

UNIVERSIDADE TIRADENTES – UNIT
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE PROCESSOS - PEP

UTILIZAÇÃO DE RESÍDUO ORIUNDO DO CULTIVO DO GIRASSOL NA
OBTENÇÃO DE SUPORTE LIGNOCELULÓSICO PARA
IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS LIPOLÍTICAS

Autora: Jaci Lima Vilanova Neta

Orientadores: Prof. Dr. Álvaro Silva Lima

Prof^a. Dr.^a Cleide Mara Faria Soares

Co-orientadores: Prof^a. Dr.^a Denise Santos Ruzene

Prof. Dr. Daniel Pereira Silva

ARACAJU, SE - BRASIL

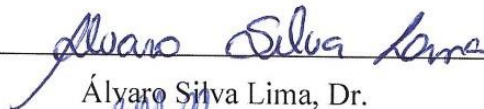
FEVEREIRO DE 2017

UTILIZAÇÃO DE RESÍDUO ORIUNDO DO CULTIVO DO GIRASSOL NA
OBTENÇÃO DE SUPORTE LIGNOCELULÓSICO PARA
IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS LIPOLÍTICAS


Jaci Lima Vilanova Neta

TESE SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA
DE PROCESSOS DA UNIVERSIDADE TIRADENTES COMO PARTE DOS
REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM
ENGENHARIA DE PROCESSOS.

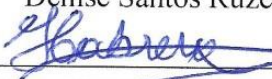
Aprovada por:

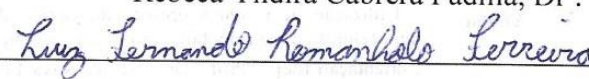

Álvaro Silva Lima, Dr.


Cleide Mara Faria Soares, Dr^a.


Daniel Pereira da Silva, Dr.


Denise Santos Ruzene, Dr^a.


Rebeca Yndira Cabrera Padilla, Dr^a.


Luiz Fernando Romanholo Ferreira, Dr.


Rita de Cássia Mendonça de Miranda, Dr^a.


Jorge Alberto López Rodríguez, Dr.

ARACAJU, SE - BRASIL

FEVEREIRO DE 2017

V695u Vilanova Neta, Jaci Lima
Utilização de resíduos oriundo do cultivo do girassol na obtenção de suporte lignocelulósico para imobilização de enzimas lipolíticas / Jaci Lima Vilanova Neta ; orientação [de] Prof. Dr. Álvaro Silva Lima; Prof. Dr. Cleide Mara Farias Soares; coorientação [de] Prof. Dr. Denise Santos Ruzene; Prof. Dr. Daniel Pereira Silva – Aracaju: UNIT, 2017.

123 f. il ; 30 cm

Tese (Doutorado em Engenharia de Processos) - Universidade Tiradentes, 2017

Inclui bibliografia.

1. Biomassa. 2. Resíduos lignocelulósicos. 3. Girassol. 4. Enzima. 5. Imobilização I. Vilanova Neta, Jaci Lima. II. Lima, Álvaro Silva. (orient.). III. Soares, Cleide Mara Farias. (orient.). IV. Ruzene, Denise Santos. (coorient.). V. Silva, Daniel Pereira. (coorient.). VI. Universidade Tiradentes. VII. Título.

CDU: 66. 013. 8 :582.998.2

SIB- Sistema Integrado de Bibliotecas

“Desistir... eu já pensei seriamente nisso, mas nunca me levei realmente a sério; é que tem mais chão nos meus olhos do que o cansaço nas minhas pernas, mais esperança nos meus passos do que tristeza nos meus ombros, mais estrada no meu coração do que medo na minha cabeça.”

Cora Coralina

AGRADECIMENTOS

*“Tudo tem seu tempo determinado e há tempo para todo o propósito
debaixo do céu” (Eclesiastes 3:1)*

Desse modo, agradeço, primeiramente, a Deus, por tudo o que ele representa em minha vida; por todas as suas providências ao longo desta caminhada, pela intensidade da sua presença bem como, por dar-me força, saúde, sabedoria, coragem e determinação para superar todos os obstáculos enfrentados e por me fazer vitoriosa nessa tão sonhada etapa que ora se encerra. Toda honra e glória a Ti!

A minha querida mãe Nete, pelo seu apoio irrestrito ao longo de toda a minha vida. Obrigada por acreditar em mim, pelo amor incondicional, pelo carinho, afeto, paciência enfim, o meu sentimento de gratidão é tão grande que não encontro palavras que consigam expressar tamanho sentimento. Tu és a minha fortaleza. Te amo!!!

As minhas irmãs Cris, Ró e Su, pelo amor, atenção, carinho... Obrigada por permanecerem ao meu lado, sempre. Aos meus anjinhos (Wagner Emanuel, João Valentim e Ana Liz) por estarem sempre presentes, apesar da distância. Vocês são, sem dúvida, um dos presentes mais preciosos e importantes em minha vida. Amo muito vocês!

A Fernando pela paciência, amor, confiança, companheirismo e compreensão nas minhas ausências e falhas. Obrigada por estar sempre comigo. Te amo!!!

Aos meus cunhados, à Valdecir, Dal, D. Ana, Sr. Hamilton e D. Neuza.

Aos meus orientadores Dr. Álvaro Silva Lima e Dr.^a Cleide Mara Faria Soares, pela oportunidade de realizar e concluir o doutorado assim como, pela orientação, assistência, contribuição, ensinamentos e, principalmente, pela confiança durante o caminhar dessa jornada.

Aos meus co-orientadores Dr.^a Denise Santos Ruzene e Dr. Daniel Pereira da Silva, com os quais partilhei o que era o broto daquilo que veio a ser esse trabalho. Obrigada pela liberdade e confiança, além da amizade e compreensão nos mais diversos momentos.

À Dr.^a Rita de Cássia, pela grandiosa contribuição nesse trabalho, pela amizade, apoio bem como, pelos inúmeros questionamentos, os quais me despertaram para um mundo totalmente desconhecido. Meus sinceros agradecimentos!

As alunas de iniciação científica Sande e Raira pelo apoio na realização dos experimentos.

Aos amigos do Laboratório de Pesquisa em Alimentos e do Laboratório de Engenharia de Bioprocessos pela contribuição nos trabalhos de laboratório, especialmente a Adriana, Acácia, Acenini, Anderson, Dani, Filipe, Gilderlan, Juliana, Lays, Lídia, Regina, Silvinha e Vanessa.

Aos amigos da pós-graduação pela atenção e carinho, em especial Aline, Ana Cláudia, Ashton, Diego, Fabi, Gláucia, Lays, Marluce e Nayara.

À Ashton e aos agricultores do assentamento Jacaré-Curituba do município de Poço Redondo -SE pela atenção, disponibilidade e pela doação dos caules de girassol utilizados neste trabalho.

Ao Prof. Dr. Edélvio Barros e ao Instituto federal da Bahia pelas análises realizadas.

À Universidade Federal de Sergipe pela disponibilidade do laboratório para realização dos experimentos.

À CAPES pelo suporte financeiro concedido durante todo o período de construção desta tese, bem como ao Instituto de Tecnologia e Pesquisa (ITP) e a Universidade Tiradentes (UNIT) pela infraestrutura da qual pude usufruir durante esse período.

Enfim, considerando esta tese como resultado de uma longa caminhada, agradecer e escolher a quem agradecer não é tarefa fácil, em virtude dos merecedores serem muitos. Assim, para não correr o risco de ser injusta, deixo aqui os meus sinceros agradecimentos a todos que de alguma forma passaram pela minha vida e contribuíram para a construção de quem sou hoje.

Resumo da Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia de Processos da Universidade Tiradentes como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutora em Engenharia de Processos.

UTILIZAÇÃO DE RESÍDUO ORIUNDO DO CULTIVO DO GIRASSOL NA OBTENÇÃO DE SUPORTE LIGNOCELULÓSICO PARA IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS LIPOLÍTICAS

Jaci Lima Vilanova Neta

O objetivo deste trabalho foi avaliar a viabilidade de caule de girassol, biomassa residual oriunda do cultivo de girassol (*Helianthus annuus* L.), *in natura* e pré- tratado, como suporte para imobilização de lipase comercial por adsorção física. Para isto, o resíduo foi inicialmente moído e peneirado até granulometria de 32-60 *mesh*, em seguida realizado pré-tratamentos com NaOH (1 – 4%) em diferentes tempos de reação (1, 2 e 3 h) e com água (auto-hidrólise) em diferentes temperaturas (165, 175 e 185 °C) e tempos de reação (5 – 35 min), a fim de obter a condição otimizada quanto à remoção de hemiceluloses. A máxima remoção de hemiceluloses no tratamento alcalino (70%) ocorreu na condição de 3% (m/v) de NaOH com 1 h de reação e na auto-hidrólise (84%) em 185 °C por 25 min de reação. A caracterização do resíduo foi realizada obtendo como resultado 37,97% de celulose, 15,93% de hemicelulose e 17,83% de lignina. Extrativos e cinzas ficaram em torno de 18% e 4%, respectivamente. Os resultados de biodegradabilidade do resíduo mostraram o potencial deste como suporte alternativo para a imobilização da lipase, uma vez que não sofreu degradação pela enzima. Foi realizado um estudo comparativo em termos de pH, temperatura e estabilidade térmica entre a lipase livre e imobilizada tanto em suporte *in natura* como nos derivados de tratamento alcalino e auto-hidrólise (hidrotérmico). O pH ótimo para a lipase livre e imobilizada nos três suportes foi 7,0, enquanto a temperatura ótima da reação foi 50 °C e 60 °C para a lipase livre e imobilizada em todos os suportes, respectivamente. A estabilidade térmica da enzima imobilizada foi 4,28 (suporte alcalino), 3,62 (suporte hidrotérmico) e 2,20 vezes (suporte *in natura*) maior que a livre, com tempo de meia - vida de 19,95, 16,86 e 10,25 h, respectivamente. Os suportes tratados possibilitaram uma maior reutilização da enzima imobilizada em 6 e 4 vezes, respectivamente para os tratamentos alcalino e hidrotérmico. O valor de $V_{m\acute{a}x}$ e K_m para o biocatalisador imobilizado foi de 625,97 U/g e 284,45 mM, 544,19 U/g e 287,32 mM, 364,74 U/g e 208,64mM nos suportes alcalino, hidrotérmico e *in natura*, respectivamente. Portanto, esses resultados sugerem que os tratamentos aplicados no resíduo tiveram efeito positivo no processo de imobilização da lipase confirmando ser um suporte alternativo de baixo custo e, principalmente, adequado para a imobilização da lipase.

Palavras-chave: biomassa, resíduos lignocelulósicos, girassol, enzima, imobilização.

Abstract of Thesis presented to the Process Engineering Post-Graduate Program of Universidade Tiradentes as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Engineering Process.

USE OF RESIDUE FROM THE SUNFLOWER CULTIVATION
IN OBTAINING LIGNOCELLULOSE SUPPORT FOR
IMMOBILIZATION OF LIPOLYTIC ENZYMES

Jaci Lima Vilanova Neta

The aims of this study was to evaluate the viability of sunflower stalk, residual biomass from the sunflower cultivation (*Helianthus annuus* L.), in natura and pretreated, as support for the immobilization of commercial lipase using physical adsorption immobilization technique. For this, the residue was initially milled and sifted to 32-60 mesh granulometry, followed by pretreatments with NaOH (1 - 4%) in different reaction times (1, 2 and 3 h) and with water (autohydrolysis) at different temperatures (165, 175 and 185 °C) and reaction times (5 - 35 min) in order to obtain the optimized condition for the removal of hemicelluloses. The maximum removal of hemicelluloses in the alkaline treatment (70%) occurred in the condition of 3% (m / v) NaOH with 1 h of reaction and in the autohydrolysis (84%) at 185 °C for 25 min of reaction. The characterization of the residue was performed resulting in 37.97% cellulose, 15.93% hemicellulose and 17.83% lignin. Extracts and ash were around 18% and 4%, respectively. The biodegradability results of the residue showed its potential as an alternative support for lipase immobilization, since it was not degraded by the enzyme. A comparative study was carried out in terms of pH, temperature and thermal stability between free and immobilized lipase both in in natura support, as well as in the alkaline treatment and autohydrolysis (hydrothermal) derivatives. The optimum pH for the free and immobilized lipase in the three supports was 7.0, and the optimum reaction temperature was 50 °C and 60 °C for free lipase and immobilized on all supports, respectively. The thermal stability of the immobilized enzyme was 4.28 (alkaline), 3.62 (hydrothermal) and 2.20 times (in natura) better than free, with a half - life of 19.95, 16.86 and 10.25 h, respectively. The treated supports allowed a greater reuse of the immobilized enzyme, six (alkaline) and four times (hydrothermal). The value of V_{max} and K_m for the immobilized biocatalyst was 625.97 U/g and 284.45 mM, 544.19 U/g and 287.32 mM, 364.74 U/g and 208.64 mM respectively in alkaline, hydrothermal and in natura, respectively. Therefore, these results suggest that the treatments applied in the residue had a positive effect on the lipase immobilization process, confirming that it is an alternative support of low cost and, especially, suitable for lipase immobilization.

Keywords: lignocellulosic materials, biomass, immobilization, enzyme, sunflower.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE TABELAS	xii
Capítulo 1.....	13
1. INTRODUÇÃO	13
Capítulo 2.....	15
2. OBJETIVO GERAL	15
2.1 – Objetivos Específicos	15
Capítulo 3.....	16
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
3.1 - Biorrefinaria	16
3.2– Resíduos Lignocelulósicos	19
3.2.1 - Girassol	20
3.3 - Composição Química dos Resíduos Lignocelulósicos	23
3.3.1 – Celulose	25
3.3.2 – Hemicelulose	27
3.3.3 – Lignina	29
3.4 – Tratamentos	31
3.4.1 – Tratamento Biológico	33
3.4.2 – Tratamento Físico	34
3.4.3 – Tratamento Físico-Químico.....	34
3.4.3.1 – Auto-hidrólise	35
3.4.3.2 – Explosão por Amônia (AFEX).....	36
3.4.3.3 – Explosão a CO ₂	36
3.4.3.4 – Percolação com Reciclo da Amônia (ARP)	36
3.4.4 – Tratamento Químico.....	36
3.4.4.1 – Alcalino.....	37
3.4.4.2 – Ácido.....	38
3.5 – Suportes para Imobilização de Enzimas	40
3.5.1 – Tipos de Suporte.....	43
3.6 – Imobilização de Enzimas	46
3.7 – Métodos de Imobilização	48
3.7.1 – Adsorção	50
3.7.2 – Ligação Covalente.....	51
Capítulo 4.....	53
4. ARTIGOS E PATENTES	53
4.1. Artigo 01	54
4.2. Artigo 02.....	74
4.3. Artigo 03.....	91
4.4. Patente 01	118
4.4. Patente 02	136
4.4. Patente 03	156

<i>Capítulo 5</i>	<i>164</i>
5. CONCLUSÕES	164
<i>Capítulo 6</i>	<i>165</i>
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	165

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura 3.1 - Vias potenciais da biorrefinaria baseada em insumos lipídicos.....</i>	<i>17</i>
<i>Figura 3.2 - Vias potenciais da biorrefinaria baseada em insumos lignocelulósicos.....</i>	<i>18</i>
<i>Figura 3.3 - Vias potenciais da biorrefinaria baseada em amido e açúcares.....</i>	<i>19</i>
<i>Figura 3.4 - Inluorescência, flores e aquênios do girassol (Castro et al., 1997).....</i>	<i>21</i>
<i>Figura 3.5 - Principais países produtores de girassol do mundo 2002 – 2014.....</i>	<i>22</i>
<i>Figura 3.6 - Esquema da estrutura da biomassa lignocelulósica.</i>	<i>24</i>
<i>Figura 3.7 - Estrutura da celulose, parte central da cadeia molecular.</i>	<i>26</i>
<i>Figura 3.8 - Estrutura dos monossacarídeos que formam as hemiceluloses.</i>	<i>27</i>
<i>Figura 3.9 – Produtos potenciais obtidos das hemiceluloses.....</i>	<i>29</i>
<i>Figura 3.10 – Principais precursores da biossíntese da lignina e suas estruturas correspondentes.....</i>	<i>30</i>
<i>Figura 3.11 - Esquema de tratamento em material lignocelulósico.....</i>	<i>32</i>
<i>Figura 3.12 - Representação esquemática do tratamento e possíveis componentes tóxicos gerados.</i>	<i>33</i>
<i>Figura 3.13 - Saponificação do complexo lignina-carboidratos com base.....</i>	<i>37</i>
<i>Figura 3.14 - Reações que ocorrem durante a hidrólise de materiais lignocelulósicos.</i>	<i>39</i>
<i>Figura 3.15 - Propriedades da enzima e do suporte que determinam as.....</i>	<i>42</i>
<i>Figura 3.16 - Diferentes métodos para imobilização de enzimas.</i>	<i>49</i>
<i>Figura 3.17 - Adsorção de enzimas num suporte por ligação iônica.....</i>	<i>50</i>
<i>Figura 3.18 - Imobilização por meio de ligação covalente: A – por meio de braço espaçador; B - Ligação Multipontual.</i>	<i>51</i>
 Artigo 1	
<i>Figure 4.1 - Percentage of hemicelluloses removed after pretreatment of autohydrolysis at 165, 175 and 185 °C, in function of different times.....</i>	<i>61</i>
<i>Figure 4.2 - Percentage of cellulose removed after pretreatment of autohydrolysis at.....</i>	<i>63</i>

Figure 4.3 - Scanning electron micrographs of the in natura sunflower stalk (A and B) and after autohydrolysis (C and D) pretreatment (magnitude 500X).....	63
Figure 4.4 - Diffractograms for the sunflower stalk in natura (a) and pretreated (b).....	64
Figure 4.5 - TGA curves obtained for sunflower stalk in natura (a) and after autohydrolysis pretreatment (b) at 10 °C/min.....	66
Figure 4.6 - Infrared analysis of sunflower stalk after (a) and before pretreatment (b).....	67

Artigo 2

Figure 4.7 - Percentage hemicellulose and cellulose removed after alkaline extraction treatment at 55 °C for 1, 2 and 3 h at different NaOH concentrations.....	80
Figure 4.8 - Scanning electron micrographs of the in natura sunflower stalk (A e B) and after alkaline extraction (C e D) pretreatment (magnitude 500X).....	82
Figure 4.9 - Diffractograms for the sunflower stalk in natura (a) and treated (b).....	83
Figure 4.10 - Thermogravimetric (TG) and differential thermogravimetric (DTG) curves obtained for in natura sunflower stalk and after alkaline extraction process at 10 °C/min.....	84
Figure 4.11 - FTIR spectra of in natura (a) and pretreated (b) sunflower stalk.....	85

Artigo 3

Figure 4.12 - Scanning electron microscopy of sunflower stalk before pretreatments (A) and after pretreatments: autohydrolysis (B) and alkaline extraction (C) (magnitude 2kx).....	99
Figure 4.13 - Relative activity of the immobilized enzyme as a function of the ratio obtained of enzyme/support (m/m) after immobilization of lipase on different supports based on sunflower stalk: in natura, treated by alkaline extraction and autohydrolysis.....	100
Figure 4.14 - Effect of pH (A) and temperature (B) in the relative activity of free enzyme and immobilized on the sunflower stalk: in natura and treated (alkaline and autohydrolysis).....	102
Figure 4.15 - Thermal stability at 60 °C of free enzyme and immobilized on the in natura sunflower stalk and treated by extraction alkaline and autohydrolysis as function of temperature at pH 7, reaction time 10min.....	103
Figure 4.16 - Operational stability of immobilized lipase on the in natura sunflower stalk and treated by extraction alkaline and autohydrolysis, reaction time 10min.....	105
Figure 4.17 - FTIR of the different sunflower stalk supports: (a) in natura (untreated); (b) autohydrolysis and (c) alkaline extraction.....	108

LISTA DE TABELAS

<i>Tabela 3.1 - Percentual dos componentes lignocelulósicos em algumas biomassas.....</i>	<i>25</i>
<i>Tabela 3.2 - Suportes frequentemente usados para imobilização.</i>	<i>41</i>
<i>Tabela 3.3 - Materiais inorgânicos usados para imobilização de enzimas, suas propriedades e as enzimas imobilizadas.</i>	<i>44</i>
<i>Tabela 3.4 - Matrizes de resíduos lignocelulósicos usados para imobilização de enzimas, técnica e enzima utilizada.</i>	<i>45</i>
<i>Tabela 3.5 - Comparação dos diferentes métodos de imobilização.</i>	<i>49</i>
 Artigo 1	
<i>Table 4.1 - Chemical composition pf the sunflower stalk.</i>	<i>59</i>
<i>Table 4.2 Yield, pH and severity factor values obtained in diferents conditions of autohydrolysis pretreatments.</i>	<i>60</i>
<i>Table 4.3 - Crystallinity indexes (CrI) of in natura sunflower stalk and pretreated.</i>	<i>64</i>
 Artigo 2	
<i>Table 4.4 - Experimental design and yield dos of the alkaline pre-treatment at 55 °C</i>	<i>79</i>
 Artigo 3	
<i>Table 4.5 - Quantification of chemical constituents of in natura and treated sunflower stalk... </i>	<i>98</i>
<i>Table 4.6 - Constant values of thermal inactivation (K_d) and half-life time $t_{(1/2)}$ of the free and immobilized enzyme.....</i>	<i>104</i>
<i>Table 4.7 - Kinetic parameters (V_{max} and K_m) of free and immobilized enzyme.....</i>	<i>107</i>
<i>Table 4.8 - Assignments of FTIR absorption bands for sunflower stalk sample.....</i>	<i>109</i>

1. INTRODUÇÃO

As biorrefinarias são instalações que integram processos e equipamentos de conversão de biomassa para produzir combustíveis, energia, produtos químicos de valor agregado e outros produtos essenciais para a manutenção da qualidade de vida moderna. Para isso, se aplicam tecnologias híbridas de diferentes áreas, incluindo a química do polímero, bioengenharia e agricultura, em busca do melhor aproveitamento da biomassa e da energia nela contida, resultando em pouco ou nenhum desperdício.

Nesse sentido, essas instalações têm atraído interesse nos últimos anos, devido, principalmente, à crescente crise energética e aos processos de eutrofização ambiental gerados pelos diferentes segmentos industriais. Na prática, pode-se citar como exemplos de biorrefinarias, que já funcionam, as usinas produtoras de açúcar, etanol e bioeletricidade, a partir da cana-de-açúcar, e as fábricas de óleo, rações, biodiesel, que utilizam a soja.

Logo, com as novas tendências de pesquisa para obtenção de produtos de base biológica/natural destacam-se as pesquisas voltadas ao desenvolvimento de produtos químicos e processos a partir do processamento do material lignocelulósico constituinte das plantas – a biomassa oriunda de resíduos agrícolas ou agroindustriais.

A biomassa de resíduo lignocelulósico é a mais abundante no mundo e apresenta um enorme potencial para a obtenção de produtos de interesse industrial uma vez que, além de não concorrer com fontes de alimentos, a substituição de produtos químicos derivados de petróleo por derivados de biomassa desempenhará um papel chave na sustentação e crescimento da indústria química. No entanto, visando melhor aproveitamento de suas frações lignocelulósicas, tornam-se necessários pré-tratamentos que causem desorganização no complexo lignocelulósico, propiciando deste modo seu fracionamento e extração para usos diversos, de modo conjunto ou em separado.

Assim, relacionando com o âmbito desse trabalho, o material lignocelulósico avaliado como suporte para imobilização de enzima nessa pesquisa provém dos resíduos do cultivo do girassol (*Helianthus annuus* L.), quarta cultura oleaginosa mais importante do mundo com produção mundial em 2016 de 40 milhões de toneladas de grãos (USDA, 2017). A produção de girassol no Brasil em 2016 foi de aproximadamente 62 mil toneladas, sendo a região nordeste responsável por 0,2 mil toneladas porém com perspectivas de aumento. A produção reduzida no Nordeste brasileiro explica-se pelo fato dessa cultura ainda ser considerada nesta região como cultura de safrinha.

Quanto à produção de biomassa residual relacionado ao cultivo de girassol, estima-se que para cada hectare de girassol cultivado sejam produzidas 3-7 toneladas de biomassa seca, o que pode ser considerado promissor, visto que a palha de milho e de trigo geram 8,4 e 6,0 t/ha respectivamente. Contudo, apesar de ser um resíduo abundante, há poucos relatos de sua utilização de forma alternativa.

