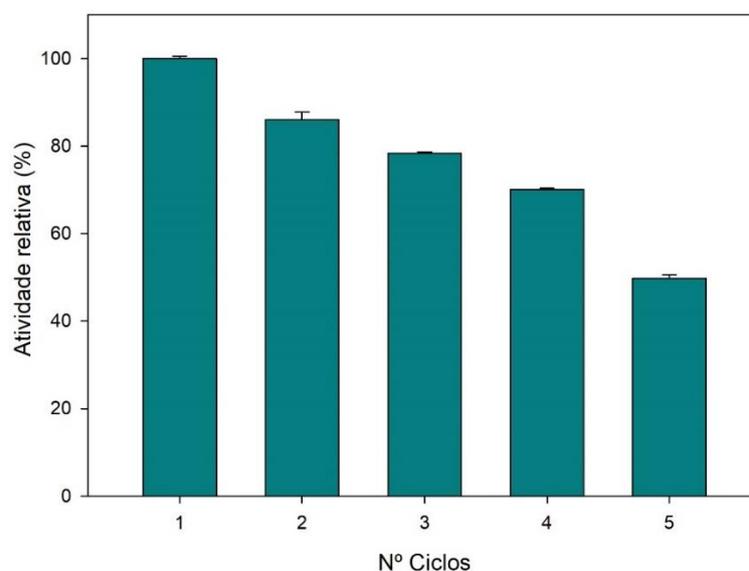
Figura 7. Efeito da temperatura na atividade da lacase de *Agaricus bisporus* livre e imobilizada em pH (4,0) ótimo.



3.7 Estabilidade operacional

Na Figura 8 são apresentados os resultados para os ciclos de uso que a enzima imobilizada foi submetida. A atividade inicial (1 ciclo) foi considerada como 100% de atividade relativa. A estabilização da lacase devido a imobilização em carvão ativado permitiu a fácil reutilização do derivado, sendo mantida 50% da atividade inicial após o último ciclo de uso. A reutilização do biocatalisador em batelada ou sistema contínuo é um fator importante na avaliação da efetividade da imobilização.

Figura 8. Atividade enzimática para os ciclos de utilização da lacase imobilizada.

