

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais

**BIOCARVÃO: UM POTENCIAL SUPORTE PARA IMOBILIZAÇÃO
DE LACASE E APLICAÇÃO NA BIOTRANSFORMAÇÃO DE
ACETAMINOFENO**

Chrys Katielli Hoinacki da Silva

Tese de Doutorado

Porto Alegre, outubro de 2022.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais

**BIOCARVÃO: UM POTENCIAL SUPORTE PARA IMOBILIZAÇÃO DE
LACASE E APLICAÇÃO NA BIOTRANSFORMAÇÃO DE
ACETAMINOFENO**

Chrys Katielli Hoinacki da Silva

Tese de doutorado realizada sob a orientação da Prof^a. Andreia N. Fernandes e coorientação da Prof^a. Roberta Bussamara Rodrigues, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul para a obtenção do título de Doutor em Ciência dos Materiais.

Porto Alegre, outubro de 2022.

CIP - Catalogação na Publicação

Silva, Chrys Katielli Hoinacki
Biocarvão: Um Potencial Suporte para Imobilização
de Lacase e Aplicação na Biotransformação de
Acetaminofeno / Chrys Katielli Hoinacki Silva. --
2022.
103 f.
Orientadora: Andreia Neves Fernandes.

Coorientadora: Roberta da Silva Bussamara
Rodrigues.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Instituto de Química, Programa de
Pós-Graduação em Ciência dos Materiais, Porto Alegre,
BR-RS, 2022.

1. Resíduos Agrícolas. 2. Biocarvão de Carvão de
Abacate. 3. Lacase imobilizada. 4. Biotransformação de
Acetaminofeno. I. Fernandes, Andreia Neves, orient.
II. Rodrigues, Roberta da Silva Bussamara, coorient.
III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Agradecimentos

Agradeço imensamente a minha família e amigos que sempre estiveram ao meu lado durante toda a minha trajetória, sempre me apoiando, me incentivando e vibrando a cada conquista.

Sou extremamente grata a minha orientadora professora Andreia e a minha coorientadora professora Roberta pelos ensinamentos, pela amizade, pela paciência, pelo carinho e compreensão, e por sempre terem acreditado no meu potencial durante esses anos de doutorado. Agradeço por sempre estarem dispostas e nunca terem poupado esforços para que esta pesquisa pudesse ser realizada.

Serei sempre grata a professora Andreia por ter me aceitado no LAPACE, onde aprendi e amadureci como pessoa e profissional. Agradeço a todos os meus amigos do LAPACE: Crislaine, Raimara, Larissa, Pedro, Fernanda Mizushima, Fernanda Martins, Leonardo e Nortom, vocês com certeza tornaram esta caminhada muito mais leve.

Agradeço também a todas as pessoas que me auxiliaram durante o desenvolvimento deste trabalho, em especial ao professor Éder e ao colega e amigo Pascal pela ajuda no desenvolvimento do material utilizado nesta pesquisa. A professora Rosângela e ao colega e amigo Allan que sempre estiveram dispostos a nos ajudar, disponibilizando o equipamento cromatógrafo para que pudéssemos realizar as análises desta pesquisa. A contribuição de vocês foi essencial para o aprimoramento deste trabalho e para a publicação do artigo.

Agradeço imensamente ao Juliano Geiss, meu namorado, companheiro e amigo que esteve ao meu lado desde minha primeira iniciação científica durante a graduação até o meu doutorado, sempre me apoiando e incentivando a nunca desistir e sim a vencer os obstáculos do caminho, muito obrigada pela paciência e carinho que sempre teve comigo.

Agradeço muito as professoras que avaliaram minha qualificação em 2020, as professoras Manuela, Jacqueline e Naira, as quais nos auxiliaram a aprimorar diversos aspectos desta pesquisa.

Agradeço também as seguintes instituições pelo suporte financeiro: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e ao Instituto Nacional de Ciências e Tecnologias Analíticas Avançadas (INCTAA).

Lista de trabalhos produzidos durante o doutorado

Artigo publicado em primeira autoria

Hoinacki da Silva, Chrys K.; Polidoro, Allan A.; Ruschel, Pedro M. C.; Thue, Pascal S.; Jacques, Rosângela Assis; Lima, Éder C.; Bussamara, Roberta; Fernandes, Andreia N. Laccase covalently immobilized on avocado seed biochar: A high-performance biocatalyst for acetaminophen sorption and biotransformation. **Journal of Environmental Chemical Engineering** 10, 107731 (2022).

<https://doi.org/10.1016/j.jece.2022.107731>

Artigo publicado em colaboração

Girardello, Francine; Leite, Camila C.; Touguinha, Luciana B.; Roesch-Ely, Mariana; Hoinacki da Silva, Chrys K.; Oliveira, Richard M.; Borges, Daniel L. G.; Villela, Izabel V.; Fernandes, Andreia N.; Salvador, Mirian; Henriques, João A. P. ZnO nanoparticles alter redox metabolism of *Limnoperna fortunei*. **Environmental Science and Pollution Research** 28, 69416-69425 (2021).

<https://doi.org/10.1007/s11356-021-15257-8>

Artigo submetido em colaboração

Silveira, Letícia E.; Fiorin, Debora G.; Hoinacki da Silva, Chrys K.; Thue, Pascal S.; Cercena, Rodrigo; Colonetti, Emerson; Lima, Éder C.; Dal-Bó, Alexandre G.; Fernandes, Andreia N.; Westrup, José L. Efficient removal of Mn²⁺ ions from aqueous solutions using apple pomace biochar. **Journal of Physics and Chemistry of Solids** (2022).

Participação e apresentação de trabalhos em congressos

1. Silva, C. K. H.; Cabrera, P. M.; Thue, P. S.; Lima, E. C.; Bussamara, R.; Fernandes, A. N. Removal of acetaminophen by laccase immobilized in avocado seed biochar. **Reunião Anual Virtual da Sociedade Brasileira de Química (SBQ)** (2020). (Pôster)
2. Silva, C. K. H.; Cabrera, P. M.; Thue, P. S.; Lima, E. C.; Bussamara, R.; Fernandes, A. N. Imobilização de enzima lacase em carvão de caroço de abacate para remoção de fármacos. **XIV Latin American Symposium on Environmental Analytical Chemistry**. Bento Gonçalves, Brazil (2019). (Pôster)
3. Cabrera, P. M.; Silva, C. K. H. Thue, P. S.; Lima, E. C.; Fernandes, A. N. Adsorção de fármacos usando carvão ativado de bagaço de maçã. **XIV Latin American Symposium on Environmental Analytical Chemistry**. Bento Gonçalves, Brazil (2019). (Pôster)
4. Silva, C. K. H.; Bussamara, R.; Fernandes, A. N. Avaliação de resíduos de bagaço de maçã como suporte para imobilização da enzima lacase para degradação de fármacos. **19° Encontro Nacional de Química analítica e 7° Congresso Iberoamericano de Química Analítica**. Caldas Novas, Brazil (2018). (Pôster)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. OBJETIVO E QUESTÕES DE INVESTIGAÇÃO.....	19
2.1 OBJETIVO GERAL	19
2.2 QUESTÕES CIENTÍFICAS	19
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
3.1 RESÍDUOS AGRÍCOLAS.....	20
3.2 BIOCARVÃO COMO SUPORTE PARA IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS....	24
3.2.1 BIOCARVÃO DE CAROÇO DE ABACATE.....	32
3.3 ENZIMAS	33
3.3.1 ENZIMA LACASE.....	35
3.4 MÉTODOS DE IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS	41
3.4.1 APRISIONAMENTO.....	42
3.4.2 ENCAPSULAMENTO.....	43
3.4.3 ADSORÇÃO.....	44
3.4.4 LIGAÇÃO COVALENTE.....	46
3.4.5 RETICULAÇÃO.....	47
3.5 FÁRMACO ACETAMINOFENO	49
4. PARTE EXPERIMENTAL.....	51
4.1 MATERIAIS E REAGENTES.....	51
4.2 PREPARO DOS BIOCARVÕES DE CAROÇO DE ABACATE	52
4.2.1 BIOCARVÃO DE CAROÇO DE ABACATE ATIVADO COM $ZnCl_2$	52
4.2.2 BIOCARVÃO DE CAROÇO DE ABACATE.....	53
4.3 CARACTERIZAÇÃO DOS BIOCARVÕES PREPARADOS	54
4.4 IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA LACASE	55
4.5 ENSAIO DE ATIVIDADE DA LACASE	56
4.6 SORÇÃO E BIOTRANSFORMAÇÃO DO ACETAMINOFENO.....	57
4.7 REUTILIZAÇÃO E ESTABILIDADE DE ARMAZENAMENTO DA LACASE IMOBILIZADA.....	60
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	61
5.1 IMOBILIZAÇÃO DA LACASE NOS BIOCARVÕES	61
5.1.1 OTIMIZAÇÃO DO SUPORTE DE IMOBILIZAÇÃO	61

5.1.2 OTIMIZAÇÃO DO pH DE IMOBILIZAÇÃO.....	66
5.2 CARACTERIZAÇÃO DO BIOCARVÃO DE CAROÇO DE ABACATE.....	70
5.2.1 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV).....	71
5.2.2 ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE <i>FOURIER</i> (FTIR).....	72
5.2.3 ÁREA DE SUPERFÍCIE (BET).....	75
5.3 SORÇÃO E BIOTRANSFORMAÇÃO DO ACETAMINOFENO.....	77
5.4 REUTILIZAÇÃO E ESTABILIDADE DE ARMAZENAMENTO DA LACASE	80
6. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	85
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	87

Lista de Figuras

Figura 1. Estrutura esquemática de biomassa lignocelulósica.	21
Figura 2. Pirólise de biomassa em diferentes temperaturas e seus respectivos produtos. Fonte: adaptada de Pandey <i>et al.</i> (2020) ⁵	25
Figura 3. Métodos de engenharia de biocarvão usando diferentes agentes físicos e químicos. Fonte: adaptada de Pandey <i>et al.</i> (2020) ⁵	27
Figura 4. Visão geral da imobilização de enzimas em biocarvão.	29
Figura 5. Principais características de imobilização de enzimas.	35
Figura 6. Representação esquemática do sítio ativo da lacase (His – Histidina; Cys – Cisteína; Met – Metionina) (a) e representação esquemática da estrutura em 3D da lacase (b) . Fonte: adaptada de Kunamneni <i>et al.</i> (2008) ¹⁰³ e Ren <i>et al.</i> (2020) ¹⁰⁷	36
Figura 7. Esquema do mecanismo de reação catalisada pela lacase.	37
Figura 8. Representação esquemática da reação catalítica de lacase com substrato difenol para formação de radical fenoxi.	37
Figura 9. Representação esquemática do efeito sinérgico da sorção de suportes e biotransformação enzimática de contaminantes.	38
Figura 10. Esquema de imobilização de enzimas por aprisionamento.	43
Figura 11. Esquema de imobilização de enzimas por encapsulamento.	44
Figura 12. Esquema de imobilização de enzimas por adsorção.	45
Figura 13. Esquema de imobilização de enzimas por ligação covalente.	47
Figura 14. Esquema de imobilização de enzimas por reticulação.	48
Figura 15. Fluxograma esquemático do processo de preparação dos diferentes biocarvões de caroço de abacate.	53
Figura 16. Representação da oxidação do ABTS na presença da enzima lacase. Fonte: adaptada de Christopher <i>et al.</i> (2014) ¹⁰⁶	57
Figura 17. Curva de calibração do acetaminofeno pela técnica de HPLC: faixa de concentração de 0,05–1,5 mg L ⁻¹ (a) e 1,5–50 mg L ⁻¹ (b)	59
Figura 18. Resultados da imobilização da enzima lacase nos BCA. Porcentagem de imobilização (PI) (a) ; eficiência de imobilização (EI) (b) ; e unidade de enzima ativa por grama do suporte (U g ⁻¹) (c)	62

Figura 19. Representação esquemática: funcionalização do biocarvão com glutaraldeído (etapa 1) e imobilização da lacase por ligação covalente (etapa 2) (a) ; tratamento ácido e funcionalização com glutaraldeído do biocarvão (etapa 1) e imobilização da lacase por ligação covalente (etapa 2) (b)	64
Figura 20. Gráficos do ponto de carga zero (pH_{pcz}) dos materiais preparados: BCA (a) , BCA-G1 (b) , BCA-G5 (c) , BCA-A (d) , BCA-AG1 (e) e BCA-AG5 (f) .	67
Figura 21. Efeito do pH na imobilização da lacase nos materiais BCA-G5 e BCA-AG5. Condições: temperatura = 25°C; massa do suporte = 10 mg; quantidade de lacase = 1,5 U mL ⁻¹ ; tempo de contato = 24 h.....	70
Figura 22. Microscopia eletrônica de varredura do biocarvão de caroço de abacate: sem tratamento (BCA, a); ativado com ácido cítrico (BCA-A, b) e com a lacase imobilizada (BCA-AG5, c).....	72
Figura 23. Espectros de FTIR dos materiais preparados.	73
Figura 24. Espectro de FTIR da lacase (a) , do material BCA-G5 com a lacase imobilizada (BCA-G5+lacase) (b) e do material BCA-AG5 com a lacase imobilizada (BCA-AG5+lacase) (c)	75
Figura 25. Resultados da sorção e biotransformação de ACT sob três condições experimentais: Lacase livre, BCA-G5 e BCA-G5+lacase (a) ; Lacase livre, BCA-AG5 e BCA-AG5+lacase (b) . Condições: temperatura = 25°C; massa do suporte = 10 mg; concentração do ACT = 30 mg L ⁻¹ ; tempo de contato = 24 h.	78
Figura 26. Reutilização da lacase imobilizada no biocarvão BCA-AG5. Condições: temperatura = 25°C; massa do suporte = 10 mg; Concentração do ACT = 30 mg L ⁻¹ ; tempo de contato = 24 h.	81
Figura 27. Estabilidade de armazenamento da lacase imobilizada no biocarvão BCA-AG5 a 4°C e ~25°C. Condições: temperatura = 25°C; massa do material = 10 mg; concentração do ACT = 30 mg L ⁻¹ ; tempo de contato = 24 h.	83

Lista de Tabelas

Tabela 1. Diferentes processos de pirólise, condições e produtos alvo.....	26
Tabela 2. Biocarvões utilizados como suporte para a imobilização de enzimas, métodos de imobilização e aplicação final.	31
Tabela 3. Aplicações da enzima lacase na biorremediação de contaminantes.	40
Tabela 4. Propriedades físico-químicas do fármaco acetaminofeno ^{142,143}	51
Tabela 5. Ponto de carga zero (pH _{pcz}) dos materiais preparados.....	68
Tabela 6. Área de superfície dos materiais preparados.....	76
Tabela 7. Biocarvões aplicados como suporte para a imobilização da lacase.	82

Resumo

O biocarvão obtido a partir da pirólise de resíduos agrícolas é um material promissor para a imobilização de enzimas, devido ao seu baixo custo e grande disponibilidade, além da presença de grupos funcionais de superfície e porosidade que contribuem para os processos de imobilização. As enzimas lacase apresentam potencial para várias aplicações, entre elas, destaca-se a biotransformação de contaminantes presentes no meio ambiente, como os compostos farmacêuticos. A utilização de enzimas na forma imobilizada em suportes sólidos possibilita a sua reutilização diminuindo os custos operacionais, além de melhorar a sua estabilidade e atividade catalítica. Neste trabalho, a enzima lacase foi imobilizada em biocarvão obtido a partir de caroço de abacate e aplicada na remoção e biotransformação do fármaco acetaminofeno (ACT) em solução aquosa. Diferentes tratamentos foram realizados no biocarvão, obtendo diferentes materiais que foram avaliados como suporte para a imobilização de lacase. O primeiro tratamento foi com cloreto de zinco e ácido clorídrico (BCA-Zn); o segundo foi a funcionalização do biocarvão com glutaraldeído a 1% (BCA-G1) e 5% (BCA-G5); o terceiro tratamento foi a ativação com ácido cítrico (BCA-A) e o quarto tratamento foi a ativação com ácido cítrico e funcionalização com glutaraldeído a 1% (BCA-AG1) e 5% (BCA-AG5). Após a realização dos tratamentos, foi observado que a área de superfície do biocarvão aumentou ~12 vezes após o tratamento com ácido cítrico; grupos carbonilas foram observados nos materiais que foram funcionalizados com glutaraldeído. O processo de funcionalização do biocarvão com glutaraldeído a 5% proporcionou um aumento na quantidade de enzima imobilizada ativa por grama do suporte. Estudos do efeito do valor de pH na imobilização de lacase mostraram que a imobilização em pH 4 possibilitou a interação entre a enzima e o suporte por ligação iônica e covalente. A eficiência da enzima imobilizada na remoção e biotransformação do ACT em solução aquosa foi de 99% após 24h de contato. A lacase imobilizada demonstrou estabilidade operacional por até sete ciclos de reuso, mantendo 50,7% de sua atividade na biotransformação do ACT. A enzima imobilizada também demonstrou estabilidade de armazenamento por 30 dias a 4°C e a ~25°C, mantendo mais de 90% de sua atividade na biotransformação do ACT.

Diante destes aspectos, com este trabalho destaca-se a valorização de resíduos agrícolas no desenvolvimento de suportes com enzimas imobilizadas mais ecológicos e sustentáveis.

Palavras-chave: resíduos agrícolas; biocarvão de caroço de abacate; lacase imobilizada; biotransformação de acetaminofeno.

Abstract

Biochar obtained from the pyrolysis of agricultural residues is a promising material for enzyme immobilization due to its low cost and excellent availability. In addition, biochar presents surface functional groups and porosity that contribute to the immobilization processes. Laccase enzymes have the potential for many applications, among them, stands out the contaminant's biotransformation present in the environment, such as pharmaceutical compounds. The use of enzymes in the form immobilized in solid supports allows their reuse, reducing operating costs, and improve their stability and catalytic activity. In this study, laccase enzyme was immobilized in biochar from avocado seeds and applied to acetaminophen (ACT) removal and biotransformation in aqueous solution. Different treatments were performed on biochar, obtaining different materials that were evaluated as support for laccase immobilization. The first treatment was with zinc chloride and hydrochloric acid (BCA-Zn); the second treatment was functionalization of biochar with 1% (BCA-G1) and 5% (BCA-G5) glutaraldehyde; the third treatment was activation with citric acid (BCA-A) and the fourth treatment was activation with citric acid and functionalization with 1% (BCA-AG1) and 5% (BCA-AG5) glutaraldehyde. After completion of the treatments, it was observed that surface area of the biochar increased ~12 times after the treatment with citric acid; carbonyl groups were observed in materials that were functionalized with glutaraldehyde. The functionalization process of biochar with 5% glutaraldehyde provided an increase in the amount of active immobilized enzyme per gram of support. Studies of the effect of pH value on laccase immobilization showed that immobilization at pH 4 enabled the interaction between enzyme and support by ionic and covalent bonding. The efficiency of the immobilized biocatalyst in the removal and biotransformation of ACT in aqueous solution was 99% after 24h of contact. The immobilized laccase demonstrated operational stability for up to seven reuse cycles, maintaining 50.7% of its activity in the biotransformation of ACT. The immobilized enzyme also demonstrated storage stability for 30 days at 4°C and ~25°C, maintaining more than 90% activity in the biodegradation of ACT. In view of these aspects,

this work highlights the valorization of agricultural residues in the development of supports with more ecological and sustainable immobilized enzymes.

Keywords: agricultural residues; avocado seed biochar; immobilized laccase; acetaminophen biotransformation.

1. INTRODUÇÃO

A crescente evolução da agricultura para atender as necessidades da sociedade tem conseqüentemente ocasionado um aumento na geração de resíduos que geralmente são descartados no solo ou são submetidos a queima, promovendo uma série de problemas ambientais^{1,2}. Desta maneira, é necessário o estudo e o desenvolvimento de tecnologias capazes de valorizar esses resíduos agrícolas e dar-lhes um destino ecologicamente correto. Como uma alternativa de gestão, o uso destes resíduos como materiais suportes para imobilização de enzimas pode ser uma forma promissora e sustentável de agregar valor^{3,4}. A transformação de resíduos agrícolas em novos materiais, como biocarvão para aplicação como suporte na imobilização de enzimas tem ganhado atenção nos últimos anos⁵. Os biocarvões obtidos a partir da pirólise de resíduos agrícolas apresentam estruturas porosas e com grupos funcionais, características potenciais para aplicação como suporte na imobilização de enzimas^{5,6}. Além disso, os resíduos agrícolas são matéria-prima de zero ou baixo custo de aquisição, de grande disponibilidade e de fácil acesso, o que contribui para o desenvolvimento de tecnologias mais baratas. Assim, nos últimos anos, as pesquisas vêm aumentando na área de síntese de biocarvão a partir de resíduos agrícolas e sua aplicação como suporte para imobilização de enzimas^{4,7}. No trabalho de Imam *et al.* (2021)⁸, a enzima lacase foi imobilizada em biocarvão de palha de arroz, cujo resíduo é abundantemente disponível na Índia. Lonappan *et al.* (2018)⁹ avaliaram a imobilização da enzima lacase em biocarvão obtido a partir de três diferentes resíduos agrícolas, casca de amêndoa, esturmo de porco e madeira de pinheiro.

Em outro cenário, a enzima lacase tem apresentado uma capacidade significativa de biotransformação de contaminantes orgânicos e tem demonstrado potencial para aplicações no tratamento de águas residuais e/ou tratadas¹⁰. As enzimas lacase, por exemplo, usam o oxigênio molecular para

oxidar uma variedade de doadores de hidrogênio aromático e não-aromático via mecanismo envolvendo radicais¹¹. No entanto, o uso da lacase na sua forma livre pode apresentar baixa estabilidade quando exposta a condições operacionais adversas e ao longo do tempo¹² e não pode ser reutilizada, aumentando assim o custo operacional¹³. Para enfrentar esses desafios, a estratégia de imobilização é considerada bastante promissora. A fixação de enzimas em suportes sólidos pode aumentar significativamente sua capacidade de manter sua atividade ao longo do tempo e sua resistência às condições operacionais (por exemplo, temperatura, pH e exposição a diferentes agentes químicos)¹⁴. Além disso, a reutilização do biocatalisador imobilizado tende a diminuir substancialmente o custo operacional em sistemas contínuos¹⁵.

Diante desses aspectos, a motivação deste trabalho está relacionada a dois fatores: *i*) à preocupação com a contaminação ambiental causada diariamente por resíduos agrícolas e contaminantes orgânicos como os fármacos; e *ii*) a busca por suportes para imobilização de enzimas que sejam mais baratos, de fontes renováveis e sustentáveis. Desta forma, este estudo avaliou a imobilização da enzima lacase em biocarvão de caroço de abacate (BCA), cujo resíduo agrícola é normalmente descartado no lixo doméstico, contribuindo para a geração de resíduos. O desempenho do biocatalisador imobilizado desenvolvido foi verificado na sorção e biotransformação do acetaminofeno (ACT), o qual é um dos analgésicos e antipiréticos mais populares e amplamente utilizados no mundo; conseqüentemente, pode ser encontrado em diferentes amostras ambientais¹⁶. Neste sentido, o ACT foi selecionado como fármaco modelo para testar a eficiência da enzima lacase imobilizada em biocarvão de resíduo agrícola que foi desenvolvido neste estudo.

2. OBJETIVO E QUESTÕES DE INVESTIGAÇÃO

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo principal desta pesquisa consiste em investigar o potencial de um biocarvão preparado a partir de caroço de abacate como suporte para a imobilização da enzima lacase e avaliar a eficiência do biocatalisador imobilizado na sorção e biotransformação do acetaminofeno.

2.2 QUESTÕES CIENTÍFICAS

Para alcançar o objetivo principal deste trabalho de doutorado, foram elaboradas as seguintes questões de investigação:

O biocarvão de caroço de abacate poderia ser um bom suporte para a imobilização da enzima lacase?

Quais modificações na superfície do material poderiam ser realizadas para promover uma interação efetiva entre a enzima e o suporte?

A conformação estrutural ativa da enzima lacase ficaria mantida neste material preparado?

A atividade da lacase imobilizada na biotransformação do ACT seria maior ou menor do que na sua forma livre?

A enzima lacase imobilizada no material poderia ser reutilizada na biotransformação do ACT?

A lacase imobilizada no material preparado teria estabilidade de armazenamento a temperatura ambiente (~25°C) e sob refrigeração (4°C)?

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 RESÍDUOS AGRÍCOLAS

O crescente aumento da população global exige uma enorme demanda por alimentos para atender às necessidades da sociedade¹⁷. O setor agrícola produz, em média, 23,7 milhões de toneladas de alimentos por dia em todo o mundo¹⁸. Para atender uma população de 9,7 bilhões estimada para ano de 2050, a produção de alimentos precisará aumentar dos atuais 8,4 bilhões de toneladas para quase 13,5 bilhões de toneladas por ano¹⁸. O Brasil destaca-se mundialmente pela agricultura com uma grande área cultivável de grãos, cereais, frutas e cana-de-açúcar¹⁹. Segundo o levantamento realizado pela Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO), o Brasil no ano de 2020 produziu 757 milhões de toneladas de cana-de-açúcar; 122 milhões de toneladas de soja; 11 milhões de toneladas de arroz; 6,6 milhões de toneladas de banana; 6,3 milhões de toneladas de trigo; 3 milhões de toneladas de feijão; 2,2 milhões de toneladas de melancia; 983 mil toneladas de maçã; 898 mil toneladas de aveia; 690 mil toneladas de frutas tropicais; 387 mil toneladas de cevada; 267 mil toneladas de abacate, entre outras²⁰. Portanto, a evolução na produção agrícola conseqüentemente leva a geração de resíduos, que quando dispostos no meio ambiente representam uma preocupação crescente, a ponto de causar impactos negativos no solo, ar e recursos hídricos².

Os resíduos agrícolas são definidos como resíduos gerados do cultivo, do processamento de produtos agrícolas e resíduos domésticos, os quais podem ser classificados em resíduos lignocelulósicos, que são de origem vegetal como cascas, sementes, bagaço, plantas e madeira, e os resíduos não lignocelulósicos, que são de origem animal como casca de ovo e esterco de porco²¹⁻²³. Os resíduos lignocelulósicos são constituídos principalmente por celulose, hemicelulose e lignina que são organizadas em estruturas tridimensionais não uniformes (**Figura 1**). A composição e estruturas variam dependendo da fonte e do tipo de biomassa lignocelulósica²⁴. Grande parte dos

resíduos lignocelulósicos geralmente são descartados pela queima, essa prática resulta na produção de dióxido de carbono e metano que contribuem para a emissão global de gases do efeito estufa^{1,4}. Além disso, a disposição e persistência a longo prazo desses resíduos não tratados em aterros sanitários também resulta na produção do gás metano, mudança no pH do solo e contaminação das águas de rios, causando sérios problemas de poluição ambiental^{2,25}.

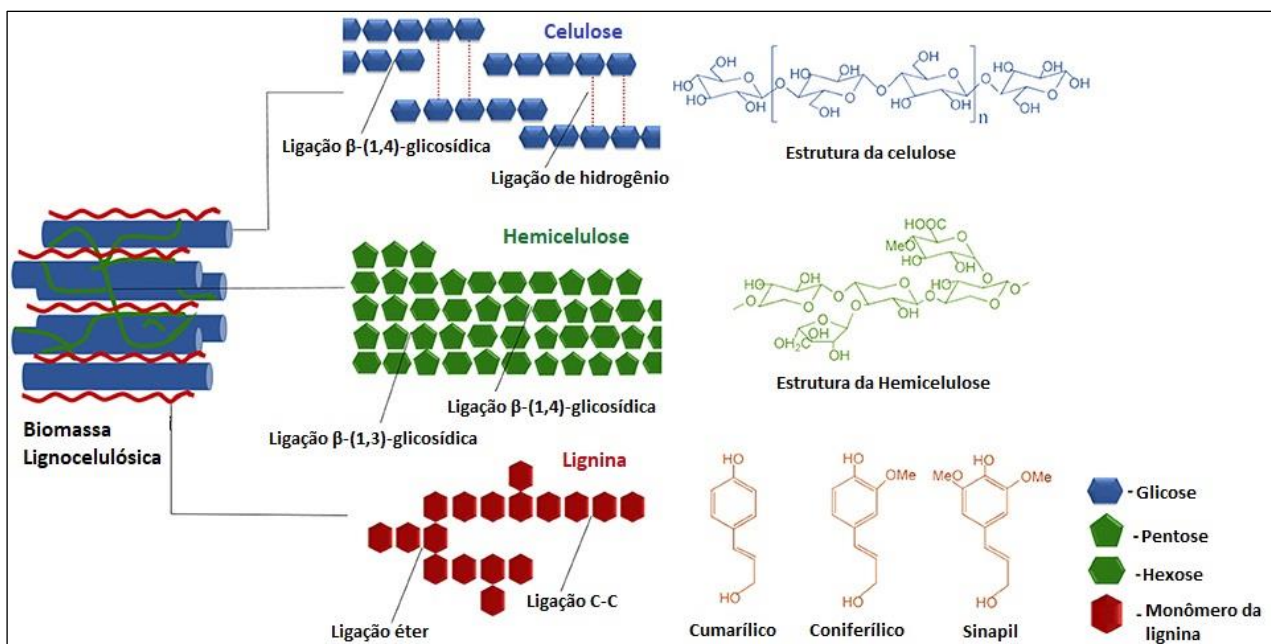


Figura 1. Estrutura esquemática de biomassa lignocelulósica.