Assim, em virtude da busca por suportes alternativos de baixo custo para imobilização de enzimas, o resíduo de girassol se destaca como alternativa aos suportes comerciais de alto custo visto a sua disponibilidade e, principalmente, o seu potencial de aplicação como matriz de imobilização. Na literatura é possível encontrar bons resultados com alguns resíduos lignocelulósicos para a imobilização de enzimas tais como: celulignina de madeira, fibra de coco verde, grãos processados, palha de arroz, caule de milho e de algodão; cujo resultados mostraram que esses resíduos são adequados e eficientes para a imobilização de enzimas.

Desse modo, como não há relatos na literatura da utilização do resíduo de girassol para tal finalidade, o seu uso como suporte além de fornecer um destino nobre ao resíduo que seria descartado, também ajudará a resolver alguns problemas enfrentados pelas indústrias que utilizam enzimas livres como catalisadores. Estes problemas vão desde custo elevado das enzimas até a fraca estabilidade e não reutilização das mesmas que acabam por inviabilizar alguns processos.

Nesse sentido, a imobilização de enzimas tende a viabilizar esses processos, tornando-os economicamente viáveis por intermédio de melhoras nos parâmetros como atividade e estabilidade, bem como possibilidade de sua recuperação e reutilização.

Portanto, o objetivo desse trabalho está centrado na utilização da biomassa de resíduo de girassol, *in natura* e/ou pré-tratado, como suporte para a imobilização de lipase de *Burkholderia cepacia* por técnica de adsorção física, avaliando as diferentes implicações dos tratamentos sobre os suportes e seus efeitos na imobilização.

2. OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar o resíduo lignocelulósico oriundo do cultivo de girassol, *in natura* e/ou pré-tratado, como suporte para a imobilização de lipase comercial de *Burkholderia cepacia*.

2.1 – Objetivos Específicos

Os objetivos específicos desenvolvidos neste trabalho foram:

- Caracterizar o resíduo de caule do girassol, *in natura* e pré-tratado, quanto ao seu perfil lignocelulósico;
- Pré-tratar o caule do girassol por processo de extração alcalina (tratamento do material lignocelulósico com hidróxido de sódio) em diferentes concentrações e tempos de reação;
- Pré-tratar o caule do girassol por processo de auto-hidrólise (tratamento do material lignocelulósico com água) em elevadas temperaturas e em diferentes tempos;
- Verificar a capacidade dos resíduos, *in natura* e pré-tratados, como suporte para imobilização da enzima lipase de *Burkholderia cepacia* comercial por técnica de adsorção física;
- Caracterizar morfológicamente (Microscopia Eletrônica de Varredura, Termogravimetria e Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier) o resíduo *in natura* e pré-tratado e o biocatalisador imobilizado;
- Caracterizar bioquimicamente (pH, temperatura, estabilidade térmica e operacional, parâmetros cinéticos K_m e $V_{máx}$) a lipase imobilizada comparando-a com a forma livre.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Nesta secção serão apresentados os tópicos referentes às biorrefinarias, aos resíduos lignocelulósicos, a imobilização de enzimas em suportes lignocelulósicos, bem como os tipos de técnicas de imobilização utilizados.

3.1 - Biorrefinaria

O uso de recursos fósseis impulsionou o desenvolvimento de um parque industrial capaz de ofertar energia e produtos que estão presentes em todos os níveis da cadeia produtiva. Contudo, em função dessa dependência, o desempenho da economia se tornou extremamente sensível a toda e qualquer mudança em sua qualidade, preço ou demanda (PEREIRA JÚNIOR, 2010; ZHAO *et al.*, 2012). Além disso, o contínuo uso desta fonte não renovável acabou gerando uma crise mundial de combustíveis e produtos derivados desses tipos de recursos, quer a partir do carvão, das refinarias de petróleo ou do gás natural (GOLDEMBERG, 2008; CHERUBINI *et al.*, 2010).

Desse modo, as preocupações quanto à limitação dos recursos fósseis, os problemas ambientais e de sustentabilidade em geral, têm motivado o desenvolvimento de processos químicos e biotecnológicos mais eficientes bem como ferramentas que suportem a concepção de alternativas mais sustentáveis. Com esta mudança de paradigma, a consciência de sustentabilidade ambiental tem se disseminado globalmente em diversos setores industriais, propiciando à biomassa destaque como matéria-prima renovável para obtenção de diversos produtos tais como: combustíveis, produtos químicos, polímeros e materiais de base biológica (CHEALI *et al.*, 2015; KHOO *et al.*, 2016; BUDZIANOWSKI & POSTAWA, 2016).

Assim, as biorrefinarias, conceito nascido no final dos anos 1990, despontam como alternativa promissora para garantir o sistema energético e químico não só devido à escassez dos combustíveis fósseis, mas também, pelo aumento na tendência de uso da biomassa como matéria-prima renovável para obtenção de bioprodutos não alimentares (GOLDEMBERG, 2008; VANHAVEREN *et al.*, 2008; CHERUBINI *et al.*, 2010; MAITY, 2015; SHARMA *et al.*, 2015).

Logo, o desenvolvimento e a implementação de processos de biorrefinaria torna-se extremamente importante no sentido de se obter uma tecnologia sustentável baseada em recursos naturais (MENON & RAO, 2012; LIU *et al.*, 2012; HASUNUMA *et al.*, 2013)

considerando que, além de aumentar as possibilidades de diversificação e descentralização do abastecimento de energia e incentivar a auto-suficiência energética a nível local e nacional, também trará benefícios socioeconômicos para toda a cadeia produtiva da biomassa visto a diversificação da economia e a geração de empregos nas áreas rurais (RAMBO *et al.*, 2015; BUDZIANOWSKI & POSTAWA, 2016).

Na literatura é possível encontrar diferentes categorias de biorrefinarias, no entanto a classificação destas são altamente discutidas e depende largamente da tecnologia de conversão de biomassa utilizada para obtenção de bioprodutos por meio de diferentes plataformas. Desse modo, apesar das diferentes categorias encontradas na literatura, Thomas & Octave (2009) e Maity (2015) definem-a como uma estrutura baseada na natureza química da biomassa, classificando-as em: *lignocellulosic biorefinery* (lignocelulósicos); *sugar biorefinery* (carboidratos) e *lipids biorefinery* (lipídeos) (Figura 3.1 – Figura 3.3).

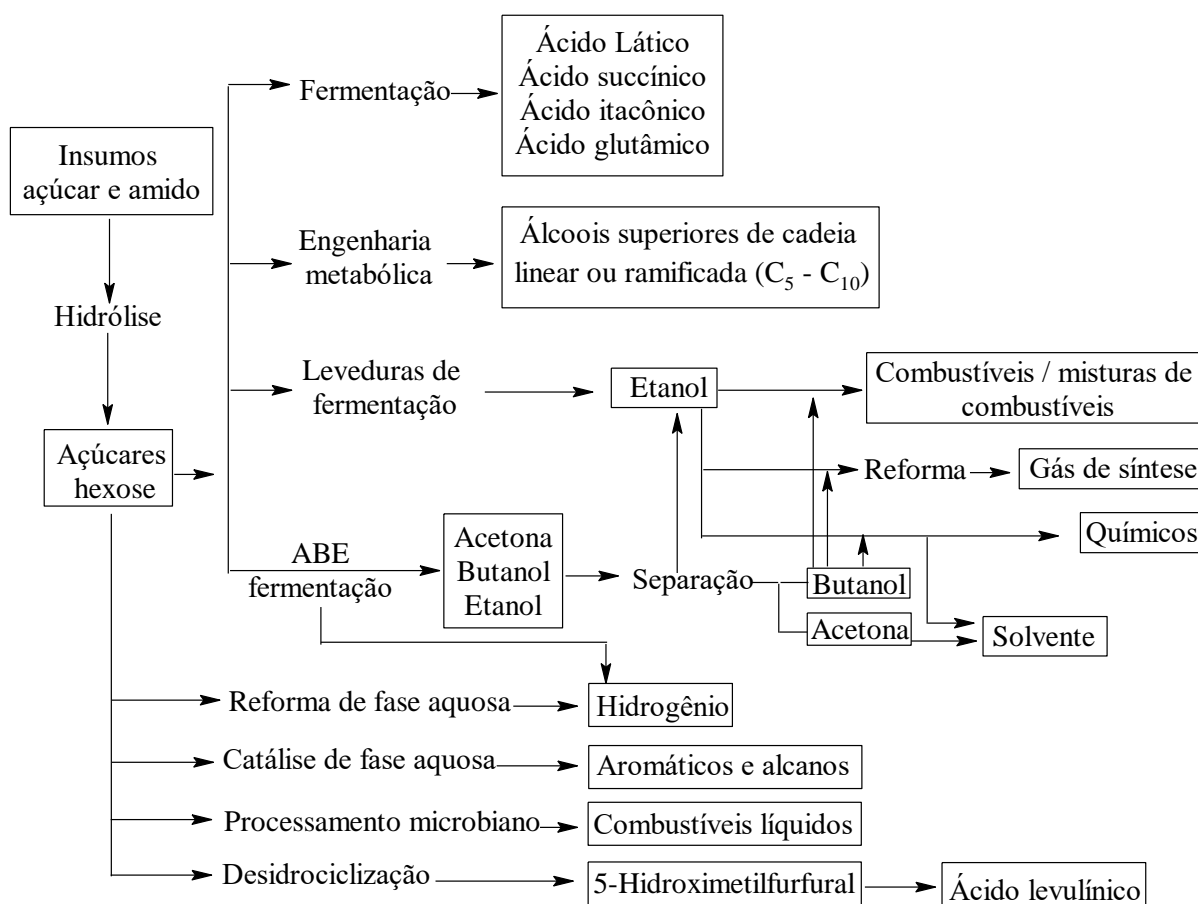


Figura 3.1 - Vias potenciais da biorrefinaria baseada em insumos lipídicos. Adaptado de Maity (2015).

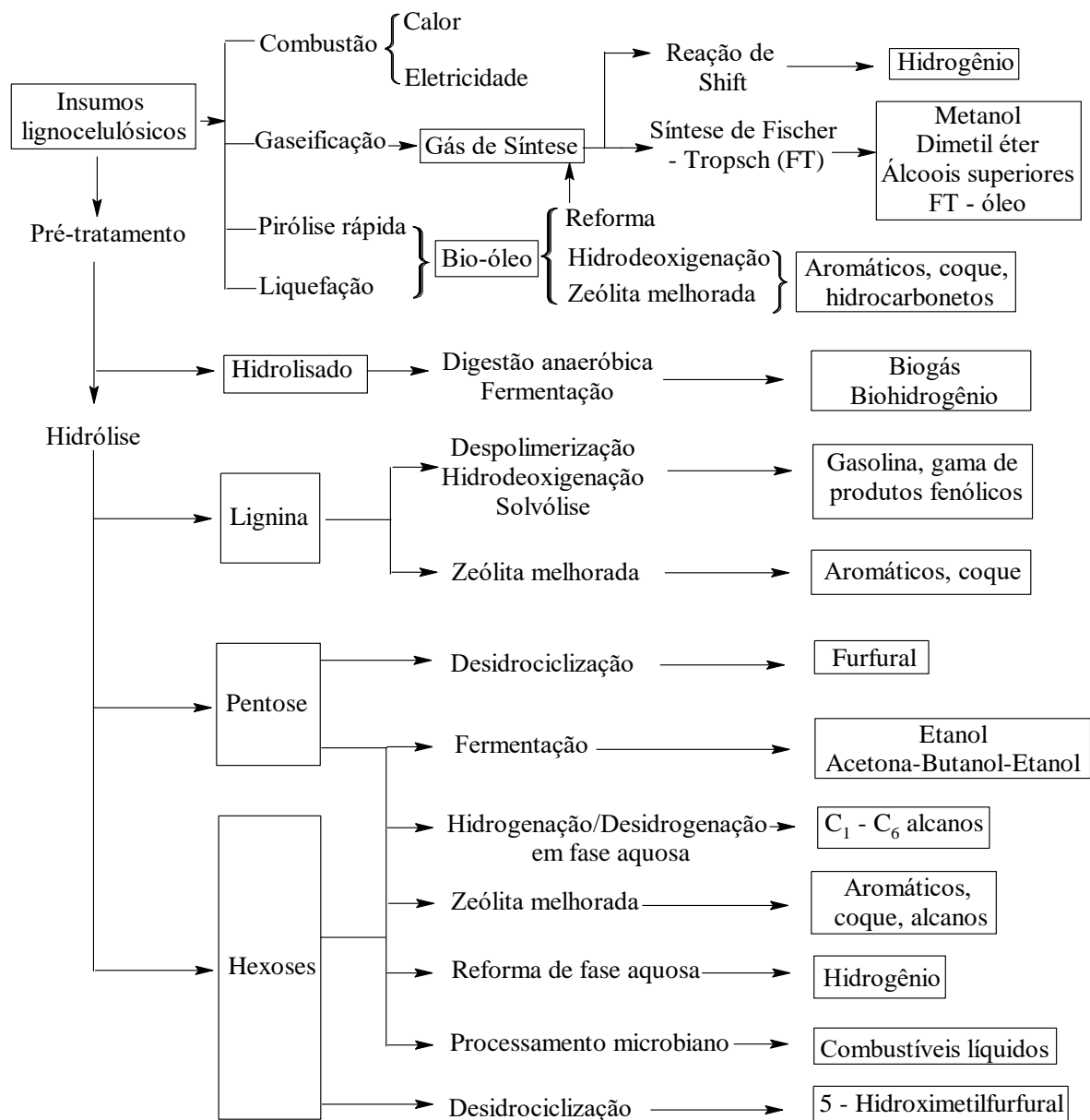


Figura 3.2 - Vias potenciais da biorrefinaria baseada em insumos lignocelulósicos. Adaptado de Maity (2015).

Nesta abordagem, com a abundância de resíduos de biomassa disponível gerados pelos sistemas agrícolas ou agroindustriais, o desenvolvimento de novas tecnologias e técnicas eficientes para o fracionamento da biomassa lignocelulósica em seus componentes básicos representa uma importante oportunidade de utilizar plenamente os recursos naturais disponíveis. Este fato beneficiará não só a pesquisa sobre a produção de açúcares específicos derivados da biomassa mas também, e de modo específico, sua utilização como suporte para imobilização de enzimas como uma alternativa de baixo custo e facilmente disponível para a imobilização e posterior utilização em larga escala em enzimas disponíveis no mercado.

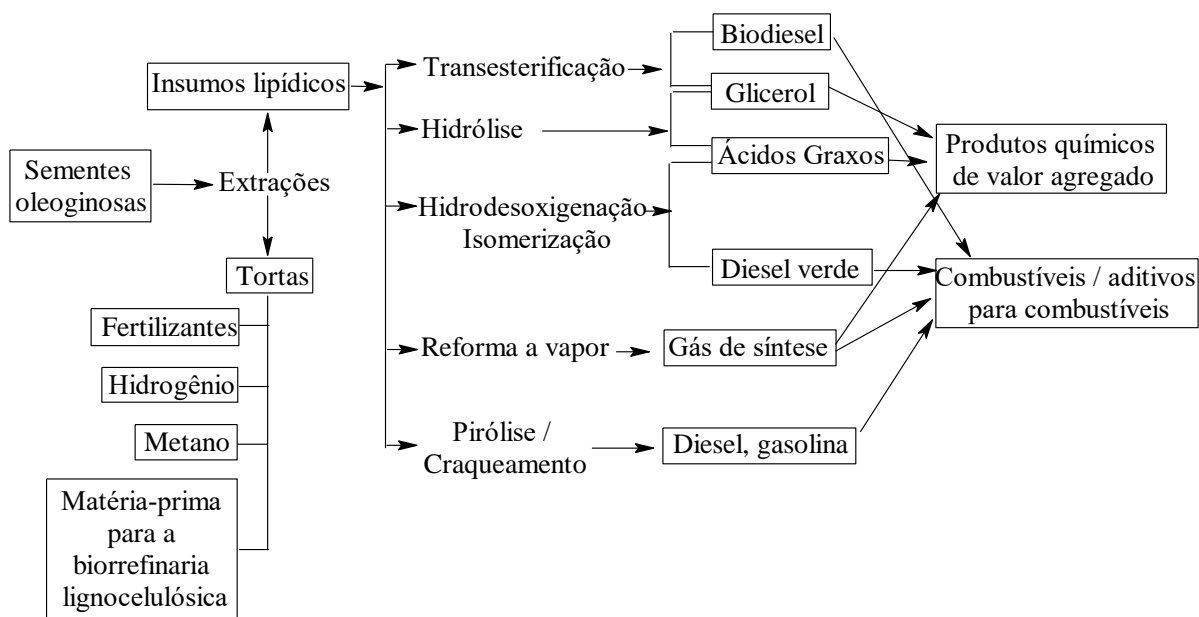


Figura 3.3 - Vias potenciais da biorrefinaria baseada em amido e açúcares. Adaptado de Maity (2015).

3.2– Resíduos Lignocelulósicos

Embora a biomassa lignocelulósica venha sendo considerada como matéria-prima alternativa para a indústria química e de energia desde o final da década de 70. Atualmente, em virtude da evolução econômica recente em muitos países e das crises ambientais, surgiu um interesse renovado da indústria, das universidades e do governo por pesquisas relacionadas à sua aplicação (DONALDSON *et al.*, 2012; MOOD *et al.*, 2013). Esse interesse tem crescido, também, em função dessa biomassa ser abundante, de baixo custo, promissora como recurso natural e renovável, além de não competir diretamente com a produção de alimentos e, principalmente, por ser essencial para o funcionamento das sociedades industriais modernas (ANWAR *et al.*, 2014; SAWATDENARUNAT *et al.*, 2015).

Nesse âmbito, pesquisas voltadas para o uso efetivo de fontes de biomassa, particularmente de materiais lignocelulósicos (biomassa vegetal predominantemente compostas de celulose, hemicelulose e lignina), para aplicações em grande escala estão evoluindo (FITZPATRICK *et al.*, 2010; ABDULKHANI *et al.*, 2013; KIM *et al.*, 2014) e ferramentas biotecnológicas têm sido desenvolvidas com o intuito de ampliar a gama de biorecursos naturais utilizáveis, reduzir os custos de conversão e melhorar o rendimento alvo do produto de interesse (ANWAR *et al.*, 2014; DIEP *et al.*, 2015).

Exemplos disso são as novas pesquisas relacionadas ao uso desses resíduos como suportes para imobilização de enzimas. É possível encontrar na literatura, estudos bem

sucedidos de diferentes lipases imobilizadas em resíduos oriundos do coco (Brígida *et al.*, 2008; Bezerra *et al.*, 2015), palha de arroz (Costa-Silva *et al.*, 2016), caule de milho (Lv *et al.*, 2013), grãos já processados (Pospiskova & Safarik, 2013), bagaço de caju (Souza *et al.*, 2016), celulignina (Gomes *et al.*, 2006), entre outros. Esses estudos mostraram que esses resíduos podem ser uma alternativa interessante para imobilização, uma vez que existem em abundância no Brasil como rejeito de diversas indústrias tais como a sucroalcooleira e a de sucos.

Desta forma, os resíduos oriundos do cultivo do girassol (*Helianthus annuus* L.) são exemplos notáveis de resíduos agrícola carente de usos alternativos (DÍAZ *et al.*, 2011; RUIZ *et al.*, 2013); pois, enquanto as sementes de girassol representam a quarta fonte de óleo vegetal do mundo, o capítulo, o caule e a folha permanecem inutilizados após a colheita gerando um enorme impacto ambiental de 3-7 toneladas de biomassa seca por hectare (ZIEBELL *et al.*, 2013; ANTONOPOULOU *et al.*, 2015; FORTUNATI *et al.*, 2016). Por estas razões, uma das tendências atuais é na utilização e revalorização destes resíduos gerados após a colheita do girassol, visto o potencial desta matéria-prima sustentável para a produção de biocombustíveis de segunda geração ou bioquímicos em um conceito de biorrefinaria.

3.2.1 - Girassol

O girassol (*Helianthus annuus* L.), planta da família das Compositae (*Asteraceae*) pertencente ao gênero *Helianthus*, é uma cultura anual, tendo uma grande inflorescência amarela do tipo capítulo, com formação plana, convexa ou côncava, contendo pequenas flores. As flores do disco dão origem aos frutos, chamados aquênios, os quais contêm um núcleo rico em óleo, enquanto as flores do raio são estéreis e servem para atrair insetos polinizadores em particular as abelhas (Figura 3.4) (CASTRO *et al.*, 1997; SALAS *et al.*, 2014).

Suas sementes contêm cerca de 39-49% de óleo de alto valor nutricional o qual consiste em mais de 90% de ácido oléico e linoléico e cerca de 24-28% de proteína. Estas sementes são ricas, também, em vitaminas, nutrientes e minerais, tais como cálcio, ferro, manganês, zinco, magnésio e selênio. Contudo, elas tendem a acumular elementos tóxicos como o cádmio, o chumbo e o mercúrio (TOMAS *et al.*, 2015).

Atualmente, é a quarta maior fonte de óleo vegetal do mundo (depois da palma, soja e canola) e desponta como uma oleaginosa competitiva no atual contexto de sustentabilidade, visto ser considerado como uma colheita de energia, portanto, um importante produto agrícola (SALAS *et al.*, 2014; JOCIC *et al.*, 2015).

Seu curto período de crescimento (90 – 130 dias) tende a maximizar o rendimento de biomassa em uma enorme diversidade de ambientes e minimizar a necessidade de irrigação,

tornando-a uma cultura potencial para regiões com pouca disponibilidade de água (ALARU *et al.*, 2011; TOLK & HOWELL, 2012; SALAS *et al.*, 2014). Além disso, por ser uma cultura de raízes profundas, ele consegue absorver tanto a água mais disponível no solo quanto aquela encontrada em maior profundidade, quando em comparação as culturas como o sorgo sacarino, o que o torna mais tolerante a curtos períodos de estresse hídrico (TOLK & HOWELL, 2012; SALAS *et al.*, 2014).

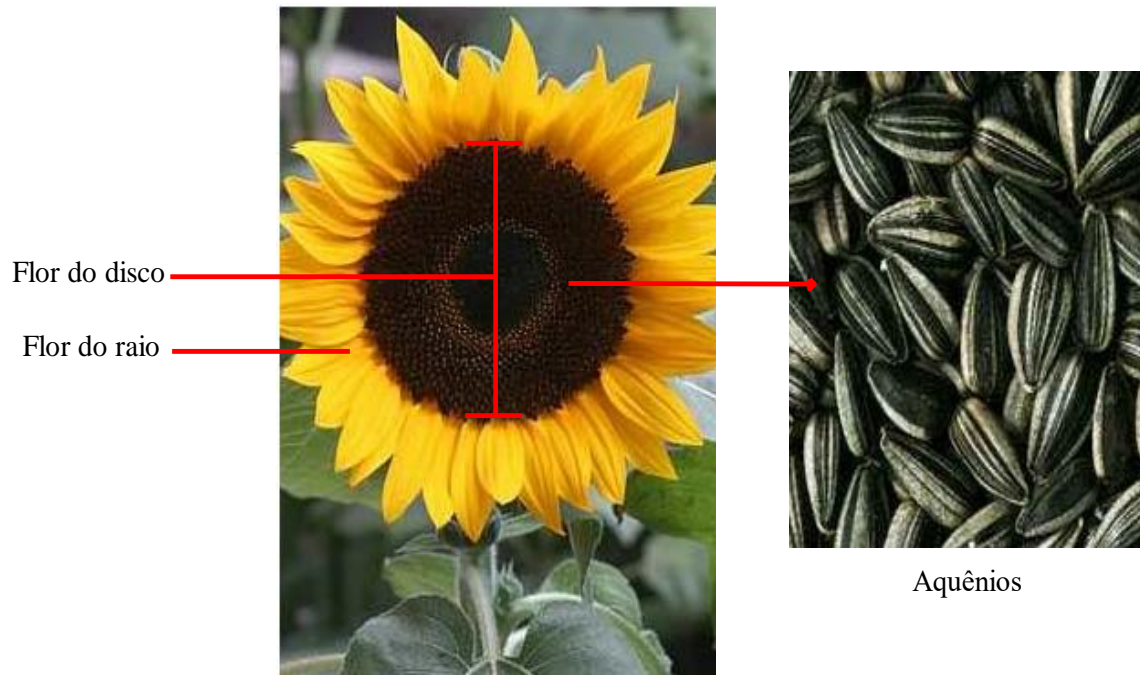


Figura 3.4 - Inflorescência, flores e aquênios do girassol (Castro *et al.*, 1997).