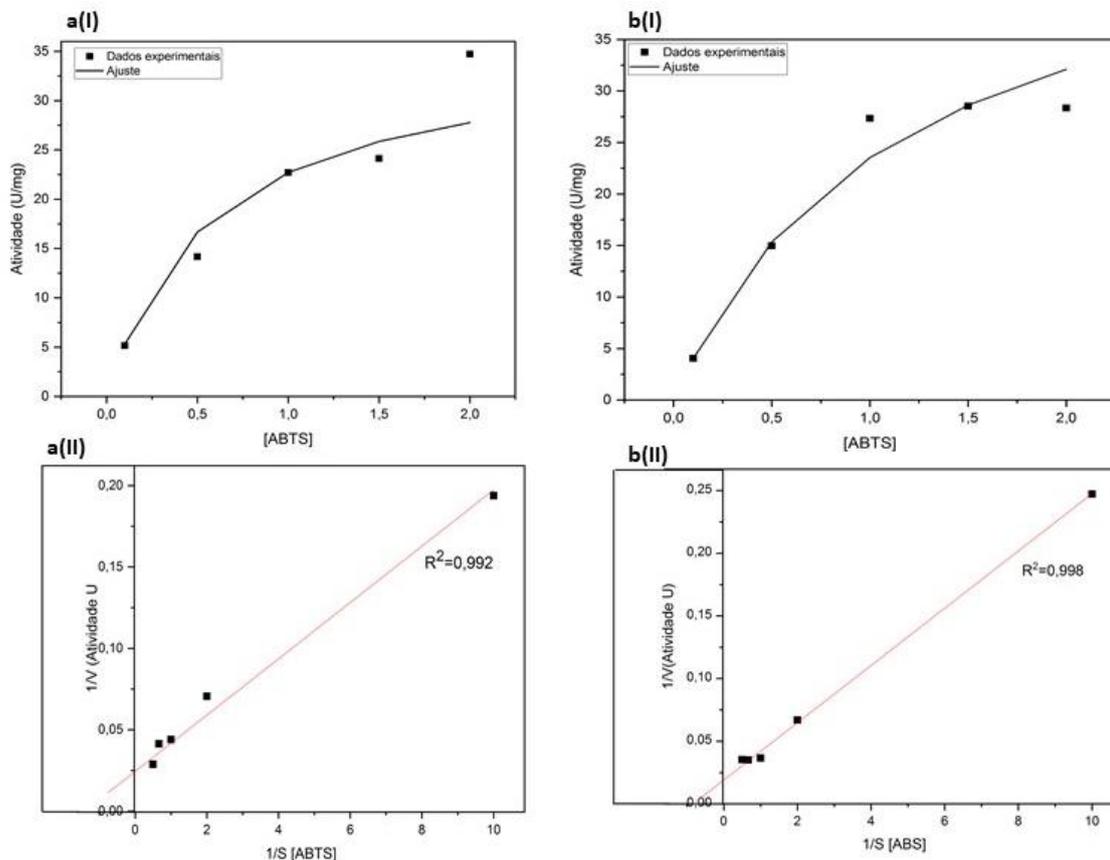


Naghdi et al. (2018) ao imobilizarem lacase covalentemente em nanobiochar de pinhal obtiveram atividade residual de 30% após 4 ciclos de reutilização e 5% de atividade após 7 ciclos de oxidação do ABTS. Uma razão para maior reutilização do biocatalisador pode estar ligada a utilização de concentração mais baixas de substrato (ABTS) e tempos de reação mais curtos (POPOVIĆ et al., 2021). Além disso, alterações conformacionais e a obstrução dos poros do suporte, seja pelo acúmulo de substrato ou produtos, são recorrentemente apontadas como as causas da redução da atividade enzimática nos ciclos subsequentes (KUMAR et al., 2014).

3.8 Estudo cinético

Na Figura 9 é apresentado o ajuste do modelo de Lineweaver-Burk aos dados experimentais.

Figura 9. Variação da atividade em função da concentração de ABTS e gráficos obtidos com o ajuste da equação de Lineweaver-Burk para enzima livre a (i e ii) e imobilizada b (i e ii) a 25°C e pH 4,0.



Os valores dos parâmetros cinéticos, constante de Michaelis Menten (K_m) e da velocidade máxima de reação (V_{max}) da lacase livre e imobilizada calculados a partir dos dados obtidos nos gráficos acima são apresentados na Tabela 13.

A constante de Michaelis-Menten, K_m , é útil principalmente para investigar a capacidade de uma enzima se ligar ao seu substrato. Esse parâmetro cinético relaciona-se inversamente com a afinidade da enzima ao substrato (SPINELLI et al., 2013). O valor do K_m da lacase livre é inferior ao da enzima imobilizada, indicando uma afinidade mais baixa entre a enzima imobilizada e o seu substrato (ABTS). Entre os fatores que podem afetar o valor de K_m em sistemas imobilizados pode ser citado a diminuição da flexibilidade da proteína causada pelo processo de imobilização, que pode limitar o acesso do substrato ao sítio ativo da enzima (OTHMAN et al., 2021). Entretanto, o aumento do K_m verificado neste estudo (1,9 vezes) foi menor do que o observado em outros estudos de imobilização para lacase. Liu et al. (2020) verificaram um aumento de 5 vezes no valor do K_m da lacase imobilizada por bioimpressão

3D. No estudo realizado por Othman et al. (2021) para reticulação de lacase em carreador o valor do K_m para lacase imobilizada aumentou 11 vezes comparado a enzima livre.

Tabela 13. Parâmetros cinéticos: constante de Michaelis-Menten (K_m) e velocidade máxima (V_{max}) da lacase livre e da lacase imobilizada.