Fonte: adaptada de Baruah *et al.* (2018)²⁴.

A celulose é um biopolímero linear homogêneo de unidades de glicose unidas por meio de ligações β -(1,4)-glicosídicas; as cadeias de celulose estão associadas por meio de forças de *van der Waals* e ligações de hidrogênio; a celulose é um dos principais componentes estruturais com regiões cristalinas e amorfas, responsáveis pela resistência mecânica^{21,24,26}. A hemicelulose é o segundo biopolímero mais abundante com estrutura amorfa e aleatória, são frequentemente polímeros heterogêneos de hexoses (glicose, manose e galactose), pentoses (xilose e arabinose) e ácidos urônicos (ácidos de açúcar) unidos por meio de ligações β -(1,3)-glicosídicas e β -(1,4)-glicosídicas^{21,24,26}. A lignina é um biopolímero constituído por três unidades de fenil propano (álcool coniferílico, álcool sinapil e álcool *p*-cumarílico) unidas por ligações C-C e éter;

a lignina forma um selo protetor em torno dos outros dois componentes (celulose e hemicelulose)^{21,24,26}. A integridade e resistência da biomassa lignocelulósica à despolimerização são atribuídas à cristalinidade da celulose, hidrofobicidade da lignina, e aprisionamento do polímero de celulose na rede de lignina-hemicelulose que são rigidamente associadas por meio de ligações não covalentes e ligações covalentes cruzadas^{21,24}.

Devido as propriedades dos resíduos agrícolas lignocelulósicos e as crescentes preocupações ambientais com a grande quantidade de resíduos agrícolas que é gerada em todo o mundo, intensificou-se nos últimos anos a busca por soluções alternativas rápidas, econômicas e ecologicamente corretas, sobre o aproveitamento desses resíduos. A agricultura é um dos setores biológicos que produz maior quantidade de biomassa, o que pode ser um importante insumo para a bioeconomia¹. As estratégias bioeconômicas baseadas na gestão de resíduos agrícolas podem prevenir a queima de resíduos e/ou seu descarte em aterros para garantir a segurança alimentar e sanitária¹. Vários resíduos agrícolas, principalmente os lignocelulósicos têm sido utilizados para produção de produtos químicos, biocombustíveis, materiais bioabsorventes, enzimas, os quais podem ser utilizados como suporte para imobilização de enzimas²⁷⁻²⁹.

Na produção de produtos químicos e biocombustíveis, os resíduos lignocelulósicos passam primeiramente por tratamentos físicos (trituração e moagem), químicos (com ácidos e líquidos iônicos), físico-químicos (expansão das fibras a vapor, água quente ou amônia) ou biológicos (fungos ou enzimas) para isolar a celulose e hemicelulose que serão convertidas para o produto de interesse^{24,30}. Esses pré-tratamentos são necessários devido a resistência da biomassa lignocelulósica à despolimerização. A lignina que forma um selo protetor em torno da celulose e hemicelulose torna a estrutura biopolimérica altamente resistente à solubilização, inibindo assim a hidrólise direta de celulose e hemicelulose, que resultaria na liberação de açúcares redutores que são altamente valorizados na produção de biocombustíveis como bioetanol e biogás, ácidos orgânicos, fenóis e aldeídos; assim, o pré-tratamento representa um desafio significativo para o isolamento dos componentes biopoliméricos da biomassa lignocelulósica²⁴. Ao longo do processo de pré-tratamento, a estrutura recalcitrante da lignocelulose é rompida resultando em quebra de lignina,

degradação da hemicelulose e redução na cristalinidade e grau de polimerização da celulose²⁴. Portanto, o processo de produção de biocombustíveis como o bioetanol, por exemplo, a partir de materiais lignocelulósicos começa com um pré-tratamento, seguido de hidrólise e finalmente fermentação de açúcares em etanol^{27,30}.

Materiais biossorbentes produzidos a partir de diferentes resíduos agrícolas tem sido estudado para remoção de poluentes como metais e contaminantes orgânicos como fármacos e hormônios de águas residuais²⁹. No entanto, existem algumas desvantagens de usar diretamente resíduos de biomassa bruta como biossorbentes; por exemplo, a taxa de remoção de metais é relativamente baixa devido à difusão lenta ou sítios tensoativos limitados; também é difícil separar os biossorbentes das soluções e reciclá-los para uso múltiplo²⁹. Como resultado, a conversão de resíduos de biomassa em materiais à base de carbono com melhor capacidade de sorção tem sido investigada nos últimos anos^{29,31}. O biocarvão produzido por meio da pirólise de resíduos agrícolas é um material promissor para remoção de contaminantes devido a sua estrutura porosa e com grupos funcionais de superfície³¹. Além disso, tratamentos como ativação química e/ou física podem ser realizados na superfície do biocarvão para aumentar a sua área de superfície, porosidade e grupos funcionais, a fim de melhorar ainda mais a sua capacidade de sorção^{29,31}. Vários relatos têm sido publicados com o uso de biocarvão obtido a partir de diferentes resíduos agrícolas para aplicação na sorção de pesticidas, hormônios, compostos farmacêuticos e metais³²⁻³⁴.

A utilização de biomassa de resíduos lignocelulósicos como substrato para a produção de enzimas também tem despertado um interesse significativo^{1,26}. As enzimas apresentam potencial como biocatalisadores em muitas indústrias, como detergentes, produtos farmacêuticos, agricultura (inseticidas, pesticidas), indústria de laticínios (produção de queijo, recuperação de queijo e melhoria de sabor), indústria de óleo (hidrólise de óleo e gordura), entre outras²⁶. Desta forma, vários estudos relatam a biossíntese sustentável de enzimas industrialmente pertinentes, incluindo lipases, lacases, pectinases, xilanases, peroxidases, celulases, α -galactosidases, β -galactosidases e proteases por fermentação microbiana utilizando resíduos lignocelulósicos como fonte de nutrientes, tornando o processo muito mais econômico³⁵⁻³⁹.

A imobilização de enzimas ganhou reconhecimento como uma tecnologia altamente útil para melhorar as propriedades das enzimas, como estabilidade catalítica, desempenho e principalmente a sua reutilização^{21,40}. A avaliação da literatura destacou que biocarvões obtidos a partir de resíduos agrícolas apresentam alto potencial para ser utilizados como suporte na imobilização de enzimas devido ao seu baixo custo, natureza bio-renovável e sustentável^{5,6}. Além disso, as vantagens do uso de biocarvão de resíduos agrícolas para a imobilização de enzimas está relacionada com a sua biocompatibilidade, estabilidade química e térmica, área de superfície, porosidade, grupos funcionais e baixa solubilidade durante a reação, contribuindo para a eficiência do processo^{5,6}. Desta maneira, nos últimos anos, as pesquisas têm destacado o uso de biocarvão obtido a partir de diferentes resíduos agrícolas como suporte para a imobilização de enzimas⁴¹⁻⁴⁴. A utilização efetiva de resíduos agrícolas como matéria-prima para o desenvolvimento de novos produtos não é apenas econômica, mas também pode reduzir os problemas ambientais de gerenciamento inadequado desses resíduos. Além do mais, as estratégias alternativas de gestão em que seja possível utilizar a biomassa residual direta torna todo o processo mais rentável, como a produção de biocarvão.

3.2 BIOCARVÃO COMO SUPORTE PARA IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

Levando em conta a crescente busca por novos materiais sustentáveis, a utilização de biocarvão obtido a partir de resíduos agrícolas tem ganhado interesse significativo como suporte barato e renovável para a imobilização de enzimas, assim como também é uma estratégia alternativa de valorização dos resíduos agrícolas⁴. O biocarvão é um material inerte, pouco solúvel em água e resistente, características essenciais para uso como suporte na imobilização de enzimas^{5,6}. Em relação a sua produção, os biocarvões são produtos da decomposição térmica direta da biomassa realizada por pirólise, na ausência de oxigênio, onde os resíduos são submetidos a altas temperaturas levando a alterações em sua composição e estrutura^{1,5}. Durante a decomposição térmica,

celulose, hemicelulose e lignina que compõem a biomassa passam por suas próprias vias de reação, incluindo reticulação, despolimerização e fragmentação, produzindo produtos sólidos, líquidos e gasosos⁴⁵. Devido às condições sob ausência de oxigênio, não há combustão de carbono, o que contribui para a mitigação de emissões antropogênicas de dióxido de carbono⁴⁶, e os materiais resultantes incluem o *syngas* (gás de síntese – principalmente monóxido de carbono e hidrogênio), bio-óleo e biocarvão (**Figura 2**)^{5,45}.

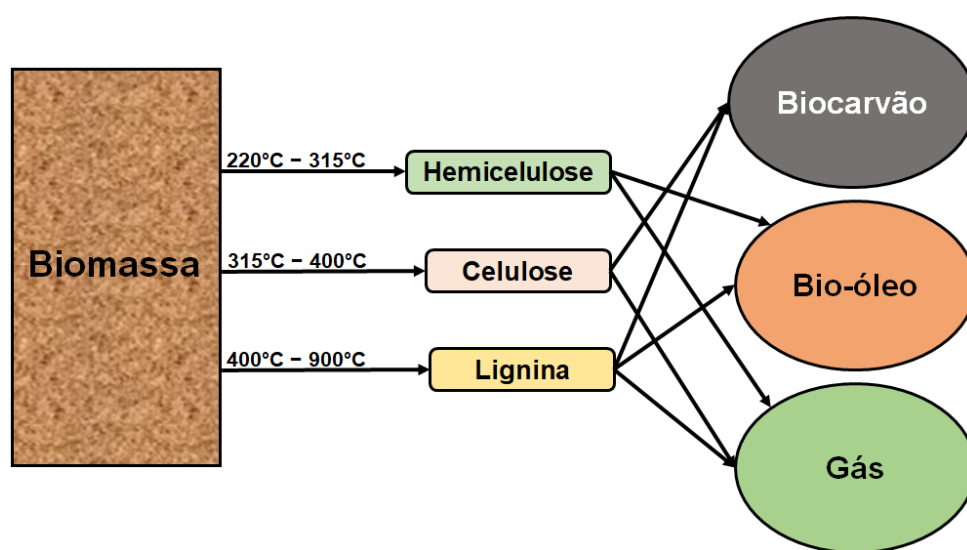


Figura 2. Pirólise de biomassa em diferentes temperaturas e seus respectivos produtos. Fonte: adaptada de Pandey *et al.* (2020)⁵.

Em relação aos produtos da pirólise de biomassa, o gás de síntese e o bio-óleo podem ser convertidos em uma série de produtos energéticos, incluindo eletricidade, bem como combustíveis gasosos ou líquidos, matéria prima para a indústria química, petroquímica e siderúrgica^{47,48}; o biocarvão é um material sólido, preto, altamente poroso, leve e rico em carbono⁵. A Fundação Europeia de Biocarvão define o biocarvão como uma substância heterogênea rica em carbono aromático e minerais⁵⁰. É produzido por pirólise de biomassa obtida de forma sustentável em condições controladas com tecnologia limpa e é utilizado para qualquer finalidade que não envolva sua rápida mineralização a dióxido de carbono⁴⁹. As condições do processo de pirólise, como temperatura, taxa de aquecimento e tempo de permanência, têm um efeito importante no rendimento e nas propriedades do biocarvão, como área superficial, porosidade, teor de carbono e grupos funcionais⁴⁵.

A pirólise pode ser categorizada em três grupos principais, incluindo pirólise lenta, pirólise rápida e pirólise *flash*^{5,46} (**Tabela 1**). O biocarvão é o principal produto da pirólise lenta com rendimento de 35 a 50%. Em relação a temperatura de pirólise, em geral, o rendimento de biocarvão muitas vezes diminui com o aumento da temperatura; em contraste, o teor de carbono fixo no biocarvão geralmente aumenta com a temperatura^{45,46}. A principal razão para este fenômeno é a seguinte: no estágio de pirólise, a matéria volátil contendo carbono é liberada aleatoriamente, resultando em um rendimento de biocarvão com menor teor de carbono. Com um aumento adicional da temperatura, a liberação de compostos ricos em carbono do biocarvão diminui significativamente, enquanto outros compostos com menos carbono são continuamente liberados. Isso resulta em um aumento no teor de carbono fixo do biocarvão remanescente⁴⁶. Em relação aos grupos funcionais é relatado que biocarvão produzido em temperatura acima de 500°C pode conter menor quantidade de grupos funcionais contendo oxigênio e hidrogênio do que quando produzido abaixo de 500°C⁵⁰. Além do rendimento, do teor de carbono fixo e grupos funcionais, as características de textura, como área de superfície e porosidade, também são influenciadas pela temperatura de pirólise. Um aumento na temperatura leva à liberação de materiais mais voláteis da superfície da biomassa, resultando na formação de poros e no aumento da área superficial do biocarvão^{5,46}.

Tabela 1. Diferentes processos de pirólise, condições e produtos alvo.

Condições	Pirólise Lenta	Pirólise Rápida	Pirólise Flash
Temperatura de pirólise (°C)	350–700	400–600	750–1000
Taxa de aquecimento (°C/min)	2–10	>300	~1000
Tempo de permanência	30–60 minutos ou mais	0,5–10 segundos	<2 segundos
Produto alvo	Biocarvão	Bio-óleo	Bio-óleo/Gás
Rendimento de biocarvão (%)	35–50	15–35	10–20

Fonte: adaptada de Pandey *et al.* (2020)⁵ e Liu *et al.* (2015)⁴⁶.

Para a aplicação do biocarvão, a sua superfície pode ser modificada para melhorar ainda mais as suas propriedades para adequação à aplicação final, como por exemplo, aumentar a sua área superficial específica e volume de poros, e formar grupos funcionais reativos na superfície⁵. Para isso, geralmente são realizados tratamentos químicos utilizando ácidos, bases e sais inorgânicos ou tratamentos físicos envolvendo o uso de gases como vapor, dióxido de carbono, nitrogênio e ozônio (**Figura 3**)^{5,45}. A funcionalidade da superfície e a porosidade do biocarvão podem, no entanto, ser facilmente ajustadas, e isso oferece uma plataforma promissora para sintetizar vários materiais funcionais⁴⁶.

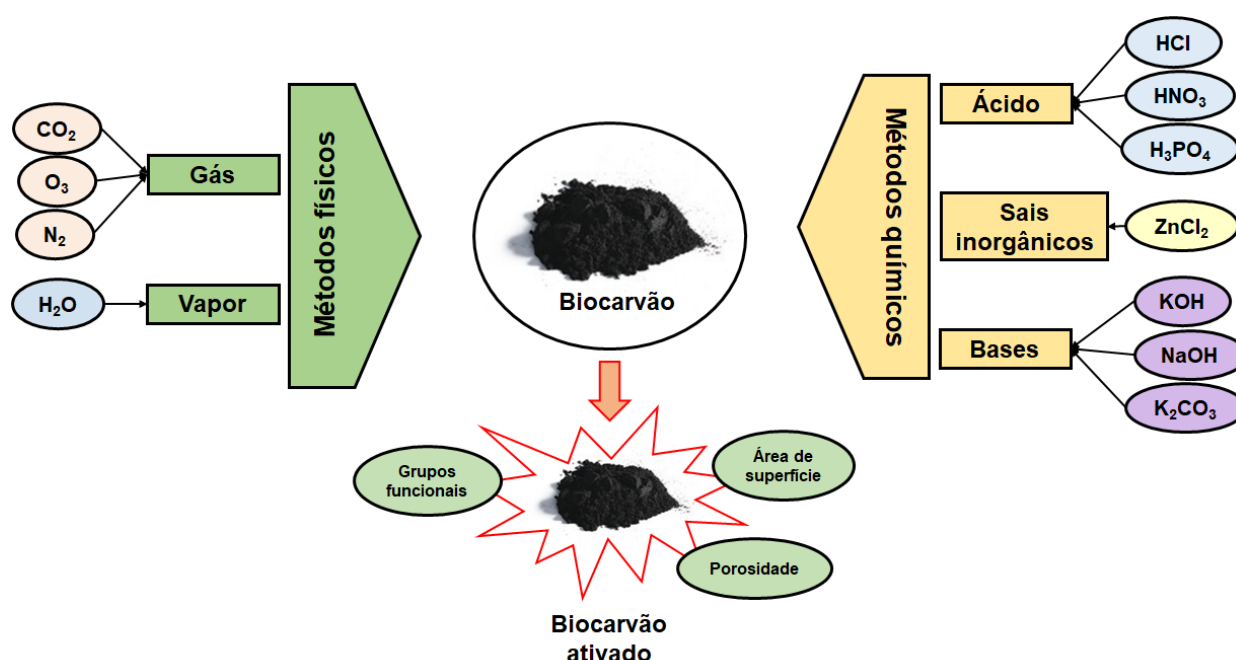


Figura 3. Métodos de engenharia de biocarvão usando diferentes agentes físicos e químicos. Fonte: adaptada de Pandey *et al.* (2020)⁵.

Grupos funcionais oxigenados como C=O, OH e COOH são importantes para melhorar o desempenho do biocarvão em várias aplicações. Por exemplo, os grupos OH e COOH de superfície podem aumentar muito a capacidade de sorção quando o biocarvão é usado como biossorvente para remoção de metais. Isso ocorre porque esses grupos interagem com os metais por meio de ligações de hidrogênio e complexação⁴⁶. Na aplicação como suporte para a imobilização de enzimas, os grupos funcionais C=O, COOH e NH₂ podem interagir com os grupos funcionais presentes em cadeias laterais de aminoácidos que constituem

a enzima, como por exemplo os grupos amino e carboxílicos, garantindo uma forte interação entre a enzima e a superfície do suporte^{5,6}. Além disso, a introdução de grupos funcionais oxigenados na superfície pode melhorar muito a hidrofiliabilidade do biocarvão, aumentando assim seu desempenho em sistemas aquosos⁴⁶. A ativação química do biocarvão com o uso de agentes químicos como ácidos, bases e sais inorgânicos normalmente promove o surgimento de grupos funcionais contendo oxigênio devido a oxidação da superfície do biocarvão, juntamente com o aumento da área de superfície^{5,6,46}. No trabalho de Vithanage *et al.* (2015)⁵¹, os autores ativaram um biocarvão obtido a partir de resíduos de plantas com ácido sulfúrico e ácido oxálico; após a ativação, grupos funcionais oxigenados, aumento na área de superfície e aumento na hidrofiliabilidade foram observados no biocarvão. No trabalho de Gokce *et al.* (2014)⁵², os autores produziram um biocarvão a partir de resíduos de chá, o qual foi ativado com ácido nítrico; após o tratamento, grupos funcionais oxigenados e nitrogenados foram observados no material. Em outro estudo, diferentes grupos funcionais oxigenados como COOH e OH foram formados na superfície de biocarvão derivado da planta de bambu por meio de ativação química com ácido nítrico, permanganato de potássio e hidróxido de sódio; de acordo com os resultados, o ácido nítrico foi mais eficaz para o surgimento de grupos funcionais oxigenados⁵³. A ativação física do biocarvão que envolve o uso de gases em temperaturas acima de 700°C pode ser resumida em duas etapas: primeiro, a área de superfície do biocarvão é aumentada por meio da decomposição de partes não estruturadas do material e abertura dos poros contidos na estrutura e, segundo a formação de carbono cristalino é melhorada^{5,6,45}. Park *et al.* (2016)⁵⁴ estudaram o efeito da modificação da superfície de biocarvão por vapor a 700°C por 1h. Os resultados confirmaram que, enquanto a área de superfície do biocarvão não tratado era próxima de zero, a do biocarvão tratado aumentou para 22 m² g⁻¹. Em outro estudo, o biocarvão foi ativado a vapor produzido a 700°C e mostrou um aumento de 55% na capacidade de sorção de sulfametazina em comparação com o biocarvão não ativado, devido ao aumento da área de superfície⁵⁵.

O teor rico em carbono e superfície em que é possível realizar alterações tornaram o biocarvão um material com potencial para aplicação em diversos campos. É usado como suplemento do solo para melhorar a fertilidade do solo e

a capacidade de retenção de nutrientes^{56,57}. Também é usado para a produção de energia renovável na forma de energia térmica, eletricidade e na produção de biocombustíveis⁵⁸. O biocarvão também é usado como biossorvente para a remoção de poluentes tóxicos do solo e da água^{59,60} e como suporte para a imobilização de enzimas⁶¹.

A utilização de biocarvão como suporte para a imobilização de enzimas para aplicação ambiental, como na remoção de contaminantes orgânicos, é uma estratégia promissora, pois não remove o contaminante apenas por sorção no material e sim o biotransforma em uma substância menos tóxica ou biologicamente inativa por meio da catálise enzimática^{61,62}. Desta forma, o biocarvão tem sido empregado de forma eficiente para imobilização de enzimas (**Figura 4**). Sua estrutura porosa bem desenvolvida, alta área superficial e existência de grupos funcionais na superfície o tornam altamente promissores para a imobilização de enzimas^{5,61,63}.

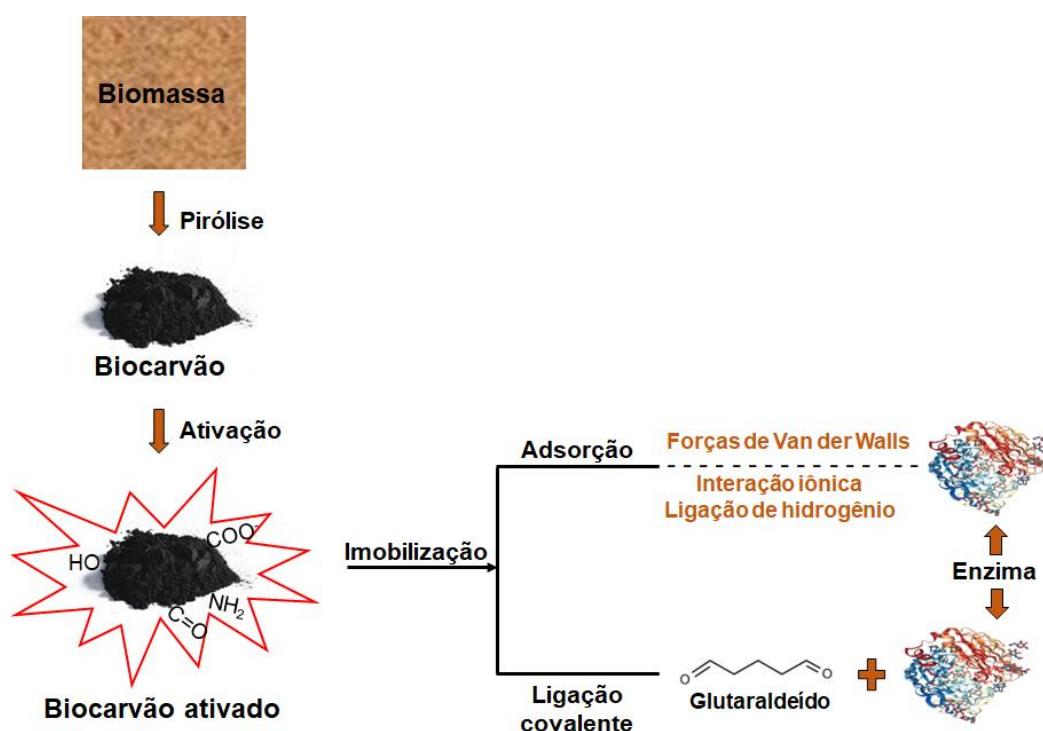


Figura 4. Visão geral da imobilização de enzimas em biocarvão.

Fonte: adaptada de Pandey *et al.* (2020)⁵ e Kaur *et al.* (2021)⁶¹.

Neste sentido, nos últimos anos diversos estudos têm focado no uso de resíduos agrícolas como biomassa para a obtenção de biocarvões para aplicação como suporte na imobilização de enzimas (**Tabela 2**). Como por exemplo, o trabalho de Veeramalai *et al.* (2022)⁶⁴, avaliou a imobilização da enzima lipase em biocarvão obtido a partir de resíduos de abacaxi e aplicou o material na remoção de corantes. Os resultados demonstraram que o biocarvão tratado com ácido nítrico teve potencial para ser usado como suporte na imobilização de lipases e na remoção de corantes. Pandey *et al.* (2022)⁶⁵ avaliaram a imobilização da enzima lacase em biocarvão de resíduos da planta pinheiro tratado com uma mistura de ácidos contendo CH₃COOH e H₃PO₄ (1:1), e aplicaram o material na remoção do corante verde malaquita em solução aquosa, obtendo 85% de remoção. Além disso, a lacase imobilizada pôde ser reutilizada 6 vezes, mantendo 53% de sua atividade inicial. Em outro estudo, Wang *et al.* (2022)⁶⁶ estudaram a imobilização da enzima lacase em biocarvão de palha de arroz tratado com hidróxido de potássio. O material com a lacase imobilizada foi aplicado na remoção de 2,4-diclorofenol em solução aquosa, obtendo 100% de remoção. A lacase imobilizada pôde ser reutilizada 6 vezes, mantendo 27,8% de sua atividade inicial. No trabalho de Imam *et al.* (2021)⁶⁷, a enzima lacase foi imobilizada em biocarvão de palha de arroz tratado com diferentes combinações de ácidos (HNO₃, HCl e H₂SO₄). O material com a lacase imobilizada foi aplicado na biodegradação de antraceno, obtendo 99% de biodegradação. A lacase imobilizada pôde ser reutilizada 6 vezes, mantendo 40% de sua atividade inicial. De acordo com esses relatos, a estrutura do biocarvão e as propriedades físico-químicas associadas desempenham um papel fundamental na interação do material com a enzima durante o processo de imobilização, o que resultará em uma diminuição na lixiviação da enzima durante a aplicação, possibilitando a sua reutilização⁵.

Tabela 2. Biocarvões utilizados como suporte para a imobilização de enzimas, métodos de imobilização e aplicação final.

Biocarvão	Enzima	Método de imobilização	Aplicação	Referência
Resíduo de abacaxi	Lipase	Adsorção	Remoção de corantes	Veeramalai <i>et al.</i> ⁶⁴
Resíduo de pinheiro	Lacase	Adsorção	Remoção de corantes	Pandey <i>et al.</i> ⁶⁵
Casca de semente de cânfora	Lipase	Ligação covalente	Produção de lipídios	Zhao <i>et al.</i> ⁶⁸
Palha de arroz	Lacase	Adsorção	Degradação de 2,4-diclorofenol	Wang <i>et al.</i> ⁶⁶
Palha de arroz	Lacase	Adsorção	-	Wang <i>et al.</i> ⁶⁹
Madeira	Peroxidase	Ligação covalente	Remoção de fenol	Petronijevic <i>et al.</i> ⁷⁰
Palha de arroz	Lacase	Adsorção	Degradação de antraceno	Imam <i>et al.</i> ⁷¹
Palha de trigo	Lacase	Adsorção e reticulação	Degradação de 2,4-diclorofenol	Wang <i>et al.</i> ⁷²
Semente de goiaba	Lipase	Adsorção	Reação de transesterificação	Almeida <i>et al.</i> ⁷³
Bagaço de cana de açúcar	Celulase	Ligação covalente	Produção de glicose	Mo and Qiu. ⁷⁴
Bagaço de cana de açúcar	Celulase	Adsorção	Produção de glicose	Mo <i>et al.</i> ⁷⁵
Lodo de esgoto	Lacase	Adsorção	-	Zhang <i>et al.</i> ⁷⁶
Casca de aveia	Lipase	Adsorção	Reação de esterificação	Cea <i>et al.</i> ⁷⁷
Madeira de pinho	Lacase	Encapsulação	Atividade antibacteriana	Naghdi <i>et al.</i> ⁷⁸
Casca de amendoim e palha de trigo	Lacase	Ligação covalente	Remoção de nove pesticidas	Chen <i>et al.</i> ⁷⁹
Madeira de pinho	Lacase	Ligação covalente	-	Naghdi <i>et al.</i> ⁸⁰
Casca de amêndoa, estribo de porco e madeira de pinheiro	Lacase	Ligação covalente e adsorção	Degradação de diclofenaco	Lonappan <i>et al.</i> ⁹
Madeira de pinheiro	Lacase	Adsorção	Degradação da carbamazepina	Naghdi <i>et al.</i> ¹⁵

3.2.1 BIOCARVÃO DE CAROÇO DE ABACATE

O abacate (*Persea americana Mill.*) pertence à família das *Lauraceae* e é típico das regiões tropicais; seu fruto oleaginoso é amplamente consumido em todo o mundo⁸¹. Sua produção mundial atingiu mais de 8 milhões de toneladas em 2020²⁰; sendo o México o maior produtor (2,4 milhões de toneladas), seguido pela Colômbia (876 mil toneladas), República Dominicana (676 mil toneladas), Peru (660 mil toneladas), Indonésia (609 mil toneladas), Quênia (322 mil toneladas) e Brasil com 267 mil toneladas, sendo o 7º maior produtor do mundo²⁰. A enorme produção mundial de abacate está correlacionada com o seu consumo e valor nutricional da polpa que é rica em proteínas, lipídios, carotenóides, vitaminas (B, C e E), fibras, ácidos graxos insaturados e polifenóis⁸². No entanto, apenas a polpa é utilizada, a semente e a casca representam uma grande quantidade de resíduos⁸². Portanto, eles têm um grande potencial como fonte de ingredientes para alimentos, cosméticos e outros campos industriais^{81,82}.