O girassol foi domesticado e cultivado, inicialmente, por nativos da América do Norte e Central, e foi introduzida na Europa por exploradores espanhóis no século XVI, sendo o seu cultivo propagado para os outros continentes nos séculos XIX e XX. No Brasil, os primeiros registros de cultivo comercial do girassol são do início do século XX, no estado de São Paulo (DALL'AGNOL *et al.*, 2005).

Segundo dados da *United States Department of Agriculture* (USDA, 2017), em 2016 foram cultivados 23,25 milhões de hectares e produzidos cerca de 40 milhões de toneladas de grãos de girassol no mundo. Desta produção, aproximadamente 80% ocorreram na Ucrânia, União Européia, Rússia, Argentina e Turquia, deixando evidente sua importância no setor do agronegócio mundial. Na Figura 3.5, é possível verificar a produção dos principais países no período de 2002 a 2014.

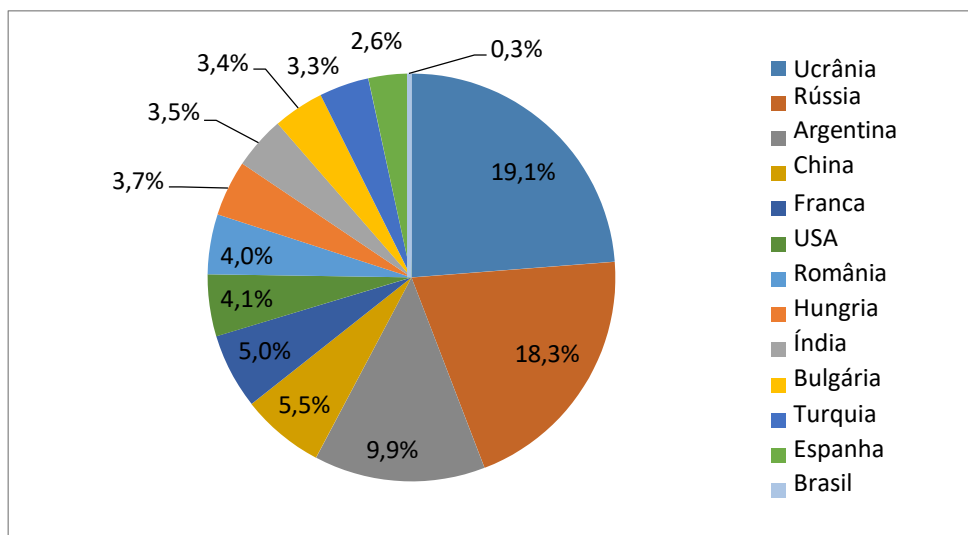


Figura 3.5 - Principais países produtores de girassol do mundo no período de 2002 – 2014.

Fonte: FAOSTAT, 2016.

No Brasil, o girassol é ainda caracterizado como cultura de safrinha, plantio realizado na entressafra, a sua produção varia bastante tanto em relação a área quanto a quantidade e, ainda, não se estabeleceu claramente dentro das estratégias de produção agrícola dos agronegócios (LAZZAROTTO *et al.*, 2005). De acordo com Feoli & Ingaramo (2015), nos últimos anos a área de girassol plantada no Brasil foi de apenas de 0,15% de toda a área agrícola, enquanto que a de soja, por exemplo, foi de 19,2%. Logo, tem-se como resultado uma produção de girassol pequena, a qual muitas vezes não é suficiente para atender nem a demanda interna de óleo comestível, tampouco a produção de biodiesel (CARVALHO *et al.*, 2015).

De acordo com a CONAB (2016), a produção nacional prevista para a safra 2016/17, por motivos políticos, de mercado e/ou climáticos, deve ficar em torno de 70 mil toneladas com produtividade média de 1.379 kg/ha. Uma queda de 13% com relação à safra 2015/2016; sendo as regiões Centro-Oeste e Sul ainda as principais regiões produtoras no país, porém com cultivos ocorrendo também nas regiões Sudeste e Nordeste (BRASIL, 2012).

A expansão dessa cultura na região Nordeste sempre teve o entrave do girassol, originalmente, ser uma cultura de clima temperado (temperatura entre 20 e 25 °C). Contudo, devido ao melhoramento genético, existem cultivares geneticamente bem adaptadas a regiões quentes permitindo a expansão do cultivo de girassol para as mais diferentes regiões do Nordeste brasileiro (OLIVEIRA *et al.*, 2008). Alguns estudos têm evidenciado o potencial dessa região para o cultivo do girassol visto que em áreas experimentais o rendimento médio superou os 2.000 kg/ha.

Oliveira *et al.* (2008) avaliaram o desempenho produtivo de cultivares de girassol no estado de Sergipe, mais especificamente nos municípios de Carira, Frei Paulo, Nossa Senhora das Dores e Simão Dias, nos anos agrícolas de 2006 e 2007, e concluíram que a produtividade média nesses municípios superou facilmente a média nacional. A produtividade média do agreste sergipano ficou acima dos 2.500 kg/ha, revelando o alto potencial dessa região para a plantio de girassol, podendo se estabelecer como uma nova fronteira agrícola para a produção no estado. Do mesmo modo, Carvalho *et al.* (2015) estudaram o comportamento de cultivares de girassol em consorciação com o feijoeiro comum no município de Frei de Paulo nos anos de 2008, 2009 e 2010 e também observaram produtividade acima de 2.000 kg/ha.

Embora a sua utilização como matéria-prima para diferentes aplicações há relativamente poucos estudos para a destinação proposta neste trabalho. O girassol é utilizado, principalmente, para a produção de óleo a partir das sementes sendo que 90% da produção total do óleo de girassol é para consumo humano e apenas 10% para a indústria de biocombustíveis, bio-lubrificantes, detergentes e cosméticos (FOLLAIN *et al.*, 2015; JOCIC *et al.*, 2015). Os subprodutos obtidos durante a produção do óleo são valorizados somente na alimentação animal enquanto que o resto da planta (caule, folha e capítulo) não tem uso industrial real (FOLLAIN *et al.*, 2015).

Há na literatura relatos sobre a utilização de resíduos do cultivo de girassol, porém a maioria está focado na produção de energia (SHARMA *et al.*, 2004; TELLI-OKUR & EKEN-SARAÇOGLU, 2008; SHARMA *et al.*, 2002; ANTONOPOULOU *et al.*, 2015); na fabricação de papel (RUDI *et al.*, 2016) e obtenção de nanocristais e nanofibrilas de celulose (FORTUNATI *et al.*, 2016). Contudo, embora alguns estudos mostrem que a biomassa lignocelulósica é uma fonte adequada para matrizes de imobilização (D'SOUZA e GODBOLE, 2002; BRÍGIDA *et al.*, 2008; CRISTOVÃO *et al.*, 2011; SOUZA *et al.*, 2016) não foram encontrados relatos de aplicação de resíduos do cultivo de girassol para tal finalidade.

3.3 - Composição Química dos Resíduos Lignocelulósicos

Os compostos orgânicos denominados de lignocelulósicos compreendem os biomaterias mais abundantes da biosfera e representam uma importante fonte de energia limpa, renovável e de carbono para os biocombustíveis, materiais e bioquímicos. De forma geral, a biomassa é um recurso barato com rendimento anual (global) de mais de 200 bilhões de toneladas secas por ano e são gerados em grande concentração por meio de produtos agrícolas, florestais, frutas e operação de processamento vegetal como lixo residual (BEHERA *et al.*, 2014; GUAN *et al.*,

2015, SAWATDEENARUNAT *et al.*, 2015).

Além disso, resíduos lignocelulósicos têm sido considerados como matéria-prima chave para os processos industriais previstos em uma futura bioeconomia visto que, compósitos à base de polímeros biodregradáveis e de biomassa, são uma alternativa aos derivados fósseis (HEGGSET *et al.*, 2016; SPIRIDON *et al.*, 2016). É composta, predominantemente, por celulose (25–55%), hemiceluloses (11–50%) e lignina (10–40%), e a soma destes corresponde a cerca de 80% do peso total do material. Estes três polímeros estão estreitamente relacionados uns com os outros, formando uma fibra coesa altamente resistente à tração e rigidez, chamada lignocelulose, e constituem as paredes celulares de plantas (SAWATDEENARUNAT *et al.*, 2015; YABUSHITA, 2016). As moléculas de celulose se organizam de forma regular, em feixes, formando um quadro de microfibrilas de celulose, que realizam uma função semelhante a de um vidro ou fibras de carbono em compósitos artificiais; as hemiceluloses e a lignina revestem esta estrutura e são unidas à celulose via ligações de hidrogênio (Figura 3.6) (GOMEZ *et al.*, 2008; SAWATDEENARUNAT *et al.*, 2015).

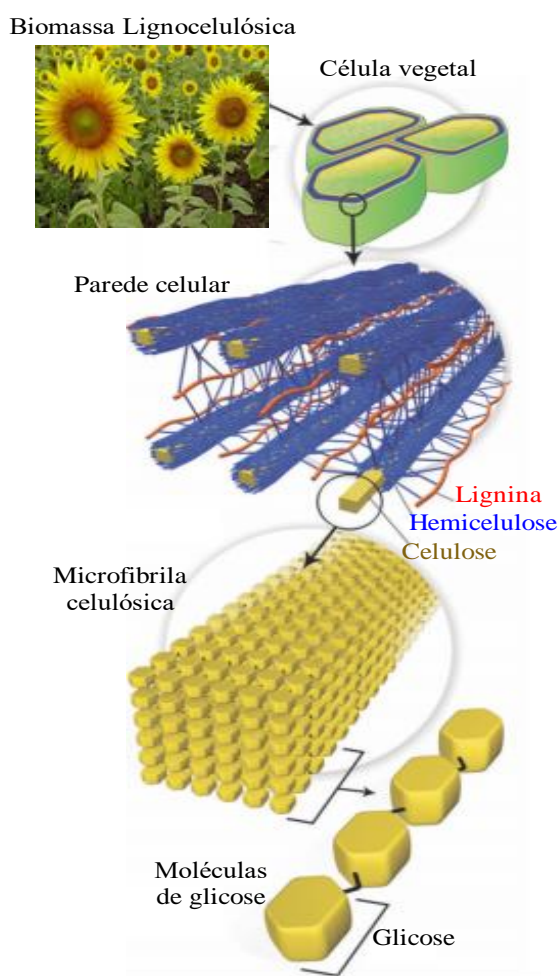


Figura 3.6 - Esquema da estrutura da biomassa lignocelulósica. Adaptado de Santos *et al.*, 2012.

Os 20% restantes atribui-se a proteínas, lipídios, cinzas, água, pectina, carboidratos de baixo peso molecular, entre outros. Contudo, cabe ressaltar que a proporção destes compostos varia de acordo com a origem e o tipo da biomassa (CARRIER *et al.*, 2011; MAITY, 2015; KAWAGUCHI *et al.*, 2016). A Tabela 3.1 apresenta a composições médias de alguns materiais lignocelulósicos.

Tabela 3.1 - Composição percentual dos componentes lignocelulósicos em algumas biomassas e resíduos.

Resíduo	Lignina (%)	Hemicelulose (%)	Celulose (%)	Referência
Caule de girassol	14,26	21,71	33,45	Ruíz <i>et al.</i> (2013)
Bagaço de cana	20	25	42	Kim e Day (2011)
Sorgo sacarino	21	27	45	Kim e Day (2011)
Madeira	18-25	24-40	40-55	Malherbe e Cloete (2002)
Sabugo de milho	15	35	45	Prassad <i>et al.</i> (2007)
Palha de milho	19	26	38	Zhu, Lee e Elander (2005)
Palha de arroz	18	24	32,1	Prassad <i>et al.</i> (2007)
Cascas de nozes	30-40	25-30	25-30	Howard <i>et al.</i> (2003)
Gramíneas	10-30	25-50	25-40	Malherbe e Cloete (2002)
Palha de Trigo	16-21	26-32	29-35	McKendry (2002)
Fibras de Esponja Vegetal	15,46	17,44	66,59	Guimarães <i>et al.</i> (2009)
Fibra de Coco	13,6	16,0	11,7	Bezerra <i>et al.</i> (2015)
Bagaço de Cajú	35,3	20,6	10,2	Souza <i>et al.</i> (2016)

Adaptado de Anwar *et al.*, 2014.

3.3.1 – Celulose

A celulose (C₆H₁₀O₅)_x, é o principal componente estrutural da parede celular das plantas e encontra-se em uma estrutura fibrosa organizada. É um dos polímeros naturais mais importantes produzidos na biosfera com uma produção anual de 1,5 trilhão de toneladas.

Acredita-se que é o biopolímero mais abundante da crosta terrestre (MAYTI *et al.*, 2015; SOREK *et al.*, 2015; PARK *et al.*, 2015), no entanto, na natureza, ela não ocorre como uma molécula individual isolada, mas sim, como um conjunto de fibras que formam cadeias individuais de celulose (HABIBI *et al.*, 2010).

Se comparada a lignina, por exemplo, celulose é uma molécula relativamente simples formada por anéis de β -D-glicopirranose unidas por ligações do tipo β -(1,4)glicosídicas (CHANDRA *et al.*, 2012; PANG *et al.*, 2014) e, independentemente da sua fonte, pode ser caracterizada como um homopolissacarídeo linear de elevada massa molar constituído por unidades de celobiose (dímero da glicose), as quais formam as cadeias de celulose (Figura 3.7 - Estrutura da celulose, parte central da cadeia molecular.) (HABIBI *et al.*, 2010). Normalmente, cerca de 36 moléculas individuais de celulose são reunidas em unidades maiores, conhecidas como fibrilas elementares (protofibrilas). A junção destas origina unidades maiores chamadas microfibrilas, que por sua vez constituem as conhecidas fibras de celulose (HABIBI *et al.*, 2010).

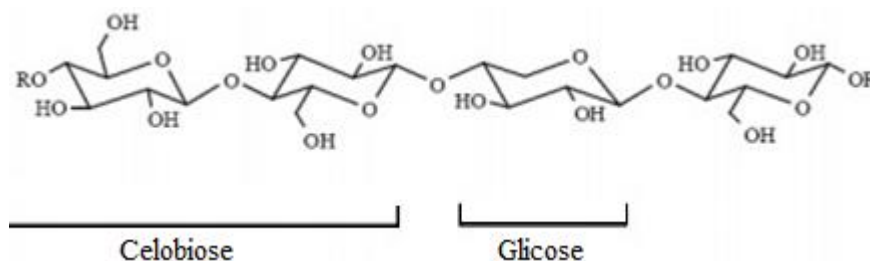


Figura 3.7 - Estrutura da celulose, parte central da cadeia molecular.
Fonte: Fengel & Wegener, 1989.

Cada unidade de glicose na molécula de celulose tem três grupos hidroxila, que formam uma rede de ligações de hidrogênio inter e intramoleculares com os outros resíduos de glicose (YABUSHITA, 2016). Consequentemente, as moléculas de celulose são acondicionadas de maneira uniforme, o que resulta em uma estrutura altamente cristalina com apenas uma pequena fração amorfa (regiões menos organizadas) (CHANDRA *et al.*, 2012; MAYTI *et al.*, 2015; SONG *et al.*, 2015; YABUSHITA, 2016).

Essa estrutura cristalina proporciona à celulose uma boa estabilidade química e física o que permite, sua ampla gama de aplicações, tais como: biocombustíveis (KIM & DAY, 2012; SAMBUSITI *et al.*, 2013; KIM *et al.*, 2014), biopolímeros (FORTUNATI *et al.*, 2012), aditivos alimentares (XIANG *et al.*, 2016), filmes e plásticos (SUN *et al.*, 2015), papel (RUDI *et al.*, 2016) e suportes enzimáticos (BEZERRA *et al.*, 2015; SOUZA *et al.*, 2016).

3.3.2 – Hemicelulose

Hemicelulose ($C_5H_8O_4$)_n é o segundo polímero mais abundante na biomassa lignocelulósica e compreende de um quarto a um terço da maioria dos materiais vegetais. Está, normalmente, associada com os outros componentes da parede celular tais como a celulose, proteínas da parede celular, lignina e outros compostos fenólicos por ligações covalentes e de hidrogênio, além de interações iônicas e hidrofóbicas (GÍRIO *et al.*, 2010; PASANGULAPATI *et al.*, 2012; PHITSUWAN *et al.*, 2013; GUAN *et al.*, 2015; KHOO *et al.*, 2016).

Sua estrutura é heterogênea e possui ramificações com cadeias laterais curtas que consistem em diferentes monômeros de açúcar, tais como: pentoses (β -D-xilose, β -L-arabinose), hexoses (β -D-manose, β -D-glicose, β -D-galactose) e ácidos urônicos, (α -D-galacturônico, β -D-glucurônico) (Figura 3.8) (GÍRIO *et al.*, 2010; KAUR *et al.*, 2014; GUAN *et al.*, 2015).

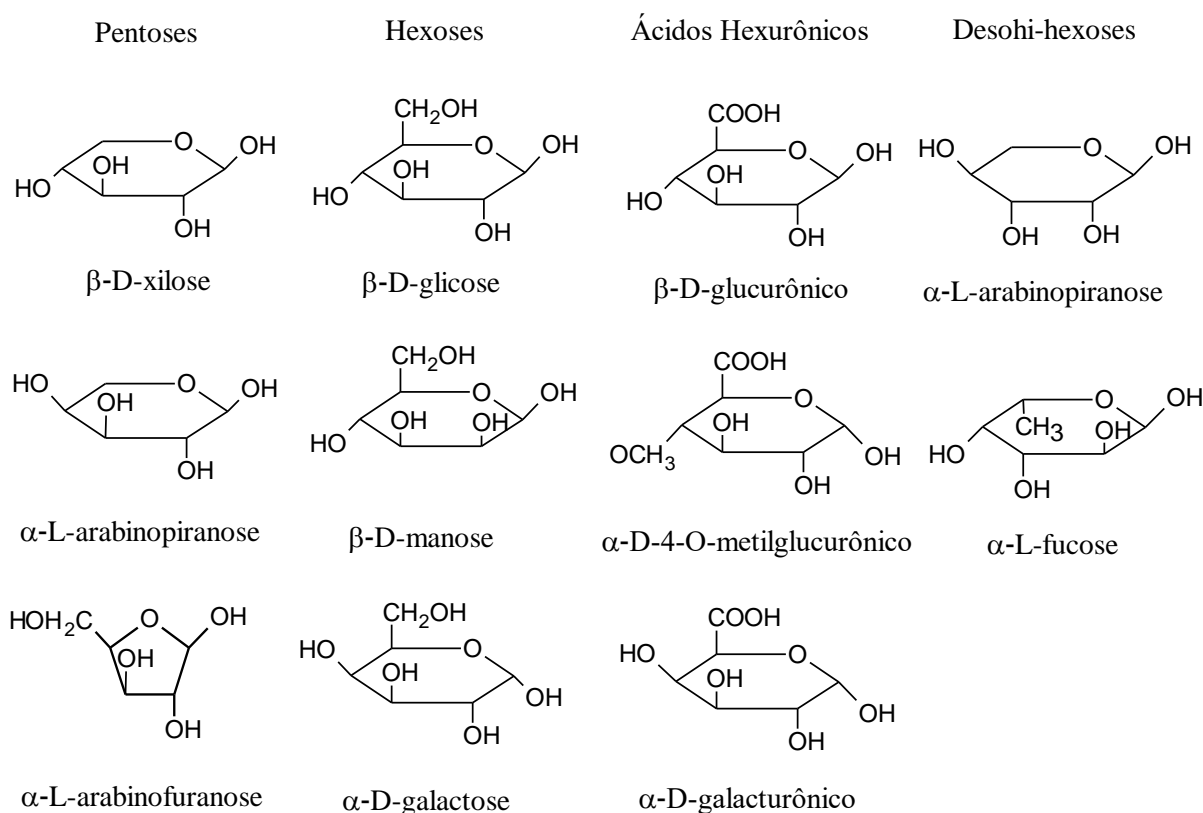


Figura 3.8 - Estrutura dos monossacarídeos que formam as hemiceluloses.
Adaptado de Fengel & Wegener, 1989.

Essas hemiceluloses são, geralmente, classificadas de acordo com o resíduo de açúcar principal do esqueleto, tais como: xilanas, mananas e glucanas; enquanto que a natureza química da hemicelulose varia de acordo com a fonte, estágio de desenvolvimento e tipo de tecidos (PASANGULAPATI *et al.*, 2012). As xilanas e as glucomananas são as hemiceluloses mais relevantes, no entanto, as xilanas se destacam pela abundância e por ser o principal componente de hemiceluloses de paredes celulares secundárias, a qual corresponde a cerca de 20-30% da biomassa de madeiras e plantas herbáceas. Em alguns tecidos de gramíneas e cereais, as xilanas podem representar até 50% (GÍRIO *et al.*, 2010).

As hemiceluloses diferem da celulose, principalmente, por sua constituição em diferentes unidades de açúcares, as quais formam cadeias moleculares curtas e muito ramificadas. Além disso, ao contrário da celulose, não formam microfibrilas, porém podem formar ligações de hidrogênio com a celulose e a lignina, o que resulta em uma associação firme que dá uma grande estabilidade ao conjunto lignocelulósico. Outra diferença notável é que a hemicelulose é um copolímero de diferentes açúcares C5 e C6, o que resulta em uma estrutura sólida amorfa, sendo com isso mais susceptível a hidrólise química sobre condições mais brandas (PASANGULAPATI *et al.*, 2012; PHITSUWAN *et al.*, 2013; KHOO *et al.*, 2016).

No que diz respeito à sua utilização, embora representem uma quantidade relativamente grande de polissacarídeos na biomassa lignocelulósica, as hemiceluloses ainda são desperdiçadas nas indústrias de biomateriais como por exemplo nas de obtenção de polpa, etanol celulósico e resinas lignofenol-formaldeído.

No entanto, estudos mostram que as hemiceluloses possuem excelentes propriedades tais como biodegradabilidade, biocompatibilidade e bioatividade, o que permite sua aplicabilidade seja na forma nativa ou modificada em diferentes áreas (PENG *et al.*, 2012; SUN *et al.*, 2014; PENG *et al.*, 2014; GUAN *et al.*, 2015). Pode-se citar, por exemplo, o seu uso para produção de açúcares, de etanol combustível, de outros produtos químicos de valor agregado, tais como: 5-hidroximetilfurfural (HMF), furfural, ácido levulínico, e xilitol (Figura 3.9) (PENG *et al.*, 2012).

Além disso, também podem ser utilizadas para obtenção de adesivos, espessantes, estabilizadores, formadores de película e emulsionantes (PENG *et al.*, 2012; SUN *et al.*, 2014; PENG *et al.*, 2014; GUAN *et al.*, 2015). Portanto, a utilização eficiente dos componentes da biomassa por pré-extração e isolamento das hemiceluloses, tende a aumentar o fluxo de receita em biorrefinarias de lignocelulósicos (PENG *et al.*, 2012).