Lacase	K_m (mM)	V_{max} (mM.min ⁻¹)	R^2
Livre	0,59	35,09	0,992
Imobilizada	1,15	50,51	0,998

De acordo com modelo de Michaelis-Menten a velocidade da reação enzimática aumenta em função da concentração do substrato, uma vez que, a velocidade máxima (V_{max}) mede o número de moléculas de substrato que são convertidos em produto por uma molécula de enzima em um determinado tempo (MINTEER, 2011). A imobilização da lacase aumentou o valor de V_{max} em 1,47 vezes em relação a lacase livre, evidenciando que apesar das limitações ao acesso do substrato ao sítio ativo de algumas enzimas imobilizadas, isso não prejudicou a velocidade máxima. Isso pode ser devido à alta razão entre área superficial e volume de poros do suporte que permitiu maior acessibilidade do substrato para interagir com as moléculas com sítios ativos acessíveis da enzima (POPOVIĆ et al., 2021).

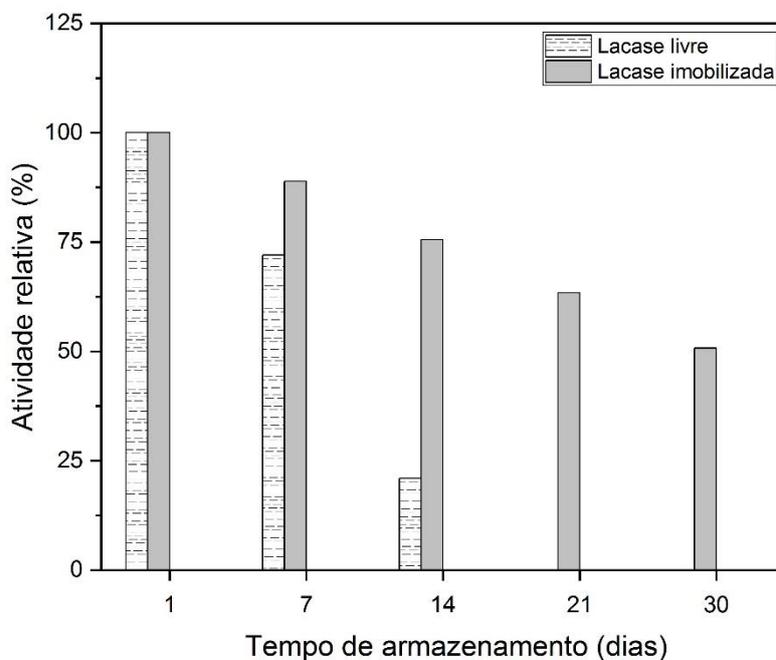
3.9 Estabilidade ao tempo de armazenamento

Na Figura 10 são apresentados os resultados para o estudo do efeito do tempo de armazenamento na atividade do derivado por um período máximo de 30 dias. A atividade inicial (dia 1) foi considerada como 100% de atividade relativa, sendo esse valor igual $29,58 \pm 1,15 \text{ U.mg}^{-1}$ para enzima livre e $23,27 \pm 0,07 \text{ U.mg}^{-1}$ para lacase imobilizada. No trigésimo dia de estudo de estabilidade ao tempo de armazenamento o derivado ainda apresentou 50% da sua atividade inicial ($11,80 \pm 0,73 \text{ U.mg}^{-1}$). Por outro lado, a enzima livre perdeu toda sua atividade no vigésimo primeiro dia de estudo. Esses resultados evidenciam que a imobilização possibilitou um ambiente favorável para que a enzima não sofresse danos ocasionados pelo microambiente, preservando sua atividade e possibilitando sua utilização após o armazenamento.

A estabilidade de armazenamento é uma vantagem importante para a enzima imobilizada em relação à enzima livre, pois a enzima nativa pode perder sua atividade em um curto período de tempo. Portanto, este parâmetro é um indicativo de custo-benefício para o uso da enzima para muitas aplicações biotecnológicas (ZHANG et al., 2021).