Recentemente, o caroço tem sido investigado como matéria-prima para a obtenção de materiais carbonáceos para aplicação na remoção de contaminantes. No trabalho de Sellaoui *et al.* (2021)⁸³, foi utilizado o caroço de abacate como matéria-prima para a obtenção de carvão ativado, o qual foi aplicado na remoção de 3-aminofenol e resorcinol em solução aquosa. Como resultado, o carvão preparado obteve alta capacidade de adsorção para os dois contaminantes estudados. Em outro estudo, Leite *et al.* (2018)⁸⁴ otimizaram o preparo de carvão ativado de caroço de abacate variando o tempo e temperatura de pirólise. Carvões com alta área superficial, estruturas porosas e com grupos funcionais de superfície foram obtidos e aplicados como material adsorvente na remoção de 15 compostos fenólicos e 10 fármacos em solução aquosa. No trabalho de Zhu *et al.* (2016)⁸⁵, o caroço de abacate também foi utilizado como biomassa para a obtenção de carvão ativado e aplicado na remoção de amônio aquoso. Em outro estudo de Zhu *et al.* (2018)⁸⁶, o carvão ativado de caroço de abacate foi aplicado na remoção simultânea de amônio e *p*-cresol em solução aquosa. Elizalde-González *et al.* (2017)⁸⁷ utilizaram carvão ativado preparado a partir de caroço de abacate e sementes de goiaba na remoção de agentes de

contraste de solução aquosa, os quais são utilizados na ressonância magnética, uma das técnicas mais utilizadas no diagnóstico clínico não invasivo; esses agentes de contraste são predominantemente excretados por via renal 24 h após o exame dos pacientes. No estudo de Bhaumik *et al.* (2014)⁸⁸, os pesquisadores investigaram a remoção de Cromo (VI) de águas residuais utilizando carvão obtido a partir de caroço de abacate. Por fim, no trabalho de Rodrigues *et al.* (2011)⁸⁹, o caroço de abacate foi utilizado como biomassa para a obtenção de carvão, o qual foi aplicado na remoção de fenóis em solução aquosa.

Com base nesses aspectos o caroço de abacate tem potencial para ser aplicado como biomassa na obtenção de materiais carbonáceos para várias aplicações. Ademais, o caroço de abacate pode ser classificado como resíduo lignocelulósico⁶; é relatado que materiais carbonáceos obtidos a partir desses resíduos lignocelulósicos apresentam maior área superficial do que os resíduos não lignocelulósicos⁶. Desta forma, biocarvões de biomassa lignocelulósica como o caroço de abacate apresentam potencial para os processos de imobilização de enzimas, sendo também uma alternativa para a valorização e reaproveitamento desses resíduos agrícolas.

3.3 ENZIMAS

As enzimas são biocatalisadores que aceleram a maioria das reações metabólicas nos seres vivos. Na natureza, as enzimas realizam reações químicas específicas com eficiência surpreendente, tornando-as de supremo interesse como uma ferramenta biocatalítica versátil sobre catalisadores homogêneos ou heterogêneos clássicos⁹⁰. Portanto, o interesse no território da biocatálise aumentou surpreendentemente nas últimas três décadas⁹⁰. Geralmente, as reações biocatalíticas são operadas em ambientes fisiológicos (pH neutro, temperatura e pressão ambiente) com excelente seletividade⁹¹. Portanto, a alta seletividade de enzimas e condições de reação suaves tem sido uma grande vantagem a ser explorada em diversos processos industriais que vão desde a indústria alimentícia até a indústria farmacêutica, como por exemplo, sintetizar substâncias farmacêuticamente ativas, reduzindo o número de etapas

de reação e solventes perigosos^{90,92,93}. Aproximadamente mais de 3 mil enzimas são conhecidas e centenas são disponíveis comercialmente; estas são classificadas em seis grandes grupos: oxirredutases, transferases, hidrolases, liases, isomerases e ligases⁹⁴.

As enzimas livres geralmente são sensíveis e precisam ser estabilizadas para resistir a uma série de desafios relacionados à variação de temperatura, valor de pH, tipo e concentração de sal, solventes, bem como forças de cisalhamento⁹³. Em contraste, a imobilização enzimática tem sido apresentada como uma abordagem que pode superar alguns desafios na aplicação de enzimas, como estabilidade, reutilização e facilidade de manuseio^{93,95}. Uma melhoria significativa na estabilidade de enzimas sob diversas configurações de reação e maior repetibilidade ao longo de vários ciclos biocatalíticos consecutivos é o maior mérito da tecnologia de imobilização^{96,97}. Portanto, biocatalisadores enzimáticos uma vez estabilizados, são enzimas eficientemente ativas⁹³. A imobilização pretende combinar a atividade e seletividade da enzima com as características físico-químicas do suporte, resultando em máxima estabilidade e desempenho do biocatalisador (**Figura 5**)²¹. O suporte fornece proteção à molécula de enzima contra condições de reação desfavoráveis, o que permite que o biocatalisador imobilizado retenha alta estabilidade. Além disso, um suporte adequadamente projetado pode melhorar o desempenho do biocatalisador; além de fortalecer e apoiar as interações enzimas-suporte estáveis, a matriz de suporte não deve influenciar a estrutura tridimensional da enzima^{40,98}.

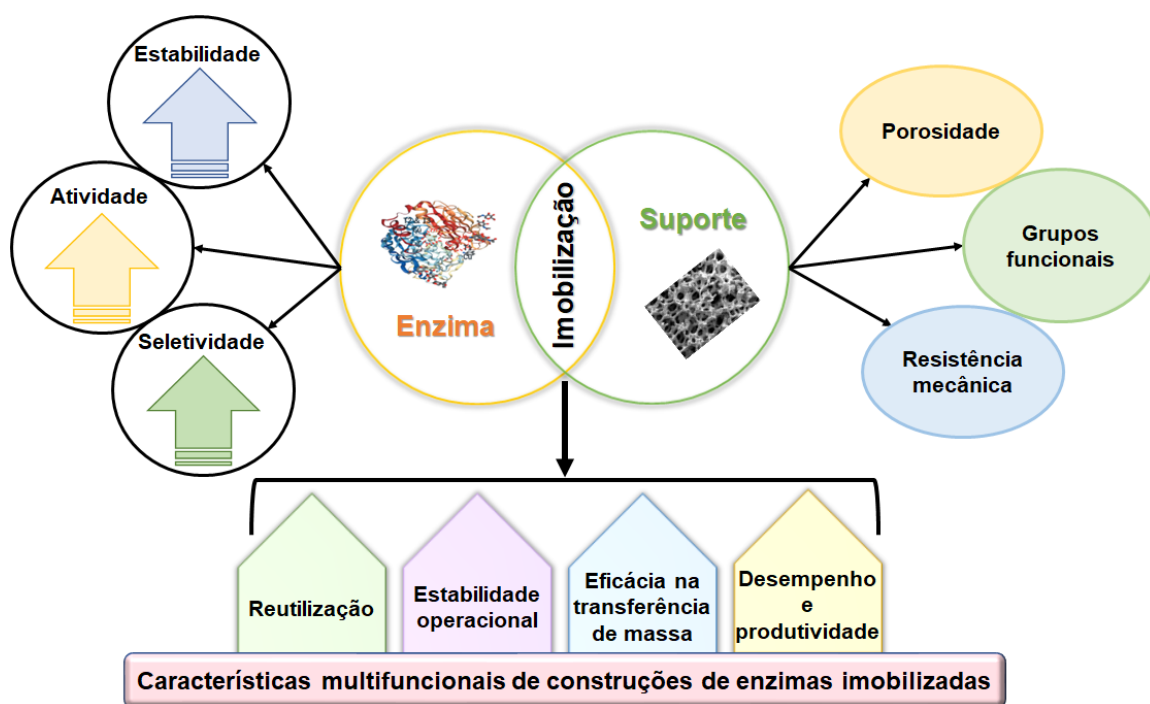


Figura 5. Principais características de imobilização de enzimas.

Fonte: adaptada de Bilal *et al.* (2020)²¹.

3.3.1 ENZIMA LACASE

Entre as diferentes enzimas existentes, a lacase tem apresentado potencial para várias aplicações, como na produção de biocombustíveis, biorremediação, indústrias de papel e celulose, têxtil, processamento de alimentos, biossensores, síntese orgânica e nanobiotecnologia^{99–101}. As lacases (benzenodiol: oxigênio oxidoredutases, EC 1.10.3.2) são enzimas que pertencem à família das azul-multicobre oxidases, que contêm átomos de cobre no seu sítio ativo, responsáveis por reações de oxidação com redução simultânea do oxigênio molecular a água. Em geral, as lacases contêm quatro átomos de cobre distribuídos em três diferentes sítios denominados: T1, T2 e T3 binuclear. Os sítios T2 e T3 binuclear formam um *cluster* de cobre trinuclear^{102–104}, conforme pode ser observado na **Figura 6**. O cobre do sítio T1 é coordenado com uma cisteína, uma metionina e duas moléculas de histidina, contribui para a cor azul intensa de lacase e é responsável pela oxidação do substrato e potencial redox da lacase; o cobre do sítio T2 é coordenado com duas histidinas

e uma molécula de água; existem três histidinas como ligantes para cada átomo de cobre do sítio T3 binuclear e uma ponte hidroxila entre o par de cobre; os átomos de cobre do sítio T2 e T3 binuclear que formam o centro trinuclear catalisam a fixação e redução do oxigênio em água^{105,106}.

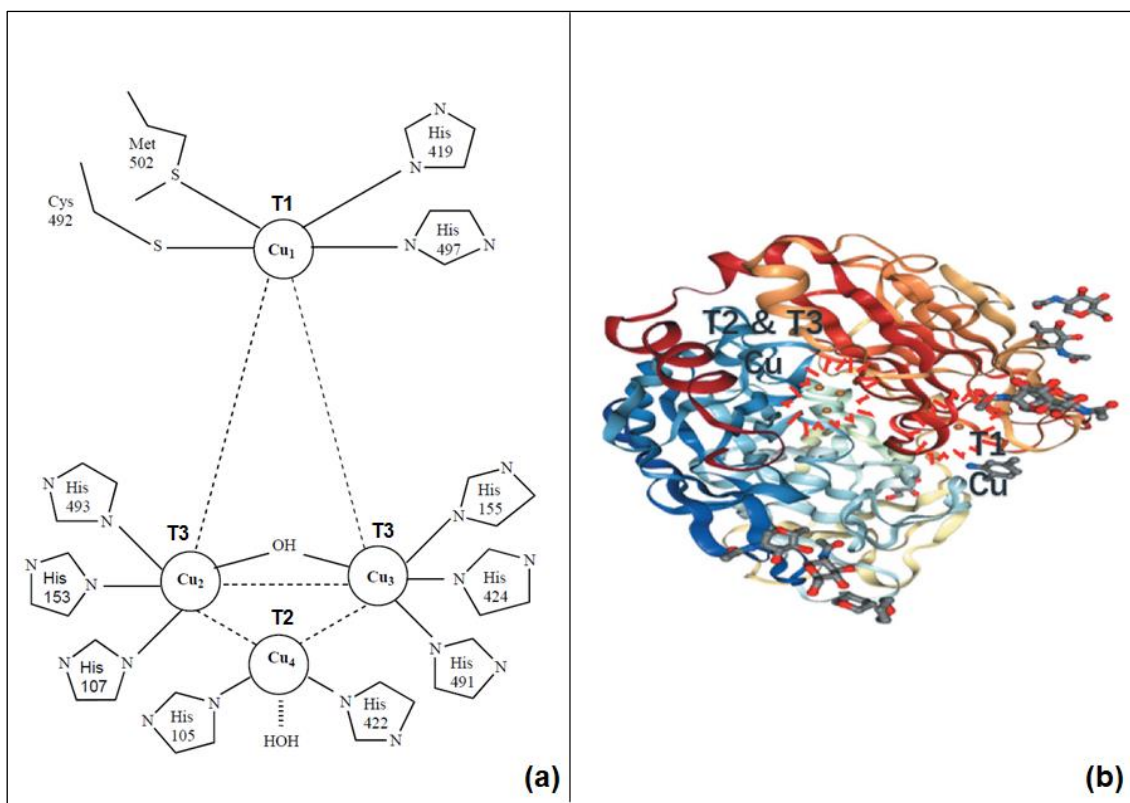


Figura 6. Representação esquemática do sítio ativo da lacase (His – Histidina; Cys – Cisteína; Met – Metionina) **(a)** e representação esquemática da estrutura em 3D da lacase **(b)**. Fonte: adaptada de Kunamneni *et al.* (2008)¹⁰³ e Ren *et al.* (2020)¹⁰⁷.

Na oxidação do substrato catalisada pelas enzimas lacase, os quatro íons de cobre no sítio ativo transferem os elétrons envolvidos na reação. O cobre do sítio T1 é reduzido com a simultânea oxidação do substrato, o elétron é então transferido pelo cobre do sítio T1 para o centro do *cluster* de cobre trinuclear T2/T3, onde o oxigênio é reduzido à água. Assim, o resultado final é a oxidação de quatro moléculas de substrato em quatro radicais e a redução de uma molécula de oxigênio em duas moléculas de água^{102–104}.

As reações catalisadas por lacases para aplicações biotecnológicas podem ser representadas por um esquema mostrado na **Figura 7**, o qual é um

dos casos mais simples em que as moléculas de substrato são oxidadas para os radicais correspondentes por interação direta com o sítio ativo da lacase¹⁰³. As lacases usam oxigênio como aceitador de elétrons para remover prótons dos grupos hidroxila fenólicos como por exemplo^{99,103}. Na **Figura 8** pode ser observada uma representação de uma conversão catalítica típica de substrato fenólico pela lacase e seu ciclo catalítico¹⁰⁴.

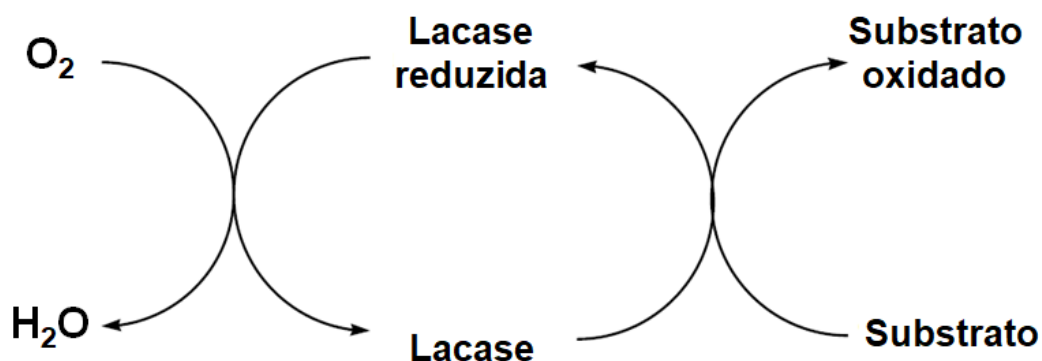


Figura 7. Esquema do mecanismo de reação catalisada pela lacase.

Fonte: adaptada de Kunamneni *et al.* (2008)¹⁰³.

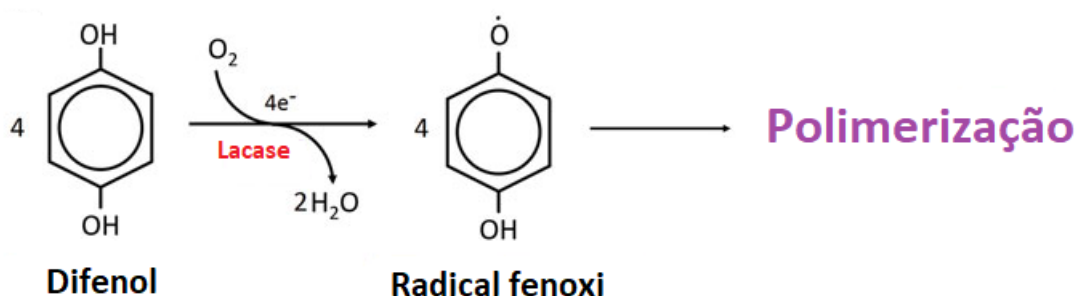


Figura 8. Representação esquemática da reação catalítica de lacase com substrato difenol para formação de radical fenoxi.

Fonte: adaptada de Ba e Kumar *et al.* (2017)¹⁰⁴.

As reações catalisadas pelas lacases também podem ocorrer na presença de mediadores, que são compostos que atuam como substratos intermediários para a lacase, cujas formas oxidadas são capazes de interagir com substâncias mais complexas, expandindo ainda mais a faixa de compostos que podem ser oxidados por enzimas lacase¹⁰³. Vários compostos tem sido

citados como mediadores de lacase, por exemplo, 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazole-6-ácido sulfônico) (ABTS), 1-hidroxibenzotriazol (HBT), N-hidroxiftalimida (HPI), ácido violúrico (VA), N-hidroxiacetanilida (HAA), 2,2',6,6'-tetrametilpiperidina-1-oxil (TMPO) e seringaldeído^{79,108}.

As lacases têm grande potencial biotecnológico devido à sua capacidade de oxidar uma ampla gama de substratos empregados em vários setores industriais¹⁰¹. Uma das principais aplicações desta enzima é na área de biorremediação, pois a lacase pode oxidar diferentes contaminantes, como compostos fenólicos, não fenólicos, aromáticos e não aromáticos. Por meio da oxidação, a lacase biotransforma os contaminantes em compostos menores ou em oligômeros de alto peso molecular com a concomitante redução de moléculas de oxigênio em água^{10,109}. A remoção de contaminantes pode ocorrer por meio de três mecanismos principais (**Figura 9**): biotransformação enzimática, sorção no suporte ou seu efeito sinérgico; estes mecanismos são simultaneamente responsáveis pela remoção de contaminantes¹¹⁰.

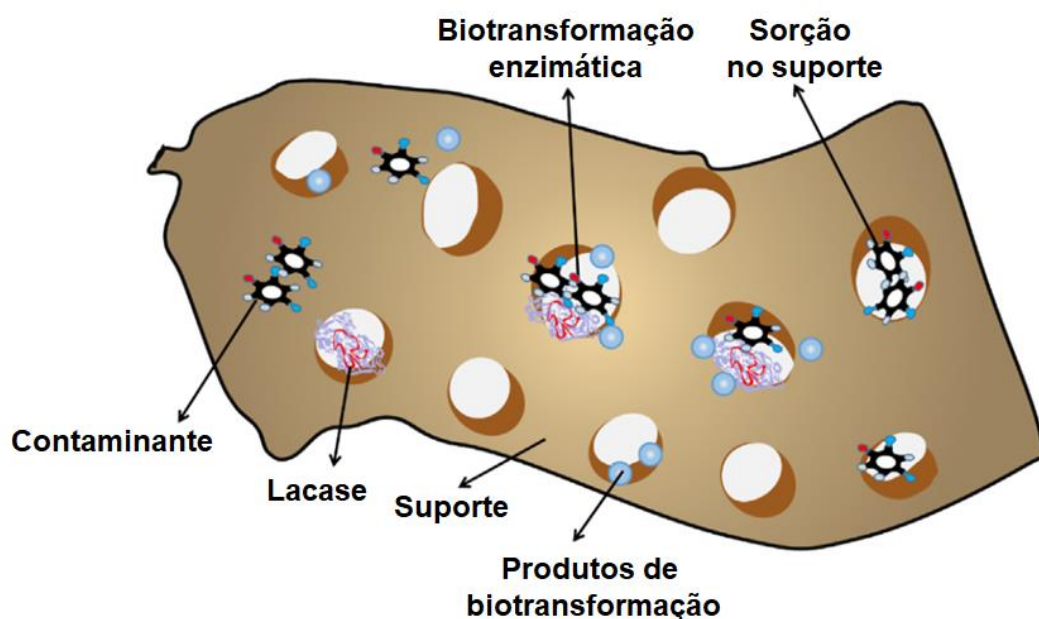


Figura 9. Representação esquemática do efeito sinérgico da sorção de suportes e biotransformação enzimática de contaminantes.

Fonte: adaptada de Zhou *et al.* (2021)¹¹⁰.

Vários relatos na literatura têm sido publicados com o uso de enzima lacase para a biorremediação de contaminantes (**Tabela 3**)^{110,111}. Em um estudo realizado por Wang *et al.* (2022)⁶⁶, a enzima lacase imobilizada foi utilizada para a biodegradação de 2,4-diclorofenol, o qual é utilizado como precursor do herbicida ácido 2,4-diclorofenoxiacético. A capacidade de remoção do 2,4-diclorofenol foi de 100%. Em outro estudo, Blair-González *et al.* (2021)¹¹² avaliaram a remoção do antibiótico oxitetraciclina em meio aquoso pela lacase imobilizada, obtendo 100% de remoção. Caraene *et al.* (2021)¹¹³ estudaram a biodegradação dos fármacos sulfametoxazol, trimetoprima, metronidazol e fenitoína pela enzima lacase. Os resultados mostraram uma biodegradação de 97% para sulfametoxazol, 44% para trimetoprima e para os fármacos metronidazol e fenitoína não houve biodegradação. Xia *et al.* (2021)¹¹⁴ avaliaram a remoção de compostos fenólicos pela lacase imobilizada, obtendo cerca de 70% de remoção em 48 horas. No estudo de Zhang *et al.* (2021)¹¹⁵, a enzima lacase imobilizada foi aplicada para a descoloração do corante azul brilhante de remazol R usado nas indústrias têxteis, a descoloração completa foi obtida em 120 min. Em outro estudo, Zhang *et al.* (2020)¹¹⁶ avaliaram a remoção do bisfenol A pela lacase imobilizada, de acordo com os resultados 100% de remoção foi obtido em 4h. Kupski *et al.* (2019)¹¹⁷ estudaram a remoção de seis pesticidas (bentazona, carbofurano, diuron, clomazona, tebuconazol e piraclostrobina) em meio aquoso pela lacase, obtendo as seguintes porcentagens de remoção: 54% para bentazona, 39% para carbofurano, 46% para diuron, 68% para clomazona, 73% para tebuconazol e 78% para piraclostrobina. No trabalho de Bayramoglu *et al.* (2019)¹¹⁸, a enzima lacase imobilizada foi aplicada na remoção do corante azul de metileno e do pesticida carbaril. Os resultados mostraram uma remoção de quase 100% para ambos os contaminantes. Alharbi *et al.* (2019)¹¹⁹ investigaram a biodegradação dos fármacos diclofenaco, trimetoprima, carbamazepina e sulfametoxazol pela lacase, obtendo 100%, 95%, 82% e 56% de biodegradação, respectivamente. Naghdi *et al.* (2018)¹²⁰, conseguiram obter uma biodegradação de 95% para o fármaco carbamazepina usando a lacase juntamente com o mediador ABTS. No trabalho de Sun *et al.* (2019)¹²¹, os pesquisadores investigaram a biotransformação e os produtos de biotransformação do antimicrobiano triclosan utilizando a enzima lacase. A identificação dos produtos de biotransformação revelou que a oxidação da

lacase gerava predominantemente dímeros, trímeros e tetrâmeros de triclosan. Os autores também revelaram que o triclosan polimerizado era menos tóxico que o composto original por meio de um ensaio com microalgas.

De acordo com os dados relatados, a biocatálise enzimática é uma grande abordagem sustentável para a biorremediação de contaminantes recalcitrantes. A enzima lacase é um excelente biocatalisador para aplicações ambientais devido às suas vantagens, incluindo alta atividade em condições ambientais e baixa necessidade de energia; ademais, seu uso na forma imobilizada confere estabilidade e capacidade de ser reutilizada, oferecendo muitas vantagens para aplicações ambientais^{109,110}.

Tabela 3. Aplicações da enzima lacase na biorremediação de contaminantes.

Método de imobilização	Suporte	Contaminante	Remoção	Referência
Adsorção	Biocarvão	2,4-diclorofenol	100%	Wang <i>et al.</i> ⁶⁶
Ligação covalente	Carvão ativado	Oxitetraciclina	100%	Blair-González <i>et al.</i> ¹¹²
-	-	Sulfametoxazol, Trimetoprima, Metronidazol, Fenitoína	97% 44% 0% 0%	Caraene <i>et al.</i> ¹¹³
Adsorção	Nanopartículas magnéticas	Fenólicos	70%	Xia <i>et al.</i> ¹¹⁴
Ligação covalente	Nanoesferas modificadas com dopamina	Azul brilhante de remazol R	100%	Zhang <i>et al.</i> ¹¹⁵
Adsorção	Carvão magnético	Bisfenol A	100%	Zhang <i>et al.</i> ¹¹⁶
-	-	Bentazona, Carbofurano, Diuron, Clomazona, Tebuconazol, Piraclostrobina	54% 39% 46% 68% 73% 78%	Kupski <i>et al.</i> ¹¹⁷
Adsorção	Microesferas	Azul de metileno e Carbaril	100%	Bayramoglu <i>et al.</i> ¹¹⁸
-	-	Diclofenaco, Trimetoprima, Carbamazepina, Sulfametoxazol	100% 95% 82% 56%	Alharbi <i>et al.</i> ¹¹⁹
-	-	Carbamazepina	95%	Naghdi <i>et al.</i> ¹²⁰

-	-	Triclosan	100%	Sun <i>et al.</i> ¹²¹
Adsorção	Membranas eletrofiadas	2,4,6-triclorofenol	95%	Xu <i>et al.</i> ¹²²
Ligação covalente	Microesferas magnéticas	Fenol	80%	Aydemir <i>et al.</i> ¹²³
Ligação covalente	Nanofibras	2,4-diclorofenol	88%	Xu <i>et al.</i> ¹²⁴
Adsorção	Sílica magnética	2,4-diclorofenol	83%	Wang <i>et al.</i> ¹²⁵
Adsorção	Esferas de sílica	2,4-dinitrofenol	90%	Dehghanifard <i>et al.</i> ¹²⁶

3.4 MÉTODOS DE IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

Imobilização significa confinar por meio de métodos químicos e/ou físicos, a enzima em uma porção do espaço, visando manter sua atividade catalítica e proporcionar a sua reutilização. Portanto, entende-se por enzima imobilizada, aquela física ou quimicamente associada a um suporte, usualmente sólido, muito pouco solúvel em água e inerte⁴⁰. O objetivo principal da imobilização é poder reutilizar a enzima, assim como também aumentar a estabilidade da mesma, como por exemplo, aumentar a termoestabilidade e resistência da enzima a condições extremas e reagentes químicos^{40,127}.

Conceitualmente, existem dois métodos básicos para imobilização enzimática, pois a conexão enzima-suporte pode ocorrer por interações físicas ou químicas. Esses dois tipos de interação envolvem vários métodos de imobilização, tais como os de acoplamento físico como o aprisionamento da enzima em matrizes poliméricas ou seu encapsulamento em membranas poliméricas e adsorção por interações hidrofóbicas, *van der Waals*, ligações de hidrogênio e iônica, enquanto o acoplamento químico pode ocorrer por ligação covalente ou reticulação (utilizando agentes de reticulação sem suporte sólido)^{6,127,128}.

3.4.1 APRISIONAMENTO

A imobilização por aprisionamento é definida como a retenção física de enzimas em uma matriz sólida porosa, usualmente um polímero orgânico ou inorgânico, sintético ou natural (**Figura 10**)^{127,128}. A enzima é primeiro suspensa na solução de monômero, e um processo de polimerização subsequente mantém a enzima presa, impedindo o contato direto com o meio ambiente^{7,127}. O aprisionamento não induz alteração estrutural da enzima, podendo aumentar a estabilidade evitando a desnaturação da enzima^{7,127,129}. No entanto, a principal limitação desta técnica é a barreira de difusão, que pode impedir o acesso de substratos à enzima, principalmente os de alto peso molecular^{7,127,129}. Além disso, a lixiviação de enzimas pode ser significativa quando o material de suporte consistir em poros grandes^{7,129}. Em um trabalho realizado por Piao *et al.* (2019)¹³⁰, a enzima lacase foi imobilizada por aprisionamento em hidrogel de polietilenoglicol (PEG) por meio de polimerização para aplicação na remoção de bisfenol A. Os resultados mostraram alta eficiência de imobilização e estabilidade da enzima em diferentes valores de pH (3–7), podendo ser reutilizada por até sete vezes. Em outro estudo, a enzima lacase foi imobilizada em alginato de cálcio e cobre pelo método de aprisionamento e aplicada na biodegradação de bisfenol A. A enzima imobilizada apresentou estabilidade de armazenamento durante 21 dias a 4°C e pode ser reutilizada por três vezes mantendo 70% de sua atividade inicial¹³¹. No estudo de Ratanapongleka *et al.* (2018)¹³², a enzima lacase foi imobilizada em alginato de bário por aprisionamento e pode ser reutilizada por até cinco vezes mantendo 70% de sua atividade inicial.

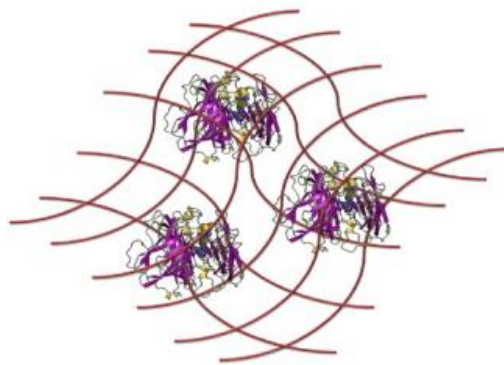


Figura 10. Esquema de imobilização de enzimas por aprisionamento.

Fonte: adaptada de Fernández-Fernández *et al.* (2013)¹²⁷.