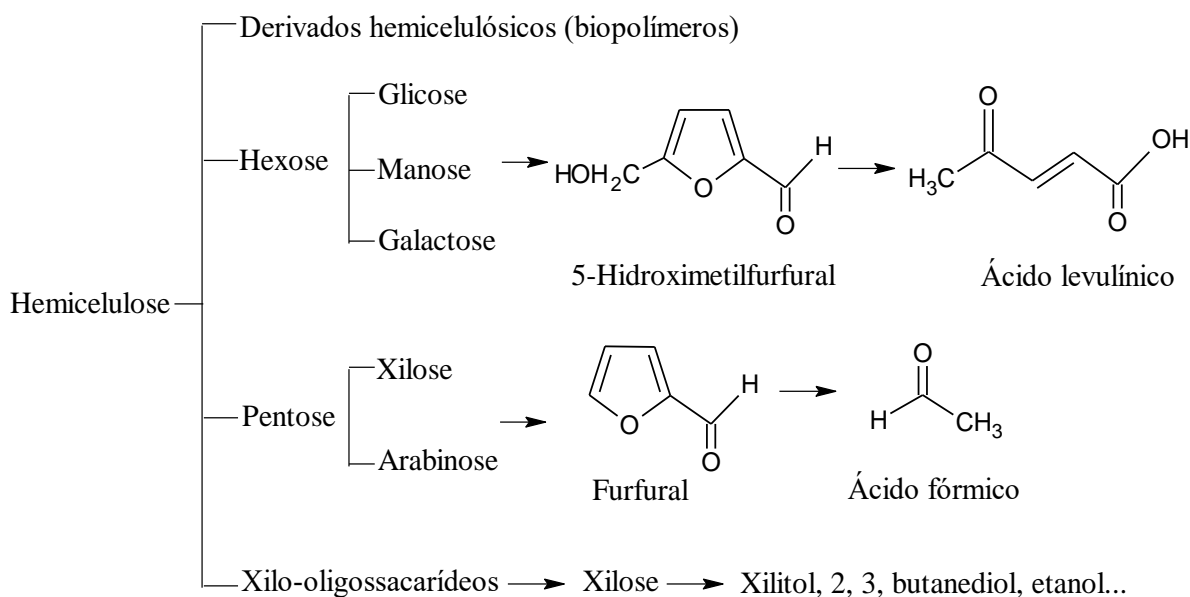


Figura 3.9 – Produtos potenciais obtidos das hemiceluloses.
Adaptado de PENG *et al.* (2012)

3.3.3 – Lignina

A lignina é o segundo biopolímero mais abundante da natureza e é a maior fonte renovável de grupos aromáticos na natureza. Na biomassa, é a menor e mais complexa fração e constitui de 10-25% da matéria seca das plantas lenhosas. É composta em grande parte por unidades de fenil propano, comumente ligadas por ligações do tipo éter (C-O-C) ou ligações de carbono-carbono (C-C), porém a principal ligação inter-unidade é β -O-4 (β aril éter) (ANWAR *et al.*, 2014; PARK *et al.*, 2015; KHOO *et al.*, 2016; CHUNG & WASHBURN, 2016). Além dos 20 diferentes tipos de ligações presentes na própria lignina, ela também está associada com as hemiceluloses via ligação covalente, formando os chamados complexos lignina-carboidratos (ALEKHINA *et al.*, 2015; HU & RAGAUSKAS, 2012; PARK *et al.*, 2015).

Como biopolímero da parede celular vegetal, a lignina é única devido à sua heterogeneidade, falta de estrutura primária definida e funcionalidade aromática, constituindo-se uma parte essencial da estrutura da biomassa pois além de servir como material estrutural, proporcionando maior resitência e rigidez, a lignina forma redes vasculares de condução de água via suas interações hidrofóbicas que tornam as paredes celulares da planta impermeáveis à água. Serve também como barreira física e bioquímica, a qual protege as plantas de micro-organismos e insetos, neste sentido dificultando a maioria dos processos de conversão da biomassa em bioenergia (NORGREN *et al.*, 2015; SAWATDEENARUNAT *et al.*, 2015; SHI *et al.*, 2016; CHUNG & WASHBURN, 2016; HAGHDAN *et al.*, 2016).

Sua estrutura exata ainda não está totalmente elucidada, contudo é conhecida e aceita a estrutura química básica composta por três monômeros de fenilpropano (unidades conhecidas como "monolignóis"), proveniente de três precursores aromáticos, convertidos por sua vez em guaiacil (L), siringil (S) e p-hidroxifenil (H), por reações enzimáticas (Figura 3.10). (RAMOS *et al.*, 2003; HU & RAGAUSKAS, 2012; PHITSUWAN *et al.*, 2013; MEDINA *et al.*, 2015; NORGREN *et al.*, 2015; CHUNG & WASHBURN, 2016).

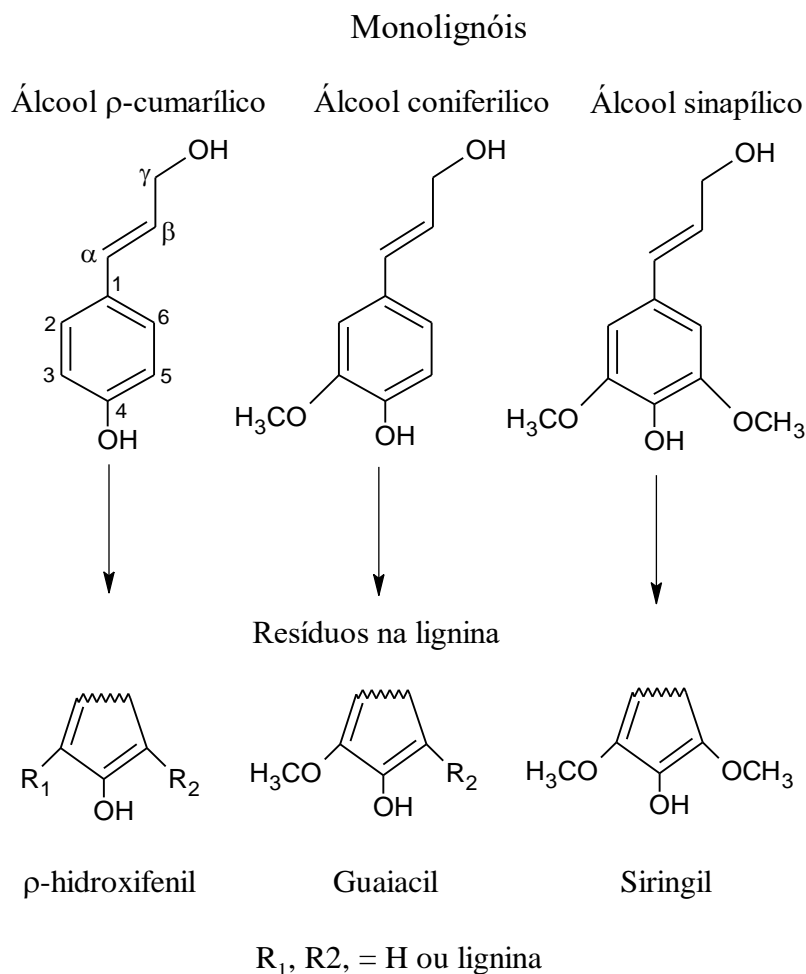


Figura 3.10 – Principais precursores da biossíntese da lignina e suas estruturas correspondentes.

Adaptado de Laurichesse & Avérous, 2015.

Estes três monolignóis representam a maioria das unidades de repetição que formam as moléculas de polímero de lignina; contudo outras unidades podem estar presentes em quantidades menores. A proporção de diferentes monômeros varia consideravelmente dependendo do tipo de material vegetal, sendo possível encontrar diversos padrões de interligação entre as unidades individuais conferindo-se uma complexidade adicional a

molécula final (NORGREN *et al.*, 2015; THAKUR *et al.*; 2015; HAGHDAN *et al.*, 2016).

Para as biorrefinarias sustentáveis a lignina torna-se uma importante matéria-prima pois pode ser convertida em diversos produtos químicos de alto valor agregado, tais como: precursores de resina, antioxidantes, agentes antimicrobianos, compostos aromáticos, álcoois sintéticos, combustível líquido de Fisher-Tropsch, gás de síntese e moléculas de baixo e elevado peso molecular. Logo, é considerada de extrema importância para que se possa alcançar uma economia sustentável bem como para reduzir as emissões de carbono (LAURICHESSE & AVÉROUS, 2015; MEDINA *et al.*, 2015; HAGHDAN *et al.*, 2016).

Nesse contexto, em virtude do resíduo lignocelulósico ser um substrato complexo, com propriedades inerentes que o torna muito resistente a degradação química ou biológica, torna-se necessário a utilização de tratamentos, que possibilitem o acesso mais fácil aos principais componentes da biomassa (celulose, hemicelulose e lignina).

3.4 – Tratamentos

Do ponto de vista tecnológico, uma grande variedade de biomassa lignocelulósica está disponível como potencial candidato a ser convertido em diversos bioprodutos. Entretanto, a conversão dessa biomassa em produtos com valor agregado, normalmente, requer um processamento multi-estágios que inclui pré-tratamento (mecânico, químico ou biológico), hidrólise enzimática e fermentação, no caso da produção de biocombustíveis (ANWAR *et al.*, 2014; BARAKAT *et al.*, 2014; BEHERA *et al.*, 2014).

Portanto, a eficiência do método de pré-tratamento é imprescindível para o sucesso da conversão desses materiais em bioquímicos. Os tratamentos desorganizam o complexo lignocelulósico (Figura 3.11), alterando a resistência do material, devido à quebra da estrutura da lignina. Essas alterações, por sua vez, além de possibilitar a retirada das hemiceluloses, reduzem a cristalinidade da celulose e propicia aumento na área superficial e na porosidade do material (TAHERZADEH & KARIMI, 2007; AGBOR *et al.*, 2011; DYK & PLETSCHE, 2012; MOOD *et al.*, 2013; BEHERA *et al.*, 2014; KHOO *et al.*, 2016).

Métodos de pré-tratamento podem ser classificadas em diferentes categorias, de acordo com vários critérios como, por exemplo, eficiência do tratamento a pH baixo (ácido diluído, organosolv, explosão a vapor), alto (hidróxido de sódio, explosão por amônia) ou neutro (água sob pressão). Os métodos a pH elevado e baixo necessitam da adição de bases (hidróxido de sódio ou amônia) e ácidos, respectivamente, para aumentar a capacidade hidrolítica. Já os métodos a pH neutro, principalmente, o pré-tratamento com água quente líquida (LHW), há

somente a necessidade de aplicar água no processo (XU & HUANG, 2014; RAVINDRAN & JAISWAL, 2016).

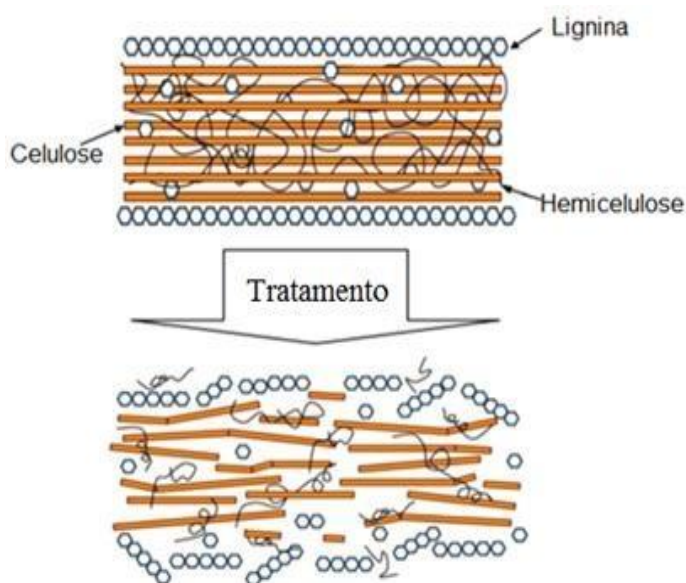


Figura 3.11 - Esquema de tratamento em material lignocelulósico.
Adaptado de Mood *et al.*, 2013.

Contudo, uma outra maneira de fazer a classificação, mais usual, baseia-se no mecanismo principal que atua durante o pré-tratamento. Desse modo, os métodos podem ser divididos em físico (trituração e moagem, extrusão e microondas), químico (alcalino, ácido, organosolv, ozonólise, líquido iônico, agentes oxidantes, solventes orgânicos), físico-químico (explosão a vapor, água quente, explosão de amônia, oxidação úmida e explosão CO₂), biológicos, elétricos ou a combinação destes (LI *et al.*, 2010; BEHERA *et al.*, 2014; KHOO *et al.*, 2016; RAVINDRAN & JAISWAL, 2016).

A depender do tratamento utilizado, diferentes efeitos são observados na matéria-prima. Alguns destes efeitos são os seguintes (DYK & PLETSCHE, 2012; TEIXEIRA *et al.*, 2014; MAURYA *et al.*, 2015):

- remoção parcial ou total da lignina que causa o aumento da porosidade do material;
- rompimento da estrutura da lignina e das suas ligações do resto da biomassa;
- redistribuição da lignina;
- remoção da hemicelulose;
- rompimento da estrutura da hemicelulose;
- redução da cristalinidade da celulose;
- redução do grau de polimerização da celulose;
- redução do tamanho das partículas.

No entanto, como não há uma tecnologia de tratamento universal que consiga superar a recalcitrância de qualquer biomassa vegetal utilizada, o processo de tratamento ideal deve ser feito levando em consideração: (i) a eficiência em termos energéticos; (ii) possibilidade de utilização de alta concentração de biomassa; (iii) degradação não significativa dos açúcares em compostos tóxicos; (iv) recuperação da lignina; (v) ambientalmente amigável. Além disso, a escolha do pré-tratamento deve levar em conta a utilização ou possibilidade de utilização dos componentes moleculares da biomassa principal (celulose, hemicelulose e lignina) (PHITSUWAN *et al.*, 2013; TEIXEIRA *et al.*, 2014; RAVINDRAN & JAISWAL, 2016).

Contudo, os processos atualmente utilizados geram compostos tóxicos e inibidores resultantes das condições severas. Os inibidores incluem os produtos de degradação do açúcar, derivados do furano, os ácidos orgânicos e os compostos fenólicos (Figura 3.12) (PHITSUWAN *et al.*, 2013).

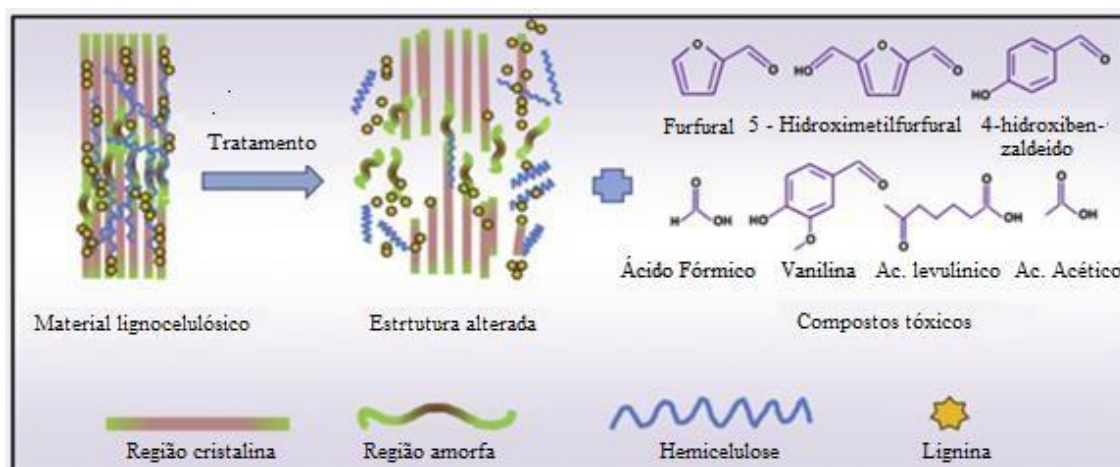


Figura 3.12 - Representação esquemática do tratamento e possíveis componentes tóxicos gerados.
Adaptado de Phitsuwan *et al.*, 2013.

3.4.1 – Tratamento Biológico

O Tratamento biológico é baseado na utilização de agentes biológicos capazes de degradar a lignina, hemicelulose e polifenóis presentes na biomassa e tornar o processo de hidrólise mais conveniente (GALBE *et al.*, 2012; RAVINDRAN & JAISWAL, 2016). Pode ser usado como um primeiro passo de pré-tratamento padrão em combinação com outro método ou sozinho caso a biomassa possua um baixo teor de lignina, e em especial quando o interesse é somente a celulose (AGBOR *et al.*, 2012).

Devido às suas potenciais vantagens tem atraído um grande interesse de pesquisadores visto que, ao contrário dos métodos de pré-tratamento físico-químicos, o biológico não envolve

alta temperatura e/ou pressão e não necessita de ácidos, bases ou quaisquer espécies reativas (RAVINDRAN & JAISWAL, 2016). Logo, tem baixo consumo de energia, propicia alto rendimento dos produtos desejados e é, ambientalmente amigável já que não gera compostos tóxicos (FITZPATRICK *et al.*, 2010; ANWAR *et al.*, 2014).

Contudo, as suas desvantagens são tão evidentes quanto as suas vantagens, uma vez que o pré- tratamento biológico é um processo muito lento, requer controle cuidadoso das condições de crescimento e de grande espaço para ser realizado. Além disso, a maior parte dos micro-organismos ligninolíticos solubilizam/consomem não só a lignina mas, também, a celulose e a hemicelulose (ANWAR *et al.*, 2014; BEHERA *et al.*, 2014). Esse pré-tratamento pode ser classificados como: uso de consórcio microbiano e tratamentos enzimáticos (RAVINDRAN & JAISWAL, 2016).

3.4.2 – Tratamento Físico

O tratamento físico (por exemplo, moagem, trituração, radiação, etc.) altera a estrutura da biomassa pela aplicação de tensão mecânica sem a adição de produtos químicos ou de um reagente biológico e visa aumentar a área superficial e o tamanho dos poros da biomassa (HARUN *et al.*, 2011; SAINI *et al.*, 2014). Além disso, reduz a cristalinidade e o grau de polimerização da celulose presente na biomassa. Geralmente é usado em combinação com outro método (MOOD *et al.*, 2013; BEHERA *et al.*, 2014). Entretanto, muitos dos métodos físicos utilizados não são economicamente viáveis devido ao alto consumo de energia, o qual está estritamente relacionado com a dimensão final da partícula e o tipo de matéria-prima utilizada (CHIARAMONTI *et al.*, 2012; BEHERA *et al.*, 2014).

3.4.3 – Tratamento Físico-Químico

Os tratamentos que combinam os processos químicos e físicos são de grande importância na dissolução da hemicelulose e na alteração da estrutura da lignina. Esta categoria inclui a grande maioria dos métodos de tratamento como a explosão a CO₂, auto-hidrólise, a explosão por amônia (AFEX) e percolação com reciclo da amônia (ARP). Diferentes agentes químicos são usados nesses processos tais como, ozônio, ácidos, bases, peróxidos e solventes orgânicos (BRODEUR *et al.*, 2011; SAINI *et al.*, 2014). No entanto, é essencial notar que, na maioria dos casos, o mecanismo por meio do qual o método funciona pode ser uma mistura de ambos os efeitos, físicos e químicos (GALBE *et al.*, 2012).

3.4.3.1 – Auto-hidrólise

A auto-hidrólise está entre as tecnologias de fracionamento mais promissoras para biorrefinarias à base de biomassa lignocelulósica, em virtude de utilizar apenas água quente comprimida para o pré-tratamento da biomassa. Esse processo consiste, no cozimento da biomassa em água em altas temperaturas (160 – 240°C) sob uma pressão elevada, o que possibilita a formação de duas fases (uma sólida e outra líquida). A fase líquida, licor, é rica em açúcares ou oligômeros derivados das hemiceluloses, produtos da decomposição dos monossacarídeos, como furfural, hidroximetilfurfural e o ácido acético. A fase sólida é, por conseguinte, constituída por hemiceluloses não convertidas, lignina e celulose (AMENDOLA *et al.*, 2012; CHIARAMONTI *et al.*, 2012; HU & RAGAUSKAS, 2012; JEONG & LEE, 2015; CARVALHEIRO *et al.*, 2016).

Durante o processo de auto-hidrólise, os prótons gerados pela auto-ionização da água atuam como catalisadores ácidos, dando início a despolimerização, principalmente, da hemicelulose por hidrólise seletiva de ligações glicosídicas, liberando o grupo O-acetil e outras porções de ácido a partir das hemiceluloses formando o ácido acético e urônico. A liberação destes ácidos dão continuidade a hidrólise das hemiceluloses e dos oligossacarídeos das hemiceluloses, com baixa concentração de produtos de degradação dos açúcares, tais como furfural e hidroximetilfurfural. Logo, é um tratamento altamente eficaz para o alargamento da área superficial acessível e susceptível da celulose. (CHIARAMONTI *et al.*, 2012; GALBE *et al.*, 2012; ZHENG *et al.*, 2014; XU & ZHANG, 2014; JEONG & LEE, 2015; CARVALHEIRO *et al.*, 2016).

Nesse tipo de tratamento é possível evitar a formação de inibidores, mantendo o pH entre 4 e 7. Ao manter o pH nessa faixa os açúcares hemicelulósicos na forma oligomérica, minimizando-se a formação de monossacarídeos, e, por conseguinte, também a formação de produtos de degradação (HENDRIKS & ZEEMAN, 2009; TEIXEIRA *et al.*, 2014; JEONG & LEE, 2015). Os principais parâmetros a serem considerados na auto-hidrólise são: tamanho de partícula, temperatura, tempo de residência, conteúdo da mistura e a combinação do efeito tempo e temperatura (MAURYA *et al.*, 2015).

Logo, a auto-hidrólise é um tratamento atraente do ponto de vista econômico, uma vez que não requer a adição de produtos químicos tais como ácido sulfúrico, hidróxido de sódio, amônia ou outros catalisadores. Podendo, portanto, ser considerado como um processo de tecnologia verde, visto a utilização dos princípios sustentáveis de biorrefinarias, ou seja, a utilização eficiente e sustentável de matérias-primas, o que evita a geração de resíduos.

3.4.3.2 – Explosão por Amônia (AFEX)

Esse processo consiste na versão alcalina da auto-hidrólise. Na AFEX, a biomassa é tratada com amoníaco anidro líquido a temperaturas entre 60 e 100 °C, sob pressão, por um período de tempo variável, seguido de imediata redução da pressão. Essa redução resulta numa rápida expansão do gás amoníaco que causa inchaço e ruptura física das fibras da biomassa e descristalização parcial da celulose (ALVIRA *et al.*, 2010; BHATIA *et al.*, 2012; RABEMANOLONTSOA & SAKA, 2016). Quantidade de amônia, de água, pressão, temperatura e tempo de residência são os parâmetros que podem ser variados de modo a otimizar esse tratamento. Ao contrário de outros tratamentos tais como, a auto-hidrólise, a AFEX só produz um material sólido tratado (MOOD *et al.*, 2013).

3.4.3.3 – Explosão a CO₂

Basicamente a explosão de CO₂ (dióxido de carbono) envolve a utilização de CO₂ supercrítico sob pressão para melhorar a digestibilidade da biomassa lignocelulósica. O CO₂ age na biomassa, sob alta pressão, adentrando nas suas estruturas e acredita-se que uma vez dissolvido em água, o CO₂ forma o ácido carbônico que aumenta a hidrólise da hemicelulose. A liberação do gás pressurizado resulta no rompimento da estrutura celulósica da biomassa aumentando a área superficial (ALVIRA *et al.*, 2010; AGBOR *et al.*, 2011; BHATIA *et al.*, 2012; RAVINDRAN & JAISWAL, 2016).

3.4.3.4 – Percolação com Reciclo da Amônia (ARP)

Neste processo, a amônia aquosa com concentração entre 5 – 15% (% em peso) passa através de um reator recheado com a biomassa, a altas temperaturas (150 – 170 °C), a uma taxa de aproximadamente de 5 mL/min e tempo de permanência de 14 min; após o processo a amônia é recuperada. A vantagem deste processo sobre AFEX é a sua capacidade para remover a maior parte da lignina (75 – 85%) e solubilizar mais de metade da hemicelulose (50 – 60%) enquanto se mantém elevado o teor de celulose. Sob estas condições, a amônia aquosa reage principalmente com a lignina causando sua despolimerização e a clivagem das ligações lignina-carboidratos (BHATIA *et al.*, 2012; MENON & RAO, 2012; RABEMANOLONTSOA & SAKA, 2016).

3.4.4 – Tratamento Químico

Tratamento químico é a técnica mais estudada entre as diferentes categorias de tratamento e tornou-se um dos métodos mais promissores de melhoramento da

biodegradabilidade da celulose pela remoção de lignina e/ou hemiceluloses, visando diminuir o grau de polimerização (DP) e cristalinidade de materiais celulósicos. Alguns produtos químicos, tais como ácidos, álcalis, solventes orgânicos, e líquidos iônicos têm sido relatados por terem um efeito significativo na estrutura nativa da biomassa lignocelulósica (AGBOR *et al.*, 2011; BEHERA *et al.*, 2014).