Os resultados de armazenamento para lacase immobilizada em carvão ativado foi superior ao relatados em estudos encontrados na literatura para imobilização da lacase em diferentes suportes. Foi observada 60% de perda de atividade após 25 dias para lacase immobilizada em poli (glycidylmethacrilato) (ARICA, 2009). Num estudo realizado por Stanescu et al. (2010), para imobilização de lacase em criogel do tipo PVA, houve uma perda de 40% da atividade da enzima immobilizada após 2 dias. Pezzella et al. (2014) imobilizaram lacase em perlite para descoloração e foi observada uma perda de 81% de atividade immobilizada após 27 dias de armazenamento em temperatura ambiente.

Figura 10. Estabilidade ao armazenamento da lacase livre e immobilizada.



4. CONCLUSÃO

A carbonização hidrotérmica realizada nas condições estabelecidas pelo planejamento experimental proporcionou um aumento de 100% de grupos funcionais, quando comparado ao teor de grupos funcionais do resíduo do sabugo de milho verde, evidenciando que o processo de carbonização hidrotérmica foi eficiente na produção de um material carbonáceo com características promissoras. Com a utilização da ACP no estudo do efeito das condições de

síntese nas propriedades do carvão ativado, foi possível selecionar um suporte eficiente para imobilização da enzima lacase, que proporcionou a obtenção de derivado com atividade enzimática adequada. Através da análise morfológica e textural, observou-se o aumento da porosidade e área superficial do carvão ativado quando comparado ao hydrochar, demonstrando que a utilização de hydrochar para síntese de carvão ativado leva a produção de um suporte promissor para emprego na imobilização de enzimas. O estudo da imobilização da lacase em carvão ativado evidenciou a faixa de pH ácido como ótimo para conduzir o processo de imobilização e de atividade enzimática. Para o efeito de temperatura, a enzima imobilizada apresentou atividade enzimática a 25°C superior à da enzima livre na mesma temperatura, resultado que evidencia seu potencial de trabalho em condições mais brandas. Dentro das condições ótimas de estudo a enzima imobilizada no carvão ativado apresentou atividade em 5 ciclos sucessivos de utilização, sendo preservada mais de 50% da atividade inicial no último ciclo. O derivado reteve 50% da atividade após 30 dias de armazenamento. Os resultados encontrados demonstram que o suporte produzido apresenta potencial na imobilização da enzima lacase em condições operacionais amenas, sendo uma alternativa de baixo custo comparado aos suportes tradicionais para aplicações em escala industrial.

5. REFERÊNCIAS

ACEVEDO, B.; BARRIOCANAL, C. Texture and surface chemistry of activated carbons obtained from tyre wastes. **Fuel Processing Technology**, v. 134, p. 275–283, 2015.

AOAC (Association of Official Analytical Chemistry). **Official methods of analysis**. 16ed. Arlington: AOAC International, 1995.

ARICA, G. Y. Immobilization of laccase onto pol(glycidymethacrylate) brush grafted poly(hydroxyethylmethacrylate) films: Enzymatic oxidation of phenolic compounds. **Material Science and Engineering:C**, v. 29, p. 1990-1997, 2009.

ARICOV, L.; LEONTIES, A. R.; GIFU, I. C.; PREDA, D.; RADUCAN, A.; ANGHEL, D. F. Enhancement of laccase immobilization onto wet chitosan microspheres using an iterative protocol and its potential to remove micropollutants. **Journal of Environmental Management**, v. 276:111326, 2020.

BILAL, M.; ASGHER, M.; CHENG, H.; YAN, Y.; IQBAL, HMN. Multi-point enzyme immobilization, surface chemistry, and novel platforms: a paradigm shift biocatalyst design. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 39, p.202-219, 2019.

BOEHM, H. P. Chemical identification of surface groups, in: ELEY, D. D.; PINES, H.; WEISZ, P. B. (Eds.), **Advances in Catalysis**, Academic Press, NewYork, v. 16, p. 179, 1966.

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.

BRANDÃO, A. C. T.; QUEIROZ, V.; SILVA, R. G. C. Synthesis and characterization of chemically activated carbon with H_3PO_4 and NaOH from the pequi bark. **Brasilian Journal of Development**, v.6, p. 60945-60962, 2020.