3.4.2 ENCAPSULAMENTO

O encapsulamento é definido como o confinamento de enzimas no núcleo de esferas feitas de material semipermeável, ou seja, a imobilização de enzimas em filme de polímero semipermeável (**Figura 11**)^{107,127}. A enzima é fisicamente encapsulada no suporte de modo que as moléculas do substrato e do produto sejam capazes de passar pela superfície do suporte, desde que as moléculas do substrato e do produto sejam de tamanho apropriado¹⁰⁷. No entanto, comportamento semelhante é observado no encapsulamento de enzimas em comparação ao aprisionamento, em ambos os métodos, a enzima é protegida do meio ambiente e a barreira de difusão que pode impedir o acesso do substrato até o sítio ativo da enzima, o que representa uma limitação nesses métodos de imobilização^{127,128}. No trabalho de Zhang *et al.* (2020)¹³³, a enzima lacase foi imobilizada por encapsulamento em estruturas metal-orgânicas contendo íons de Cu^{2+} para aplicação na biodegradação de bisfenol A. Os resultados mostraram que enzima imobilizada apresentou melhor estabilidade e maior eficiência de biodegradação do bisfenol A do que a enzima livre. Em outro estudo, Yang *et al.* (2015)¹³⁴ utilizaram sílica como suporte para imobilização da enzima lacase seguida de encapsulamento em membranas de quitosana/alginate para formar microcápsulas com lacase imobilizada, as quais foram empregadas na biodegradação do 2,4-diclorofenol. A lacase imobilizada

exibiu estabilidade operacional, podendo ser reutilizada e estabilidade em alta temperatura.

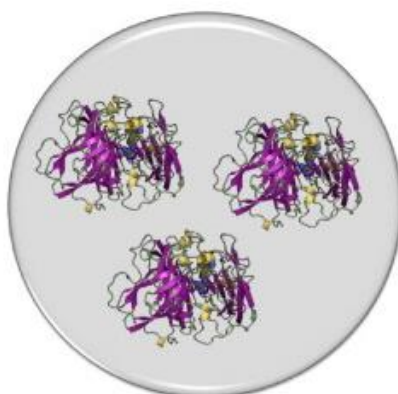


Figura 11. Esquema de imobilização de enzimas por encapsulamento.

Fonte: adaptada de Fernández-Fernández *et al.* (2013)¹²⁷.

3.4.3 ADSORÇÃO

A adsorção é um dos métodos mais simples e de baixo custo, muito empregado para imobilização de enzimas, o suporte é mantido em contato com a solução enzimática por um tempo determinado e a interação entre a enzima e o suporte pode ocorrer por forças de *van der Waals*, interações hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e troca iônica (**Figura 12**)^{6,127,128}. No entanto, a ligação é geralmente muito fraca e, por isso, é possível que ocorra a dessorção da enzima para fora do suporte durante a reação, principalmente devido a variações de temperatura, pH e sob condições de alta força iônica^{7,128}. Contudo, técnicas foram desenvolvidas a fim de reduzir a dessorção da enzima, como a modificação química da superfície do suporte, a redução do tamanho de seus poros ou a reticulação da enzima no interior dos poros¹²⁷. A imobilização por ligação iônica baseia-se em interações eletrostáticas entre moléculas de enzima com um suporte carregado. Embora as ligações iônicas sejam mais fortes do que as demais interações não covalentes, as limitações em relação a dessorção da enzima são semelhantes^{127,128}. Em um estudo realizado por Kołodziejczak-Radzimska *et al.* (2020)¹³⁵, a enzima lacase foi imobilizada por adsorção em um

suporte mesoporoso de alumina. A enzima imobilizada manteve 65% de sua atividade inicial após 30 dias de armazenamento e pode ser reutilizada por até 10 vezes. Em outro trabalho, Wang *et al.* (2020)¹³⁶ avaliaram a imobilização de lacase em nanopartículas de sílica magnéticas. Os resultados mostraram que a lacase imobilizada apresentou maior atividade em diferentes valores de pH e temperatura do que quando aplicada na forma livre. No estudo de Gou *et al.* (2020)¹³⁷, nanopartículas de magnetita modificadas com grupos amino e íons de Cu^{2+} foram avaliadas como suporte para imobilização de lacase por interação iônica. De acordo com os resultados, a lacase imobilizada pode ser reutilizada por até seis vezes mantendo 50% de sua atividade inicial. Em outro estudo, a enzima lacase foi imobilizada por adsorção em um suporte mesoporoso de bentonita obtido por tratamento alcalino e ácido da bentonita. A lacase imobilizada foi aplicada na remoção de tetraciclina obtendo 60% de remoção em 3 horas. Em relação a reutilização da enzima imobilizada, após o quinto ciclo de reutilização a lacase manteve 36,21% de sua atividade inicial. Os autores relatam que a interação por adsorção relativamente fraca entre a enzima e o suporte pode ter ocasionado a lixiviação da lacase durante as etapas de lavagem para a reutilização¹³⁸.

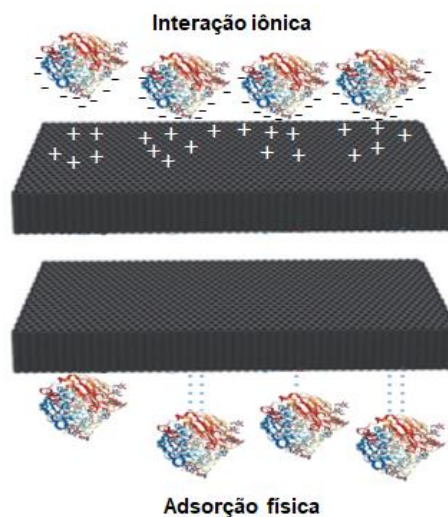


Figura 12. Esquema de imobilização de enzimas por adsorção.

Fonte: adaptada de Ren *et al.* (2020)¹⁰⁷.

3.4.4 LIGAÇÃO COVALENTE

A imobilização por ligações covalentes geralmente são mais fortes e conferem maior estabilidade à enzima. Este tipo de imobilização frequentemente se inicia com a modificação da superfície do suporte, na qual grupos funcionais são inseridos ou modificados para produzir intermediários reativos (**Figura 13**)^{7,107,127}. Portanto, a ligação covalente se dá pela reação de grupos reativos do suporte com os grupos funcionais da enzima, os quais estão presentes em cadeias laterais de aminoácidos que formam a enzima e que não são essenciais para a sua atividade catalítica^{7,61}. As reações geralmente envolvem as seguintes cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos: lisina (grupo amino), cisteína (grupo tiol) e ácidos aspártico e glutâmico (grupo carboxílico)⁶¹. A maioria das enzimas é ligada covalentemente usando seus grupos amino da lisina por causa de sua presença frequente na superfície da proteína e alta reatividade^{127,139}.

O glutaraldeído é um dos reagentes mais empregados na funcionalização de suportes e/ou como braço espaçador, devido à simplicidade dos métodos de funcionalização e obtenção de preparações enzimáticas ativas e estáveis¹⁴⁰. Nesse caso, a molécula de glutaraldeído reage com o suporte e a enzima, e estas são imobilizadas covalentemente no suporte por reação com seus grupos aminos, que reagem com os grupos aldeídos do glutaraldeído no suporte, formando ligações imina (bases de Schiff)^{139,140}. A ligação covalente previne a perda de enzima durante a reação por ser um processo de imobilização de caráter irreversível e confere maior capacidade de reutilização¹²⁸. No trabalho de Lonappan *et al.* (2018)⁹, a enzima lacase foi imobilizada covalentemente em três diferentes suportes funcionalizados com o reagente glutaraldeído. De acordo com os resultados, a lacase imobilizada nos suportes manteve cerca de 40% da sua atividade inicial após 5 ciclos de reuso. Em outro estudo, Abd El Aty *et al.* (2017)¹⁴¹ avaliaram a imobilização covalente da enzima lacase em esferas de alginato ativadas com quitosana e funcionalizadas com glutaraldeído. Os resultados mostraram que a enzima imobilizada pôde ser reutilizada por 19 vezes com perda de 68% de atividade. No trabalho de Chen *et al.* (2018)¹⁴², a enzima lacase foi imobilizada covalentemente em nanopartículas magnéticas de polidopamina funcionalizadas com dialdeído amido, como resultado a enzima

imobilizada apresentou maior estabilidade em diferentes valores de pH e temperatura em comparação com a lacase livre e pode ser reutilizada quando aplicada na biodegradação de 2,4-diclorofenol. Simón-Herrero *et al.* (2019)¹⁴³ avaliaram a imobilização da lacase por ligação covalente em aerogéis de poliimida funcionalizados com glutaraldeído. A enzima imobilizada foi aplicada na biodegradação de carbamazepina e pode ser reutilizada por até sete vezes mantendo 50% de sua atividade inicial.

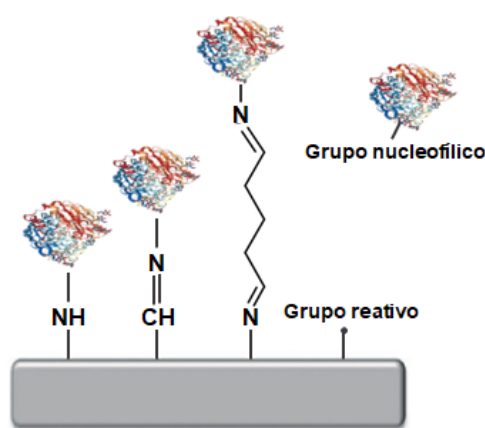


Figura 13. Esquema de imobilização de enzimas por ligação covalente.

Fonte: adaptada de Ren *et al.* (2020)¹⁰⁷.

3.4.5 RETICULAÇÃO

A imobilização de enzimas por meio de reticulação não envolve a utilização de suportes sólidos, baseando-se em ligações covalente cruzadas por meio da adição de reagentes bifuncionais ou multifuncionais, resultando assim na formação de agregados de enzimas entrecruzados (CLEA) pouco solúveis em água (**Figura 14**)^{7,127,128}. Nesta técnica, as enzimas são primeiramente precipitadas em soluções aquosas pela adição de sais ou solventes orgânicos para formar agregados e depois reticuladas com agentes reticulantes para formar CLEA¹⁴⁴. Como nesse método as enzimas atuam como seus próprios suportes sólidos, ele é chamado de técnica de auto-imobilização. No entanto, neste tipo de imobilização a estrutura da enzima fica mais suscetível à desnaturação, podendo levar a perda de atividade; sendo então geralmente

combinados outros métodos de imobilização com a reticulação para suprir essas limitações¹⁰⁷. No trabalho de Nguyen *et al.* (2017)¹⁴⁴, agregados de enzimas entrecruzados foram preparados a partir de enzimas lacase e glutaraldeído como reagente reticulante e aplicaram na biodegradação do corante azul de tripano. Como resultado, o corante pode ser completamente descolorido dentro de 270 minutos mesmo em pH 10,0, no qual a enzima livre perdeu completamente sua atividade. Em outro estudo, Matijošyte *et al.* (2010)¹⁴⁵ prepararam agregados de enzimas entrecruzados (CLEA) a partir de enzimas lacase de três fontes diferentes (*Trametes versicolor*, *Trametes villosa* e *Agaricus bisporus*) utilizando glutaraldeído como agente reticulante. Como resultado, os CLEA de lacase exibiram um aumento na estabilidade em comparação com a enzima livre.

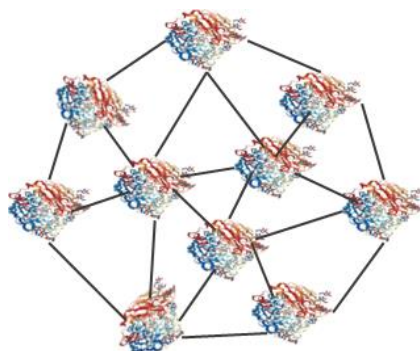


Figura 14. Esquema de imobilização de enzimas por reticulação.

Fonte: adaptada de Ren *et al.* (2020)¹⁰⁷.

Por fim, devido à grande especificidade das reações enzimáticas, não existe uma técnica de imobilização ou suporte ideal para todos os processos enzimáticos. A escolha do método de imobilização e do tipo de suporte dependerá das características peculiares da enzima e das condições de uso da enzima imobilizada. Na maioria das vezes é realizado o procedimento de imobilização da enzima em vários suportes por meio de diferentes métodos, avaliando-se a seguir a atividade do sistema imobilizado⁴⁰. O método suporte mais adequado será aquele que propiciar uma maior atividade após imobilização.

3.5 FÁRMACO ACETAMINOFENO

Os compostos farmacêuticos são uma classe dos contaminantes emergentes que têm sido amplamente detectados no ambiente aquático, pois são parcialmente removidos pelos processos convencionais de tratamento de efluentes^{146,147}. Desta forma, uma fração dos compostos farmacêuticos acaba permanecendo no efluente tratado, o qual é liberado para corpos de água receptores contaminando as águas superficiais e subterrâneas, solos e sedimentos^{147,148}. Esses contaminantes são biologicamente ativos e sua persistência no meio ambiente é potencialmente prejudicial a organismos aquáticos e possivelmente à saúde humana^{146,149}.

O fármaco acetaminofeno (ACT), conhecido como paracetamol é atualmente um dos fármacos analgésicos e antipiréticos mais amplamente utilizado, disponível sem receita médica em todo o mundo. Foi relatado que 58-68% do ACT é excretado do corpo humano durante o uso terapêutico^{150,151}. Portanto, devido ao seu uso extensivo, o ACT é um dos compostos farmacêuticos mais frequentemente encontrado em várias matrizes ambientais, como águas superficiais e subterrâneas, sedimentos, solo e possivelmente na água potável^{16,152}. O acetaminofeno foi detectado em águas residuais de vários países da Ásia, América e Europa em uma faixa de concentração entre 0,1–300 $\mu\text{g L}^{-1}$ ¹⁶. Também foi detectado em estações de tratamento de efluentes hospitalares nas concentrações entre 50–400 $\mu\text{g L}^{-1}$ ¹⁵³. Embora a concentração de ACT detectada em ambientes aquáticos variem de ng L^{-1} a $\mu\text{g L}^{-1}$, a liberação contínua desses baixos níveis pode ter um efeito negativo sobre os organismos nos ambientes aquáticos receptores. David *et al.* (2009)¹⁵⁴ investigaram os efeitos do acetaminofeno no desenvolvimento embrionário do peixe-zebra *Danio rerio*. Os resultados do estudo revelaram que o acetaminofeno interferiu no desenvolvimento embrionário normal, crescimento, comportamento e sobrevivência das larvas de *Danio rerio*.

Entre os diferentes métodos que tem sido estudado para a remoção de fármacos, os tratamentos biológicos como a biotransformação/biodegradação utilizando enzimas do tipo lacase, tem sido investigada como uma alternativa para a remoção de fármacos como o acetaminofeno da água^{155–158}. Estudos

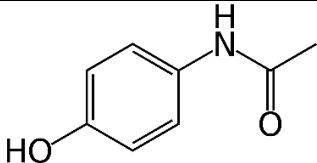
demonstram que a biotransformação do acetaminofeno assistida pela lacase, envolve a oxidação das moléculas de acetaminofeno em radicais livres, os quais subsequentemente sofrem polimerização formando dímeros, trímeros e tetrâmeros de acetaminofeno^{155,159,160}. Esses produtos de degradação formados são biologicamente inativos e mais facilmente removíveis da água^{159,160}. A biocatálise enzimática é uma grande abordagem sustentável para a degradação de contaminantes orgânicos persistentes devido às suas vantagens, incluindo alta atividade em condições ambientais, pouca geração de subprodutos tóxicos e baixa necessidade de energia¹⁵⁵.

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1 MATERIAIS E REAGENTES

O caroço de abacate utilizado neste trabalho foi obtido a partir de resíduos domésticos. Para a etapa de ativação do biocarvão de caroço de abacate foi utilizado cloreto de zinco (97%, Anidrol), ácido clorídrico (P.A., Anidrol) e ácido cítrico anidro (Synth). O glutaraldeído (solução 25% em água, Vetec) foi utilizado para a etapa de funcionalização do biocarvão. Para os ensaios de imobilização, foi utilizada a enzima lacase de *Trametes versicolor* ($\geq 0,5$ U mg^{-1} ; EC 1.10.3.2) adquirida da Sigma-Aldrich. As soluções tampão foram preparadas com ácido acético (Vetec), acetato de sódio tri-hidratado (Neon) e fosfato dissódico (Nuclear). O reagente 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazole-6-ácido sulfônico) (ABTS), usado como substrato na medida da atividade da lacase, foi adquirido da Sigma-Aldrich. O padrão analítico do acetaminofeno (ACT, 99%) foi adquirido da Sigma-Aldrich e suas propriedades físico-químicas estão listadas na **Tabela 4**. Inicialmente, uma solução estoque de ACT foi preparada em álcool metílico grau HPLC (Tedia) e armazenada em congelador. A partir desta solução foram preparadas as soluções de trabalho empregando água ultrapura para as diluições necessárias. O grau de álcool metílico das soluções de trabalho foi mantido a 3% (v/v) para evitar efeitos do solvente. Para as análises de remoção do acetaminofeno foi utilizado acetonitrila grau HPLC (Panreac). A água ultrapura usada neste estudo foi obtida usando um sistema Milli-Q da Millipore.

Tabela 4. Propriedades físico-químicas do fármaco acetaminofeno^{161,162}.

Estrutura molecular	Massa molar (g mol^{-1})	Solubilidade em água em 28°C (g L^{-1})	log K_{ow}	pK _a
	151,16	19	1,1	9,5

4.2 PREPARO DOS BIOCARVÕES DE CAROÇO DE ABACATE

4.2.1 BIOCARVÃO DE CAROÇO DE ABACATE ATIVADO COM $ZnCl_2$

O preparo do biocarvão de caroço de abacate ativado com cloreto de zinco (BCA-Zn) foi realizado de acordo com o método prescrito por Leite *et al.* (2018)⁸⁴ e Thue *et al.* (2017)¹⁶³. Esse processo consistiu em três principais etapas: impregnação do metal na biomassa; pirólise da biomassa e lixiviação do metal com ácido clorídrico (**Figura 15**). Primeiramente, 100 g de biomassa de caroço de abacate seca e moída com diâmetro $<250 \mu m$ foi misturada com 100 g de cloreto de zinco e 30 mL de água, sob aquecimento ($\sim 80^\circ C$), até a formação de uma pasta homogênea para permitir a penetração total e reação completa entre íons do metal e o material lignocelulósico. Após, a pasta obtida foi colocada em um reator de tubo de quartzo dentro de um forno de aquecimento convencional (Sanchis, Porto Alegre, Brasil). A pirólise foi realizada aquecendo a amostra até $500^\circ C$ a uma taxa de $10^\circ C \text{ min}^{-1}$, e a temperatura final foi mantida por 30 min sob fluxo de N_2 (150 mL min^{-1}). Em seguida, o sistema foi resfriado, também sob atmosfera de N_2 , e o material pirolisado foi lixiviado com uma solução de ácido clorídrico 6 mol L^{-1} sob refluxo a $80^\circ C$ durante 24h. A mistura foi filtrada e o biocarvão lavado abundantemente com água deionizada até pH final 7. Por fim, o biocarvão foi seco em estufa a $70^\circ C$ por 24h, peneirado para obter um tamanho de partícula menor que $63 \mu m$.

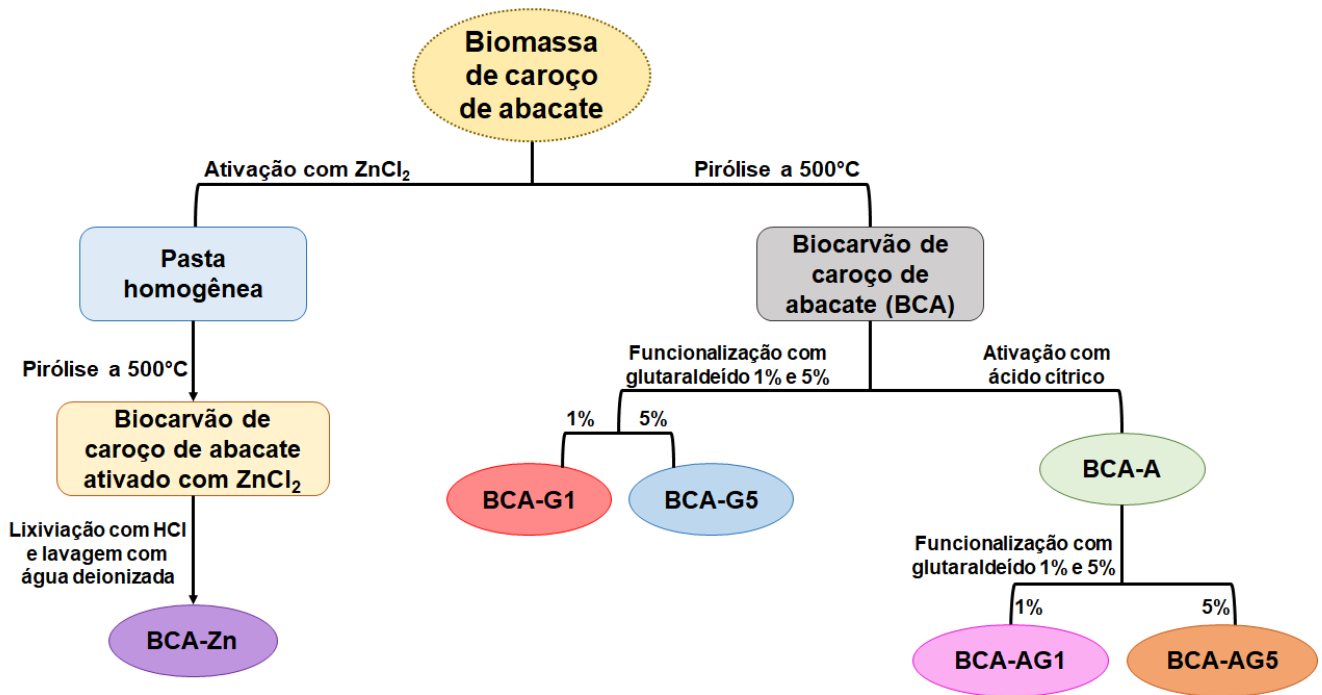


Figura 15. Fluxograma esquemático do processo de preparação dos diferentes biocarvões de caroço de abacate.

4.2.2 BIOCARVÃO DE CAROÇO DE ABACATE

Um segundo biocarvão foi obtido por meio da pirólise direta da biomassa de caroço de abacate (**Figura 15**) e as condições de pirólise empregadas foram previamente otimizadas por Leite *et al.* (2018)⁸⁴. Para a preparação do biocarvão de caroço de abacate (BCA), 100 g de biomassa lavada com água ultrapura e com diâmetro <250 μm foram colocadas em um reator de tubo de quartzo dentro de um forno de aquecimento convencional (Sanchis, Porto Alegre, Brasil). A pirólise foi realizada aquecendo a amostra até 500°C a uma taxa de 10°C min^{-1} , e a temperatura final foi mantida por 30 min sob fluxo de N_2 (150 mL min^{-1}). Em seguida, o sistema foi resfriado, também sob atmosfera de N_2 , obtendo o biocarvão de caroço de abacate que foi nomeado como BCA. Este material foi peneirado para obter um tamanho de partícula menor que 63 μm .

O BCA preparado foi tratado com ácido cítrico para remover impurezas presentes em sua superfície e poros, e para gerar grupos funcionais oxigenados em sua superfície^{5,164}. Para isso, uma massa de 2 g do material foi colocada em

contato com 50 mL de ácido cítrico 2 mol L⁻¹ sob agitação a 80 rpm durante 24 h^{9,164}. Após, o biocarvão foi lavado com água ultrapura até atingir pH~7. O biocarvão de caroço de abacate ativado com ácido foi seco em estufa a 70°C por 24 h e nomeado como BCA-A.

Outro tratamento foi realizado nos materiais BCA e BCA-A empregando o reagente glutaraldeído, o qual apresenta em sua estrutura molecular o grupo funcional aldeído que tem a função de formar ligação covalente com o grupo funcional amino da enzima lacase. Assim, 50 mg de BCA e BCA-A foram colocados individualmente em contato com 10 mL de glutaraldeído 1% e 5% (v/v), por 3 h a 80 rpm⁹. Em seguida, a fase líquida foi removida e os materiais foram lavados com aproximadamente 100 mL de água ultrapura para remover o excesso de glutaraldeído e secos a 70°C por 24 h. Os materiais tratados com glutaraldeído a 1% foram nomeados como BCA-G1 e BCA-AG1, enquanto os materiais tratados com glutaraldeído a 5% foram nomeados como BCA-G5 e BCA-AG5.

4.3 CARACTERIZAÇÃO DOS BIOCÁRVÕES PREPARADOS

A morfologia da superfície dos biocarvões foi analisada por microscopia eletrônica de varredura (SEM) utilizando um microscópio JEOL JSM-6060 (Tokyo, Japão), operando em 15 kV. Todas as amostras foram previamente recobertas com uma fina camada de ouro por 10 min antes da análise. Os grupos funcionais presentes foram caracterizados por espectroscopia na região do infravermelho com transformada de *Fourier* em modo de reflectância total atenuada (ATR-FTIR), empregando um espectrofotômetro modelo Alpha P (Bruker). A área de superfície específica dos materiais foi obtida pelo método de *Brunauer-Emmett-Teller* (BET) usando um analisador de superfície Nova 1000 modelo TriStar II 3020 (Norcross, EUA). Anteriormente a análise, as amostras foram desgaseificadas por 12 h a 150°C sob vácuo.

A determinação do pH em que a superfície do material é eletricamente neutra (pH no ponto de carga zero (pH_{pcz})) foi realizada pela adição de 20 mL de solução de NaNO₃ 0,10 mol L⁻¹ a 50 mg de amostra. Os valores de pH foram

ajustados entre 2,0 e 10,0 por adição de solução de NaOH ou HCl 0,10 mol L⁻¹. As suspensões foram agitadas durante 24 h a 25°C e 150 rpm. O pH foi determinado antes (pH inicial (pH_i)) e após o tempo de contato (pH final (pH_f)) de 24 h. O valor de pH_{pcz} é o ponto em que a curva de ΔpH (pH_f - pH_i) *versus* pH_i cruza a linha da abscissa y em zero^{165,166}.

4.4 IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA LACASE

A imobilização da lacase de *Trametes versicolor* foi realizada em triplicata em todos os biocarvões preparados (BCA-Zn, BCA, BCA-G1, BCA-G5, BCA-A, BCA-AG1 e BCA-AG5) para avaliar qualquer melhora na imobilização da enzima devido aos tratamentos realizados na superfície dos materiais. Uma massa de 10 mg de cada biocarvão foi adicionada em tubo falcon de 15 mL e suspensa em 5 mL de tampão acetato de sódio 0,2 M (pH 5,0) contendo lacase (1,5 U mL⁻¹). A mistura foi incubada por 24 h a 25°C e 50 rpm em agitador orbital (Cientec, Brasil). Posteriormente, a amostra foi centrifugada e, em seguida, a fase líquida foi removida e o sólido foi lavado com 5 mL de tampão (pH 5,0), para que a enzima não ligada fosse drenada para fora do sistema. Logo em seguida, a atividade da lacase foi determinada na fase líquida, no tampão de lavagem e no suporte com a enzima. Para todos os experimentos foram realizados como branco o ensaio sem a enzima lacase. O suporte que permitiu a melhor imobilização da lacase foi selecionado para estudos posteriores de otimização do pH de imobilização.

O estudo do pH ótimo para a imobilização da enzima lacase foi realizado usando valores de pH entre 2,0 e 7,0 usando tampão ácido cítrico-Na₂HPO₄ 0,3 M. Para isso, uma massa de 10 mg de biocarvão foi misturada com 5 mL do tampão ácido cítrico-Na₂HPO₄ contendo a enzima lacase (1,5 U mL⁻¹) em diferentes valores de pH e incubados por 24h a 25°C e 50 rpm. Após, as amostras foram centrifugadas, a fase líquida foi removida para fora do frasco e o sólido foi lavado com 5 mL do tampão no pH da imobilização. Finalmente, as atividades da lacase foram determinadas na fase líquida, no tampão de lavagem e no suporte. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

4.5 ENSAIO DE ATIVIDADE DA LACASE

A atividade da lacase foi determinada monitorando a oxidação do ácido 2,2-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS) por 10 min a 25°C; o ABTS é prontamente oxidado pela lacase para o radical catiônico ABTS⁺, e a concentração do radical catiônico de coloração verde-azul pode ser correlacionada com a atividade da enzima (**Figura 16**)¹⁰⁶. Logo após o processo de imobilização da enzima o ensaio de atividade foi realizado, para iniciar a reação, 10 µL da solução enzimática ou 10 mg do suporte com a enzima imobilizada foi misturado com 150 µL de ABTS (40 mM) e tampão de acetato de sódio (0,2 M, pH 5,0) para completar um volume final de 3000 µL. Posteriormente, a atividade da enzima livre e imobilizada foi monitorada por um aumento na absorvância no comprimento de onda de 420 nm, utilizando um espectrofotômetro UV-Visível Cary 50 (Varian, EUA). A medida da absorvância da atividade da enzima imobilizada foi realizada na solução após a sedimentação do suporte por centrifugação. Uma unidade de atividade da lacase foi definida como a quantidade de enzima necessária para oxidar um µmol de ABTS por minuto, nas condições do ensaio. A atividade da enzima livre e imobilizada foi calculada de acordo com as seguintes equações^{8,167}:

$$\textit{Atividade da enzima livre (U mL}^{-1}\text{)} = \frac{\textit{Abs} \times \textit{VR} \times \textit{FD}}{\varepsilon \times L \times t \times \textit{VE}} \quad (1)$$

$$\textit{Atividade da enzima imobilizada (U g}^{-1}\text{)} = \frac{\textit{Abs} \times \textit{VR} \times \textit{FD}}{\varepsilon \times L \times t \times m_{\textit{suporte}}} \quad (2)$$

onde, *Abs* representa a absorvância do ABTS⁺, *VR* volume da reação (mL), *FD* fator de diluição, ε coeficiente de extinção molar do ABTS⁺ (36 mL µmol⁻¹ cm⁻¹), *L* distância que a luz atravessa a amostra (cm), *t* tempo de reação (min), *VE* volume de enzima (mL), e *m_{suporte}* massa do material em que a enzima foi imobilizada (g).