3.4.4.1 – Alcalino

O tratamento alcalino envolve o uso de bases, tais como hidróxido de sódio e de amônio, para tratar matérias-primas lignocelulósicas e, é realizada a um nível, ligeiramente, menor de temperatura e pressão quando comparado ao método ácido (GALBE *et al.*, 2012; ANWAR *et al.*, 2014; SINDHU *et al.*, 2015). Vem sendo estudado durante muitos anos e tem sido demonstrado que a sua principal vantagem é a remoção eficiente da lignina e solubilização eficiente das hemiceluloses da biomassa, quando em determinadas condições de uso (XU & ZHANG, 2014; MAURYA *et al.*, 2015; RABEMANOLONTSOA & SAKA, 2016).

O processo de hidrólise alcalina promove reações de solvatação e saponificação que causam a quebra das ligações éster entre a lignina, a hemicelulose e a celulose (complexo lignina-carboidratos) resultando na ruptura da estrutura da lignina, inchaço da celulose, descristalização parcial da celulose e solvatação parcial da hemicelulose (Figura 3.13). Além disso, os grupos acetil e vários substitutos do ácido urônico são também removidos pelo tratamento, reduzindo, assim, o impedimento estérico das enzimas hidrolíticas e aumentando a acessibilidade das enzimas aos carboidratos (IBRAHIM *et al.*, 2011; MCINTOSH *et al.*, 2010; SILLS *et al.*, 2011; CHIARAMONTI *et al.*, 2012; GALBE *et al.*, 2012; BEHERA *et al.*, 2014; XU & ZHANG, 2014; KIM *et al.*, 2016).

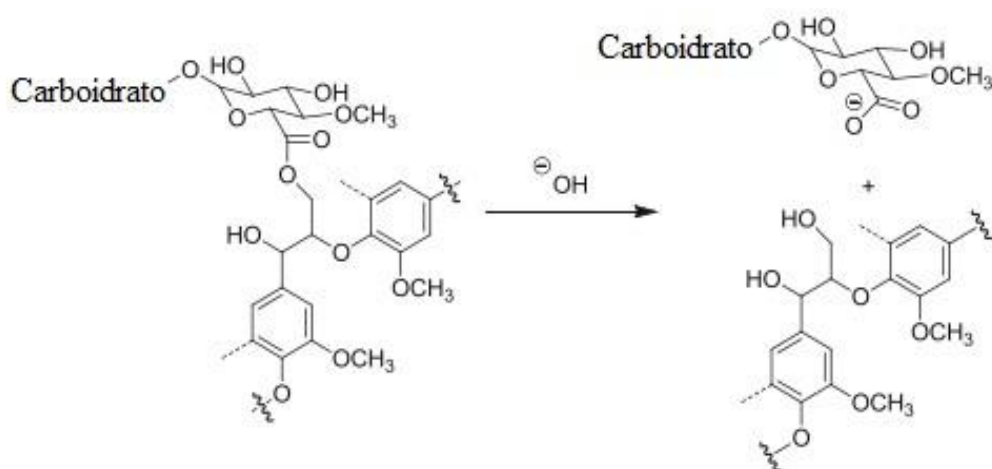


Figura 3.13 - Saponificação do complexo lignina-carboidratos com base.
Adaptado de Hu & Ragauskas, 2012.

A deslignificação da biomassa nesse processo ocorre de forma semelhante a tecnologia Kraft usada nas indústrias de papel e celulose. Além disso, estudos recentes indicaram que o pré-tratamento alcalino também pode aumentar a porosidade da fibra devido ao rompimento de estruturas de biomassa (XU & ZHANG, 2014; TEIXEIRA *et al.*, 2014).

Em geral, as condições de tratamento aplicadas com NaOH são bem variadas. Na literatura, a temperatura testada varia entre 10 °C a 200 °C, as dosagens de NaOH entre 0,1% a 10%, e os tempos de contato compreendido entre alguns minutos até 5 dias sendo que, normalmente, diminuiu com o aumento da temperatura (SAMBUSITI *et al.*, 2012).

As baixas temperaturas requeem tempo relativamente longo e alta concentração de base; e o aumento da temperatura propicia menor tempo e menores concentrações de base. Entre os métodos químicos, é o mais eficaz para quebrar as ligações éster entre a lignina, hemicelulose e celulose evitando a fragmentação das hemiceluloses (GASPAR *et al.*, 2007; BADIEI *et al.*, 2014). No entanto, a eficácia desse pré-tratamento depende tanto da estrutura física e composição química do substrato, como das condições de tratamento utilizadas. De modo geral, é mais eficiente em biomassas com baixo teor de lignina como as culturas herbáceas e os resíduos agrícolas e menos eficiente naquelas com alto teor de lignina como a madeira, por exemplo (AGBOR *et al.*, 2012; CHEN *et al.*, 2017).

3.4.4.2 – Ácido

Neste método de pré-tratamento químico tanto os ácidos orgânicos como os inorgânicos tais como, o ácido sulfúrico (H₂SO₄), ácido clorídrico (HCl), ácido nítrico (HNO₃), ácido fosfórico (H₃PO₄), ácido acético (CH₃COOH) e ácido maléico (C₄H₄O₄), têm sido usados como catalisadores na hidrólise da biomassa (ZHENG *et al.*, 2014; RABEMANOLONTSOA & SAKA, 2016). Contudo, o ácido sulfúrico é o mais comumente empregado para quebrar a estrutura rígida do material lignocelulósico e hidrolisar polissacarídeos (principalmente hemicelulose) da biomassa a monossacarídeos (MOOD *et al.*, 2013; TEIXEIRA *et al.*, 2014; KHOO *et al.*, 2016).

Pode ser realizado tanto com ácido concentrado (por exemplo, 30 – 70%) a baixa temperatura (por exemplo, 40 °C), como com ácido diluído (por exemplo, 0,1 %) e temperatura elevada (por exemplo 230 °C) (CHIARAMONTI *et al.*, 2012; BHATIA *et al.*, 2012; ZHENG *et al.*, 2014). Entretanto, quando realizado sob temperatura elevada e condições ácidas conduz a formação e liberação de uma série de compostos; as principais vias de degradação estão apresentadas esquematicamente na (Figura 3.14) (PALMQVIST & HAHN-HAGERDAL, 2000). Quando degradada, a hemicelulose libera xilose, manose, ácido acético, galactose e

glicose (Figura 3.14); a celulose é hidrolisada em glicose e a xilose é degradada a furfural (PHITSUWAN *et al.*, 2013).

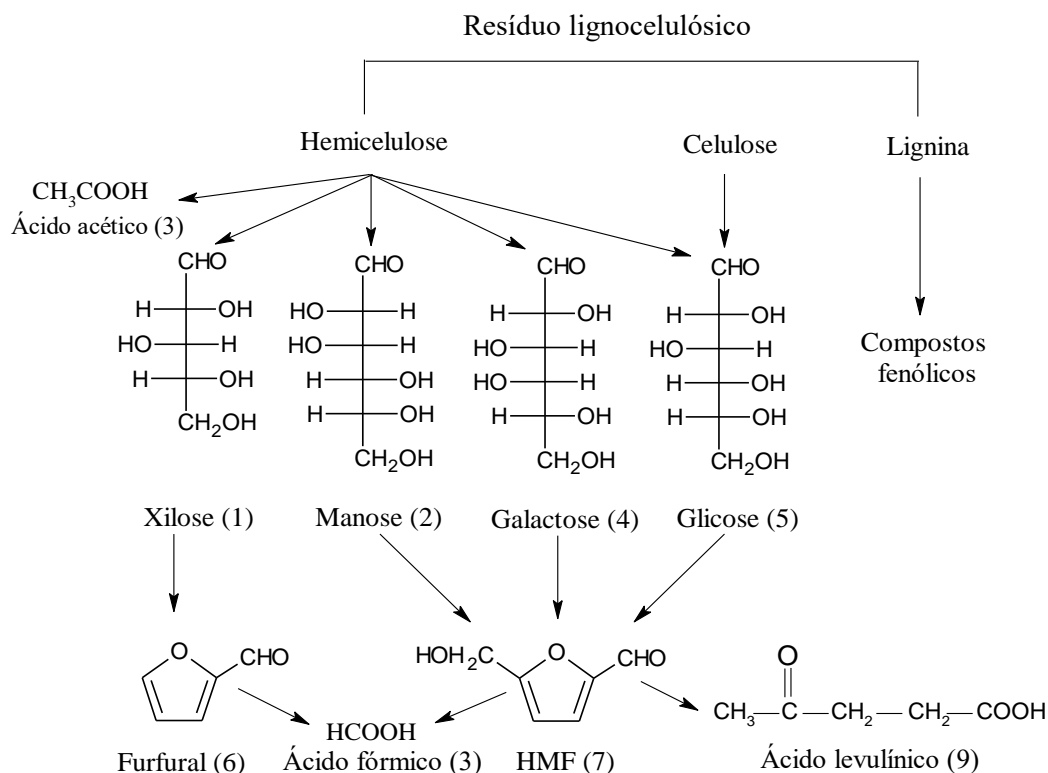


Figura 3.14 - Reações que ocorrem durante a hidrólise de materiais lignocelulósicos. Adaptado de Palmqvist & Hahn-Hagerdal, 2000.

Produtos da degradação de açúcar, furfural (6) e 5-hidroximetilfurfural (HMF) (7), são derivados a partir da solubilização da hemicelulose e da degradação da celulose, respectivamente. Sob alta temperatura e pressão, os monômeros de açúcar (hexoses), manose, galactose e glucose, são degradados a HMF, enquanto a xilose (pentose) é degradada a furfural. Por outro lado, o ácido fórmico é formado pela quebra do furfural e do HMF, e o ácido levulínico pela degradação do HMF. Além disso, o ácido acético é liberado pela desacetilação da hemicelulose e da lignina (PHITSUWAN *et al.*, 2013; XU e ZHANG, 2014).

O uso de ácidos concentrados é bastante efetivo, hidrolisando praticamente toda a hemicelulose; entretanto, requer materiais caros com custos de manutenção mais elevados e acaba por tornar o processo potencialmente perigoso. Além disso, a recuperação do ácido torna-se necessário visando alcançar uma maior economia no processo (CHIARAMONTI *et al.*, 2012; BHATIA *et al.*, 2012; TEIXEIRA *et al.*, 2014).

No que diz respeito a hidrólise com ácido diluído, é normalmente realizada com soluções diluídas de ácido, isto é, menos do que 4% (em peso) de ácido sulfúrico, a temperaturas entre 140 e 200 °C; demanda utilização de matéria-prima com reduzido teor de

cinzas e impurezas devido ao efeito tamponante das mesmas, sendo necessária a lavagem da biomassa antes do pré-tratamento (MENON & RAO, 2012).

Desse modo, após o tratamento, a biomassa lignocelulósica pode constituir-se, também, em suporte para imobilização de enzima, tendo em vista o aumento da área superficial e do tamanho do poro, em virtude da diminuição do grau de polimerização da celulose e da remoção da hemicelulose e da lignina que acaba por aumentar a porosidade do material.

3.5 – Suportes para Imobilização de Enzimas

O suporte funciona como uma barreira física que evita a livre mobilidade das moléculas de enzima e é, o maior responsável pelo bom desempenho ou não, do sistema imobilizado (MENDES *et al.*, 2011; GUPTA *et al.*, 2013; SIRISHA *et al.*, 2016). Logo, a escolha adequada do suporte bem como da técnica de imobilização, deve ser realizada de forma meticulosa para que se obtenha um procedimento bem sucedido visto que, do mesmo modo que o suporte pode aumentar o tempo de meia-vida da enzima imobilizada, ele também pode afetar nocivamente o desempenho global do sistema (MENDES *et al.*, 2011; SCHERER *et al.*, 2012; ES *et al.*, 2015; MOHAMAD *et al.*, 2015).

Desse modo, Krajewska (2004), Gupta *et al.* (2013), Zucca & Sanjust (2014) e Sirisha *et al.* (2016) afirmam que para uma imobilização eficiente o suporte precisa ter as seguintes propriedades:

- Adequada funcionalidade - Presença de grupos funcionais adequados prontos para prender as moléculas e também para promover sua atividade e estabilidade;
- Porosidade e área superficial elevada - Deve ter uma área superficial elevada tanto quanto possível, de modo a melhorar a acessibilidade aos locais funcionais e poros grandes o suficiente para permitir a difusão da enzima para os poros da membrana;
- Hidrofobicidade e hidrofiliabilidade – A hidrofobicidade da superfície, geralmente, precisa ser minimizada, uma vez que favorece a adsorção de proteínas não desejadas e provoca a desnaturação. Entretanto, no caso de enzimas hidrofóbicas, tais como as lipases, a atuação deve ser contrária. Portanto, de modo geral, o suporte deve apresentar o micro-ambiente ideal afim de melhorar as características catalíticas das enzimas imobilizadas;
- Insolubilidade – O suporte deve ser insolúvel a fim de evitar a perda de enzimas e protegê-las do contato com os contaminantes indesejáveis;
- Resistência térmica e mecânica – São propriedades importantes, pois permitem a

utilização da enzima imobilizada sob as mais diversas condições de processo. A resistência à abrasão (reatores em batelada) e a pressão de fluxo (reatores contínuos), também devem ser levadas em consideração;

- Inércia - Após a imobilização, o suporte deve ser totalmente inerte e não pode interferir nem bloquear a reação desejada.

Além disso, o suporte deve ser de baixo custo e ecologicamente correto, de modo a reduzir o impacto econômico do processo. Contudo, a maioria dos suportes possuem apenas algumas das propriedades acima mencionadas. Logo, é preciso ter cuidado na escolha do material, avaliando sempre os prós e os contras de suas propriedades (ES *et al.*, 2015; SIRISHA *et al.*, 2016). Diversos tipos de materiais e tecnologias de suporte têm sido desenvolvidos para a imobilização de enzimas bem como, para a utilização prática de biocatalisadores ao longo das últimas décadas (MIN & YOO, 2014), sendo possível encontrar, na literatura, diferentes materiais que podem ser usados como suporte para imobilização (Tabela 3.2) (MILETIC *et al.*, 2012; AN *et al.*, 2015).

Tabela 3.2 - Suportes frequentemente usados para imobilização.

Suporte	Vantagens	Desvantagens	Exemplo
Inorgânico	Ótima estabilidade quando comparado com o orgânico	Abrasão pode ocorrer nos vasos de agitação	Sílica, derivados de sílica, vidro, cerâmica e à base de Alumínio
Orgânico Natural	Boa compatibilidade com enzimas	Ligação ruim; fraca estabilidade mecânica	Alginato, quitosana, quitina, celulose, colágeno e pectina
Orgânico Sintético	Feitos sob medida	Transferência de massa sólido-líquido, difusão limitada	Polímeros sintéticos

Adaptada de Milétic *et al.*, 2012.

Quanto à natureza física podem variar desde materiais geliformes (alginato, álcool polivinílico, carragena, etc) até superfícies sólidas (vidro poroso, Eupergit C, alumina, pérolas de vidro, etc.) recobertas com alguma substância capaz de interagir com a enzima (VITOLLO, 2011; JESIONOWSK *et al.*, 2014).

Logo, como o processo de imobilização envolve a interação entre a enzima e o material que servirá como suporte, o resultado real irá depender tanto da natureza de ambos os

envolvidos como do microambiente resultante do processo, podendo resultar em aumento ou redução da atividade catalítica da enzima. (MOHAMAD *et al.*, 2015; GUTARRA *et al.*, 2016). Assim, essa interação fornecerá um biocatalisador imobilizado com propriedades química, bioquímica, mecânica e cinética específicas visto que, as alterações impostas pelo suporte e pelas próprias características da enzima tendem a alterar a estabilidade e as propriedades cinéticas da enzima (Figura 3.15) (MILETIC *et al.*, 2012; MOHAMAD *et al.*, 2015).

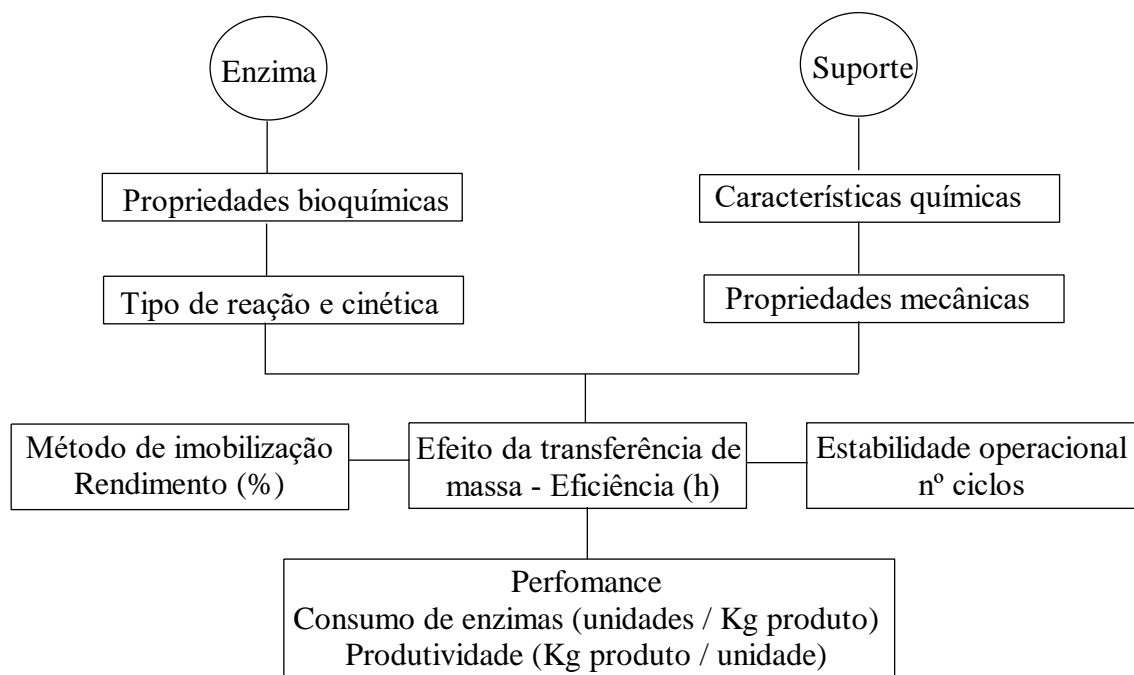


Figura 3.15 - Propriedades da enzima e do suporte que determinam as propriedades da biocatalisador imobilizado. Adaptado de Milétic *et al.*, 2012.

Portanto, as características do suporte são de extrema importância para a obtenção de um sistema imobilizado eficiente. Sua seleção deve ser feita de forma consciente, pois não há um método geral de imobilização, muito menos um suporte universal visto que, diversos compostos tais como, resinas acrílicas, polímeros sintéticos, membranas, polissacarídeos, entre outros, podem ser utilizados com sucesso (VITOLLO, 2011; JESIONOWSKI *et al.*, 2014; MOHAMAD *et al.*, 2015).

Desse modo, fica claro que as condições de imobilização para uma dada enzima só podem ser estabelecidas empiricamente, pois diferenças nas características físicas e morfológicas do suporte podem afetar o biocatalisador imobilizado e as suas propriedades catalíticas, uma vez que, a enzima está diretamente ligada ao suporte. Assim, o processo de escolha deve consistir na imobilização em vários tipos de suporte por meio de diferentes métodos, e aquele que propiciar maior eficiência após a imobilização será o mais adequado (VITOLLO, 2011; JESIONOWSKI *et al.*, 2014; MOHAMAD *et al.*, 2015).

3.5.1 – Tipos de Suporte

Com base na sua composição química, os suportes podem ser classificados em duas categorias principais: suportes inorgânicos e orgânicos. Sendo que, os orgânicos são subdivididos em orgânicos naturais e sintéticas (MOHAMAD *et al.*, 2015; SIRISHA *et al.*, 2016). Já conforme a morfologia são classificados em materiais porosos, não porosos e geleiformes (MILÉTIC *et al.*, 2012).

Os materiais porosos, geralmente, são os preferidos em virtude de possuírem uma grande área superficial interna disponível para a imobilização, na qual a enzima fica protegida dos efeitos de turbulência externa. Bem como, pelo fato de ter maior número de poros, o que permite uma carga mais elevada de enzima. Entretanto, é importante salientar que o diâmetro do poro deve ser suficientemente grande para acomodar a enzima e permitir o acesso do substrato (DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004; MOHAMAD *et al.*, 2015).

Os suportes não-porosos apresentam baixa área superficial disponível para a ligação da enzima. No entanto, esse problema pode ser superado pela utilização de partículas finas ou fibras, mas se a partícula for muito fina, podem surgir outras dificuldades tais como, alta queda de pressão e baixas vazões para operações em reatores contínuos (DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004).

Os suportes inorgânicos podem ser originados de uma variedade de sólidos inorgânicos como, por exemplo, alumina, sílica, zeólitos, e sílicas mesoporosas (HUDSON *et al.*, 2008; HOMAEI *et al.*, 2013; SIRISHA *et al.*, 2016). Os derivados de sílica, são considerados as matrizes mais adequadas para a imobilização de enzimas utilizadas na área industrial para a fabricação de produtos à base de enzimas processadas bem como, para fins de pesquisa em virtude de possuírem a resistência térmica, mecânica e porosidade mais elevadas (VIANELLO *et al.*, 2000; BLANCO *et al.*, 2004; HO *et al.*, 2004; JESIONOWSKI *et al.*, 2014; ZUCCA & SANJUST *et al.*, 2014).

Comparando com suportes orgânicos, os suportes inorgânicos, na maioria dos casos, oferecem maior resistência à contaminação microbiana visto não serem substrato para o crescimento de nenhum fungo/bactéria, e maior inércia química em condições de reação com elevada pressão e temperatura. Desse modo, essa categoria de suportes tem sido extensivamente estudada e os resultados alcançados têm conduzido a aplicação tanto em laboratórios quanto em escala industrial (VIANELLO *et al.*, 2013; MIN & YOO, 2014; SIRISHA *et al.*, 2016). A Tabela 3.3 mostra algumas matrizes de suporte inorgânicos, suas propriedades e as enzimas que foram imobilizadas.

Tabela 3.3 - Materiais inorgânicos usados para imobilização de enzimas, suas propriedades e as enzimas imobilizadas.

Materiais	Propriedades	Enzimas imobilizadas	Referências
Cerâmicas	Poros macro e micro eficientes tanto na redução da taxa de difusão como no aumento da área superficial específica.	Lipases	Huang & Cheng (2008); Kamori <i>et al.</i> (2000).
Sílica	Estruturas nanométricas com elevada área superficial, arranjo ordenado e elevada estabilidade química e mecânica.	Lipases	Oliveira <i>et al.</i> (2014); Barbosa <i>et al.</i> (2016)
Vidro	Líquido altamente viscoso	Glicose isomerase; peroxidase	Chopda <i>et al.</i> (2014); Marchis <i>et al.</i> (2012).
Carbono ativado	Elevada área superficial.	Pectinase; lipase ácida	Mahesh <i>et al.</i> (2016); Ramani <i>et al.</i> (2012).
Zeólitas	Elevada área superficial específica o que resulta em elevada carga de enzima.	Lipases	Mitchell & Pérez-Ramirez (2011); Vasconcellos <i>et al.</i> (2012).
Celite	Barata, elevada área de adesão, quimicamente inerte, resistente a pH, temperatura, ureia, detergentes e solventes orgânicos.	Lipase; β -galactosidase	Liu <i>et al.</i> (2009), Ansari & Husain (2012).

Adaptado de Sirisha *et al.* (2016).

Os orgânicos, por sua vez, são subdivididos em sintéticos (polímeros) e naturais (quitina, quitosana, alginato, celulose, etc.). Sendo que, os sintéticos se apresentam sob uma variedade de formas físicas e estruturas químicas que podem ser combinadas e modificadas de modo a se adequarem às condições para uma dada enzima e sua aplicação (MILÉTIC *et al.*, 2012; JESIONOWSK *et al.*, 2014; CARVALHO *et al.*, 2015). Além disso, apresentam perfeita estabilidade mecânica, são menos susceptíveis a ataques bacterianos e são facilmente preparados nas configurações geométricas pretendidas (MARINOV *et al.*, 2009; MILÉTIC *et al.*, 2012).