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

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, p. 1048–1052, 2008.

CHEN, J.; ZHANG, L.; YANG, G.; WANG, Q.; LI, R.; LUCIA, L. A. Preparations and characterization of activated carbon from hydrochar by phosphoric acid activation and its adsorption performance in prehydrolysis liquor. **Bioresource**, v. 12, p. 5928-5941, 2017.

CRISTÓVÃO, R.O.; SILVÉRIO, S.C.; TAVARES, A.P.M.; BRÍGIDA, A.I.S.; LOUREIRO, J.M.; BOAVENTURA, R.A.R.; MACEDO, E.A.; COELHO, M.A.Z. Green coconut fiber: a novel carrier for the immobilization of commercial laccase by covalent attachment for textile dyes decolorization. **World Journal Microbiology Biotechnology**. v. 28, p. 2827–2838, 2012.

FANG, J.; ZHAN, L.; OK, Y. S.; GAO, B. Mini review of potential applications of hydrochar derived from hydrothermal carbonization of biomass. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 57, p. 15-21, 2018.

GAO, P.; ZHOU, Y.; MENG, F.; ZHANG, Y.; LIU, Z.; ZHANG, W.; XUE, G. Preparation and characterization of hydrochar from waste eucalyptus bark by hydrothermal carbonization. **Energy**, v. 97, p. 238-245, 2016.

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

GONÇALVES, G. R. F.; GANDOLFI, O. R. R.; BRITO, M. J. P.; BONOMO, C. F.; FONTAN, R. C. I.; VELOSO, C. M. Immobilization of porcine pancreatic lipase on activated carbon by adsorption and covalent bonding and its application in the synthesis of butyl butyrate. **Process Biochemistry**, v. 111, p. 114-123, 2021.

HE, C.; ZHAO, J.; YANG, Y.; WANG, J.Y. Multiscale characteristics dynamics of hydrochar from hydrothermal conversion of sewage sludge sub- and near- critical water. **Bioresource Technology**, v. 211, p. 486-493, 2016.

INHEANACHO, O. C.; NWABANNE, J. T.; OBI, C. C.; ONU, C. E. Packed bed column adsorption of phenol onto corn cob activated carbon: linear and non linear kinetics modeling. **South African Journal of Chemical Engineering**, v. 36, p. 80-93, 2021.

JAWAD, A. H.; BARDHAN, M.; ISLAM, MD. A.; ISLAM, MD. A.; SYED-HASSAN, S. S. A.; SURIP, S. N.; ALOTHMAN, Z. A.; KHAN, M. R. Insights into the modeling,

characterization and adsorption performance of mesoporous activated carbon from corn cob residue via microwave-assisted H₃PO₄ activation. **Surfaces and Interfaces**, v. 21:100688, 2020.

JIAN, X.; ZHUANG, X.; LI, B.; XU, X.; WEI, Z.; SONG, Y.; JIANG, E. Comparison of characterization and adsorption of biochars produced from hydrothermal carbonization and pyrolysis. **Environmental Technology & Innovation**, v. 10, p. 27–35, 2018.

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.

KUMAR, A.; SAINI, K.; BHASKAR, T. Hydrochar and biochar: Production, physico chemical properties and techno economic analysis. **Bioresource Technology**, v. 310:123442, 2020.

KUŚMIEREK, K; SZALA, M.; ŚWIĄTKOWSKI, A. Adsorption of 2,4-dichlorophenol and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid from aqueous solution on carbonaceous materials obtained by combustion synthesis, **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers.**, v. 63: 371–378, 2016.

LENG, L.; HUANG, H. An overview of the effect of pyrolysis process parameters on biochar stability. **Bioresource Technology**, v. 270, p. 627–642, 2018.