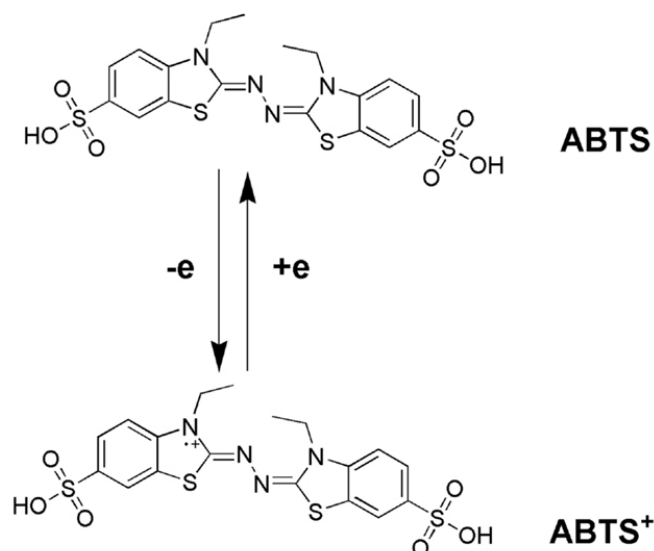


Figura 16. Representação da oxidação do ABTS na presença da enzima lacase. Fonte: adaptada de Christopher *et al.* (2014)¹⁰⁶.

A eficácia da imobilização foi verificada em termos de porcentagem de imobilização, eficiência de imobilização e unidade de enzima por grama do suporte (U g^{-1}). A porcentagem de imobilização (PI) foi calculada de acordo com a equação 3⁸, onde, *atividade inicial* representa a atividade enzimática inicialmente adicionada no processo de imobilização e a *atividade residual* representa as atividades enzimáticas residuais que permaneceram na fase líquida e tampão de lavagem após a imobilização. A eficiência de imobilização (EI) que corresponde à porcentagem de enzima imobilizada no suporte na forma ativa foi calculada conforme a equação 4¹⁶⁸.

$$PI (\%) = \frac{\textit{atividade inicial} - \textit{atividade residual}}{\textit{atividade inicial}} \times 100 \quad (3)$$

$$EI (\%) = \frac{\textit{atividade da enzima medida no suporte}}{\textit{atividade inicial} - \textit{atividade residual}} \times 100 \quad (4)$$

4.6 SORÇÃO E BIOTRANSFORMAÇÃO DO ACETAMINOFENO

Primeiramente, experimentos de sorção foram realizados utilizando o suporte sem a enzima lacase imobilizada, para avaliar qualquer contribuição do

material na remoção do acetaminofeno (ACT). Para isso, em tubos falcon de 15 mL, 10 mg do biocarvão sem a enzima foi incubado com 5 mL de ACT 30 mg L⁻¹ por 24h a 25°C e 80 rpm em um agitador orbital; após as amostras foram centrifugadas e a concentração do ACT na fase líquida foi determinada. Para os testes de sorção e biotransformação do acetaminofeno (ACT) o suporte que permitiu a melhor imobilização da lacase foi selecionado. Experimentos usando a lacase livre para a biotransformação do ACT também foram realizados; neste ensaio, a quantidade de enzima utilizada foi a mesma obtida por grama do suporte que apresentou a melhor imobilização. Estes dois últimos experimentos foram realizados em tubos falcon de 15 mL, 10 mg do biocarvão com a enzima ou a lacase livre foram encubados com 5 mL de solução de ACT 30 mg L⁻¹ por 24 h a 25°C e 80 rpm em um agitador orbital. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas e a concentração do ACT na fase líquida foi determinada. Para todos os experimentos foram realizados como branco o ensaio sem o ACT, somente com o suporte com e sem a enzima imobilizada ou a enzima livre, e como controle positivo os ensaios contendo somente o ACT (30 mg L⁻¹) sem o suporte ou a enzima livre. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

A determinação da concentração de ACT foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência Shimadzu (Kyoto, Japão) modelo LC-20AD Prominence equipada com detector de arranjo de diodos (DAD) com faixa de varredura de 190-800 nm. O fluxo da fase móvel (ACN:H₂O, 20:80, v/v, acidificada com ácido fórmico 0,5%) foi mantido em 1 mL min⁻¹ e a detecção foi realizada em 245 nm. Uma coluna C18 Inertsil ODS-3 (GL Sciences) (250 mm x 4,6 mm, tamanho de partícula de 5 µm) foi usada para as análises. A temperatura da coluna de separação cromatográfica foi mantida a 25°C e o volume de injeção utilizado foi de 10 µL, com tempo de análise de 7 min¹⁶⁹. Todas as soluções foram previamente filtradas em membrana de PTFE de 0,22 µm (Allcrom). Duas curvas de calibração foram realizadas para a determinação da concentração de ACT, uma de nível inferior de 0,05-1,5 mg L⁻¹ e outra de nível superior de 1,5-50 mg L⁻¹ (**Figura 17**). Os limites de detecção de 0,015 mg L⁻¹ e quantificação de 0,05 mg L⁻¹ foram calculados da seguinte forma $\frac{3 \times DP}{CA}$ e $\frac{10 \times DP}{CA}$, respectivamente, onde *DP* representa o desvio padrão do branco e *CA* coeficiente angular da reta¹⁷⁰.

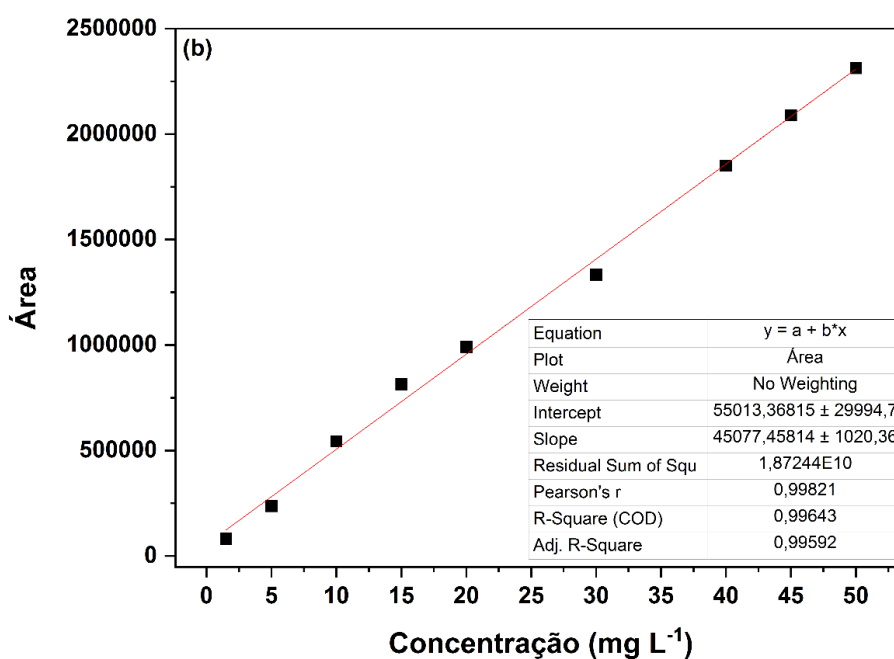
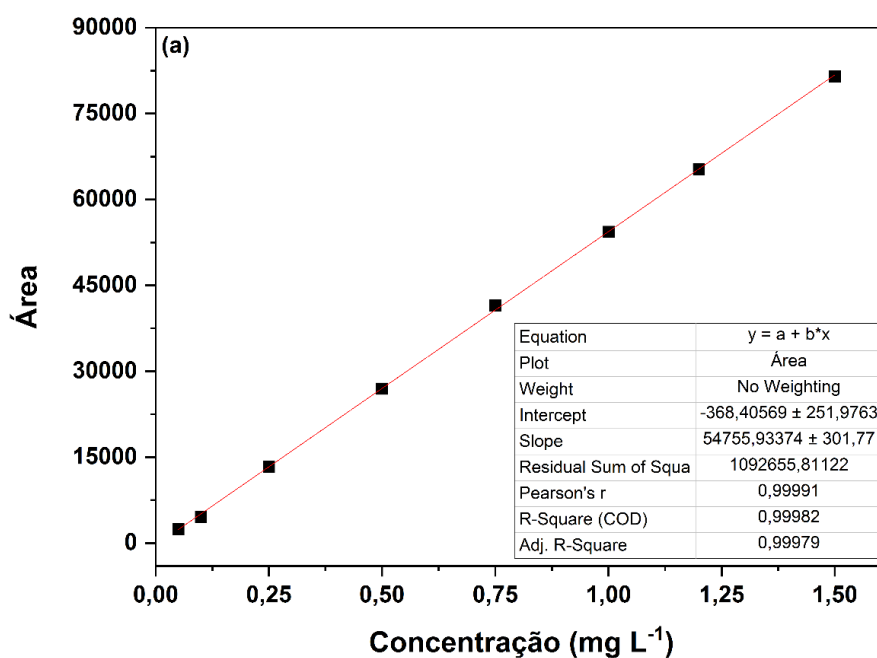


Figura 17. Curva de calibração do acetaminofeno pela técnica de HPLC: faixa de concentração de 0,05–1,5 mg L⁻¹ **(a)** e 1,5–50 mg L⁻¹ **(b)**.

4.7 REUTILIZAÇÃO E ESTABILIDADE DE ARMAZENAMENTO DA LACASE IMOBILIZADA

A reutilização da lacase imobilizada foi avaliada nos processos de sorção e biotransformação do ACT. Logo após o processo de imobilização da lacase em 10 mg de biocarvão, o material com a enzima imobilizada foi misturado com 5 mL de solução de ACT (30 mg L^{-1}). A mistura foi mantida sob agitação orbital a 80 rpm por 24 h e a 25°C . Após, a amostra foi centrifugada e a concentração do ACT na fase líquida foi determinada. Em seguida, o suporte foi lavado duas vezes com 5 mL de água ultrapura para evitar qualquer resíduo do substrato ACT. Na sequência, um novo meio reacional (solução de ACT 30 mg L^{-1}) foi introduzido no tubo contendo o suporte com a enzima imobilizada e a atividade da lacase foi medida. Este processo foi repetido por sete vezes para determinar a estabilidade operacional do biocatalisador.

Para avaliar a estabilidade de armazenamento, a lacase imobilizada em 10 mg de biocarvão foi estocada levemente úmida e em recipiente fechado a temperatura ambiente (entre 25°C e 27°C) e sob refrigeração (4°C) por até 30 dias. A cada 5 dias, uma amostra da enzima estocada era recolhida e aplicada nos processos de sorção e biotransformação do ACT. Todos os experimentos de reutilização e estabilidade de armazenamento foram realizados em triplicata.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 IMOBILIZAÇÃO DA LACASE NOS BIOCÁRVÕES

Neste trabalho, a enzima lacase foi imobilizada no biocárvão de caroço de abacate (BCA) por meio de diferentes estratégias. Previamente aos experimentos de imobilização, foram realizados diferentes tratamentos no BCA, a fim de obter um suporte que permitisse uma imobilização eficiente, ou seja, uma maior unidade de enzima imobilizada ativa por grama do suporte ($U\ g^{-1}$). Na primeira imobilização foi utilizado os materiais BCA-Zn e BCA, individualmente, para avaliar a imobilização por adsorção física. Na segunda, foi utilizado o material BCA funcionalizado com glutaraldeído a 1% (BCA-G1) e 5% (BCA-G5) para avaliar qualquer melhora na imobilização devido a presença de glutaraldeído, possibilitando a interação enzima-suporte por ligação covalente. Na terceira estratégia, foi utilizado o material BCA ativado com ácido cítrico (BCA-A), para investigar se as mudanças na superfície do suporte como aumento da área superficial e formação de grupos funcionais oxigenados poderiam vir a melhorar a imobilização. E por fim, na quarta imobilização foi utilizado o material ativado com ácido cítrico e funcionalizado com glutaraldeído 1% (BCA-AG1) e 5% (BCA-AG5) para estudar a imobilização por ligação covalente.

5.1.1 OTIMIZAÇÃO DO SUPORTE DE IMOBILIZAÇÃO

Para selecionar o melhor suporte, os ensaios de imobilização da enzima lacase foram realizados em todos os biocárvões preparados (BCA-Zn, BCA, BCA-G1, BCA-G5, BCA-A, BCA-AG1, BCA-AG5). Os resultados de porcentagem de imobilização (**Figura 18a**) e eficiência de imobilização (**Figura 18b**) para o suporte BCA-Zn foram iguais a zero, isto quer dizer que toda a enzima inicialmente adicionada no processo de imobilização ficou na fase líquida

e no tampão de lavagem após a imobilização. Portanto, este resultado pode estar relacionado com a adsorção e dessorção da enzima da superfície do material durante o processo de imobilização. Em relação ao resultado de unidade de atividade da lacase por grama do suporte (**Figura 18c**) foi obtido $0,2 \text{ U g}^{-1}$ para o BCA-Zn, este resultado pode estar relacionado com uma pequena fração da lacase que ficou imobilizada na superfície deste material. No entanto, devido aos resultados de imobilização obtidos para o material BCA-Zn, este suporte não foi utilizado para os demais estudos realizados neste trabalho.

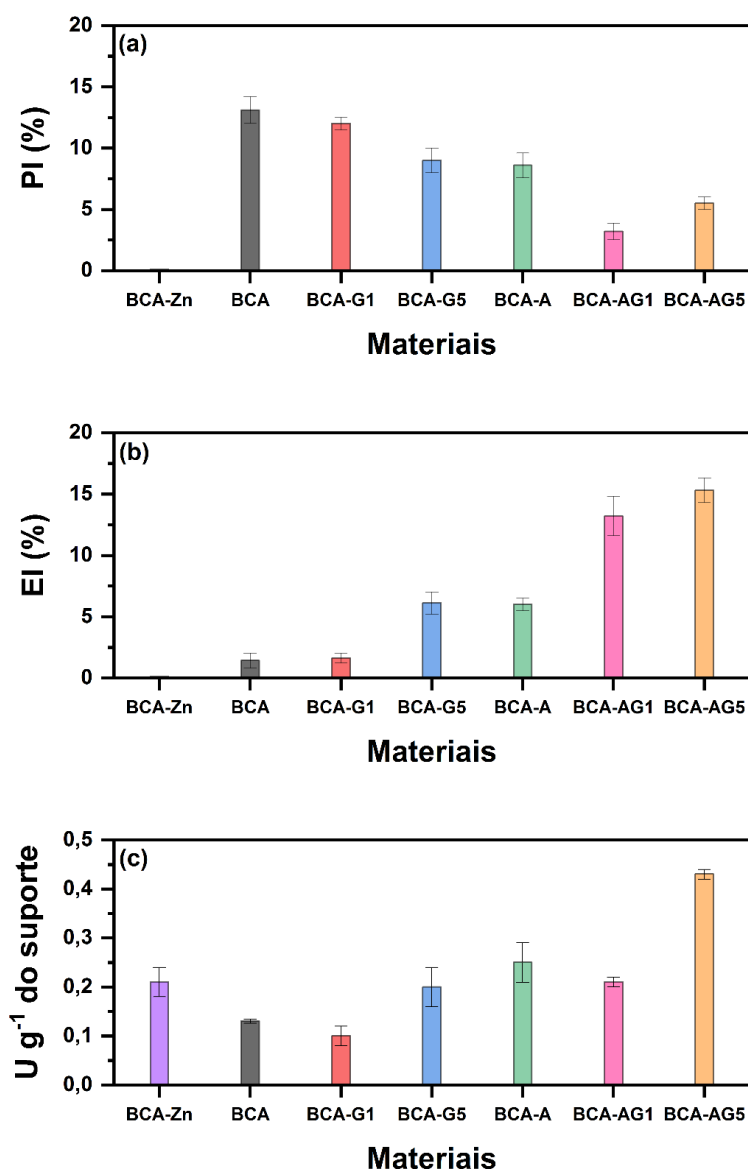


Figura 18. Resultados da imobilização da enzima lacase nos BCA. Porcentagem de imobilização (PI) **(a)**; eficiência de imobilização (EI) **(b)**; e unidade de enzima ativa por grama do suporte (U g^{-1}) **(c)**.

Em relação aos resultados obtidos para os materiais sem tratamento (BCA) e funcionalizados com glutaraldeído 1% e 5% (BCA-G1 e BCA-G5) observa-se pouca diferença nas porcentagens de imobilização (13%, 11,7% e 9%, respectivamente), sendo a maior porcentagem obtida para o material BCA. No grupo dos materiais tratados com ácido cítrico (BCA-A) e funcionalizados com glutaraldeído 1% e 5% (BCA-AG1 e BCA-AG5), o material BCA-A apresentou a maior porcentagem de imobilização. A razão para a maior porcentagem de enzima imobilizada nos materiais sem glutaraldeído (BCA e BCA-A) pode estar relacionada com a adsorção de uma enzima em cima da outra no suporte durante o processo de imobilização; conseqüentemente, mais enzimas são imobilizadas, no entanto, a forma não controlada de imobilização por adsorção pode gerar impedimento estérico entre as moléculas de enzima e menos ficam com o sítio ativo livre para atuação, ocasionando uma menor atividade enzimática após a imobilização no suporte, como pode ser observado nos resultados de eficiência de imobilização (**Figura 18b**) e unidade de enzima ativa por grama do suporte (**Figura 18c**).

A maior eficiência de imobilização que corresponde a porcentagem de enzima imobilizada no suporte na forma ativa, foi obtida quando os materiais BCA e BCA-A foram funcionalizados com glutaraldeído na concentração de 5% (BCA-G5 e BCA-AG5) (**Figura 18b**). Este resultado pode estar relacionado com a estratégia de imobilização por ligação covalente; nesta estratégia, a molécula de glutaraldeído reage com o suporte e a enzima, e estas são imobilizadas covalentemente no suporte por reação com seus grupos aminos, que se ligam aos grupos aldeídos do glutaraldeído no suporte, formando ligações imina (bases de Schiff)^{140,171}. Ademais, é possível observar que a maior eficiência de imobilização (**Figura 18b**) e maior unidade de enzima ativa por grama do suporte (**Figura 18c**) foram obtidas para o material BCA-AG5 em comparação com o BCA-G5; isto está relacionado com a maior interação das moléculas de glutaraldeído com a superfície do biocarvão que foi ativada com ácido cítrico, conseqüentemente, mais enzimas interagiram com a superfície desse material (BCA-AG5). A **Figura 19** mostra uma representação esquemática das possíveis interações da molécula de glutaraldeído com a superfície do biocarvão sem e com tratamento ácido, e na sequência, a interação com o grupo amino da lacase formando uma ligação imina. Os grupos funcionais envolvidos no processo de

imobilização covalente ajudam a reter a conformação ativa e a posição da enzima¹⁷².

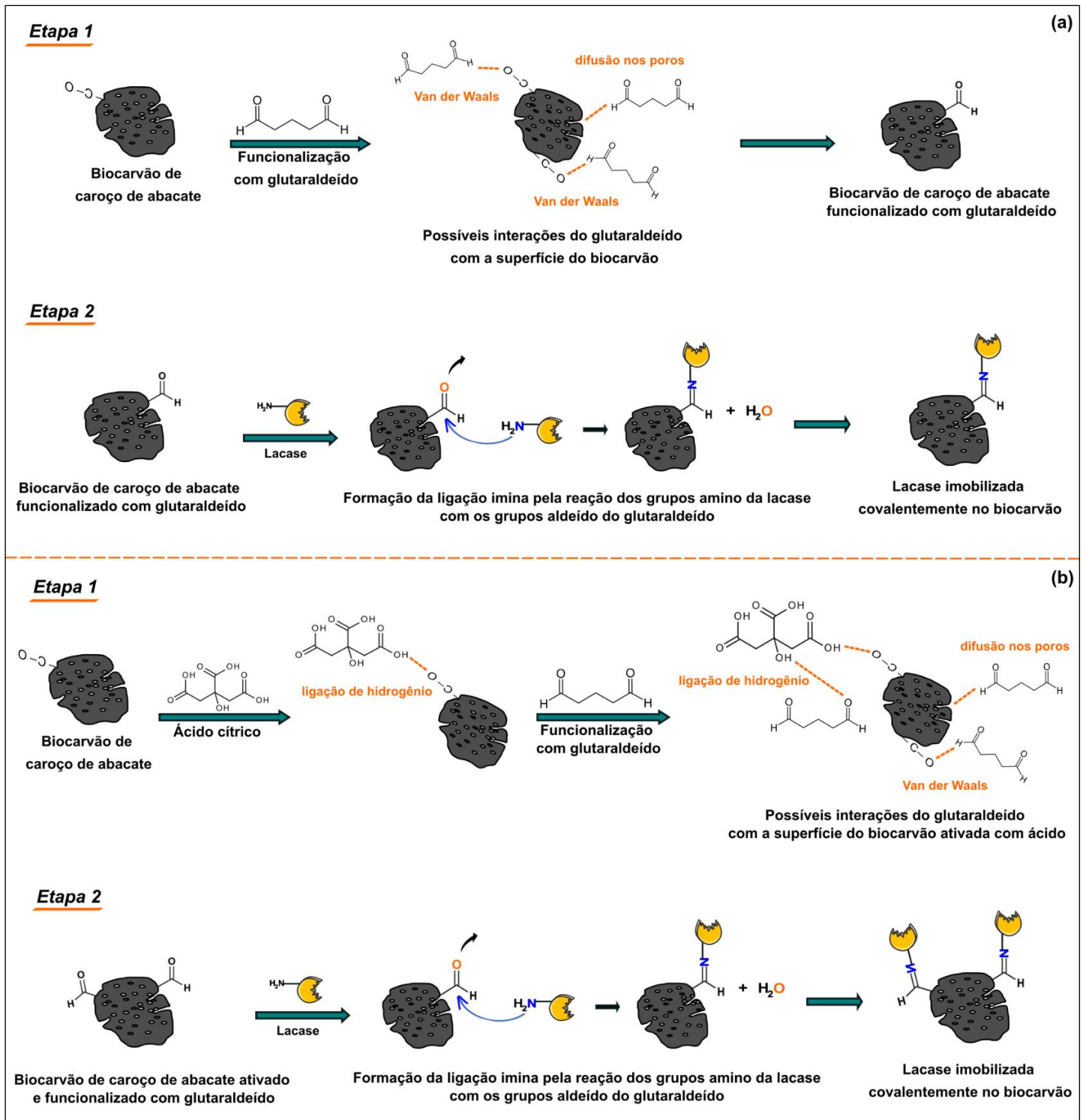


Figura 19. Representação esquemática: funcionalização do biocarvão com glutaraldeído (etapa 1) e imobilização da lacase por ligação covalente (etapa 2) **(a)**; tratamento ácido e funcionalização com glutaraldeído do biocarvão (etapa 1) e imobilização da lacase por ligação covalente (etapa 2) **(b)**.

Ademais, entre os biocarvões não tratados com ácido (**Figura 18c**, BCA, BCA-G1, BCA-G5), não foi observado um aumento na quantidade de enzima imobilizada ativa quando o suporte BCA-G1 funcionalizado com glutaraldeído 1% foi usado em comparação com o biocarvão não funcionalizado (BCA). No entanto, quando funcionalizado com glutaraldeído 5% (BCA-G5) a quantidade de enzima que permaneceu ativa após ser imobilizada no suporte dobrou, ou seja, de $0,13 \text{ U g}^{-1}$ passou para $0,2 \text{ U g}^{-1}$. Em relação ao grupo de biocarvões tratados com ácido cítrico (**Figura 18c**, BCA-A, BCA-AG1, BCA-AG5), os mesmos resultados foram observados para o suporte funcionalizado com glutaraldeído a 1% (BCA-AG1) e glutaraldeído a 5% (BCA-AG5) em relação ao biocarvão não funcionalizado (BCA-A).

A concentração de 1% de glutaraldeído forneceu um número insuficiente de moléculas para ligar as moléculas de lacase no biocarvão. Quando a concentração de glutaraldeído aumentou para 5%, uma maior quantidade de moléculas de lacase foram covalentemente ligadas às moléculas de glutaraldeído no biocarvão. Assim, com o aumento do número de moléculas de glutaraldeído na superfície do biocarvão, as moléculas de lacase foram imobilizadas com a sua estrutura conformacional favorecida, resultando no aumento de enzimas na forma ativa em ambos os materiais BCA-G5 e BCA-AG5. Além disso, o glutaraldeído apresenta características de braço-espaçador, que confere maior mobilidade à enzima imobilizada, diminuindo as limitações de transferência de massa do substrato até o seu sítio ativo e aumentando a sua movimentação quando em contato com o substrato¹⁷³. Estudos semelhantes também observaram que glutaraldeído a 5% demonstrou ser a concentração ideal para os processos de imobilização por ligação covalente da lacase^{174,175}. Lonappan *et al.* (2018)⁹ investigaram a funcionalização de biocarvões com glutaraldeído 1%, 5% e 10%, os resultados mostraram que a maior unidade de enzima ativa ocorreu nos biocarvões funcionalizados com glutaraldeído 5%. Em outro estudo, Wang *et al.* (2021)⁷² investigaram a influência da concentração de glutaraldeído na imobilização da lacase, e os resultados mostraram uma maior atividade da lacase imobilizada quando a concentração de glutaraldeído ficou entre 4% e 5%.

O aumento da imobilização da enzima em sua forma ativa nos suportes funcionalizados com glutaraldeído a 5% pode estar relacionado com o

mecanismo de imobilização quando comparado com os seus respectivos suportes não funcionalizados. Nos suportes não funcionalizados o mecanismo ocorre preferencialmente por adsorção física e a interação entre a enzima e a superfície do suporte é geralmente fraca quando comparada com outros métodos¹²⁷. Desta forma, as enzimas ficam mais suscetíveis a dessorção da superfície do material durante a reação, resultando em uma menor atividade enzimática e menor estabilidade da lacase no material^{127,173}. No processo de adsorção as enzimas podem se adsorver uma na outra, formando duplas camada e dificultando o acesso ao substrato. Por outro lado, a funcionalização de suportes sólidos com agentes reticulantes como o glutaraldeído pode propiciar a reação com grupos reativos apropriados da enzima, evitando a perda da enzima durante a reação. Além disso, os grupos funcionais envolvidos na imobilização por ligação covalente ajudam a manter a conformação ativa e a orientação correta da enzima^{140,173}. Isso permite que a enzima seja arranjada de forma mais controlada/específica, em comparação com outros métodos de imobilização. Portanto, neste trabalho os dois biocarvões BCA-G5 e BCA-AG5 funcionalizados com glutaraldeído a 5% foram considerados adequados para o processo de imobilização da lacase e estudos adicionais de otimização do pH de imobilização foram conduzidos nestes dois suportes.

5.1.2 OTIMIZAÇÃO DO pH DE IMOBILIZAÇÃO

As condições de imobilização como o valor de pH devem ser otimizados para a melhor eficiência de imobilização e estabilidade da enzima imobilizada, pois cada sistema de imobilização varia de enzima para enzima, suporte e tipo de imobilização¹⁷¹. Previamente aos experimentos de otimização do pH de imobilização foram realizados os estudos do ponto de carga zero (pH_{pcz}) dos materiais (BCA, BCA-G1, BCA-G5, BCA-A, BCA-AG1, BCA-AG5) a fim de compreender o comportamento de carga de superfície dos biocarvões antes e após o tratamento ácido e funcionalização com glutaraldeído, o que contribuirá para o entendimento do mecanismo de imobilização da lacase nos diferentes valores de pH. O ponto de carga zero (pH_{pcz}) é o pH no qual a superfície de um

adsorvente é neutra, ou seja, contém tanto funções de superfície carregadas positivamente quanto negativamente. Abaixo desse valor, a superfície é carregada positivamente (grupos funcionais em sua superfície são protonados), podendo atrair ânions; acima desse valor, a superfície é carregada negativamente (grupos funcionais em sua superfície são desprotonados), podendo atrair cátions. Pode-se observar na **Figura 20** e **Tabela 5** os resultados do ponto de carga zero dos materiais, os valores do pH_{pcz} de todos os biocarvões preparados estão entre 5,44 e 6,07, esses valores revelam que as superfícies desses materiais estão próximas da neutralidade.