Contudo, a aplicabilidade de copolímeros macroporosos, depende, em grande parte, da sua porosidade. Logo, o conhecimento do mecanismo de formação da estrutura porosa e a capacidade de otimização dos parâmetros de porosidade (distribuição de tamanho de poro, volume específico de poro, área superficial específica e o diâmetro médio dos poros) são necessários para a concepção dos copolímeros com o desempenho desejado (MILÉTIC *et al.*, 2012).

Quando comparado aos sintéticos, os naturais apresentam vantagens como baixo custo e facilidade de degradação, sem gerar ônus ao meio ambiente. Diferentes matrizes têm sido usadas como material de suporte orgânico natural tais como, alginato, quitosana, quitina, colágeno, gelatina, pectina, celulose, entre outros (SIRISHA *et al.*, 2016; CARVALHO *et al.*, 2015). Dentre elas, destacam-se as matrizes de materiais lignocelulósicos, as quais têm ganhado importância como suporte para imobilização de enzimas e células, visto não só a disponibilidade econômica como subproduto agroindustrial, o que possibilita redução de custos no processo e agrega valor ao resíduo mas, também, pelo fato de estudos mostrarem a eficiência destes como meios alternativos para imobilização de enzimas (D’SOUZA & GODBOLE, 2012; BEZERRA *et al.*, 2015; SOUZA *et al.*, 2016).

Entretanto, embora alguns métodos de ativação tenham sido sugeridos para a imobilização de enzimas sobre a celulose e afins, suportes à base de carboidratos, não estão muito disponíveis em relação aos materiais lignocelulósicos (Tabela 3.4) (D’SOUZA & GODBOLE, 2012; BEZERRA *et al.*, 2015).

Tabela 3.4 - Matrizes de resíduos lignocelulósicos usados para imobilização de enzimas, técnica e enzima utilizada.

Material	Técnica usada	Enzima imobilizada	Referências
Casca de arroz	Adsorção física; ligação covalente.	Invertase; Lipase.	D’Souza & Godbole (2002); Costa-Silva <i>et al.</i> (2016).
Fibra de coco verde	Adsorção física; ligação covalente.	Lipase; lacase	Brígida <i>et al.</i> (2008); Cristovão <i>et al.</i> (2011); Bezerra <i>et al.</i> (2015).
Bagaço de cana	Adsorção física; ligação covalente.	Células de <i>Candida guilliermondii</i>	Santos <i>et al.</i> (2008); Mendes <i>et al.</i> (2013)
Celulignina de madeira	Adsorção física	Lipase	Gomes <i>et al.</i> (2006).
Talos de milho	Adsorção física	Levedura; lipase.	Yan <i>et al.</i> (2012); Lv <i>et al.</i> (2013)
Bagaço de malte	Ligação covalente.	Lacase	Silva <i>et al.</i> (2012).
Bagaço de cajú	Ligação covalente	Lipase	Souza <i>et al.</i> (2016).

3.6 – Imobilização de Enzimas

As enzimas ou biocatalisadores têm grande potencial de aplicação tanto na área científica como industrial em virtude de possuírem mecanismos catalíticos altamente eficientes e elevada seletividade e especificidade pelo substrato (DATTA *et al.*, 2013; JIA *et al.*, 2014). Essas características é o que as tornam importantes do ponto de vista econômico e tecnológico, visto serem essenciais para a concepção de processos de síntese que têm como finalidade a obtenção de uma vasta gama de produtos, sob condições suaves e ambientalmente corretas (MILETIC *et al.*, 2012; LV *et al.*, 2014).

Contudo, a baixa estabilidade operacional das enzimas solúveis seja por desnaturação ou desativação, seu custo elevado e, principalmente, as dificuldades encontradas na sua recuperação para uso posterior, acaba por inviabilizar seu uso na indústria (JIA *et al.*, 2014; SIRISHA *et al.*, 2016). Desse modo, diferentes propostas para a redução de custos têm sido postas em prática a fim de viabilizar a utilização de enzimas em processos biotecnológicos, entre elas pode-se citar a imobilização de enzimas (MOHAMAD *et al.*, 2015).

O termo “enzimas imobilizadas” foi utilizado inicialmente em uma Conferência de Engenharia Enzimática em 1971 (ALTINKAYNAK *et al.*, 2016) e refere-se a enzimas fisicamente confinadas ou localizadas em uma determinada região definida de espaço com retenção de sua atividade catalítica e que possa ser usada de forma repetida e contínua (JEGANNATHAN *et al.*, 2008; ES *et al.*, 2015). No entanto, é importante salientar que as moléculas do substrato e os produtos formados devem se mover livremente para dentro e para fora da fase em que as enzimas estão confinadas (SIRISHA *et al.*, 2016).

Nesse sentido, a atual demanda da indústria biotecnológica mundial está voltada para a melhoria da produtividade enzimática e para o desenvolvimento de novas técnicas de imobilização que aumente sua vida útil uma vez que, esses são os requisitos essenciais para facilitar sua utilização em grande escala de forma econômica (DATTA *et al.*, 2013; HOMAIEI *et al.*, 2013; ES *et al.*, 2015).

Diversas pesquisas têm mostrado que a imobilização em suportes sólidos são altamente eficiente para uso comercial, pois oferecem muitas vantagens sobre as enzimas solúveis, tais como: (i) conveniência econômica; (ii) aumento da atividade e da estabilidade em função da temperatura, solventes, pH, contaminantes e impurezas; (iii) possibilidade de recuperação da enzima imobilizada por filtração ou centrifugação no fim da reação conduzindo a um produto final puro sem a presença da biocatalisador; (iv) capacidade de reutilização das enzimas - mesmo em outro tipo de reação e (v) aumento da disponibilidade da enzima para o substrato

com maior volume ao longo de um período de tempo considerável. (KHARRAT *et al.*, 2011; MILETIC *et al.*, 2012; ZHANG *et al.*, 2012; DATTA *et al.*, 2013; HOMAEI *et al.*, 2013; MOHAMAD *et al.*, 2015).

Assim, com base no binômio custo-benefício de um processo o emprego de enzimas imobilizadas tende a aumentar a produtividade dos biocatalisadores, melhora as suas características e reduz notavelmente o custo com enzimas e com produtos enzimáticos, tornando-os, assim, mais atraente tanto do ponto de vista econômico como do operacional em comparação a enzima livre (MOHAMAD *et al.*, 2015).

Entretanto, cabe ressaltar que embora a imobilização torne a enzima mais estável frente a mudanças ambientais, reutilizável e econômica, a maioria delas, inevitavelmente, acaba perdendo atividade catalítica e sofrendo mudanças nas propriedades cinéticas após a imobilização. Essas alterações, no entanto, podem ocorrer tanto por limitações de transferência de massa entre a enzima e o substrato, como por conformações desfavoráveis adquiridas após o processo de imobilização (ALTINKAYNAK *et al.*, 2016; DWEVEDI, 2016).

Portanto, a escolha do método a ser utilizado ainda é uma questão que precisa ser analisada caso a caso, de modo a avaliar a eficiência do biocatalisador imobilizado nas mais diversas aplicações, principalmente, no que diz respeito ao percentual de enzima recuperada, estabilidade operacional, seletividade e redução da inibição por produtos ou qualquer outro componente presente no meio (DWEVEDI, 2016).

Nesse âmbito, entre as inúmeras enzimas que têm sido aplicadas para as sínteses orgânicas, as lipases foram as que ganharam maior destaque ao longo dos anos. As lipases (EC 3.1.1.3) são hidrolases e estão entre as enzimas mais populares na biocatálise com uma ampla variedade de aplicações em química fina, farmacêutica e na indústria de alimentos, devido à sua alta seletividade, condições suaves de reação, alta estabilidade em temperatura e pH extremos e a multiplicidade das reações por elas catalisadas tais como: hidrólise de gorduras, síntese de ésteres, ácidos graxos e glicerol e modificação de gorduras (KHARRAT *et al.*, 2011; ABDULLA & RAVINDRA, 2013; MIRANDA *et al.*, 2015; ANGAJALA *et al.*, 2016).

Além disso, ao contrário de outras enzimas, as lipases possuem uma faixa de especificidade de substrato extremamente ampla bem como, uma enorme capacidade de utilizar diversos compostos sintéticos estruturalmente diferentes como substrato, tanto em laboratórios de pesquisa como na indústria (BRAHMACHARI, 2017).

Desse modo, devido à natureza regio e enantiosseletiva dessas enzimas, as lipases foram e continuam sendo as preferidas dos bioquímicos, farmacêuticos, químicos orgânicos,

biofísicos, biotecnólogos e microbiologistas. Essa preferência se dá pela eficiente aplicabilidade das lipases na resolução de fármacos quirais, preparação de vários substituintes da manteiga de cacau, produção de biocombustíveis, formulação de detergentes, síntese de biosurfactantes, síntese de cosméticos, intensificadoras de sabor, degradação de resíduos bem como, na indústria oleoquímica, agroquímica, de laticínios, entre outros (SHARMA *et al.*, 2001; ANGAJALA *et al.*, 2016).

De acordo com Zhang *et al.* (2009), as lipases podem ser encontradas em todos os organismos vivos logo, são classificadas em função da fonte da qual foram obtidas, podendo ser microbiana, animal (lipases pancreáticas) e vegetal (lipase de sementes de aveia e de sementes de mamona).

Nesse âmbito, a lipase de *Burkholderia cepacia* (anteriormente conhecida como lipase *Pseudomonas cepacia*) recebe destaque na aplicação industrial por realizar a catálise em ambos os meios aquosos e não aquosos (ABDULLA & RAVINDRA, 2013). Trodler *et al.* (2009) descreve que a lipase de *Burkholderia cepacia* (LBC) é um catalisador muito seletivo para uma ampla gama de substratos, incluindo a resolução cinética de misturas racêmicas de álcoois secundários por meio de hidrólise em água ou esterificação em solventes orgânicos.

Na literatura é possível encontrar a LBC imobilizada por vários métodos em diferentes tipos de suportes (PALOMO *et al.*, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2014; MARTINS *et al.*, 2016; BARBOSA *et al.*, 2016). No entanto, apesar dos vários procedimentos de imobilização de enzimas descritos na literatura, um número limitado é utilizado no mercado.

3.7 – Métodos de Imobilização

Uma variedade de técnicas para os mais diferentes suportes têm sido desenvolvidos ao longo dos últimos 100 anos (DWEVEDI, 2016). Contudo, as técnicas de imobilização típicas podem ser divididas em dois grupos: os métodos físicos (adsorção, encapsulamento e aprisionamento) e os que são baseados nas interações químicas (troca iônica e ligação covalente) (LV *et al.*, 2014) (Figura 3.16).

Nos métodos físicos, a ligação da enzima ao suporte se dá via interações físicas o que torna o processo passível de reversão apenas controlando os parâmetros físico-químicos. Já nos químicos, a interação enzima-suporte ocorre por meio de ligações químicas sejam elas, covalente ou iônicas, o que torna o processo irreversível (DWEVEDI, 2016). A Tabela 3.5 apresenta um comparativo das técnicas mais usadas.

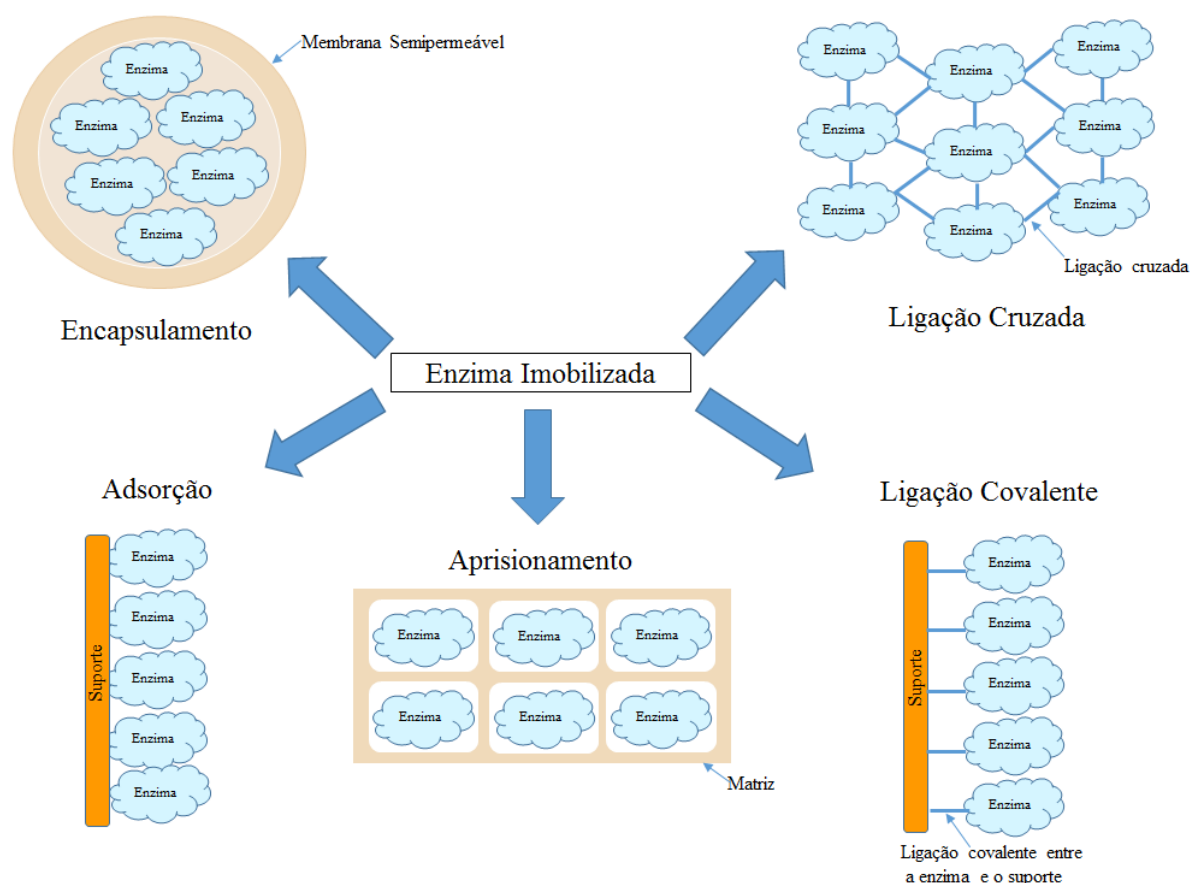


Figura 3.16 - Diferentes métodos para imobilização de enzimas.
Adaptado de Sirisha *et al.*, 2016.

Tabela 3.5 - Comparação dos diferentes métodos de imobilização.

<i>Características</i>	<i>Adsorção</i>	<i>Encapsulamento</i>	<i>Ligações Cruzada</i>	<i>Ligações Covalente</i>
<i>Processo de imobilização</i>	<i>Fácil</i>	<i>Difícil</i>	<i>Difícil</i>	<i>Difícil</i>
<i>Interação</i>	<i>Fraca</i>	<i>Forte</i>	<i>Forte</i>	<i>Forte</i>
<i>Recuperação da atividade da lipase</i>	<i>Baixa</i>	<i>Alta</i>	<i>Moderada</i>	<i>Baixa</i>
<i>Recuperação da lipase imobilizada</i>	<i>Possível</i>	<i>Impossível</i>	<i>Impossível</i>	<i>Impossível</i>
<i>Custo da imobilização</i>	<i>Baixo</i>	<i>Baixo</i>	<i>Moderado</i>	<i>Alto</i>

Adaptada de Zhang *et al.*, 2012.

3.7.1 – Adsorção

Dentre as técnicas de imobilização, a adsorção é um dos mais antigos métodos de imobilização e o que tem maior potencial comercial em relação às outras técnicas, devido ao seu custo relativamente baixo e a facilidade de execução. Além disso, normalmente, mantém intacta a estrutura da enzima o que preserva a sua atividade catalítica (KHARRAT *et al.*, 2011; JESIONOWSK *et al.*, 2014; AGYEI *et al.*, 2015).

Nesse tipo de imobilização as enzimas estão ligadas à matriz por meio de ligações de hidrogênio, forças de Van der Waals, interações hidrofóbicas e dipolo-dipolo (Figura 3.17) (DWEVEDI, 2016).

Desse modo, como as forças envolvidas neste processo são fracas quando comparadas à covalente, o processo de imobilização pode ser revertido, oferecendo, assim, a capacidade de reutilização do suporte após a inativação da enzima imobilizada. Para isto, basta apenas mudar as condições que influenciam a força da interação enzima-suporte, como por exemplo, pH, força iônica, temperatura, ou a polaridade do solvente. Todavia, o resultado da atuação dessas forças é a baixa estabilidade e a possibilidade de lixiviação das enzimas imobilizadas (BRENA & BATISTA-VIEIRA, 2006; JESIONOWSK *et al.*, 2014; ES *et al.*, 2015; DWEVEDI, 2016).

Outra desvantagem desta técnica é o fato das enzimas adsorvidas formarem camadas heterogêneas separadas sobre a superfície do suporte, o que causa impedimento estérico e, conseqüentemente, reduz a capacidade catalítica das enzimas (JIA *et al.*, 2014). No entanto, de acordo com Jesionowsk *et al.* (2014) e Es *et al.* (2015), a adsorção continua sendo o método universal mais simples e rápido para imobilização de enzimas na indústria. Ainda de acordo com esses autores, isso se deve ao fato desta ser uma técnica que envolve pouca ou nenhuma medida de funcionalização o que a torna simples e menos dispendiosa, porém com atividade catalítica satisfatória.

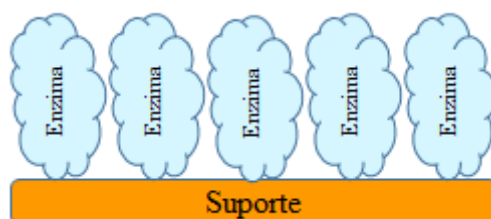


Figura 3.17 - Adsorção de enzimas num suporte por ligação iônica.

3.7.2 – Ligação Covalente

A ligação covalente é um dos métodos de imobilização mais estudado e baseia-se no acomplamento irreversível da enzima ao suporte por ligações fortes as quais, fazem desta técnica a forma mais estável de imobilização (LV *et al.*, 2014; AGYEI *et al.*, 2015).

É um método que depende da formação da ligação covalente entre a enzima e o suporte, a qual ocorre por meio dos aminoácidos de cadeia lateral tais como, a histidina, arginina, ácido aspártico, entre outros. Essa ligação pode ocorrer diretamente nos grupos reativos do suporte (por exemplo, hidroxila, amida, amino, carboxílico, fenólico, sulfídrico, tiol e imidazol) ou via braço espaçador, “ponte” artificial ligada à matriz através de reações químicas tais como, diazotização, base de Schiff, e formação de ligações imina) (DWEVEDI, 2016; SIRISHA *et al.*, 2016).

Normalmente, é delineada em dois diferentes métodos globais (Figura 3.18): o primeiro denominado unipontual, ocorre via um braço espaçador e tem a vantagem de restringir moderadamente a configuração das enzimas; o segundo, fixação multipontual, proporciona uma maior estabilidade, porém pode tornar a enzima inflexível e reduzir a sua atividade catalítica (MILÉTIC *et al.*, 2012).

Em ambos os métodos, diferentes mecanismos de ligação podem ser utilizados, sendo possível imobilizar a enzima através de qualquer um dos seus grupos superficiais ativos. Entretanto, os grupamentos amino são os alvos preferenciais visto a sua abundância nas proteínas. Logo, as ligações amida em que os grupos amino dos aminoácidos reage com os grupos carboxila do suporte, são os grupos covalentes mais comuns (MIGNEAULT *et al.*, 2004; MATEO *et al.*, 2007; JIA *et al.*, 2014).

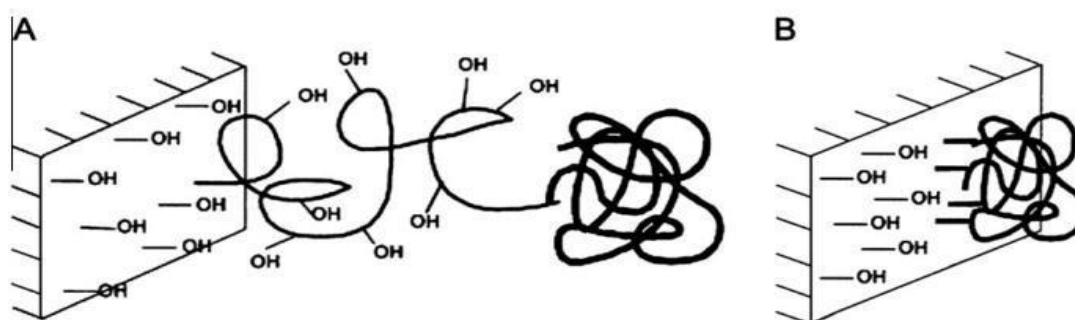


Figura 3.18 - Imobilização por meio de ligação covalente: A – por meio de braço espaçador; B - Ligação Multipontual.
Adaptado de Miletic *et al.*, 2012.

Quando comparados a outras técnicas, possui como vantagens além da forte ligação enzima-suporte que minimiza sua lixiviação para o meio reacional; a fácil interação

enzima/substrato devido à localização superficial do catalisador; o aumento da resistência a condições físicas e químicas extremas (tais como, temperatura e solventes orgânicos), aumento da estabilidade operacional e formação de múltiplas ligações covalentes o que reduz a flexibilidade conformacional, as vibrações térmicas, o desdobramento e a desnaturação da proteína (MILETIC *et al.*, 2012; DATTA *et al.*, 2013; DWEVEDI, 2016).

Todavia, cabe salientar, que em alguns casos, esta forte interação restringe bastante o livre movimento da enzima causando enrijecimento e alterações catalíticas e conformacionais drásticas, resultando na diminuição da atividade enzimática. Além disso, é relativamente dispendioso e complicado (MILETIC *et al.*, 2012; DATTA *et al.*, 2013; ES *et al.*, 2015; HOMAIEI *et al.*, 2013; DWEVEDI, 2016).

Geralmente, o procedimento se dá em três etapas: 1^a - ativação do suporte; 2^a - modificação da superfície do suporte ativado; 3^a - acoplamento da enzima - e quando envolve os grupos amino, geralmente, são feitos em meio aquoso, à temperatura entre 0 e 25°C, pH entre 7,0 - 8,0, próximo a neutralidade, utilizando diferentes agentes ativadores tais como: glutaraldeído e o brometo de cianogênio (MIGNEAULT *et al.*, 2004; MATEO *et al.*, 2007). No entanto, conforme Vitolo (2011), a escolha das condições de imobilização irá depender da estabilidade da enzima e do suporte frente ao pH de formação das ligações covalentes, bem como da estabilidade das ligações suporte-enzima frente ao pH de utilização do sistema imobilizado.

Ademais, Agyei *et al.* (2015) ressaltam que devido ao tipo de ligação depender muito das propriedades químicas do material utilizado como suporte e dos grupos de aminoácidos residuais existentes na estrutura protéica, as condições de reação durante o processo de imobilização não devem comprometer a atividade nem o sítio ativo da enzima quando no uso dos reagentes.

Dessa forma, pesquisas sobre novos materiais que possam ser utilizados como suporte, mecanismos de funcionalização mais suaves e que não alterem as propriedades químicas da enzima são fundamentais, pois é sabido que a exposição de enzimas a condições ambientais adversas tais como valores de pH extremos, podem resultar em perda de atividade catalítica ou modificação do sítio ativo da enzima (AGYEI *et al.*, 2015).

Portanto, sabendo que as propriedades das enzimas imobilizadas são regidas pelas características da enzima e do material do suporte (SHELDON, 2007), pode-se inferir que as características da matriz são de importância primordial na determinação do desempenho do sistema imobilizado.

Logo, não há um método ou suporte ideal para todas as enzimas e as suas diversas aplicações visto que, todos os métodos podem apresentar uma série de vantagens e desvantagens (SCHERER *et al.*, 2012).

4. ARTIGOS E PATENTES

Neste capítulo serão apresentados os resultados e discussões do tema abordado por intermédio de 3 produções científicas e 3 pedidos de depósito de patente junto ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI), as quais demonstram o potencial do caule de girassol *in natura* e pré-tratado como suporte para imobilização de enzimas.

4.1 – Artigo 01

Autohydrolysis pretreatment of sunflower stalk: effect of process conditions in the extraction of hemiceluloses.