LETTERA, V.; PEZZELLA, C.; CICATIELLO, P.; PISCITELLI, A.; GIACOBELLI, V. G.; AMORESANO, A.; SANNIO, G. Efficient immobilization of a fungal laccase and its exploitation in fruit juice clarification. **Food Chemistry**, v. 196, p. 1272–1278.

LIU, J.; SHEN, X.; ZHENG, Z.; LI, M.; ZHU, X.; CAO, H.; CUI, C. Immobilization of laccase by 3D bioprinting its application in the biodegradation of phenolic compound. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 164, p. 518–525, 2020.

LIU, Y.; ZENG, Z.; ZENG, G.; TANG, L.; PANG, Y.; LI, Z.; LIU, C.; LEI, X.; WU, M.; REN, P.; LIU, Z.; CHEN, M.; XIE, G. Immobilization of laccase on magnetic bimodal mesoporous carbon and the application in the removal of phenolic compounds, **Bioresources Technolgy**, v. 115, p. 21–26, 2012.

LIU, Z.; LIU, Z. Comparison of hydrochar and pyrochar based solid acid catalysts from cornstalk: Physicochemical properties, catalytic activity and deactivation behavior. **Bioresource Technology**, v. 297:122477, 2020.

MARTINEZ, C. L. M.; SERMYAGINA, E.; SAARI, J.; DE JESUS, M. S.; CARDOSO, M.; DE ALMEIDA, G. M.; VAKKILAINEN, E. Hydrothermal carbonization of lignocellulosic agro-forest based biomass residues. **Biomass and Bioenergy**, v. 147:106004, 2021.

MINTEER, S. D. Kinetic Measurements for Enzyme Immobilization Michael. **Methods in molecular biology**, v. 679, p 230, 2011.

MISRA, N.; KUMAR, V.; GOEL, N.K.; VARSHNEY, L. Laccase immobilization on radiation synthesized polyoxy functionalized polyether sulfone beads and the application for degradation of acid dye. **Polymers**, v. 55, p. 6017–6024, 2014.

NAGHDI, M.; TAHERAN, M.; BRAR, S. K.; KERMANSHAHI-POUR, A.; VERMA, M.; SURAMPALLI, R. Y. Pine wood nanobiochar: A unique carrier for the immobilization of crude

laccase by covalent bonding. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.115, p. 563-571, 2018.

OTHMAN A. M., SANROMÁN M. A., MOLDES D. Kinetic and thermodynamic study of laccase cross-linked onto glyoxyl Immobead 150P carrier: Characterization and application for beechwood bio grafting. **Enzyme and Microbial Technology**, v.150,109865, 2021.

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 carbonos from coco a shells and siriguela seed susing H₃PO₄ and ZnCL as activating agents for BSA and α -lactalbumin adsorption. **Fuel Processing Technology**, v. 126, p. 476-486, 2014.

PEZZELLA, C.; RUSSO, M. E.; MARZOCHELLA, A.; SALATINO, P.; SANNIA, G. Immobilization of a Pleurotus ostreatus Laccase Mixture on Perlite and Its Appllication to Dye Decolourisation. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.

POPOVIĆ, N.; STANIŠIĆ, M.; ĐURĐIĆ, K. I.; PRODANOVIĆ, O.; POLOVIĆ, N.; PRODANOVIĆ, R. Dopamine-modified pectin for a Streptomyces cyaneus laccase induced microbeads formation, immobilization, and textile dyes decolorization. **Environmental Techology & Innovation**, v. 22:101399, 2021.

RAMÍREZ-MONTOYA L. A., HERNÁNDEZ-MONTOYA V., MONTES-MORÁN M. A., JÁUREGUI-RINCÓ J, CERVATES F. J. Decolorization of dyes with different molecular properties using free and immobilized laccases from Trametes versicolor. **Journal of Molecular Liquids**, v. 212, p. 30-37,2015.

SANTANA, M. S.; ALVS, R. P.; BORGES, W. M. S.; FRACISQUINI, E.; GUERREIRO, M. C. Hydrochar production from defective coffee beans by hydrothermal carbonization. **Bioresouce Technology**, v.300:122653,2020.