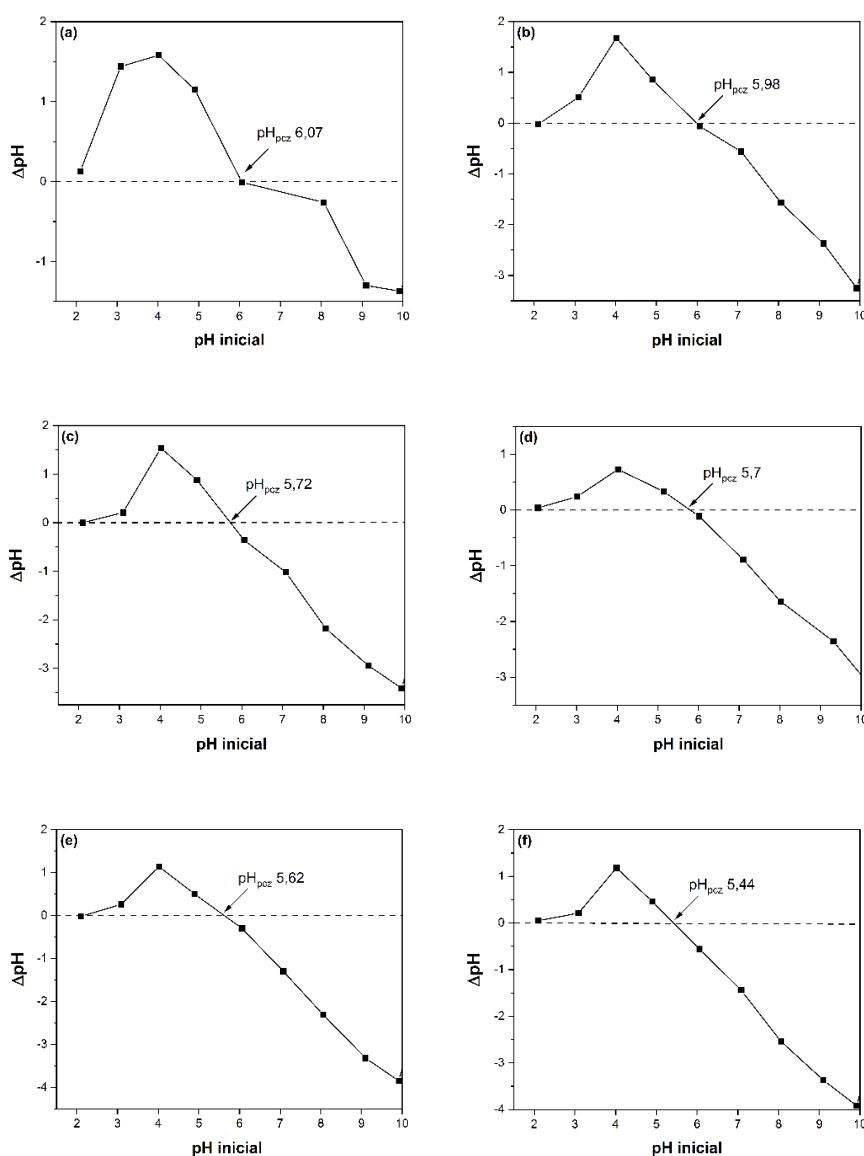


Figura 20. Gráficos do ponto de carga zero (pH_{pcz}) dos materiais preparados: BCA (a), BCA-G1 (b), BCA-G5 (c), BCA-A (d), BCA-AG1 (e) e BCA-AG5 (f).

Tabela 5. Ponto de carga zero (pH_{pcz}) dos materiais preparados.

Material	Tratamento	pH_{pcz}
BCA	Pirolise a 500°C	6,07
BCA-G1	Pirolise a 500°C / glutaraldeído 1%	5,98
BCA-G5	Pirolise a 500°C / glutaraldeído 5%	5,72
BCA-A	Pirolise a 500°C / ácido cítrico	5,7
BCA-AG1	Pirolise a 500°C / ácido cítrico / glutaraldeído 1%	5,62
BCA-AG5	Pirolise a 500°C / ácido cítrico / glutaraldeído 5%	5,44

Um estudo anteriormente publicado por Leite *et al.* (2018)⁸⁴ mostrou por meio de titulação de *Boehm* que carvões ativados de caroço de abacate tinham um pequeno excesso de grupos ácidos em relação aos grupos básicos, e que as amostras com maior quantidade de grupos ácidos apresentaram menores valores de pH_{pcz} . Portanto, os valores de pH_{pcz} podem estar em total concordância com as quantidades totais de grupos ácidos e básicos presentes nas amostras de biocarvão. Desta forma, neste estudo os valores do pH_{pcz} para os biocarvões tratados com ácido cítrico (BCA-A, BCA-AG1, BCA-AG5) foram menores em relação aos biocarvões não tratados com ácido (BCA, BCA-G1, BCA-G5). Esse resultado pode estar relacionado com a quantidade total de grupos ácidos presentes nas amostras, uma vez que grupos funcionais oxigenados (como ácidos carboxílicos) podem ter sido formados e/ou enxertados na superfície dos biocarvões após o tratamento ácido^{67,164}. Com base nesses resultados de pH_{pcz} dos materiais será possível compreender o mecanismo de imobilização da enzima lacase nos materiais BCA-G5 e BCA-AG5 variando o pH de imobilização.

Para a otimização do pH de imobilização, os ensaios foram realizados variando o pH do meio entre 2,0 e 7,0. Os resultados do efeito do pH na quantidade de enzima imobilizada ativa nos biocarvões são mostrados na **Figura**

21. Como mostrado anteriormente o ponto de carga zero (pH_{pcz}) dos materiais BCA-G5 e BCA-AG5 são 5,72 e 5,44 (**Tabela 5**), respectivamente; portanto, abaixo de desse valor de pH as superfícies dos materiais estão carregadas positivamente e acima desse valor negativamente. Além disso, o ponto isoelétrico (pI) da enzima lacase utilizada neste estudo é em torno de pH 3,0, abaixo desse valor de pH a enzima está carregada positivamente e acima negativamente^{76,105}. Desta forma, é possível verificar um aumento na quantidade de enzima imobilizada nos suportes em pH 4,0 em relação ao pH 5,0 utilizado anteriormente no processo de imobilização da enzima (**Figura 21**).

Em pH 4,0 pode ocorrer a contribuição de interação iônica juntamente com a ligação covalente no processo de imobilização da enzima nos suportes, pois os biocarvões foram previamente funcionalizados com glutaraldeído. Em pH 2 não houve imobilização da lacase em ambos os materiais, provavelmente devido à instabilidade da ligação covalente e instabilidade da enzima em meio reacional ácido. É reportado que em condições ácidas as bases de *Schiff* são instáveis e são clivadas, podendo regenerar os grupos aldeído e amina¹⁴⁰. Além disso, em pH 2 a superfície dos biocarvões e da lacase são carregadas positivamente, causando uma repulsão eletrostática. Em pH 3, 4 e 5, observou-se uma melhora no carregamento enzimático dos biocarvões. Em pH 3, a enzima lacase está no ponto isoelétrico, e em pH 5, a superfície dos materiais está próxima da neutralidade; portanto, uma contribuição de interação iônica para a imobilização em pH 3 e pH 5 provavelmente não ocorreu ou foi muito pequena; consequentemente, a imobilização por ligação covalente foi predominante. Em pH 4, a superfície dos materiais é carregada positivamente e a enzima é carregada negativamente. Assim, a imobilização da lacase em pH 4 ocorreu por interação iônica e por ligação covalente, o que resultou na maior unidade de enzima ativa no biocarvão BCA-G5 e BCA-AG5 (**Figura 21**). Em pH 6 e pH 7, observou-se uma diminuição no carregamento enzimático dos materiais devido à repulsão eletrostática entre a superfície dos biocarvões e a lacase, pois nessas condições de pH a superfície dos materiais e da enzima são carregadas negativamente. Com base neste estudo, foi possível verificar uma faixa ótima de pH entre 3-5 para a imobilização da lacase. No entanto, a maior unidade de enzima ativa nos suportes BCA-G5 e BCA-AG5 foi obtida quando a imobilização foi realizada em pH 4. Resultado semelhante foi relatado no trabalho de

Fernandez-Sanroman *et al.* (2020)¹⁷⁶, em que a imobilização da lacase em pH 4 favoreceu interações eletrostáticas entre a enzima e o biocarvão.

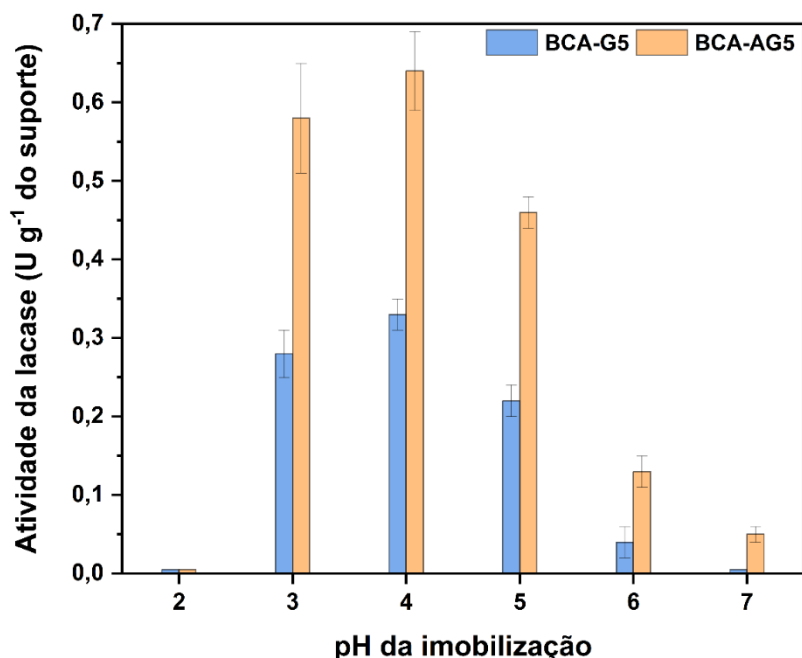


Figura 21. Efeito do pH na imobilização da lacase nos materiais BCA-G5 e BCA-AG5. Condições: temperatura = 25°C; massa do suporte = 10 mg; quantidade de lacase = 1,5 U mL⁻¹; tempo de contato = 24 h.

5.2 CARACTERIZAÇÃO DO BIOCÁRVÃO DE CAROÇO DE ABACATE

As caracterizações químicas e morfológicas foram realizadas nos materiais sem e com tratamento e com a enzima imobilizada na condição otimizada, para verificarmos alterações na superfície do material devido aos diferentes processos realizados. Medidas de microscopia eletrônica de varredura foram realizadas no biocarvão de caroço de abacate sem tratamento (BCA), ativado com ácido cítrico (BCA-A) e com a lacase imobilizada em pH 4 no material BCA-AG5, condição em que foi possível obter mais enzimas

imobilizadas na forma ativa. A espectroscopia na região do infravermelho com transformada de *Fourier* (FTIR) e a área de superfície (BET) foram realizadas em todos os biocarvões preparados (BCA, BCA-G1, BCA-G5, BCA-A, BCA-AG1, BCA-AG5) e nos biocarvões BCA-G5 e BCA-AG5 com a lacase imobilizada em pH 4, melhor condição de imobilização obtida para a lacase neste trabalho.

5.2.1 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

Os estudos da morfologia de superfície dos materiais são apresentados na **Figura 22**. Como podem ser observadas nas imagens, houve uma mudança morfológica na superfície do biocarvão após a ativação e principalmente após a imobilização enzimática. Na imagem do material sem tratamento (BCA, **Figura 22a**) pode-se observar uma superfície mais homogênea com cavidades, o que é esperado devido ao processo de pirólise da biomassa. Entende-se que durante o processo de pirólise, o aumento da temperatura remove substâncias voláteis causando a formação de cavidades e aumento da área de superfície do biocarvão⁵. Por outro lado, no material ativado com ácido cítrico (BCA-A, **Figura 22b**) é possível notar uma superfície mais heterogênea com cavidades, o que pode estar relacionado com os efeitos do tratamento com ácido que geralmente remove impurezas presentes na superfície do biocarvão⁵. Em um estudo semelhante, Lonappan *et al.* (2020)¹⁶⁴ também observaram que após o tratamento do biocarvão com ácido cítrico, estruturas porosas eram mais visíveis. Para o biocarvão com a enzima imobilizada (BCA-AG5, **Figura 22c**) foi possível observar uma distinção na superfície do suporte, um encobrimento e/ou formação de aglomerados, possivelmente devido ao processo de funcionalização com glutaraldeído seguido da imobilização enzimática, corroborando com os resultados de imobilização da lacase para este material. Esses resultados são semelhantes a outros estudos, que também observaram uma aglomeração na superfície dos suportes após imobilização enzimática^{9,177,178}.

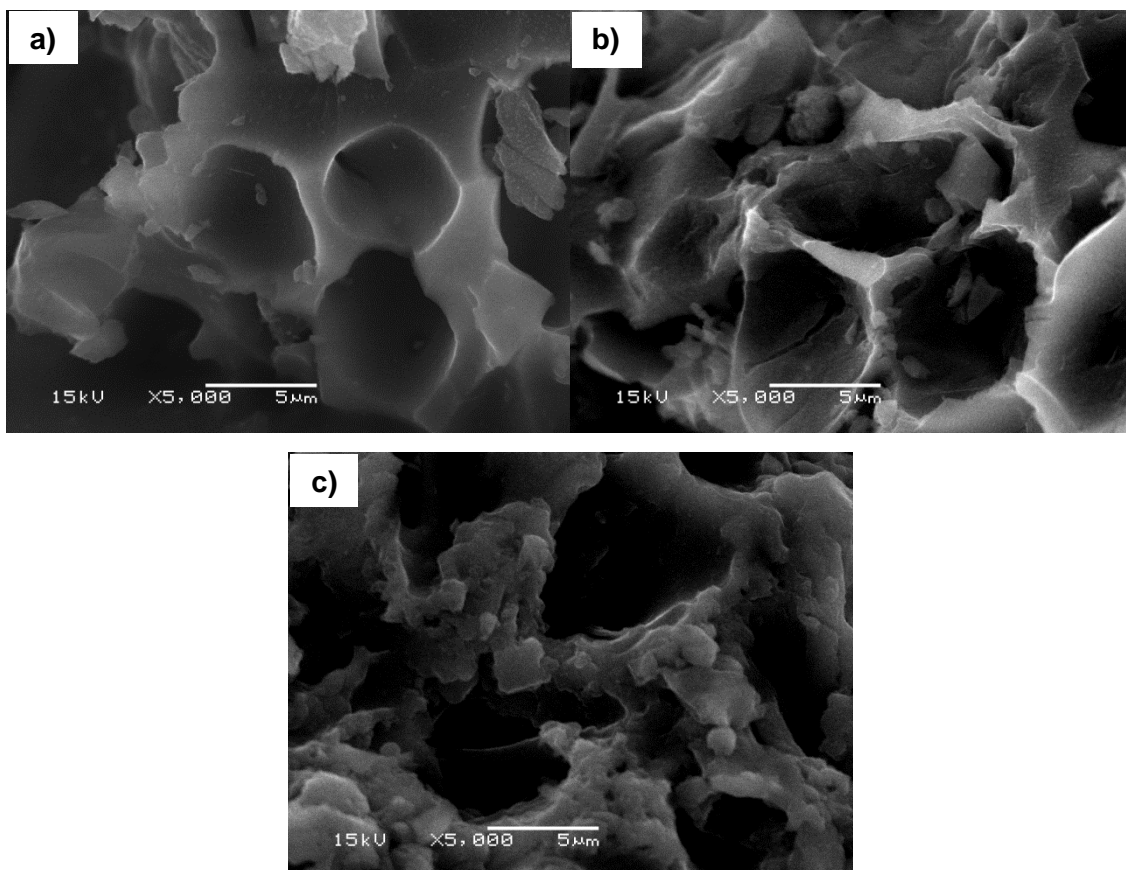


Figura 22. Microscopia eletrônica de varredura do biocarvão de caroço de abacate: sem tratamento (BCA, **a**); ativado com ácido cítrico (BCA-A, **b**) e com a lacase imobilizada (BCA-AG5, **c**).

5.2.2 ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE *FOURIER* (FTIR)

A análise de FTIR contribui na identificação de grupos funcionais presentes em uma superfície sólida que podem contribuir para explicar os efeitos de diferentes tratamentos realizados e a interação entre adsorvato e adsorvente. Na **Figura 23** são mostrados os espectros de FTIR do biocarvão antes e após os seus respectivos tratamentos com ácido cítrico, glutaraldeído e combinação dos dois tratamentos. Em geral, o mesmo grupo de bandas vibracionais de FTIR foram observadas para todos os materiais preparados, exceto um pequeno ombro em $\sim 1700\text{ cm}^{-1}$ que não foi observado para o biocarvão sem tratamento (BCA). A presença desta banda em torno de 1700 cm^{-1} corresponde a vibrações

de alongamento da ligação dupla C=O¹⁷⁹. Para o biocarvão tratado com ácido cítrico (BCA-A), esta banda pode ser atribuída a oxidação do carbono e/ou à inserção de carbonila na superfície do biocarvão após o tratamento com ácido^{8,164,180}. Para os biocarvões funcionalizados com glutaraldeído a 1% e 5% (BCA-G1 e BCA-G5) e para os biocarvões com a combinação dos dois tratamentos, ácido cítrico e glutaraldeído a 1% e 5% (BCA-AG1 e BCA-AG5), a banda em 1700 cm⁻¹ foi mais aguda, indicando à inserção de grupos carbonila do glutaraldeído na superfície dos biocarvões. Ademais, as bandas vibracionais presentes em todos os biocarvões incluem as bandas em 2970 e 2890 cm⁻¹ devido ao alongamento C–H assimétrico e simétrico, respectivamente; as bandas em 1400-1200 cm⁻¹ podem ser atribuídas ao modo de anel aromático⁸⁴. A banda em torno de 1100-1040 cm⁻¹ pode ser atribuída ao alongamento C–O de éteres¹⁷⁹, e as bandas em torno de 880-760 cm⁻¹ podem ser atribuídas a C–H fora do plano nos anéis aromáticos⁸⁴.

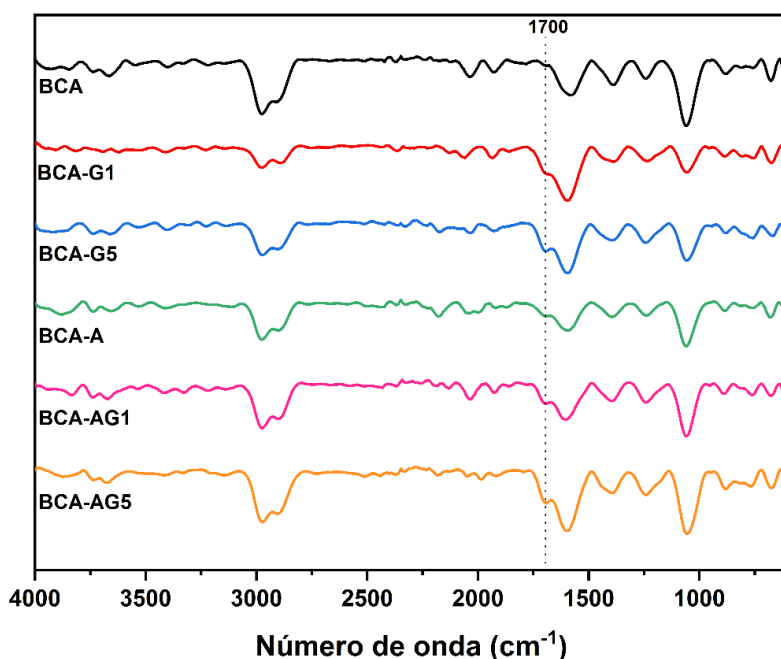


Figura 23. Espectros de FTIR dos materiais preparados.

Em relação ao processo de imobilização, no espectro da lacase (**Figura 24a**) pode ser observado duas pequenas bandas em torno de 3500-3300 cm^{-1} que podem ser atribuídas à vibrações de estiramento N–H de aminas primárias (NH_2)^{179,181,182}, as quais estão presentes em cadeias laterais de aminoácidos que constituem a enzima¹³⁹; uma pequena banda em torno de 1350 cm^{-1} pode estar relacionada ao estiramento da ligação C–N^{179,181}; e a banda em torno de 1100-1040 cm^{-1} indica vibrações de alongamento C–O de lacases^{41,181,182}. Com relação aos espectros dos materiais após a imobilização da lacase (**Figura 24b e 24c**), pode ser observado bandas vibracionais que não estavam presentes antes do processo. Essas bandas são devido a fixação da lacase na superfície dos materiais, como a banda em torno de 1690-1640 cm^{-1} que pode ser atribuída ao estiramento da ligação C=N de iminas que absorvem próximo da região onde aparecem ligações duplas¹⁷⁹. Durante a imobilização da lacase nos biocarvões funcionalizados com glutaraldeído, ligações covalentes são formadas entre os grupos aminos da lacase e grupos aldeídos do glutaraldeído formando ligações imina (bases de schiff)¹⁴⁰. Ademais, a banda larga em ~1100-1040 cm^{-1} observada após a imobilização, também é devida a fixação da lacase nos suportes, indicando vibrações de alongamento C–O de lacases. Esses aspectos também foram observados no estudo de Zhang *et al.* (2020)⁴¹ e confirmam a preparação bem-sucedida do biocarvão carregado com lacase.

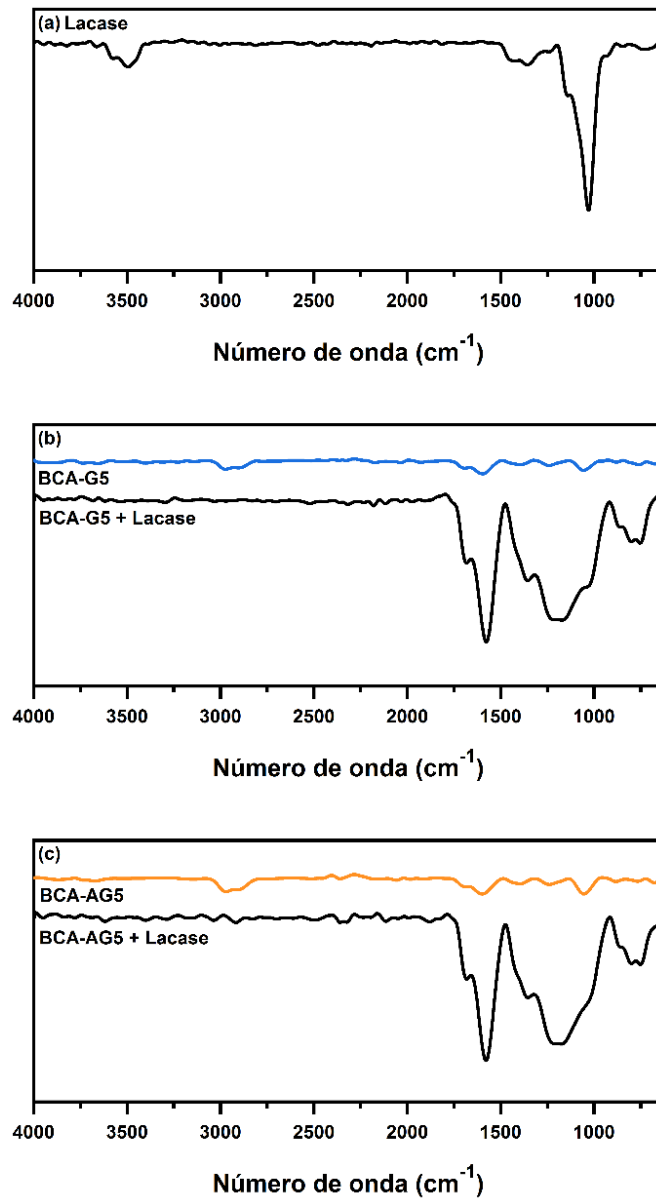


Figura 24. Espectro de FTIR da lacase **(a)**, do material BCA-G5 com a lacase imobilizada (BCA-G5+lacase) **(b)** e do material BCA-AG5 com a lacase imobilizada (BCA-AG5+lacase) **(c)**.

5.2.3 ÁREA DE SUPERFÍCIE (BET)

De acordo com os resultados de área de superfície dos materiais preparados (**Tabela 6**) é possível observar um aumento de ~12 vezes na área superficial do biocarvão (BCA) após o tratamento com ácido cítrico (BCA-A).

Durante o tratamento ácido, geralmente impurezas são removidas da superfície e de dentro dos poros do biocarvão, ocasionando um aumento na sua área superficial e porosidade⁵. Por outro lado, durante a funcionalização do biocarvão sem tratamento (BCA) e do biocarvão ativado com ácido cítrico (BCA-A) utilizando glutaraldeído na concentração de 1% e 5%, foi verificada uma redução na área de superfície, especialmente para o biocarvão ativado com ácido. Esses resultados indicam que o tratamento com ácido cítrico aumentou a quantidade de glutaraldeído que reagiu com a superfície do material. Conforme visto anteriormente, após o tratamento ácido a área de superfície aumentou consideravelmente, e como mostrado nos espectros de FTIR, grupos funcionais foram formados e/ou enxertados na superfície do biocarvão após o tratamento ácido, podendo melhorar a interação entre a superfície do biocarvão BCA-A e o glutaraldeído. Em um estudo semelhante, os autores também obtiveram uma diminuição na área superficial dos biocarvões após a funcionalização com glutaraldeído¹⁷⁷.

Tabela 6. Área de superfície dos materiais preparados.

Material	Tratamento	Área superficial (m² g⁻¹)	Volume de poro (cm³ g⁻¹)	Tamanho de poro
BCA	Pirolise a 500°C	4,09	0,006	14,7 nm
BCA-G1	Pirolise a 500°C / glutaraldeído 1%	2,57	0,004	7,9 nm
BCA-G5	Pirolise a 500°C / glutaraldeído 5%	1,82	0,003	16,4 nm
BCA-G5+lacase	Biocarvão com a lacase imobilizada	1,44	0,002	20,8 nm
BCA-A	Pirolise a 500°C / ácido cítrico	49,74	0,04	3,7 nm
BCA-AG1	Pirolise a 500°C / ácido cítrico / glutaraldeído 1%	2,27	0,004	9,3 nm
BCA-AG5	Pirolise a 500°C / ácido cítrico / glutaraldeído 5%	2,42	0,004	8,3 nm
BCA-AG5+lacase	Biocarvão com a lacase imobilizada	1,39	0,002	23,2 nm

Após a imobilização, um decréscimo na área de superfície dos materiais BCA-G5 e BCA-AG5 foi verificado, provavelmente devido a ocupação da área superficial pelas moléculas de lacase. Esses resultados também confirmam que as moléculas de lacase permaneceram na superfície dos materiais por meio da imobilização por ligação covalente com o glutaraldeído. Ademais, verificou-se que as moléculas de lacase ocuparam a maior área superficial quando o biocarvão foi tratado com ácido cítrico e funcionalizado com glutaraldeído (BCA-AG5), o que pode estar relacionado com a maior interação/enxerto de moléculas de glutaraldeído na superfície do biocarvão tratado com ácido, que subsequentemente tiveram uma maior interação com as moléculas de lacase, imobilizando-as mais efetivamente, corroborando com os resultados de imobilização da lacase obtidos para o material BCA-AG5. Em comparação, Lonappan *et al.* (2018)⁹ também tiveram uma redução de 65%, 15,8% e 25,8% da área de superfície dos biocarvões após a imobilização da lacase. Naghdi *et al.* (2017)¹⁵ obtiveram uma redução de 56% da área de superfície do biocarvão após a imobilização enzimática.

5.3 SORÇÃO E BIOTRANSFORMAÇÃO DO ACETAMINOFENO

Neste trabalho avaliamos a eficiência da enzima lacase imobilizada no biocarvão de caroço de abacate na sorção e biotransformação do fármaco acetaminofeno (ACT), o qual é um dos contaminantes orgânicos que podem estar presentes no meio ambiente sem serem monitorados ou regulados na maioria dos casos, mas podem afetar adversamente a saúde humana e vários outros organismos vivos^{146,183,184}. Além disso, o ACT apresenta em sua estrutura molecular o grupo fenol, o qual a enzima lacase é altamente reativa, sendo um excelente substrato para avaliar a eficiência do biocatalisador imobilizado que foi desenvolvido neste trabalho.

Para os ensaios de sorção e biotransformação do ACT em solução aquosa, foram utilizados os biocarvões BCA-G5 e BCA-AG5 com a lacase imobilizada na faixa ótima de pH entre 3-5 para avaliar qualquer diferença operacional dos materiais preparados nas melhores condições (**Figura 25**). Para

investigar qualquer contribuição de sorção dos materiais, experimentos usando o biocarvão sem a lacase immobilizada foram conduzidos. Além disso, ensaios utilizando a lacase livre também foram realizados para comparação; nestes experimentos a quantidade de enzima livre utilizada foi a mesma obtida por grama nos suportes após os processos de imobilização.