Será submetido ao periódico **Carbohydrate Polymers**

4.2 – Artigo 02

Influence of parameters alkaline pretreatment in removal of carbohydrates of sunflower stalk for utilization in sugar platform in biorrefineries.

Será submetido ao periódico **Química Nova**

4.3 – Artigo 03

Sunflower stalk in natura and treated as support for lipase immobilization by physical adsorption.

Será submetido ao periódico **Applied Biochemistry and Biotechnology**

4.4 – Patente 01

Processo de tratamento de biomassa lignocelulósica de resíduo de abacaxi (coroa) com líquido iônico prótico.

Patente depositada junto ao INPI nº **BR 10 2015 023926 2**

4.5 – Patente 02

Suportes alternativos para imobilização de lipases.

Patente depositada junto ao INPI nº **BR 10 2017 005101 3**

4.6 – Patente 03

Imobilização de lipases em suporte derivado de tratamento químico.

Patente aprovada junto aos NITs e já em fase de depósito junto ao INPI

4.1. Artigo 01

Autohydrolysis pretreatment of sunflower stalk: effect of process conditions in the extraction of hemiceluloses

Jaci L. Vilanova-Neta¹, Sande A. S. Costa¹, Edelvio de Barros Gomes²,
Rita C. M. Miranda³, Daniel. P. Silva⁴, Denise S. Ruzene⁴,
Cleide M. F. Soares¹, Álvaro S. Lima¹

¹ Universidade Tiradentes, Instituto de Tecnologia e Pesquisa

² Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Sergipe,
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia da Bahia

³ Universidade Ceuma, Mestrado em Meio Ambiente

⁴ Universidade Federal de Sergipe, Centro de Ciências Exatas e Tecnologia

Abstract: The lignocellulosic biomass is one of the most promising alternative energy sources for obtaining various chemical products and biofuels through biorefinery. However, the physical and chemical structure of these materials make them highly recalcitrant, which hampers their bioconversion. Therefore, an appropriate pretreatment is needed to break down the lignocellulose structure. Thus, this work aims to contribute with the studies of pre-treatment in the extraction process of hemiceluloses from sunflower stalk by autohydrolysis. For this, tests were performed at different temperatures (165 – 185 °C) and reaction time (5 - 35 min), with determination of the yield of the process and chemical composition of the liquor obtained of each condition. Severity factor was also determined, as well as its effect on the pH values. The results obtained show that the process yield and the pH of the reaction medium are a direct function of temperature and reaction time seen that vary conform the increase or reduce the severity factor of the process. The process proved to be efficient for extracting hemiceluloses, allowing a extraction maximum of 84% of hemicellulose from sunflower stalk to 185°C and 25 min of reaction, while the cellulose, due its highly crystalline structure, proved resilient to the pretreatment with extraction maximum of 8%.

Keywords: biomass, agroindustrial waste, lignocellulosic, sunflower.

1 – Introduction

Agricultural and agroindustrial wastes are considered one of the most promising renewable energy sources for the development of a sustainable and environmentally friendly productive chain, based on biorefinery processes. Among these residues highlights those based in lignocellulosic structures (consisting mainly of cellulose, hemicellulose and lignin), as it besides being considered one of the best sources of cheap carbohydrates, they can also be used for the production of energy and various high value added products such as chemicals, polymer precursors, among others, opening thus, new areas in the chemical industry (RUIZ *et al.*, 2013; RAVINDRAN & JAISWAL, 2016; CHERUBINI, STRØMMAN & ULGIATI, 2011).

In that sense, by virtue of the alarming environmental, economic and social issues generated by the massive use of fossil resources such as uncertainty in the supply and price and generated pollution, research have been conducted in order to optimize the management and use of lignocellulosic wastes in a wide range of using conditions (ÉGUES *et al.*, 2012; RABETAFIKA *et al.*, 2014; RABEMANOLONTSOA & SAKA, 2016).

Within this context, residues from Sunflower (*Helianthus annuus* L.), annual dicotyledonous Compositae family, native to North America, fourth most important oleaginous the world, with global production of about 40 million tons (USDA, 2015), shows itself promising in the branch of biorefineries. In Brazil, the production of the crop 2014/15 was 153 thousand tons (CONAB, 2015) and it is estimated that for each hectare of cultivated sunflower are produced 3-7 tons of dry waste biomass per hectare (RUIZ *et al.*, 2013).

The sunflower crop is associated mainly to the food industry, however is also used in the biofuels industry and in the area of bio-lubricants, detergents and cosmetics. The by-products derived from the production of oils are used in animal nutrition, while that residues of the plant as stalk, leaf and flower-head, are left in the fields without any real industrial use, necessitating, therefore, of alternative uses seeing that possess a high concentration of cellulose, hemicellulose and lignin, which can be fractionated and used as an excellent source renewable organic for biorefinery (DÍAZ *et al.*, 2015; FOLLAIN *et al.*, 2015).

The fractionation, implies in the use of pre-treatments that provoke disorganization in the lignocellulosic complex to remove chemical and physical barriers that make the native biomass recalcitrant and prevents its conversion (JÖNSSON & MARTÍN, 2016; ATAIE *et al.*, 2014; RABEMANOLONTSOA & SAKA, 2016).

Environmental-friendly technologies such as autohydrolysis, which uses only water as reagent, has been searched, as it in addition to reducing the process and environmental impacts costs, avoids corrosion problems (as compared to acid hydrolysis) and reduces the

content of inhibitor compounds in the pretreated samples (ÉGUES *et al.*, 2012; SINGH *et al.*, 2015; SUN *et al.*, 2016).

The pretreatment by autohydrolysis consists on cooking biomass in water at high temperatures. The protons generated by the autoionization of water act as catalysts, that hydrolyze the acetyl groups of the hemicelluloses, present in the form of esters in xylan, thus freeing acetic and uronic acids to the medium. These acids helps to catalyze the hydrolysis reaction, facilitating the hemiceluloses extractions (SANTUCCI *et al.*, 2015; ÉGUES *et al.*, 2012).

Of this process are obtained two distinct phases: i. liquid phase (autohydrolysis liquor), rich in hemicelluloses and products resultants of its hydrolysis and of the hydrolysis of acetyl groups, acetic acid, as also of the decomposition of the sugars to furfural and hydroxymethylfurfural; and ii. solid phase, composed mainly of a cellulose-lignin complex (AMENDOLA *et al.*, 2012; RUZENE *et al.*, 2008). Thus, this study focused on the use of autohydrolysis, to evaluate the effect of time and temperature on the efficiency of the process for extracting the hemicelluloses sunflower stalk, defining an optimum condition for maximum extraction. Furthermore, it was evaluated also the effect of the process severity factor, which combines time of reaction and temperature at a single order of reaction, on the yield and the pH value, of each process condition.

2 – Materials and methods

2.1 – Materials

Sunflower stalk, kindly provided by farmers from Jacaré-Curituba settlement in the rural area of Poço Redondo municipality, semi-arid region of Sergipe / Northeast of Brazil (latitude: -09°43'55.8 "S, longitude -37°45'31.8" W) the stalk was separated manually and dried at 60°C in an oven (Biopar 51005); in sequence it was milled and classified to particle size of 32-60 mesh.

2.2 – Chemical composition of sunflower stalk

The *in natura* material composition was determined according to the National Renewable Energy Laboratory (NREL, Golden, CO) by analytical methods for biomass. Initially, approximately 5 g of dry sample was hydrolyzed with 72% H₂SO₄ at 30°C for 1 h. Then, the reaction mixture was diluted to 4% H₂SO₄ and autoclaved at 121 °C for 1 h. This hydrolysis liquid was then analysed for sugar content by high performance liquid

chromatography (HPLC - Shimadzu – Prominence) with refractive index detector (RID-10A). The concentration of monomeric sugars in the soluble fraction was determined in a carbohydrate analysis column Supelcogel – Pb, 30 cm x 7.8 mm, equipped with a guard column operating at 85°C with deionised water as mobile-phase at a flow rate of 0.5 mL/min. The acetyl group content was evaluated by HPLC with the same system mentioned, with a Bio-Rad Aminex HPX-87H column at 45°C and mobile phase of 5 mM H₂SO₄ at a flow rate of 0.6 mL/min.

The concentration of acid-soluble lignin (ASL) in the filtrate was determined by absorbance on a spectrophotometer UV / Visible at 280 nm. The solids were dried at 105°C to constant weight and regarded as acid-insoluble lignin (AIL).

2.3 – Autohydrolysis pretreatment

Autohydrolysis procedures were carried out in a reactor ampoule type submersed in silicone oil bath, using a solid/liquid ratio of 1:10 (w:v/stalks:water). Three temperatures (165, 175 e 185 °C) and seven residence times (5, 10, 15, 20, 25, 30 e 35 min) were tested. After the reaction time, the reactor was immediately cooled in an ice bath and the separated liquid phase from the solid part by filtration. The filtrate, hemiceluloses rich phase (called hemicelluloses liquor) was used for composition analysis, while the precipitate (rich phase in cellulose-lignin complex) was washed with distilled water and dried at 60 °C overnight. The experimental design consisted of 35 experimental conditions, all performed in triplicate.

The parameter of severity factor (R_0) was calculated in order to verify the effect of time and temperature on the yield of the process according to Overend and Chornet (1987), as shown in Eq. (1),

$$R_0 = t \cdot \exp[(T_H - T_R)/14,75] \quad \text{Eq. (1)}$$

where t represents the reaction time in minutes, T_H is the process temperature and T_R is a reference temperature value of 100 °C.

According to National Renewable Energy Laboratory (NREL, Golden, CO), a post-hydrolysis procedure with sulfuric acid (5% v/v) at a ratio of liquor: acid 4:1 (v/v), at 121 °C and 30 min, was carried out in the liquor obtained of the pretreatment in order to convert the oligosaccharides resulting from the treatment at monosaccharides making it possible to quantifies them for the calculation of its chemical composition.

The pre-treatment mass yield was calculated according to the Eq. (2):

$$PM = m_{\text{final}} / m_{\text{initial}} * 100 \quad \text{Eq. (2)}$$

where: m_{initial} : initial mass of the sunflower stalk (g); m_{final} : mass of the sunflower stalk after pre-treatment (g); PM: pre-treatment mass yield.

2.4 – Morphologic and Physicochemical properties

2.4.1 – Fourier Transform Infrared (FTIR) Analysis

Analyses were carried out on a FTIR spectrum over a range of 400–4000 cm^{-1} (spectrophotometer FTIR Agilent) in order to investigate the changes in the functional groups in the lignocellulosic biomass before and after the pretreatment.

2.4.2 – Thermogravimetric Analysis

The thermal degradation was determined by thermogravimetric analysis (Thermogravimetric Analyser, TGA - 50 Shimadzu,) with heating rate of 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$, in the temperature range from room temperature to 800 $^{\circ}\text{C}$, with mass variation 4-6 mg using nitrogen atmosphere during experiments.

2.4.3 – Scanning Electron Microscopy

The morphology of sunflower stalk, before and after pretreatment, were analyzed using a scanning electron microscope (SEM, Hitachi S-3000N).

2.4.4 – Crystallinity of biomass

The crystallinity of the residue was evaluated based on the analysis X-ray diffraction and the crystallinity index calculated according to the Segal *et al.* (1959) method, Eq. (3).

$$CrI = \frac{I_{(002)} - I_{(am)}}{I_{(002)}} * 100 \quad \text{Eq. (3)}$$

where: CrI - crystallinity index, in percentage; $I_{(002)}$ - maximum intensity (in arbitrary units) of the 002 lattice diffraction, representing crystalline material at 22.5 $^{\circ}$; $I_{(am)}$ - intensity diffraction at 18.7 $^{\circ}$, 2 θ degrees, representing only amorphous material.

3 – Results and Discussion

3.1 – In natura Material Composition

The composition (% dry basis) of the sunflower stalks varies according to the plant variety, climate, soil, water availability and planting conditions (RUIZ *et al.*, 2013). Therefore, to determine the overall efficiency of any process designed to convert lignocellulosic polysaccharides to value-added products, it is first fundamental determine the composition of these lignocellulosic materials. Thus, the Table 4.1 summarizes the composition of the sunflower stalk used as a feedstock in this work. Sugars are expressed as monomers.

Table 4.1 - Chemical composition of the sunflower stalk.

Composition	Dry matter (%)		
	Dry matter (%)	Diaz <i>et al.</i> , 2011	Ruiz <i>et al.</i> , 2013
Cellulose (as glucose)	37.97 ± 0.95	32.56 ± 1.64	33.45 ± 0.40
Hemicellulosic sugars	15.93 ± 1.77	20.73 ± 0.66	21,71 ± 0.16
Xylose	10.30 ± 0.64	15.19 ± 0.57	16.65 ± 0.12
Arabinose	1.51 ± 0.6	1.13 ± 0.02	0.87 ± 0.01
Mannose	2.18 ± 0.17	1.73 ± 0.18	1.79 ± 0.01
Galactose	1.94 ± 0.36	2.68 ± 0.05	2.40 ± 0.02
Acetyl groups	1.71 ± 0.05	2.08 ± 0.05	2.08±0.05
Total lignina	17.83 ± 0.053	13,32 ± 1,12	14,26 ± 0,63
Acid soluble lignin (ASL)	0.17 ± 0.003	1.87 ± 0.06	1.66 ±0.10
Acid insoluble lignin (AIL)	17.67 ± 0.05	11.45 ± 1.06	12.60 ±0.53
Extractives	18.70 ± 0.48	15.96 ± 1.01	16.73±0.38
Ash	3.94 ± 0.004	6.03 ± 2.46	7.77±0.05
Total	94,06	90,68	96,00

The main constituents present were cellulose as glucose, 37.97 % ± 0.95, total lignina, 17.83 % ± 0.053, and hemicellulose which represents 15.93 ± 1.77% of the raw material dry weight. Of this total of hemicelluloses, 67% corresponds to xylose, main hemicellulosic sugar. Ash, acetyl groups and extractives represents 3.94 ± 0.004, 1.71 ± 0.05 e 18.70 ± 0.48, respectively. These values are similar to those already reported in the literature by other authors, when in studies with sunflower stalk (DÍAZ *et al.*, 2011; RUIZ *et al.*, 2008; RUIZ *et al.*, 2013). However, differences in composition may be partially attributed to differences in variety of the plant, climate, water availability, soil, or other factors, which end up causing that plants of the same species have different compositions (RUIZ *et al.*, 2013).

3.2 –Autohydrolysis Pretreatment

Pretreatment by autohydrolysis is widely used for dissolution of hemicellulose since it use any additional catalyst, only water (AMENDOLA *et al.*, 2012). Thus, proposing to study the influence of this pretreatment in the removal of hemicelluloses, sunflower stalk were treated under different conditions of time and temperature. Assays were carried out at times of 5, 10, 15, 20, 25, 30 e 35 min, and temperatures of 165, 175 and 185 °C, for each studied condition.

The analysis for quantification of biomass recovered after the pretreatment revealed lower process yields, or, in other words, higher solubilizations of the solid fraction, under higher temperatures and higher reaction times (Table 4.2). The process yields varied from 85% at milder conditions (severity 2.61) at 65% in the most severe condition (severity 4.05).

Table 4.2 Yield, pH and severity factor values obtained in diferents conditions of autohydrolysis pretreatments.

Experiment	T (°C)	t (min)	Yield (%)	pH	Severity factor
1	165	5	85.53	7.23	2.61
2	165	10	83.68	7.07	2.91
3	165	15	81.73	6.98	3.09
4	165	20	78.34	6.48	3.21
5	165	25	77.10	6.03	3.31
6	165	30	75.38	5.91	3.39
7	165	35	71.76	5.40	3.46
8	175	5	86.17	7.18	2.91
9	175	10	84.22	7.08	3.21
10	175	15	80.78	5.97	3.38
11	175	20	77.10	5.93	3.51
12	175	25	73.95	5.43	3.61
13	175	30	72.47	5.20	3.69
14	175	35	71.06	5.09	3.75
15	185	5	89.62	7.13	3.20
16	185	10	83.16	7.03	3.50
17	185	15	79.14	6.14	3.68
18	185	20	74.88	5.79	3.80
19	185	25	73.18	5.46	3.90
20	185	30	68.44	5.05	3.98
21	185	35	65.85	4.57	4.05

This 24% reduction in process yield, between the more condition and the less severe, may be associated with a greater solubilization of biomass components, especially hemicelluloses. Similar or even lower process yields are reported in literature for different residues, however at higher temperatures (RUIZ *et al.*, 2008; RUIZ *et al.*, 2010; ÉGUES *et al.*, 2012; AMENDOLA *et al.*, 2012).

Similarly, the pH values in the liquor also decrease with increasing severity of pretreatment, varying of 7.2 (165 °C for 5 min) to 4.6 (185 °C for 35 min) in conditions less and more severes, respectively. This decrease in pH value of the reaction medium indicates a more pronounced formation of acetic acid, due to more intense hydrolysis of the acetyl groups of the hemicelluloses, that liberate acetic acid to the reaction medium (SANTUCCI *et al.*, 2015).

In order to better evaluate the effect of the severity of the pretreatment and of the pH value under the liquor composition, the pretreatment liquor was characterized in relation to the sugars contents (hemicelluloses and cellulose) and the results are shown in Figure 4.1 and Figure 4.2. The results revealed that the hemicelluloses extraction rate was directly linked to the severity of process seen that increasing the extraction was a consequence to the intrinsic effect of temperature and reduction of pH. At 165 °C, a reaction time of 35 min was necessary for a removal of 54% of hemicelluloses, whilst at 175 e 185 °C, the correspondent reaction time was reduced to 20 min (Figure 4.1). Thus reducing the necessary time by approximately 2-fold.

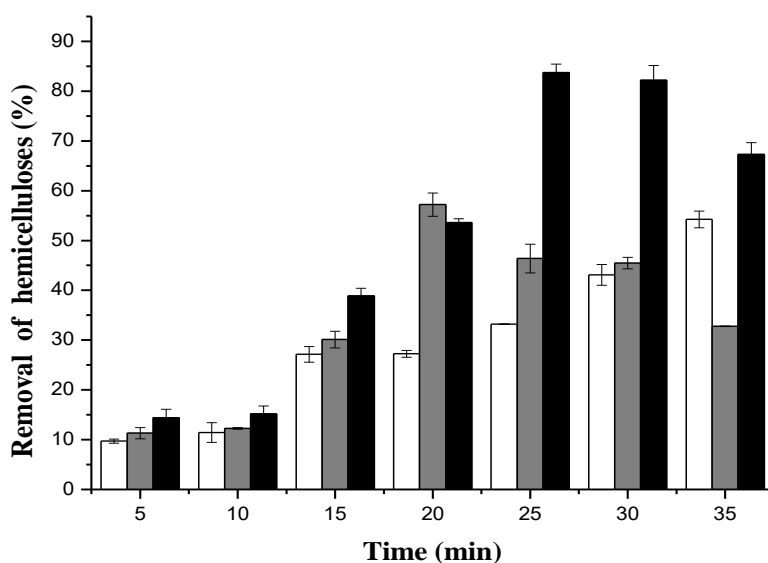


Figure 4.1 - Percentage of hemicelluloses removed after pretreatment of autohydrolysis at 165 (□), 175 (■), and 185 °C (■), in function of different times.

On the other hand, the highest sugars content in liquor was obtained when the pretreatment was carried out in condition 185 °C for 25 min with severity factor of 3.90. At this severity, 84% of hemicelluloses were extracted in the liquid fraction resultant from the pretreatment of 4 g of raw material. Whereas in lower temperatures, 165 e 175 °C, was possible to check smaller extraction, equivalent to 54 e 57% respectively (Figure 4.1). Suggesting, therefore, that the effect of the temperature is essential in the process. This behavior was also observed for different biomasses, as reported by other authors such as, Caparrós *et al.* (2008) and Díaz *et al.* (2011), which observed high efficiency of hemicellulose extraction from sunflower stalk at temperatures above 180 °C.

However, it was also observed that the liquors obtained in times of 25 - 35 min at temperature of 175 °C (severity of 3.61 – 3.75) and times of 30 – 35 min at 185 °C (severity of 3.98 – 4.05), showed lower amounts of sugars when compared with those obtained in lower times and lower severities 20 min at 175 °C and 25 min at 185 °C (severity of 3.51 and 3.90, respectively) (Figure 4.1). This reduction occurred, probably, due to the more severe process conditions which tend to degrade the hemicellulose sugars to furfural, hydroxymethylfurfural and other byproducts (DÍAZ *et al.*, 2011; HAN *et al.*, 2015), seen that not occurred in the temperature of 165 °C.

Other authors also observed a decrease in the hemicelluloses content in more severe reaction conditions, in other words under higher times and temperatures. Égues *et al.* (2012) observed a reduction in extraction after 45 min of reaction at 190 °C, when study the effect of the autohydrolysis in the removal of hemicelluloses of corn stalks. Han *et al.* (2015) reported a decrease in hemicelluloses extraction after 20 min reaction when treated wheat straw at 180 °C.

However, it can also be observed that the hydrothermal pretreatment minimally affected the dissolution and decomposition of cellulose as shown in Figure 4.2. The maximum extraction was 8% at 185 °C at 35 min, 88% lower than the extraction of hemicelluloses.

This low solubility of the cellulose is largely attributed to crystalline regions of cellulose microfibrils which are formed by inter and intramolecular hydrogen bonds, while the hemicelluloses have an amorphous nature, easily degraded (IROBA *et al.*, 2014; SANTUCCI *et al.*, 2015).

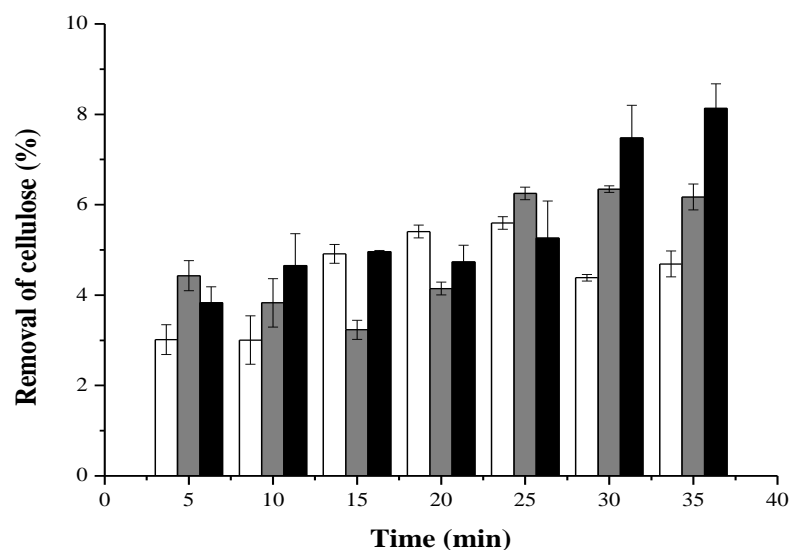


Figure 4.2 - Percentage of cellulose removed after pretreatment of autohydrolysis at 165 (□), 175 (■), and 185 °C (■), in function of different times.

3.3 – Physicochemical and Morphological Characterization of Treated Sunflower Stalk

3.3.1 – Morphological Characterization

The micrographs of sunflower stalk surfaces before and after pretreatment, obtained by scanning electron microscopy showed the changes undergone by the biomass after the performed pretreatments (Figure 4.3).

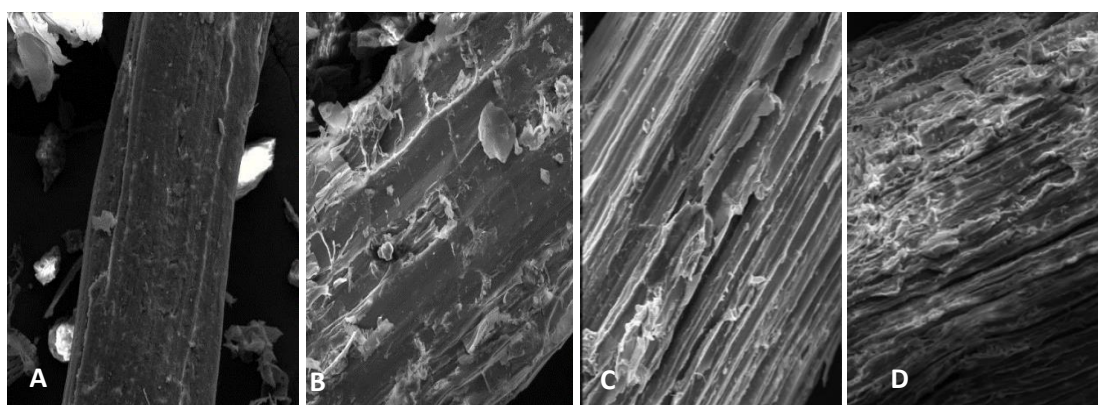


Figure 4.3 - Scanning electron micrographs of the in natura sunflower stalk (A and B) and after autohydrolysis pretreatment (C and D) (magnitude 500X).