SANTOS, M. P. F.; BRITO, M. J. P.; JUNIOR, E. C. S.; BONOMO, R. C. F.; VELOSO, C. M. Pepsin immobilization on biochar by adsorption and covalent binding, and its application for hydrolysis of bovine casein. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 94, p. 1982-1990, 2019.

SEVILLA, M.; FUERTES, A. B. The production of carbonization materials by hydrothermal carbonization of cellulose. **Carbon**, v. 47, p. 2281-2289, 2009.

SHEN, A. H. P.; BEULAH, K. C.; MUTHY, P. S. Enzyme immobilization methods and applications in the food industry. *Enzymes in Food Biotechnology*, p. 645-658, 2019.

SHEN, R.; LU, J.; YAO, Z.; ZHAO, L.; WU, Y. The hydrochar activation and biocrude upgrading from hydrothermal treatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 342,2021.

SHEN,W. Z.; LI, Z. J.; LIU, Y. H. Surface chemical functional groups modification of porous carbon. **Recent Patents on Chemical Engineering**, v. 1, p. 27-40, 2008.

SHOKRI, Z.; SEIDI, F.; KARAMI, S.; LI, C.; SAEB. M. R.; XIAO, H. Laccase immobilization onto natural polysaccharides for biosensing and biodegration. **Carbohydrate Polymers**, v. 262: 117963, 2021.

SMITH, A. M.; SINGH, S.; ROSS, A. B. Fate of inorganic material during hydrothermal carbonization of biomass: Influence of feed stock on combustion behaviour of hydrochar. **Fuel Processing Technology**, v. 169, p. 135-145, 2016.

SONG, C.; WU, S.; CHENG, M.; TAO, P.; SHAO, M.; GAO, G. Adsorption studies of coconut shell carbons prepared by KOH activation for removal of lead (ii) from aqueous solution. *Sustainability*, v. 6, p. 86-98, 2014.

SPINELLI, D. et al. Immobilization of fungal (*Trametes versicolor*) laccase onto Amberlite IR-120 H beads: Optimization and characterization. **Process Biochemistry**, v. 48, p. 218–223, 2013.

STANESCU, M. D.; FOGORASI, M.; SHASKOLSKIY, B. L.; GAVRILAS, S.; LOZINSKY, V. I. New Potential Biocatalysts by Laccase Immobilization in PVA Cryogel Type Carrier. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 160, p. 1947-1954, 2010.

TAG, A. T.; DUMAN, G.; YANIK, J. Influences of feed stock type and process variables on hydrochar properties. **Bioresource Technology**, v. 250, p. 337-344, 2018.

TAHERI-KAFRANI, A.; KHARAZMI, S.; NASROLLAHZADEH, M.; SOOZANJPOUR, A.; EJEIAN, F.; ETEDALI, P.; MANSOURI-TEHRANI, HA.; RAZMJOU, A.; YEK, SM.; VARMA, RS: Recent developments in enzyme immobilization technology for high-throughput processing in food industries. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, p. 1-37, 2020.

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

WANG, X.; CHENG, H.; YE, G.; FAN, J.; YAO, F.; WANG, Y.; JIAO, Y.; ZHU, W.; HUANG, H.; YE, D. Key factors and primary modification of activated carbon and their application in adsorption of carbon-based gases: A review. **Chemosphere**, v. 287:131995, 2022.

ZHANG, Z.; YANG, J.; QIAN J.; ZHAO, Y.; WANG, T.; ZHAI, Y. Biowaste hydrothermal carbonization for hydrochar valorization: Skeleton structure, conversion path ways and clean biofuel applications. **Bioresource Technology**, v. 324,2021.

ZUBIOLO, C., PEREIRA L. L., SANTANA H. E. P., FREITAS L. S., RUZENE D. S., SILVA D. P. Recursos Naturais Energia de Biomassa Florestal. In: OLIVEIRA, Robson (Org). Caracterização de resíduos lignocelulósicos e avaliação de seus produtos de pirólise. São Paulo: Editora científica digital, 2021.