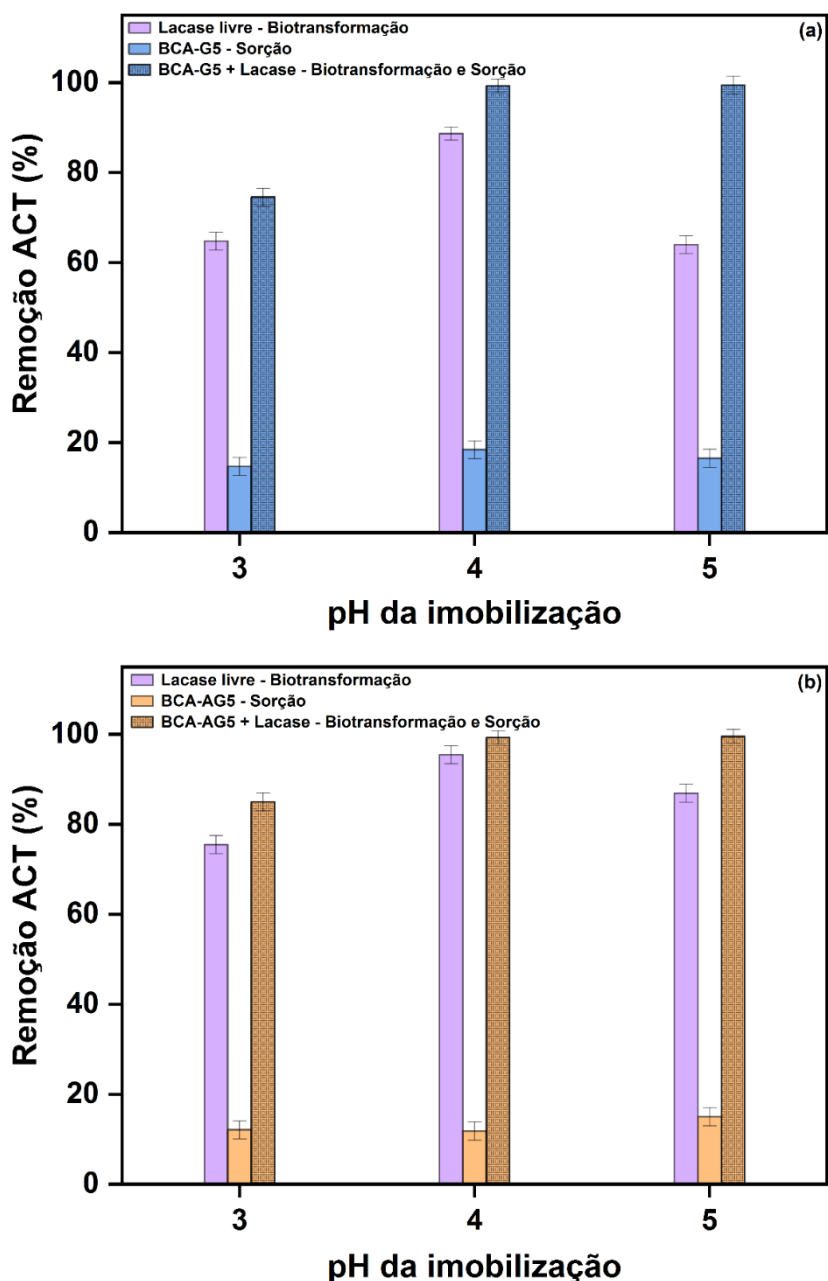


Figura 25. Resultados da sorção e biotransformação de ACT sob três condições experimentais: Lacase livre, BCA-G5 e BCA-G5+lacase **(a)**; Lacase livre, BCA-AG5 e BCA-AG5+lacase **(b)**. Condições: temperatura = 25°C; massa do suporte = 10 mg; concentração do ACT = 30 mg L⁻¹; tempo de contato = 24 h.

Os testes dos suportes BCA-G5 e BCA-AG5 sem a lacase imobilizada resultaram em menos de 20% de sorção do ACT; esta pequena remoção pode estar relacionada com a difusão das moléculas do ACT nos poros do biocarvão assim como a interação por forças de *van der Waals* e ligação de hidrogênio entre as moléculas do ACT e a superfície do biocarvão com glutaraldeído. No entanto, para o suporte BCA-G5 com a lacase imobilizada em pH 3, 4 e 5 foi possível observar 74,5%, 99,3% e 99,5% de sorção e biotransformação do ACT, respectivamente. Resultados similares foram encontrados para o suporte BCA-AG5 com a lacase imobilizada em pH 3, 4 e 5 (85%, 99,3% e 99,5% de sorção e biotransformação do ACT, respectivamente). Assim, fica evidente que a diminuição de cerca de 99% da concentração de ACT está ocorrendo principalmente devido à presença da lacase no suporte, uma vez que esse decréscimo ocorre somente após contato com os materiais contendo a lacase imobilizada, indicando uma forte interação entre a lacase e o substrato ACT. Além disso, a maior biotransformação do ACT ocorreu quando a lacase foi imobilizada entre pH 4-5 para ambos os materiais (BCA-G5 e BCA-AG5). Esses resultados mostram que na imobilização em pH 4,0 e 5,0 a enzima lacase assume uma conformação mais estável e na forma ativa, favorecendo a catálise.

Ademais, comparando os ensaios de biotransformação entre a lacase livre e a imobilizada, observa-se que a maior biotransformação ocorreu quando a lacase estava imobilizada em ambos os materiais (BCA-G5 e BCA-AG5) (**Figura 25**). Isto está relacionado com a forma como a enzima lacase foi arranjada na superfície dos materiais. É relatado que o uso de glutaraldeído, além de formar ligação covalente estável com a enzima, também mantém a enzima fixa na conformação ativa, tornando-a mais eficiente. Assim, a atividade do biocatalisador resultante é similar ou, em muitos casos, maior do que as formas livres¹⁷³. Portanto, os resultados deste estudo confirmam que a enzima lacase foi imobilizada nos materiais BCA-G5 e BCA-AG5 em sua forma estável e ativa sem limitações de acesso do substrato ao seu sítio ativo.

Os resultados deste estudo também podem ser comparados com outros trabalhos, como Hachi *et al.* (2017)¹⁸⁵ que alcançaram uma biotransformação de 70% do ACT pela lacase imobilizada. Em outro estudo, Ratanapongleka e Punbut (2018)¹³² obtiveram uma biotransformação de 94% do ACT usando a lacase imobilizada em alginato de bário. No entanto, o diferencial do presente

estudo é o suporte de imobilização que foi obtido a partir de resíduos agrícolas, material que é de fonte renovável e de baixo custo, contribuindo para o desenvolvimento de tecnologias mais sustentáveis. Além disso, é relatado na literatura que o mecanismo de biotransformação do ACT pela lacase envolve a oxidação de moléculas de acetaminofeno em radicais ativos que imediatamente formam dímeros, trímeros e tetrâmeros por meio de polimerização radicalar^{159,160,186}. Esses produtos de biotransformação são biologicamente inativos e mais facilmente removíveis da água^{159,160}. Diante destes aspectos, o uso de enzimas lacase para a biorremediação de contaminantes emergentes, como o ACT, pode ser uma estratégia alternativa principalmente quando conjugada com a imobilização enzimática, pois permite o uso repetido do suporte com a enzima.

5.4 REUTILIZAÇÃO E ESTABILIDADE DE ARMAZENAMENTO DA LACASE

O estudo da reutilização e estabilidade de armazenamento das enzimas imobilizadas é de extrema importância para consolidar o sistema desenvolvido pois a estabilidade da enzima pode aumentar ou diminuir dependendo do tipo de suporte, bem como da interação entre a enzima e o suporte. Neste estudo, os materiais BCA-G5+lacase e BCA-AG5+lacase demonstraram excelente desempenho na sorção e biotransformação do ACT. No entanto, o material BCA-AG5+lacase obtido após a imobilização da lacase em pH 4,0 foi selecionado como o melhor, por apresentar duas vezes mais enzima ativa por grama do suporte quando comparado ao material BCA-G5 (**Figura 21**). Portanto, esses resultados sugerem que a enzima lacase assumiu uma conformação mais estável e na forma ativa na superfície do material BCA-AG5.

A **Figura 26** mostra os resultados de reutilização do material BCA-AG5+lacase no processo de biotransformação do ACT. De acordo com os resultados, após os 4 primeiros ciclos de reutilização a eficiência do sistema BCA-AG5+laccase na biotransformação do ACT manteve-se em mais de 90%. Este resultado confirma a alta eficiência da imobilização da lacase no biocarvão por ligação covalente, evitando a perda de enzima durante a reação e etapas de

lavagens para a reutilização. Após o 5º, 6º e 7º ciclos de reutilização a biotransformação do ACT foi diminuída para 80,2%, 65,7% e 50,5% respectivamente. A diminuição da atividade da lacase após o 5º reuso pode ser atribuída a desnaturação ou pelo efeito inibidor do próprio composto ACT, ou pela perda de massa do material durante as reutilizações. No entanto, esses resultados demonstram a eficiente estabilidade e aplicação do material desenvolvido em repetidos ciclos.

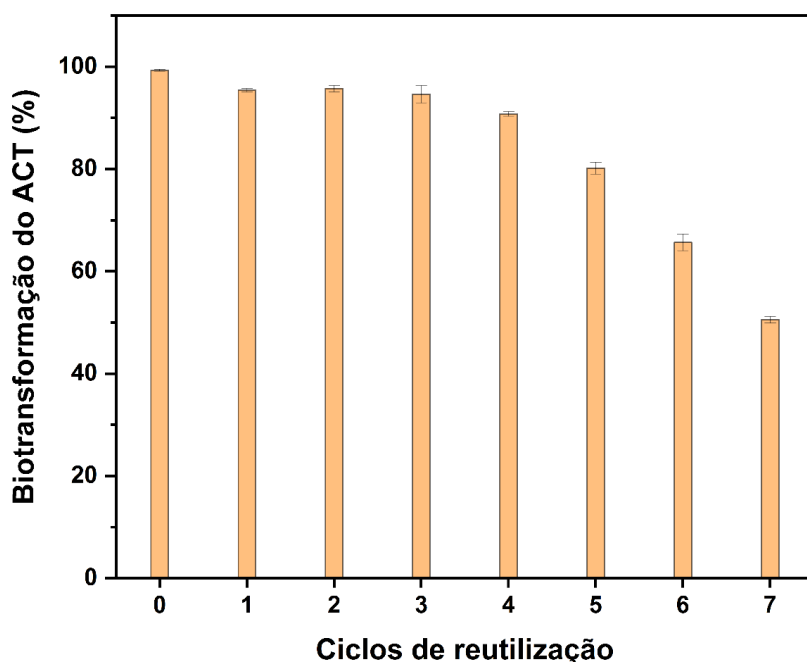


Figura 26. Reutilização da lacase imobilizada no biocarvão BCA-AG5.

Condições: temperatura = 25°C; massa do suporte = 10 mg; Concentração do ACT = 30 mg L⁻¹; tempo de contato = 24 h.

Estes resultados de reutilização podem ser comparados com outros estudos da literatura (**Tabela 7**) que utilizaram a enzima lacase imobilizada em materiais a base de biocarvão. Estes trabalhos apresentam diferentes mecanismos de imobilização, como adsorção, ligação covalente, adsorção-*crosslinking* e encapsulação. Resultados similares foram observados em estudos que utilizaram o glutaraldeído como agente ligante ou agente de *crosslinking* para a imobilização da lacase. No trabalho de Wang *et al.* (2021)⁷², a enzima lacase imobilizada no biocarvão por adsorção-*crosslinking* manteve

61% de sua atividade inicial após seis ciclos de reuso. Em um outro estudo, Lonappan *et al.* (2018)⁹ relataram que a lacase imobilizada por ligação covalente manteve 46% de sua atividade inicial após 5 ciclos de reuso. Os demais estudos realizaram a imobilização da lacase em biocarvão por adsorção e obtiveram uma perda maior de atividade da lacase após os ciclos de reutilização. Sabe-se que a imobilização por adsorção é um dos métodos mais simples de ser empregado, no entanto, a interação física entre a enzima e o suporte não é forte, causando a lixiviação da enzima do suporte após cada ciclo de reutilização. Desta forma, os resultados apresentados neste estudo mostram que a estabilidade operacional obtida pela lacase imobilizada covalentemente no biocarvão de caroço de abacate pode ser atribuída à ocorrência de fortes interações entre a superfície do suporte e a enzima em sua forma ativa.

Tabela 7. Biocarvões aplicados como suporte para a imobilização da lacase.

Biocarvão	Tipo de Imobilização	Ciclos de Reuso	Atividade Residual (%)*	Referências
Palha de arroz	Adsorção	6	40	Imam <i>et al.</i> ⁷¹
Palha de trigo	Adsorção- <i>crosslinking</i>	6	61	Wang <i>et al.</i> ⁷²
Palha de arroz	Adsorção	6	27,8	Wang <i>et al.</i> ⁶⁶
Madeira de pinho	Encapsulação	7	19	Naghdi <i>et al.</i> ⁷⁸
Madeira	Adsorção	7	33,8	Li <i>et al.</i> ⁴²
Madeira de pinho, estrume de porco, casca de amêndoa	Ligação covalente	5	46	Lonappan <i>et al.</i> ⁹
Madeira de pinho	Adsorção	7	6	Naghdi <i>et al.</i> ¹⁵
Caroço de abacate	Ligação covalente	7	50,5	Este estudo

*Atividade da lacase residual após os ciclos de reutilização.

Em relação a estabilidade de armazenamento do biocarvão BCA-AG5+lacase (**Figura 27**), durante os 30 dias de armazenamento à 4°C não foi observada perda de atividade da lacase na biotransformação do ACT, confirmando a eficiência do processo de imobilização por ligação covalente e iônica realizado neste estudo. Sabe-se que nos processos de imobilização por ligação covalente os grupos funcionais envolvidos ajudam a reter a conformação ativa e a orientação correta da enzima, e isto permite a estabilização do sistema enzima imobilizada^{140,172}. Durante os 30 dias de armazenamento a temperatura ambiente (entre 25°C e 27°C), a eficiência do sistema BCA-AG5+lacase na biotransformação do ACT foi mantida em mais de 90%. Uma pequena redução na biotransformação do ACT foi observada a partir dos 20 dias de armazenamento a ~25°C e isto pode estar relacionado com a desnaturação da enzima (pequena mudança na sua conformação). Essa tendência era esperada, pois sob refrigeração a temperatura baixa ajuda a reter a conformação e a orientação correta da enzima. No entanto, esses resultados confirmam mais uma vez a estabilização excepcional da lacase imobilizada no material BCA-AG5.

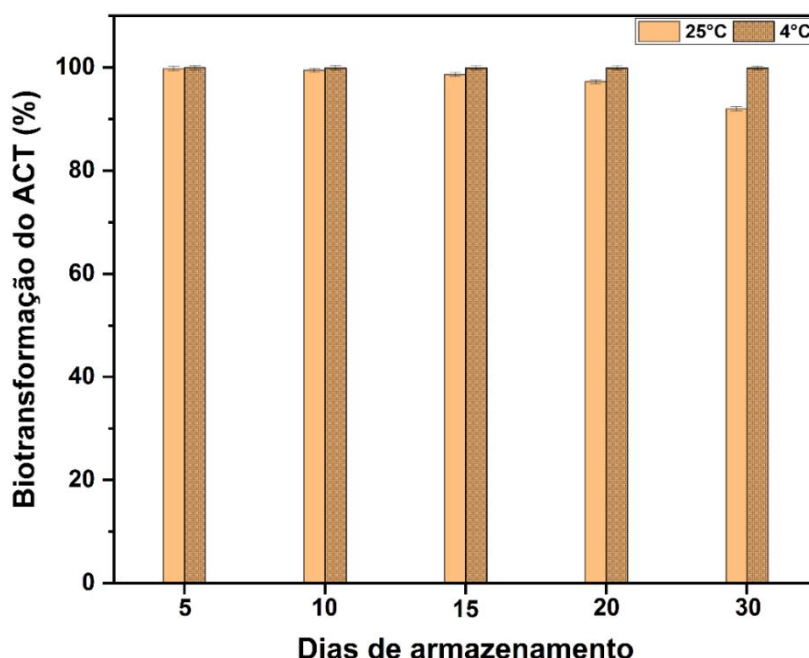


Figura 27. Estabilidade de armazenamento da lacase imobilizada no biocarvão BCA-AG5 a 4°C e ~25°C. Condições: temperatura = 25°C; massa do material = 10 mg; concentração do ACT = 30 mg L⁻¹; tempo de contato = 24 h.

Os resultados deste estudo podem ser comparados com outros trabalhos, como por exemplo, Zhang *et al.* (2020)⁴¹ que investigaram a estabilidade de armazenamento da lacase imobilizada por adsorção-*crosslinking* em biocarvão magnético, e após 30 dias de armazenamento a 4°C e a 25°C a lacase manteve 81,8% e 64,4% de sua atividade inicial, respectivamente. Em outro trabalho, Lonappan *et al.* (2018)⁹ imobilizaram a lacase por ligação covalente em biocarvão e após 30 dias de armazenamento a temperatura ambiente a enzima manteve 80% de sua atividade inicial. Neste estudo, a estabilidade de armazenamento da lacase imobilizada no biocarvão de caroço de abacate pode ser atribuída a proteção da enzima à desnaturação (alterações estruturais e conformacionais) e a sua imobilização na orientação correta, sem limitação do acesso do substrato até o seu sítio ativo. Ademais, este estudo demonstra a aplicabilidade potencial de biocarvão obtido a partir de resíduos agrícolas como suporte para a imobilização de enzimas. Conforme descrito anteriormente, a porosidade e a presença de grupos funcionais de superfície no biocarvão desempenham papéis importantes na imobilização de enzimas. Além disso, a ativação e funcionalização do biocarvão pode ser uma ferramenta eficaz para aumentar a quantidade de enzima imobilizada na forma ativa. Assim, materiais como o biocarvão adequadamente projetados podem resultar em excelentes suportes para imobilização de enzimas.

6. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo destaca a importância da recuperação de resíduos agrícolas para o desenvolvimento de sistemas de enzimas imobilizadas mais sustentáveis e de baixo custo. A biomassa lignocelulósica utilizada neste trabalho de caroço de abacate mostrou-se um excelente precursor para a preparação de biocarvão e para aplicação como suporte na imobilização da enzima lacase. O tratamento da superfície do biocarvão com ácido cítrico e funcionalização com glutaraldeído a 5% e o pH de imobilização de valor 4,0 foram identificados como parâmetros cruciais para o aumento na quantidade de enzima ativa no biocarvão. Os resultados deste estudo indicam que a imobilização da lacase no biocarvão de caroço de abacate ocorreu principalmente por ligação covalente e interação iônica. Este processo de imobilização foi responsável pelo alto desempenho do catalisador na biotransformação do acetaminofeno em meio aquoso. Além disso, esse processo de imobilização permitiu que o biocatalisador tivesse excelente estabilidade de armazenamento e reutilização na biotransformação do acetaminofeno. A proposta de aplicação do sistema enzimático imobilizado na biotransformação do ACT é significativa do ponto de vista da biorremediação ambientalmente correta. Além disso, os resultados deste estudo também mostraram o grande potencial de aproveitamento de resíduos agrícolas, que atualmente é uma grande preocupação ambiental. Este biocatalisador imobilizado em um biocarvão de resíduo agrícola tem grande potencial para ser utilizado na remediação de poluentes emergentes, trazendo enormes benefícios ao meio ambiente e à sociedade. Espera-se que os resultados obtidos neste trabalho contribuam para estudos futuros sobre o aproveitamento de resíduos agrícolas no desenvolvimento de novos materiais, uma vez que, a evolução da agricultura acarreta o aumento da geração de resíduos, que quando descartados no solo ou submetidos à queima podem gerar uma série de problemas ambientais. Desta forma, é cada vez mais importante o desenvolvimento contínuo de estudos para explorar ainda mais o potencial de aplicabilidade de resíduos agrícolas. A conversão desses resíduos em produtos de valor agregado

é uma alternativa para reduzir os impactos ambientais e oferece vantagens econômicas no desenvolvimento de trabalhos de baixo custo.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Koul, B., Yakoob, M. & Shah, M. P. Agricultural waste management strategies for environmental sustainability. *Environ Res* **206**, 112285 (2022).
2. Duque-Acevedo, M., Belmonte-Ureña, L. J., Cortés-García, F. J. & Camacho-Ferre, F. Agricultural waste: Review of the evolution, approaches and perspectives on alternative uses. *Glob Ecol Conserv* **22**, e00902 (2020).
3. Bilal, M. & Iqbal, H. M. N. Sustainable bioconversion of food waste into high-value products by immobilized enzymes to meet bio-economy challenges and opportunities – A review. *Food Research International* **123**, 226–240 (2019).
4. Girelli, A. M., Astolfi, M. L. & Scuto, F. R. Agro-industrial wastes as potential carriers for enzyme immobilization: A review. *Chemosphere* **244**, 125368 (2020).
5. Pandey, D., Daverey, A. & Arunachalam, K. Biochar: Production, properties and emerging role as a support for enzyme immobilization. *J Clean Prod* **255**, 120267 (2020).
6. Adamian, Y., Lonappan, L., Alokpa, K., Agathos, S. N. & Cabana, H. Recent Developments in the Immobilization of Laccase on Carbonaceous Supports for Environmental Applications - A Critical Review. *Front Bioeng Biotechnol* **9**, (2021).
7. Adamian, Y., Lonappan, L., Alokpa, K., Agathos, S. N. & Cabana, H. Recent Developments in the Immobilization of Laccase on Carbonaceous Supports for Environmental Applications - A Critical Review. *Front Bioeng Biotechnol* **9**, (2021).
8. Imam, A. *et al.* Application of laccase immobilized rice straw biochar for anthracene degradation. *Environmental Pollution* **268**, 115827 (2021).
9. Lonappan, L. *et al.* Covalent immobilization of laccase on citric acid functionalized micro-biochars derived from different feedstock and removal of diclofenac. *Chemical Engineering Journal* **351**, 985–994 (2018).

10. Unuofin, J. O., Okoh, A. I. & Nwodo, U. U. Aptitude of Oxidative Enzymes for Treatment of Wastewater Pollutants: A Laccase Perspective. *Molecules* **24**, 2064 (2019).
11. Majeau, J.-A., Brar, S. K. & Tyagi, R. D. Laccases for removal of recalcitrant and emerging pollutants. *Bioresour Technol* **101**, 2331–2350 (2010).
12. Wen, X. *et al.* Immobilized laccase on bentonite-derived mesoporous materials for removal of tetracycline. *Chemosphere* **222**, 865–871 (2019).
13. Masjoudi, M., Golgoli, M., Ghobadi Nejad, Z., Sadeghzadeh, S. & Borghei, S. M. Pharmaceuticals removal by immobilized laccase on polyvinylidene fluoride nanocomposite with multi-walled carbon nanotubes. *Chemosphere* **263**, 128043 (2021).
14. Shakerian, F., Zhao, J. & Li, S.-P. Recent development in the application of immobilized oxidative enzymes for bioremediation of hazardous micropollutants – A review. *Chemosphere* **239**, 124716 (2020).
15. Naghdi, M. *et al.* Immobilized laccase on oxygen functionalized nanobiochars through mineral acids treatment for removal of carbamazepine. *Science of The Total Environment* **584–585**, 393–401 (2017).
16. Phong Vo, H. N. *et al.* Acetaminophen micropollutant: Historical and current occurrences, toxicity, removal strategies and transformation pathways in different environments. *Chemosphere* **236**, 124391 (2019).
17. Godfray, H. C. J. *et al.* Food Security: The Challenge of Feeding 9 Billion People. *Science (1979)* **327**, 812–818 (2010).
18. FAO. Strategic work of FAO for Sustainable Food and Agriculture. *Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO)* <https://www.fao.org/3/i6488e/i6488e.pdf> (2017).
19. Rodrigues, C. *et al.* Materiais lignocelulósicos como matéria-prima para a obtenção de biomoléculas de valor comercial. in *Biotecnologia Aplicada à Agro&Indústria - Vol. 4* 283–314 (Editora Blucher, 2017). doi:10.5151/9788521211150-08.
20. FAOSTAT. Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAOSTAT). <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL> (2022).
21. Bilal, M. *et al.* Environmental impact of lignocellulosic wastes and their effective exploitation as smart carriers – A drive towards greener and eco-

- friendlier biocatalytic systems. *Science of The Total Environment* **722**, 137903 (2020).
22. Anwar, Z., Gulfraz, M. & Irshad, M. Agro-industrial lignocellulosic biomass a key to unlock the future bio-energy: A brief review. *J Radiat Res Appl Sci* **7**, 163–173 (2014).
 23. Obi, F., Ugwuishiwu, B. & Nwakaire, J. Agricultural waste concept, generation, utilization and management. *Nigerian Journal of Technology* **35**, 957 (2016).
 24. Baruah, J. *et al.* Recent Trends in the Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Value-Added Products. *Front Energy Res* **6**, (2018).
 25. Ittrat, P., Chacho, T., Pholprayoon, J., Suttiwarayanon, N. & Charoenpanich, J. Application of agriculture waste as a support for lipase immobilization. *Biocatal Agric Biotechnol* **3**, 77–82 (2014).
 26. Lu, H., Yadav, V., Bilal, M. & Iqbal, H. M. N. Bioprospecting microbial hosts to valorize lignocellulose biomass – Environmental perspectives and value-added bioproducts. *Chemosphere* **288**, 132574 (2022).
 27. Iqbal, H. M. N., Kyazze, G. & Keshavarz, T. Advances in the Valorization of Lignocellulosic Materials by Biotechnology: An Overview. *Bioresources* **8**, 3157–3176 (2013).
 28. Rao, P. & Rathod, V. Valorization of Food and Agricultural Waste: A Step towards Greener Future. *The Chemical Record* **19**, 1858–1871 (2019).
 29. Zhou, C. & Wang, Y. Recent progress in the conversion of biomass wastes into functional materials for value-added applications. *Sci Technol Adv Mater* **21**, 787–804 (2020).
 30. Arevalo-Gallegos, A., Ahmad, Z., Asgher, M., Parra-Saldivar, R. & Iqbal, H. M. N. Lignocellulose: A sustainable material to produce value-added products with a zero waste approach—A review. *Int J Biol Macromol* **99**, 308–318 (2017).
 31. Madadi, R. & Bester, K. Fungi and biochar applications in bioremediation of organic micropollutants from aquatic media. *Mar Pollut Bull* **166**, 112247 (2021).
 32. Chen, H. *et al.* Adsorption of cadmium and lead ions by phosphoric acid-modified biochar generated from chicken feather: Selective adsorption and

- influence of dissolved organic matter. *Bioresour Technol* **292**, 121948 (2019).
33. Tong, Y., McNamara, P. J. & Mayer, B. K. Adsorption of organic micropollutants onto biochar: a review of relevant kinetics, mechanisms and equilibrium. *Environ Sci (Camb)* **5**, 821–838 (2019).
 34. Enaime, G., Baçaoui, A., Yaacoubi, A. & Lübken, M. Biochar for Wastewater Treatment—Conversion Technologies and Applications. *Applied Sciences* **10**, 3492 (2020).
 35. Kumar Ramamoorthy, N., Sambavi, T. R. & Renganathan, S. A study on cellulase production from a mixture of lignocellulosic wastes. *Process Biochemistry* **83**, 148–158 (2019).
 36. Kumar, A., Singh, A. K., Bilal, M. & Chandra, R. Sustainable Production of Thermostable Laccase from Agro-Residues Waste by *Bacillus aquimaris* AKRC02. *Catal Letters* **152**, 1784–1800 (2022).
 37. Bansal, N., Tewari, R., Soni, R. & Soni, S. K. Production of cellulases from *Aspergillus niger* NS-2 in solid state fermentation on agricultural and kitchen waste residues. *Waste Management* **32**, 1341–1346 (2012).
 38. Mehmood, T. *et al.* Pectinase Production from *Schizophyllum commune* Through Central Composite Design Using Citrus Waste and Its Immobilization for Industrial Exploitation. *Waste Biomass Valorization* **10**, 2527–2536 (2019).
 39. Chugh, P., Soni, R. & Soni, S. K. Deoiled Rice Bran: A Substrate for Co-Production of a Consortium of Hydrolytic Enzymes by *Aspergillus niger* P-19. *Waste Biomass Valorization* **7**, 513–525 (2016).
 40. Sheldon, R. A. & van Pelt, S. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. *Chem. Soc. Rev.* **42**, 6223–6235 (2013).
 41. Zhang, Y. *et al.* Immobilization of laccase on magnetically separable biochar for highly efficient removal of bisphenol A in water. *RSC Adv* **10**, 4795–4804 (2020).
 42. Li, N., Xia, Q., Niu, M., Ping, Q. & Xiao, H. Immobilizing Laccase on Different Species Wood Biochar to Remove the Chlorinated Biphenyl in Wastewater. *Sci Rep* **8**, 13947 (2018).

43. Almeida, L. C. *et al.* Use of conventional or non-conventional treatments of biochar for lipase immobilization. *Process Biochemistry* **61**, 124–129 (2017).
44. Santos, M. P., Brito, M. J., Junior, E. C., Bonomo, R. C. & 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* **94**, 1982–1990 (2019).
45. Cha, J. S. *et al.* Production and utilization of biochar: A review. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* **40**, 1–15 (2016).
46. Liu, W.-J., Jiang, H. & Yu, H.-Q. Development of Biochar-Based Functional Materials: Toward a Sustainable Platform Carbon Material. *Chem Rev* **115**, 12251–12285 (2015).
47. Börjesson, M. & Ahlgren, E. O. Biomass CHP Energy Systems. in *Comprehensive Renewable Energy* 87–97 (Elsevier, 2012). doi:10.1016/B978-0-08-087872-0.00508-4.
48. No, S.-Y. Application of bio-oils from lignocellulosic biomass to transportation, heat and power generation—A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **40**, 1108–1125 (2014).
49. Schmidt, H. P. *et al.* European Biochar Certificate-Guidelines for a sustainable production of Biochar. *European Biochar Foundation (EBC)* <http://www.european-biochar.org/en/download> (2012) doi:10.13140/RG.2.1.4658.7043.
50. Janu, R. *et al.* Biochar surface functional groups as affected by biomass feedstock, biochar composition and pyrolysis temperature. *Carbon Resources Conversion* **4**, 36–46 (2021).
51. Vithanage, M. *et al.* Acid-activated biochar increased sulfamethazine retention in soils. *Environmental Science and Pollution Research* **22**, 2175–2186 (2015).
52. Gokce, Y. & Aktas, Z. Nitric acid modification of activated carbon produced from waste tea and adsorption of methylene blue and phenol. *Appl Surf Sci* **313**, 352–359 (2014).
53. Li, Y. *et al.* Characterization of Modified Biochars Derived from Bamboo Pyrolysis and Their Utilization for Target Component (Furfural) Adsorption. *Energy & Fuels* **28**, 5119–5127 (2014).

54. Park, S. H., Cho, H. J., Ryu, C. & Park, Y.-K. Removal of copper(II) in aqueous solution using pyrolytic biochars derived from red macroalga *Porphyra tenera*. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* **36**, 314–319 (2016).
55. Rajapaksha, A. U. *et al.* Steam activation of biochars facilitates kinetics and pH-resilience of sulfamethazine sorption. *J Soils Sediments* **16**, 889–895 (2016).
56. Mohan, D. *et al.* Biochar production and applications in soil fertility and carbon sequestration – a sustainable solution to crop-residue burning in India. *RSC Adv* **8**, 508–520 (2018).
57. El-Naggar, A. *et al.* Biochar composition-dependent impacts on soil nutrient release, carbon mineralization, and potential environmental risk: A review. *J Environ Manage* **241**, 458–467 (2019).
58. Waqas, M. *et al.* Development of biochar as fuel and catalyst in energy recovery technologies. *J Clean Prod* **188**, 477–488 (2018).
59. Regkouzas, P. & Diamadopoulos, E. Adsorption of selected organic micro-pollutants on sewage sludge biochar. *Chemosphere* **224**, 840–851 (2019).
60. Xiang, W. *et al.* Biochar technology in wastewater treatment: A critical review. *Chemosphere* **252**, 126539 (2020).
61. 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* **107**, 153–163 (2021).
62. Naghdi, M. *et al.* Removal of pharmaceutical compounds in water and wastewater using fungal oxidoreductase enzymes. *Environmental Pollution* **234**, 190–213 (2018).
63. Zdarta, J., Meyer, A., Jesionowski, T. & Pinelo, M. A General Overview of Support Materials for Enzyme Immobilization: Characteristics, Properties, Practical Utility. *Catalysts* **8**, 92 (2018).
64. Veeramalai, S. *et al.* Development of organic porous material from pineapple waste as a support for enzyme and dye adsorption. *Ind Crops Prod* **181**, 114823 (2022).
65. Pandey, D., Daverey, A., Dutta, K. & Arunachalam, K. Bioremoval of toxic malachite green from water through simultaneous decolorization and

- degradation using laccase immobilized biochar. *Chemosphere* **297**, 134126 (2022).
66. Wang, Z. *et al.* Study on adsorption-degradation of 2,4-dichlorophenol by modified biochar immobilized laccase. *International Journal of Environmental Science and Technology* **19**, 1393–1406 (2022).
 67. Imam, A. *et al.* Application of laccase immobilized rice straw biochar for anthracene degradation. *Environmental Pollution* **268**, 115827 (2021).
 68. Zhao, J. *et al.* Green synthesis of polydopamine functionalized magnetic mesoporous biochar for lipase immobilization and its application in interesterification for novel structured lipids production. *Food Chem* **379**, 132148 (2022).
 69. Wang, Z. *et al.* The study of laccase immobilization optimization and stability improvement on CTAB-KOH modified biochar. *BMC Biotechnol* **21**, 47 (2021).
 70. Petronijević, M. *et al.* Characterization and application of biochar-immobilized crude horseradish peroxidase for removal of phenol from water. *Colloids Surf B Biointerfaces* **208**, 112038 (2021).
 71. Imam, A. *et al.* Application of laccase immobilized rice straw biochar for anthracene degradation. *Environmental Pollution* **268**, 115827 (2021).
 72. Wang, Z. *et al.* Remediation and improvement of 2,4-dichlorophenol contaminated soil by biochar-immobilized laccase. *Environ Technol* **42**, 1679–1692 (2021).
 73. Almeida, L. C. *et al.* Enzymatic transesterification of coconut oil by using immobilized lipase on biochar: An experimental and molecular docking study. *Biotechnol Appl Biochem* **68**, 801–808 (2021).
 74. Mo, H. & Qiu, J. Preparation of Chitosan/Magnetic Porous Biochar as Support for Cellulase Immobilization by Using Glutaraldehyde. *Polymers (Basel)* **12**, 2672 (2020).
 75. Mo, H., Qiu, J., Yang, C., Zang, L. & Sakai, E. Preparation and characterization of magnetic polyporous biochar for cellulase immobilization by physical adsorption. *Cellulose* **27**, 4963–4973 (2020).
 76. Zhang, H. & Hay, A. G. Magnetic biochar derived from biosolids via hydrothermal carbonization: Enzyme immobilization, immobilized-enzyme kinetics, environmental toxicity. *J Hazard Mater* **384**, 121272 (2020).

77. Cea, M., González, M. E., Abarzúa, M. & Navia, R. Enzymatic esterification of oleic acid by *Candida rugosa* lipase immobilized onto biochar. *J Environ Manage* **242**, 171–177 (2019).
78. Naghdi, M. *et al.* Fabrication of nanobiocatalyst using encapsulated laccase onto chitosan-nanobiochar composite. *Int J Biol Macromol* **124**, 530–536 (2019).
79. Chen, X., Zhou, Q., Liu, F., Peng, Q. & Teng, P. Removal of nine pesticide residues from water and soil by biosorption coupled with degradation on biosorbent immobilized laccase. *Chemosphere* **233**, 49–56 (2019).
80. Naghdi, M. *et al.* Pinewood nanobiochar: A unique carrier for the immobilization of crude laccase by covalent bonding. *Int J Biol Macromol* **115**, 563–571 (2018).
81. Colombo, R. & Papetti, A. Avocado (*Persea americana* Mill.) by-products and their impact: from bioactive compounds to biomass energy and sorbent material for removing contaminants. A review. *Int J Food Sci Technol* **54**, 943–951 (2019).
82. Araújo, R. G., Rodriguez-Jasso, R. M., Ruiz, H. A., Pintado, M. M. E. & Aguilar, C. N. Avocado by-products: Nutritional and functional properties. *Trends Food Sci Technol* **80**, 51–60 (2018).
83. Sellaoui, L. *et al.* Adsorption of 3-aminophenol and resorcinol on avocado seed activated carbon: Mathematical modelling, thermodynamic study and description of adsorbent performance. *J Mol Liq* **342**, 116952 (2021).
84. Leite, A. B. *et al.* Activated carbons from avocado seed: optimisation and application for removal of several emerging organic compounds. *Environmental Science and Pollution Research* **25**, 7647–7661 (2018).
85. Zhu, Y., Kolar, P., Shah, S. B., Cheng, J. J. & Lim, P. K. Avocado seed-derived activated carbon for mitigation of aqueous ammonium. *Ind Crops Prod* **92**, 34–41 (2016).
86. Zhu, Y., Kolar, P., Shah, S. B., Cheng, J. J. & Lim, P. K. Simultaneous mitigation of p-cresol and ammonium using activated carbon from avocado seed. *Environ Technol Innov* **9**, 63–73 (2018).
87. Elizalde-González, M. P., García-Díaz, E., González-Perea, M. & Mattusch, J. Removal of gadolinium-based contrast agents: adsorption on

- activated carbon. *Environmental Science and Pollution Research* **24**, 8164–8175 (2017).
88. Bhaumik, M., Choi, H. J., Seopela, M. P., McCrindle, R. I. & Maity, A. Highly Effective Removal of Toxic Cr(VI) from Wastewater Using Sulfuric Acid-Modified Avocado Seed. *Ind Eng Chem Res* **53**, 1214–1224 (2014).
 89. Rodrigues, L. A., da Silva, M. L. C. P., Alvarez-Mendes, M. O., Coutinho, A. dos R. & Thim, G. P. Phenol removal from aqueous solution by activated carbon produced from avocado kernel seeds. *Chemical Engineering Journal* **174**, 49–57 (2011).
 90. Woodley, J. M. Accelerating the implementation of biocatalysis in industry. *Appl Microbiol Biotechnol* **103**, 4733–4739 (2019).
 91. Sheldon, R. A. & Woodley, J. M. Role of Biocatalysis in Sustainable Chemistry. *Chem Rev* **118**, 801–838 (2018).
 92. Devine, P. N. *et al.* Extending the application of biocatalysis to meet the challenges of drug development. *Nat Rev Chem* **2**, 409–421 (2018).
 93. Bommarius, A. S. & Paye, M. F. Stabilizing biocatalysts. *Chem Soc Rev* **42**, 6534 (2013).
 94. Hudlicky, T. & Reed, J. W. Applications of biotransformations and biocatalysis to complexity generation in organic synthesis. *Chem Soc Rev* **38**, 3117 (2009).
 95. Bilal, M., Asgher, M., Cheng, H., Yan, Y. & Iqbal, H. M. N. Multi-point enzyme immobilization, surface chemistry, and novel platforms: a paradigm shift in biocatalyst design. *Crit Rev Biotechnol* **39**, 202–219 (2019).
 96. Bilal, M., Rasheed, T., Zhao, Y., Iqbal, H. M. N. & Cui, J. “Smart” chemistry and its application in peroxidase immobilization using different support materials. *Int J Biol Macromol* **119**, 278–290 (2018).
 97. Amin, F., Bhatti, H. N., Bilal, M. & Asgher, M. Improvement of activity, thermo-stability and fruit juice clarification characteristics of fungal exopolygalacturonase. *Int J Biol Macromol* **95**, 974–984 (2017).
 98. Yaashikaa, P. R., Devi, M. K. & Kumar, P. S. Advances in the application of immobilized enzyme for the remediation of hazardous pollutant: A review. *Chemosphere* **299**, 134390 (2022).

99. Rodríguez-Couto, S. Solid-State Fermentation for Laccases Production and Their Applications. in *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering* 211–234 (Elsevier, 2018). doi:10.1016/B978-0-444-63990-5.00011-6.
100. Bilal, M. *et al.* Oxidoreductases as a versatile biocatalytic tool to tackle pollutants for clean environment – a review. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* **97**, 420–435 (2022).
101. Mate, D. M. & Alcalde, M. Laccase: a multi-purpose biocatalyst at the forefront of biotechnology. *Microb Biotechnol* **10**, 1457–1467 (2017).
102. Baldrian, P. Fungal laccases – occurrence and properties. *FEMS Microbiol Rev* **30**, 215–242 (2006).
103. Kunamneni, A., Plou, F., Ballesteros, A. & Alcalde, M. Laccases and Their Applications: A Patent Review. *Recent Pat Biotechnol* **2**, 10–24 (2008).
104. Ba, S. & Vinoth Kumar, V. Recent developments in the use of tyrosinase and laccase in environmental applications. *Crit Rev Biotechnol* **37**, 819–832 (2017).
105. Piontek, K., Antorini, M. & Choinowski, T. Crystal Structure of a Laccase from the Fungus *Trametes versicolor* at 1.90-Å Resolution Containing a Full Complement of Coppers. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 37663–37669 (2002).
106. Christopher, L. P., Yao, B. & Ji, Y. Lignin Biodegradation with Laccase-Mediator Systems. *Front Energy Res* **2**, (2014).
107. Ren, D. *et al.* Recent environmental applications of and development prospects for immobilized laccase: a review. *Biotechnol Genet Eng Rev* **36**, 81–131 (2020).
108. Morozova, O. V., Shumakovich, G. P., Shleev, S. V. & Yaropolov, Ya. I. Laccase-mediator systems and their applications: A review. *Appl Biochem Microbiol* **43**, 523–535 (2007).
109. Arregui, L. *et al.* Laccases: structure, function, and potential application in water bioremediation. *Microb Cell Fact* **18**, 200 (2019).
110. Zhou, W., Zhang, W. & Cai, Y. Laccase immobilization for water purification: A comprehensive review. *Chemical Engineering Journal* **403**, 126272 (2021).

111. Zofair, S. F. F. *et al.* Catalytic roles, immobilization and management of recalcitrant environmental pollutants by laccases: Significance in sustainable green chemistry. *J Environ Manage* **309**, 114676 (2022).
112. Blair-González, J., Contreras-Villacura, E., Carvajal Guevara, A. & Palma Toloza, C. Oxytetracycline removal by biological/chemical activated mesoporous carbon. *Microporous and Mesoporous Materials* **327**, 111384 (2021).
113. Caraene, I. D., Gruchlik, Y., Buseti, F., Linge, K. L. & Joll, C. A. Degradation of selected pharmaceuticals detected in wastewater systems using an enzyme-mediator system and identification of resulting transformation products. *Biocatal Biotransformation* 1–12 (2021) doi:10.1080/10242422.2021.2003344.
114. Xia, T., Feng, M., Liu, C., Liu, C. & Guo, C. Efficient phenol degradation by laccase immobilized on functional magnetic nanoparticles in fixed bed reactor under high-gradient magnetic field. *Eng Life Sci* **21**, 374–381 (2021).
115. Zhang, Y. *et al.* High-density immobilization of laccase on hollow nanosphere NH₂-MIL88(Fe) host with interfacial defects to improve enzyme activity and stability for remazol brilliant blue R decolorization. *Chemical Engineering Journal* **405**, 127003 (2021).
116. Zhang, C. *et al.* Construction of luffa sponge-based magnetic carbon nanocarriers for laccase immobilization and its application in the removal of bisphenol A. *Bioresour Technol* **305**, 123085 (2020).
117. Kupski, L. *et al.* Optimization of a laccase-mediator system with natural redox-mediating compounds for pesticide removal. *Environmental Science and Pollution Research* **26**, 5131–5139 (2019).
118. Bayramoglu, G. & Arica, M. Y. Biodegradation of methylene blue and carbaryl by *Trametes versicolor* laccase preparations in the presence of a mediator compound. *Journal of Macromolecular Science, Part A* **56**, 277–285 (2019).
119. Alharbi, S. K. *et al.* Degradation of diclofenac, trimethoprim, carbamazepine, and sulfamethoxazole by laccase from *Trametes versicolor*: Transformation products and toxicity of treated effluent. *Biocatal Biotransformation* **37**, 399–408 (2019).

120. Naghdi, M. *et al.* Biotransformation of carbamazepine by laccase-mediator system: Kinetics, by-products and toxicity assessment. *Process Biochemistry* **67**, 147–154 (2018).
121. Sun, K. *et al.* Cu²⁺ assisted laccase from *Trametes versicolor* enhanced self-polyreaction of triclosan. *Chemosphere* **225**, 745–754 (2019).
122. Xu, R., Cui, J., Tang, R., Li, F. & Zhang, B. Removal of 2,4,6-trichlorophenol by laccase immobilized on nano-copper incorporated electrospun fibrous membrane-high efficiency, stability and reusability. *Chemical Engineering Journal* **326**, 647–655 (2017).
123. Aydemir, T. & Güler, S. Characterization and immobilization of *Trametes versicolor* laccase on magnetic chitosan–clay composite beads for phenol removal. *Artif Cells Nanomed Biotechnol* **43**, 425–432 (2015).
124. Xu, R., Zhou, Q., Li, F. & Zhang, B. Laccase immobilization on chitosan/poly(vinyl alcohol) composite nanofibrous membranes for 2,4-dichlorophenol removal. *Chemical Engineering Journal* **222**, 321–329 (2013).
125. Wang, Y., Chen, X., Liu, J., He, F. & Wang, R. Immobilization of laccase by Cu²⁺ chelate affinity interaction on surface-modified magnetic silica particles and its use for the removal of 2,4-dichlorophenol. *Environmental Science and Pollution Research* **20**, 6222–6231 (2013).
126. Dehghanifard, E. *et al.* Biodegradation of 2,4-dinitrophenol with laccase immobilized on nano-porous silica beads. *Iranian J Environ Health Sci Eng* **10**, 25 (2013).
127. Fernández-Fernández, M., Sanromán, M. Á. & Moldes, D. Recent developments and applications of immobilized laccase. *Biotechnol Adv* **31**, 1808–1825 (2013).
128. Ren, D. *et al.* Recent environmental applications of and development prospects for immobilized laccase: a review. *Biotechnol Genet Eng Rev* **36**, 81–131 (2020).
129. Karthik, V. *et al.* Enzyme-loaded nanoparticles for the degradation of wastewater contaminants: a review. *Environ Chem Lett* **19**, 2331–2350 (2021).

130. Piao, M. *et al.* Multi-Functional Laccase Immobilized Hydrogel Microparticles for Efficient Removal of Bisphenol A. *Materials* **12**, 704 (2019).
131. Olajuyigbe, F. M., Adetuyi, O. Y. & Fatokun, C. O. Characterization of free and immobilized laccase from *Cyberlindnera fabianii* and application in degradation of bisphenol A. *Int J Biol Macromol* **125**, 856–864 (2019).
132. Ratanapongleka, K. & Punbut, S. Removal of acetaminophen in water by laccase immobilized in barium alginate. *Environ Technol* **39**, 336–345 (2018).
133. Zhang, R. *et al.* Improving laccase activity and stability by HKUST-1 with cofactor via one-pot encapsulation and its application for degradation of bisphenol A. *J Hazard Mater* **383**, 121130 (2020).
134. Yang, J., Huang, Y., Yang, Y., Yuan, H. & Liu, X. Cage-like mesoporous silica encapsulated with microcapsules for immobilized laccase and 2, 4-DCP degradation. *Journal of Environmental Sciences* **38**, 52–62 (2015).
135. Kołodziejczak-Radzimska, A., Budna, A., Ciesielczyk, F., Moszyński, D. & Jesionowski, T. Laccase from *Trametes versicolor* supported onto mesoporous Al₂O₃: Stability tests and evaluations of catalytic activity. *Process Biochemistry* **95**, 71–80 (2020).
136. Wang, F., Owusu-Fordjour, M., Xu, L., Ding, Z. & Gu, Z. Immobilization of Laccase on Magnetic Chelator Nanoparticles for Apple Juice Clarification in Magnetically Stabilized Fluidized Bed. *Front Bioeng Biotechnol* **8**, 589 (2020).
137. Gou, Z. *et al.* Innovative hydrolysis of corn stover biowaste by modified magnetite laccase immobilized nanoparticles. *Environ Res* **188**, 109829 (2020).
138. Wen, X. *et al.* Immobilized laccase on bentonite-derived mesoporous materials for removal of tetracycline. *Chemosphere* **222**, 865–871 (2019).
139. Souza, L. T. de A. *et al.* Imobilização enzimática: princípios fundamentais e tipos de suporte. in *Biotecnologia Aplicada à Agro&Indústria - Vol. 4* 529–568 (Editora Blucher, 2017). doi:10.5151/9788521211150-15.
140. Barbosa, O. *et al.* Glutaraldehyde in bio-catalysts design: a useful crosslinker and a versatile tool in enzyme immobilization. *RSC Adv.* **4**, 1583–1600 (2014).

141. Abd El Aty, A. A., Mostafa, F. A., Hassan, M. E., Hamed, E. R. & Esawy, M. A. Covalent immobilization of *Alternaria tenuissima* KM651985 laccase and some applied aspects. *Biocatal Agric Biotechnol* **9**, 74–81 (2017).
142. Chen, C. *et al.* Spacer arm-facilitated tethering of laccase on magnetic polydopamine nanoparticles for efficient biocatalytic water treatment. *Chemical Engineering Journal* **350**, 949–959 (2018).
143. Simón-Herrero, C. *et al.* Immobilized laccase on polyimide aerogels for removal of carbamazepine. *J Hazard Mater* **376**, 83–90 (2019).
144. Nguyen, L. T., Seow, N. & Yang, K.-L. Hollow cross-linked enzyme aggregates (h-CLEA) of laccase with high uniformity and activity. *Colloids Surf B Biointerfaces* **151**, 88–94 (2017).
145. Matijošytė, I., Arends, I. W. C. E., de Vries, S. & Sheldon, R. A. Preparation and use of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) of laccases. *J Mol Catal B Enzym* **62**, 142–148 (2010).
146. Mohan, H. *et al.* Ecotoxicity, Occurrence, and Removal of Pharmaceuticals and Illicit Drugs from Aquatic Systems. *Biointerface Res Appl Chem* **11**, 12530–12546 (2021).
147. Patel, M. *et al.* Pharmaceuticals of emerging concern in aquatic systems: Chemistry, occurrence, effects, and removal methods. *Chem Rev* **119**, 3510–3673 (2019).
148. Starling, M. C. V. M., Amorim, C. C. & Leão, M. M. D. Occurrence, control and fate of contaminants of emerging concern in environmental compartments in Brazil. *J Hazard Mater* **372**, 17–36 (2019).
149. Hong, X. *et al.* Risks to aquatic environments posed by 14 pharmaceuticals as illustrated by their effects on zebrafish behaviour. *Science of the Total Environment* **771**, (2021).
150. Muir, N., Nichols, J. D., Stillings, M. R. & Sykes, J. Comparative bioavailability of aspirin and paracetamol following single dose administration of soluble and plain tablets. *Curr Med Res Opin* **13**, 491–500 (1997).
151. de Gusseme, B., Vanhaecke, L., Verstraete, W. & Boon, N. Degradation of acetaminophen by *Delftia tsuruhatensis* and *Pseudomonas aeruginosa* in a membrane bioreactor. *Water Res* **45**, 1829–1837 (2011).

152. Zur, J., Wojcieszynska, D., Hupert-Kocurek, K., Marchlewicz, A. & Guzik, U. Paracetamol - toxicity and microbial utilization. *Pseudomonas moorei* KB4 as a case study for exploring degradation pathway. *Chemosphere* **206**, 192–202 (2018).
153. Phong Vo, H. N. *et al.* Removal and monitoring acetaminophen-contaminated hospital wastewater by vertical flow constructed wetland and peroxidase enzymes. *J Environ Manage* **250**, 1–9 (2019).
154. David, A. & Pancharatna, K. Effects of acetaminophen (paracetamol) in the embryonic development of zebrafish, *Danio rerio*. *Journal of Applied Toxicology* **29**, 597–602 (2009).
155. Wu, Y., Chen, Y. & Wei, N. Biocatalytic properties of cell surface display laccase for degradation of emerging contaminant acetaminophen in water reclamation. *Biotechnol Bioeng* **117**, 342–353 (2020).
156. George, J. *et al.* Insolubilization of *Trametes versicolor* laccase as cross-linked enzyme aggregates for the remediation of trace organic contaminants from municipal wastewater. *Environ Res* **209**, (2022).
157. Sotelo, L. D., Sotelo, D. C., Ornelas-Soto, N., Cruz, J. C. & Osma, J. F. Comparison of Acetaminophen Degradation by Laccases Immobilized by Two Different Methods via a Continuous Flow Microreactor Process Scheme. *Membranes (Basel)* **12**, 298 (2022).
158. Kang, B. R., Kim, S. Y., Kang, M. & Lee, T. K. Removal of pharmaceuticals and personal care products using native fungal enzymes extracted during the ligninolytic process. *Environ Res* **195**, (2021).
159. Lu, J., Huang, Q. & Mao, L. Removal of Acetaminophen Using Enzyme-Mediated Oxidative Coupling Processes: I. Reaction Rates and Pathways. *Environ Sci Technol* **43**, 7062–7067 (2009).
160. Wang, K., Huang, K. & Jiang, G. Enhanced removal of aqueous acetaminophen by a laccase-catalyzed oxidative coupling reaction under a dual-pH optimization strategy. *Science of the Total Environment* **616–617**, 1270–1278 (2018).
161. Sigma Aldrich. Ficha de informação de segurança de produto químico. *Sigma Aldrich* <https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/sds/sial/a3035> (2021).
162. Castro, P. L. P. Farmacocinética do paracetamol. (Universidade Fernando Pessoa, 2014).

163. Thue, P. S. *et al.* Effects of first-row transition metals and impregnation ratios on the physicochemical properties of microwave-assisted activated carbons from wood biomass. *J Colloid Interface Sci* **486**, 163–175 (2017).
164. Lonappan, L., Liu, Y., Rouissi, T., Brar, S. K. & Surampalli, R. Y. Development of biochar-based green functional materials using organic acids for environmental applications. *J Clean Prod* **244**, 118841 (2020).
165. Calvete, T., Lima, E. C., Cardoso, N. F., Dias, S. L. P. & Pavan, F. A. Application of carbon adsorbents prepared from the Brazilian pine-fruit-shell for the removal of Procion Red MX 3B from aqueous solution— Kinetic, equilibrium, and thermodynamic studies. *Chemical Engineering Journal* **155**, 627–636 (2009).
166. Prola, L. D. T. *et al.* Comparison of *Jatropha curcas* shells in natural form and treated by non-thermal plasma as biosorbents for removal of Reactive Red 120 textile dye from aqueous solution. *Ind Crops Prod* **46**, 328–340 (2013).
167. Zhang, Y. *et al.* Immobilization of laccase on magnetically separable biochar for highly efficient removal of bisphenol A in water. *RSC Adv* **10**, 4795–4804 (2020).
168. Matte, C. R. *et al.* Immobilization of *Thermomyces lanuginosus* Lipase by Different Techniques on Immobead 150 Support: Characterization and Applications. *Appl Biochem Biotechnol* **172**, 2507–2520 (2014).
169. Clausen, D. N., Oliveira, F. M., Casarin, J., Sartori, E. R. & Tarley, C. R. T. Development of HPLC Method for Quantification of Orphenadrine, Paracetamol, and Caffeine in Pharmaceutical Formulations. *Revista Virtual de Química* **7**, 2066–2079 (2015).
170. Agência Nacional de Vigilância Sanitária-ANVISA. *RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA - RDC Nº 166, DE 24 DE JULHO DE 2017* (2017).
171. Dwevedi, A. *Enzyme Immobilization - Advances in industry, agriculture, medicine, and the environment.* (2004).
172. Wahab, R. A., Elias, N., Abdullah, F. & Ghoshal, S. K. On the taught new tricks of enzymes immobilization: An all-inclusive overview. *React Funct Polym* **152**, 104613 (2020).

173. Wahab, R. A., Elias, N., Abdullah, F. & Ghoshal, S. K. On the taught new tricks of enzymes immobilization: An all-inclusive overview. *React Funct Polym* **152**, 104613 (2020).
174. Lonappan, L., Rouissi, T., Liu, Y., Brar, S. K. & Surampalli, R. Y. Removal of diclofenac using microbiocchar fixed-bed column bioreactor. *J Environ Chem Eng* **7**, 102894 (2019).
175. Xu, R., Cui, J., Tang, R., Li, F. & Zhang, B. Removal of 2,4,6-trichlorophenol by laccase immobilized on nano-copper incorporated electrospun fibrous membrane-high efficiency, stability and reusability. *Chemical Engineering Journal* **326**, 647–655 (2017).
176. Fernandez-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. *J Clean Prod* **271**, 122436 (2020).
177. Fernandez-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. *J Clean Prod* **271**, 122436 (2020).
178. Khazravi, M. S., Bahmaei, M., Olya, M. E. & Etehad, S. M. Application of a new self-cleaning filter for colored wastewaters treatment using laccase enzyme immobilized on activated CARBON powder and fiber. *Progress in Color, Colorants and Coatings* **12**, 39–56 (2019).
179. Pavia, D. L., Lampman, G. M., Kriz, G. S. & Vyvyan, J. R. Introdução à Espectroscopia. *Cengage Learning: São Paulo* 15–78 (2010).
180. Rajapaksha, A. U. *et al.* Engineered/designer biochar for contaminant removal/immobilization from soil and water: Potential and implication of biochar modification. *Chemosphere* **148**, 276–291 (2016).
181. Lepore, M. & Portaccio, M. Optical detection of different phenolic compounds by means of a novel biosensor based on sol-gel immobilized laccase. *Biotechnol Appl Biochem* **64**, 782–792 (2017).
182. Fu, M., Xing, J. & Ge, Z. Preparation of laccase-loaded magnetic nanoflowers and their recycling for efficient degradation of bisphenol A. *Science of The Total Environment* **651**, 2857–2865 (2019).

183. Starling, M. C. V. M., Amorim, C. C. & Leão, M. M. D. Occurrence, control and fate of contaminants of emerging concern in environmental compartments in Brazil. *J Hazard Mater* **372**, 17–36 (2019).
184. Morsi, R., Bilal, M., Iqbal, H. M. N. & Ashraf, S. S. Laccases and peroxidases: The smart, greener and futuristic biocatalytic tools to mitigate recalcitrant emerging pollutants. *Science of The Total Environment* **714**, 136572 (2020).
185. Hachi, M., Chergui, A., Yeddou, A. R., Selatnia, A. & Cabana, H. Removal of acetaminophen and carbamazepine in single and binary systems with immobilized laccase from *Trametes hirsuta*. *Biocatal Biotransformation* **35**, 51–62 (2017).
186. Ba, S. *et al.* Synthesis and characterization of combined cross-linked laccase and tyrosinase aggregates transforming acetaminophen as a model phenolic compound in wastewaters. *Science of the Total Environment* **487**, 748–755 (2014).