While the surface of the biomass in natura showed covered by a smooth layer, uniform and compact (Figure 4.3 A-B), the surface of the pretreated material by autohydrolysis (Figure 4.3 C - D) showed an irregular surface with cavities suggesting drastic alterations in the surface of the fiber that can be associated mostly the removal of hemicelluloses (YAN *et al.*, 2012;

JÚNIOR *et al.*, 2013; BEZERRA *et al.*, 2015). Others studies which removed hemicelluloses and/or others components, as lignin and cellulose, also reported similar modifications, in which different lignocellulosic materials lost their highly compact structure and passed to exhibit a greater surface area (RUIZ *et al.*, 2011; YAN *et al.*, 2012; JÚNIOR *et al.*, 2013).

3.3.2 – X-Ray Diffraction Analysis

Biomass CrI is defined as the mass fraction of crystalline cellulose in the biomass. The X-ray diffraction analysis for in natura sunflower stalk and pretreated are shown in Figure 4.4 and the corresponding crystallinity indexes (CrI) in Table 4.3.

Table 4.3 - Crystallinity indexes (CrI) of in natura sunflower stalk and pretreated.

Sunflower stalk	Calculated CrI	Yield (%)	Corrected CrI (%)
In natura	51.7	100	51.7
Autohydrolysis	67.7	73	49.4

All diffractograms obtained (Figure 4.4) were typical type I cellulose, with peaks in the amorphous region ($18^\circ \leq 2\theta \leq 19^\circ$) and the crystalline region ($22^\circ \leq 2\theta \leq 23^\circ$) (PEREIRA *et al.*, 2012). Other authors also reported this type of cellulose in their jobs when analyzing corncob, wood, banana, sugarcane bagasse and sponge gourd (GUIMARÃES *et al.*, 2009, ZHANG *et al.*, 2017; YIN *et al.*, 2017).

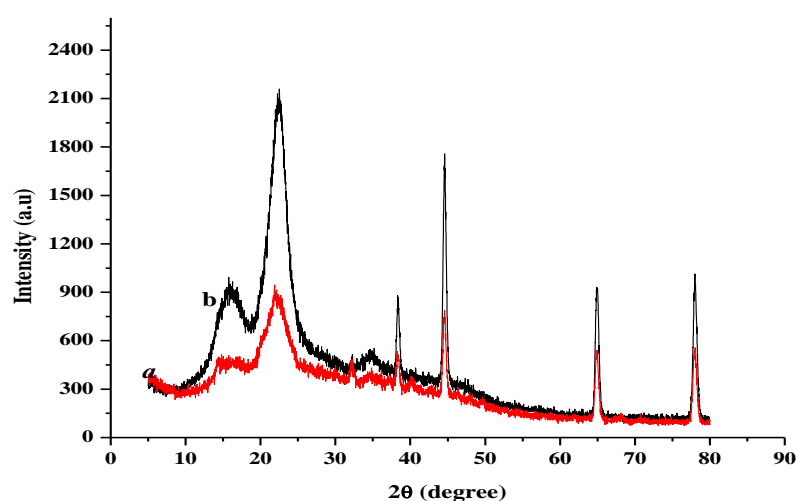


Figure 4.4 - Diffractograms for the sunflower stalk in natura (a) and pretreated (b).

With data obtained by the diffratograms (Figure 4.4) were calculated crystallinity index by Equation (2) and the results showed that the calculated CrI of the sunflower stalk without treatment (in natura) was lower (51.7%) which the residue pretreated by autohydrolysis (67.7%). This increase in the calculated CrI values of the treated materials can be attributed to an increase in cellulose concentration due to removal of amorphous hemicellulose and migration, removal and relocation of lignin (RABELO *et al.*, 2013; ZAKARIA *et al.*, 2014; ZHANG & WU, 2015; ZHANG *et al.*, 2017).

However, as the calculated CrI can be affected by non-cellulosic components, it was necessary to determine the corrected CrI (multiplying CrI by the pretreatment yield), considering the removal of amorphous components.

These results corrected, also confirmed the removal of amorphous components once there was a reduction of crystallinity in the residue pretreated (49.42%) when compared to the in natura residue (51.7%). Other authors also observed this reduction in the crystallinity index after thermal and/or chemical pretreatment (KIM *et al.*, 2014; RABELO *et al.*, 2013; ZAKARIA *et al.*, 2014).

3.3.3 – Thermogravimetric Analysis (TGA)

The natural fibers are a complex mixture of organic material and when submitted to thermal or chemical pretreatment produce a variety of chemical and physical changes which depend on the composition of the material seen that the different components of lignocellulosic materials have different thermal behavior (ALVAREZ E VÁZQUEZ, 2004; NEGRO *et al.*, 2013).

Thus, the thermal degradation of the in natura sunflower stalk and pretreated was evaluated in the temperature range of 25 – 800 °C (Figure 4.5), profiles showing three weight loss stages. The first one, from 25 to 200 °C, being attributed to elimination of volatiles and water, corresponding to a loss of approximately 10% in both materials. The second stage, between 200 and 350 °C corresponds to the combustion of organic matter, cellulose and hemicellulose, with a weight loss of 52 and 54% for the biomass before and after pretreatment, respectively.

These results corroborate to others found by several other authors when analyzed by cellulose-based derivatives (RUZENE *et al.*, 2008; SAIAH *et al.*, 2009; SANTOS *et al.*, 2011; RABETAFIKA *et al.*, 2014; FOLLAIN *et al.*, 2015; HUANG *et al.*, 2015). Alvarez & Vázquez (2004) reported that, by having a predominantly amorphous structure, the hemicellulose is the

first to decompose at 220 – 310 °C, while the cellulose, by having a more crystalline structure than amorphous, especially after treatments applied to the fiber, decomposes between 310 – 360 °C.

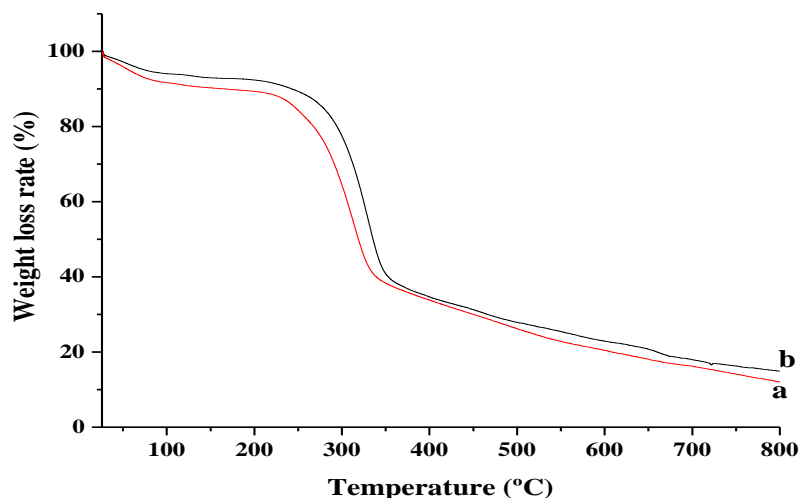


Figure 4.5 - TGA curves obtained for sunflower stalk in natura (a) and after autohydrolysis pretreatment (b) at 10 °C/min.

The third and final stage (350 – 800 °C) (Figure 4.5) is equivalent to decomposition of lignin, than by having an aromatic structure tends to decompose at higher temperatures than cellulose and hemicellulose which are structures aliphatic (NEGRO *et al.*, 2003). However, lignin decomposes in a wide temperature range, 200 – 550 °C (ALVAREZ & VÁZQUEZ, 2004; SANTOS *et al.*, 2011). In this stage, the weight loss was of 28% in both materials (*in natura* and treated material).

3.3.4 – FTIR Analysis

The FTIR spectra obtained from biomass in natura and pretreated were analyzed in order to evaluate the characteristics of the samples as well as their structural composition before and after pretreatment. The analysis was performed in the region 500-4000 cm^{-1} and the results showed rather similar spectra (Figure 4.6).

The bands at 3330 cm^{-1} and 2900 cm^{-1} were attributed to O-H and C-H stretching, respectively (ÉGUES *et al.*, 2012; SAMBUSITI *et al.*, 2013). The bands exhibited increase in intensity of the pretreated material indicating that hydrogen bonds and the methyl and methylene components of cellulose were not disrupted or ruptured during pretreatment (Figure 4.6) (KUMAR *et al.*, 2009; LV *et al.*, 2013).

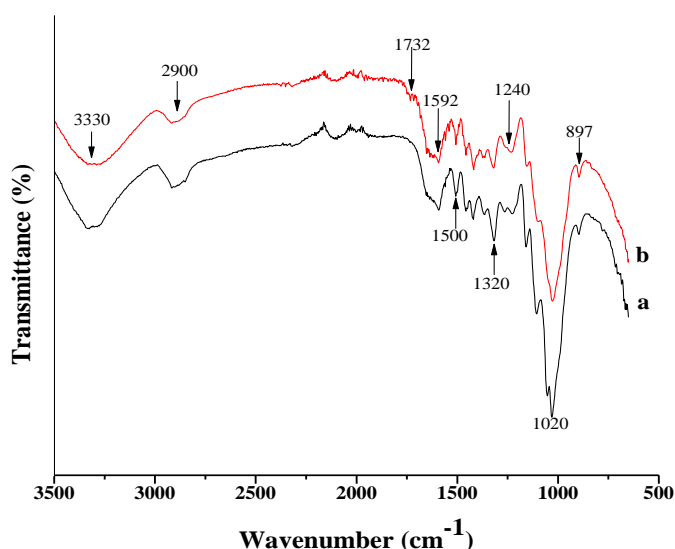


Figure 4.6 - Infrared analysis of sunflower stalk after (a) and before pretreatment (b).

The ester bond at 1732 cm^{-1} disappeared in the pretreated-sample spectra, suggesting that ether linkages and some ester linkages between lignin and carbohydrates were cleaved during pretreatment (KUMAR *et al.*, 2009; LV *et al.*, 2013; LI *et al.*, 2014).

The absorption at 1592 cm^{-1} is principally associated with deformation vibrations of H-OH in absorbed water (RUZENE *et al.*, 2008). The intensity of the peak at 1500 cm^{-1} associated with aromatic skeleton vibrations and C=C bond in lignin as well as, of the peak at 1320 cm^{-1} (stretching of C=O group of siringyl ring) was higher at the pretreated-sample, indicating increase in the relative content of lignin, since a simultaneous reduction of the hemicelluloses occurred (ÉGUES *et al.*, 2012; LI *et al.*, 2014). The pretreatments also reduced the intensity of the 1245 cm^{-1} band attributed to the cleaving and/or alterations of acetyl groups, indicating that the acetyl groups were almost completely removed by pretreatment (KUMAR *et al.*, 2009; LI *et al.*, 2014).

The bands at 1020 cm^{-1} corresponds to stretching of C-C bonds, C = C and C-C-O of cellulose, hemicellulose and lignin (BEZERRA *et al.*, 2015). A small adsorption at 897 cm^{-1} is characteristic of β -glycosidic linkages between the sugar units in cellulose and hemicellulose. The reduction in band indicated that pretreatment disrupts the β -glycosidic linkages, indicating that one part of carbohydrates was depolymerized (LV *et al.*, 2013; LI *et al.*, 2014). Thus, the results corroborate with others previously presented; the treatments affected the structure of the lignocellulosic material by cleaving of ester bonds between lignin and carbohydrates as well as by the partial solubilization of amorphous cellulose and hemicellulose by breakdown of β -glycosidic bonds.

4 – Conclusions

The results of this work demonstrated that the autohydrolysis process changed the biomass of sunflower stalk both in chemical terms as also mechanical. The autohydrolysis allowed a high extraction of hemicelluloses from sunflower stalk under mild conditions such as 185 °C at 25 min, enabling future applications of the lignocellulosic fractions due to its low degradation. In this condition (185 °C at 25 min reaction to autohydrolysis) was obtained 84% of extraction of the hemicelluloses from sunflower stalk. The process yield, the pH and the liquor composition are a direct function of temperature and time reaction as it ranged according to increasing or reducing the severity factor of the process. Cellulose, by presenting a highly crystalline structure, proved to be resistant to treatment since the maximum solubilization was only 8% enabling applying sequential stages of treatments for the extraction also between the lignin and the cellulose for integral use of all the different fractions in chemical or biotechnological processes.

5 – References

- ALVAREZ, V.; VAZQUEZ, A. Thermal degradation of cellulose derivatives/starch blends and sisal fibre biocomposites. *Polymer Degradation and Stability*. v.84, p.13–21, 2004.
- AMENDOLA, D.; DE FAVERI, D. M.; EGÜES, I.; SERRANO, L.; LABIDI, J.; SPIGNO, G. Autohydrolysis and organosolv process for recovery of hemicelluloses, phenolic compounds and lignin from grape stalks. *Bioresource Technology*. v.107, p.267–274, 2012.
- ATAIE, F. F.; RIDING, K. A. Impact of pretreatments and enzymatic hydrolysis on agricultural residue ash suitability for concrete. *Construction and Building Materials*. v.58, p.25–30, 2014.
- BEZERRA, T. M. S.; BASSAN, J. C.; SANTOS, V. T. O; FERRAZ, A.; MONTI, R. Covalent immobilization of laccase in green coconut fiber and use in clarification of apple juice. *Process Biochemistry*, v.50, p.417–423, 2015.
- CAPARRÓS, S.; ARIZA, J.; LÓPEZ, F.; NACIMIENTO, J.A.; GARROTE, G.; JIMÉNEZ, L. Hydrothermal treatment and ethanol pulping of sunflower stalks. *Bioresource Technology*. v.99, p.1368–1372, 2008.

CHERUBINI, F.; ANDERS HAMMER STRØMMAN, H. A.; ULGIATI, S. Influence of allocation methods on the environmental performance of biorefinery products - A case study. *Resources, Conservation and Recycling*. v.55, p.1070–1077, 2011.

DÍAZ, M. J.; CARA, C.; RUIZ, E.; PÉREZ-BONILLA, M.; CASTRO, E. Hydrothermal pretreatment and enzymatic hydrolysis of sunflower stalks. *Fuel*, v.90, p.3225–3229, 2011.

EGÜÉS, I.; SANCHEZ, C.; MONDRAGON, I.; LABIDI, J. Effect of alkaline and autohydrolysis processes on the purity of obtained hemicelluloses from corn stalks. *Bioresource Technology*. v.103, p.239–248, 2012.

FOLLAIN, N.; SAIAH, R.; FATYEYEVA, K.; RANDRIANANDRASANA, N.; LEBLANC, N.; MARAIS, S.; LECAMP, L. Hydrophobic surface treatments of sunflower pith using eco-friendly processes. *Cellulose*. v.22, p.245–259, 2015.

GUIMARÃES, J. L.; FROLLINI, E.; DA SILVA, C.G.; WYPYCH, F.; SATYANARAYANA, K.G. Characterization of banana, sugarcane bagasse and sponge gourd fibers of Brazil. *Industrial Crops and Products*, v.30, p.407–415, 2009.

HAN, Q.; JIN, Y.; JAMEEL, H.; CHANG, H.; PHILLIPS, R.; PARK, S. Autohydrolysis Pretreatment of Waste Wheat Straw for Cellulosic Ethanol Production in a Co-located Straw Pulp Mill. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. v.175, p.1193–1210, 2015.

HUANG, X. J.; CHEN, P. C.; HUANG, F.; OU, Y.; CHEN, M. R.; XU, Z. K. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on electrospun cellulose nanofiber membrane. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. v.70, p.95–100, 2011.

IROBA, K. L.; TABIL, L. G.; SOKHANSANJ, S.; DUMONCEAUX, T. Pretreatment and fractionation of barley straw using steam explosion at low severity factor. *Biomass and Bioenergy*. v.66, p.286–300, 2014.

JÖNSSON, L. J.; MARTÍN, C. Pretreatment of lignocellulose: Formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects – Review. *Bioresource Technology*. v.199, p.103–112, 2016.

JÚNIOR, L. D.; COLODETTE, J. L. Remoção de hemiceluloses da madeira por tratamento de auto-hidrólise. *Ciência Florestal*, v.21, p.541-550, 2011.

JUNIOR, C. S.; MILAGRES, A. M. F.; FERRAZ, A.; CARVALHO, W. The effects of lignin removal and drying on the porosity and enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse. *Cellulose*. v.20, p.3165–3177, 2013.

KIM, S. B.; PARK, C.; KIM, S. W. Process design and evaluation of production of bioethanol and b-lactamanti biotic from lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*. v.172, p.194–200, 2014.

LI, X.; LU, J.; ZHAO, J.; QU, Y. Characteristics of Corn Stover Pretreated with Liquid Hot Water and Fed-Batch Semi-Simultaneous Saccharification and Fermentation for Bioethanol Production. *PLoS ONE* 9(4): e95455. Doi:10.1371/journal.pone.0095455. 2014.

LV, J-S; LIU, X-Y; XU, J-X; DENG, Y-F; WU, Z; WANG, Y-M; FAN, M-Y; XU, H. Preparation and properties of adsorption material from corn stalksncore when used for enzyme immobilization and the subsequent activities of the adsorbed enzymes. *Industrial Crops and Products*. v.50, p.787–796, 2013.

NATIONAL RENEWABLE ENERGY LABORATORY (NREL). Chemical Analysis and Testing Laboratory Analytical Procedures: LAP-002 (1996), LAP-003 (1995), LAP - 004 (1996), LAP-005 (1994), LAP-010 (1994) and LAP 017 (1998). NREL, Golden, CO, USA. <http://www.eere.energy.gov/biomass/analyticalprocedures.html>

NEGRO, M. J.; MANZANARES, P.; OLIVA, J.M.; BALLESTEROS, I.; BALLESTEROS, M. Changes in various physical/chemical parameters of Pinus pinaster wood after steam explosion pretreatment. *Biomass and Bioenergy*. v.25, p.301–308, 2013.

OVEREND, R. P., CHORNET, E. Fractionation of lignocellulosics by steam-aqueous pretreatments. *Philosophical Transactions of The Royal Society Lond.* A321, p.523–536. 1987.

PEREIRA, P. H. F.; VOORWALD, H. C. J. CIOFFI, M. O. H. Preparação e Caracterização de Materiais Híbridos Celulose/ NbOPO₄.nH₂O a partir de Celulose Branqueada de Bagaço

de Cana-de-Açúcar. *Polímeros*. v.22, p.88-95, 2012.

RAVINDRAN, R.; JAISWAL, A. K. A comprehensive review on pre-treatment strategy for lignocellulosic food industry waste: Challenges and opportunities – Review. *Bioresource Technology*. v.199, p.92–102, 2016.

RABELO, S. C.; FILHO, R. M.; COSTA, A. C. Lime Pretreatment and Fermentation of Enzymatically Hydrolyzed Sugarcane. *Applied Biochemical and Biotechnology*. v. 169, p. 1696–1712, 2013.

RABETAFIKA, H. N.; BCHIR, B.; BLECKER, C.; PAQUOT, M.; WATHELET, B. Comparative study of alkaline extraction process of hemicelluloses from pear pomace. *Biomass and Bioenergy*. v.61, p.254-264, 2014.

RABEMANOLONTSOA, H.; SAKA, S. Various pretreatments of lignocellulosics – Review. *Bioresource Technology*. v.199, p.83–91, 2016.

RUIZ, E.; CARA, C.; MANZANARES, P.; BALLESTEROS, M.; CASTRO, E. Evaluation of steam explosion pre-treatment for enzymatic hydrolysis of sunflower stalks. *Enzyme and Microbial Technology*. v.42, p.160–166, 2008.

RUIZ, H. A.; RUZENE, D. S.; SILVA, D. P.; QUINTAS, M. A. C.; F. F. M.; VICENTE, A. A.; TEIXEIRA, J. A. Evaluation of a hydrothermal process for pretreatment of wheat straw – effect of particle size and process conditions. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. v.86, p.88–94, 2010.

RUIZ, H. A.; SILVA, D. P.; RUZENE, D. S.; SILVA, F. F. M.; VICENTE, A. A.; TEIXEIRA, J. A. Development and Characterization of an Environmentally Friendly Process Sequence (Autohydrolysis and Organosolv) for Wheat Straw Delignification. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. v.164, p.629–641, 2011.

RUIZ, E.; ROMERO, I.; MOYA, M.; CARA, C.; VIDAL, J. D.; CASTRO, E. Dilute sulfuric acid pretreatment of sunflower stalks for sugar production. *Bioresource Technology*. v.140, p.292–298, 2013.

- RUZENE, D. S.; SILVA, D. P.; VICENTE, A. A.; GONÇALVES, A. R.; TEIXEIRA, J. A. An Alternative Application to the Portuguese Agro-Industrial Residue: Wheat Straw. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. v.147, p.85–96, 2008.
- SAIAH, R.; SREEKUMAR, P. A.; GOPALAKRISHNAN, P.; LEBLANC, N.; GATTIN, R.; SAITER, J. M. Fabrication and characterization of 100 % green composite: thermoplastic based on wheat flour reinforced by flax fibers. *Polymers Composite*. v.30, p.1595–1600, 2009.
- SAMBUSITI, C.; FICARA, E.; MALPEI, F.; STEYER, J. P.; CARRÈRE, H. Effect of sodium hydroxide pretreatment on physical, chemical characteristics and methane production of five varieties of sorghum. *Energy*. v.55, p.449–456, 2013.
- SANTOS, M. L.; LIMA, O. J.; NASSAR, E. J.; CIUFFI, K. J.; CALEFI, P. S. Estudo das condições de estocagem do bagaço de cana-de-açúcar por análise térmica. *Química Nova*. v.34, p.507–511, 2011.
- SANTUCCI, B. S.; MAZIERO, P.; RABELO, S. C.; CURVELO, A. A. S.; PIMENTA, M. T. B Autohydrolysis of Hemicelluloses from Sugarcane Bagasse During Hydrothermal Pretreatment: a Kinetic Assessment. *Bioenergy Resource*. Doi 10.1007/s12155-015-9632-z. 2015.
- SEGAL, L.; CREELY, J. J.; MARTIN JR, A. E.; CONRAD, C. M. An Empirical Method for Estimating the Degree of Crystallinity of Native Cellulose Using the X-Ray Diffractometer Textile. *Research Journal*. v.29, p.786–794, 1959.
- SINGH, J.; SUHAG, M.; DHAKA, A. Augmented digestion of lignocellulose by steam explosion, acid and alkaline pretreatment methods: A review. *Carbohydrate Polymers*. v.117, p.624–631, 2015.
- SUN, S.; SUN, S.; CAO, X.; SUN, R. The role of pretreatment in improving the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials – Review. *Bioresource Technology*. v.199, p.49–58, 2016.
- YAN, S.; CHEN, S.; WU, J.; WANG, P. Ethanol production from concentrated food waste hydrolysates with yeast cells immobilized on corn stalk. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. v.94, p.829–838, 2012.

YIN, J.; YUAN, T.; LU, Y.; SONG, K.; LI, H.; ZHAO, G.; YIN, Y. Effect of compression combined with steam treatment on the porosity, chemical composition and cellulose crystalline structure of wood cell walls. *Carbohydrate Polymers*. v.155, p.163–172, 2017.

ZAKARIA, M. R.; HIRATA, S.; HASSAN, M. A. Combined pretreatment using alkaline hydrothermal and ball milling to enhance enzymatic hydrolysis of oil palm mesocarp fiber. *Bioresource Technology*. v.169, p.236–243, 2014.

ZHANG, H.; WU, S. Generation of lignin and enzymatically digestible cellulose from ethanol-based organosolv pretreatment of sugarcane bagasse. *Cellulose*. v.22, p.2409–2418, 2015.

ZHANG, X.; YUAN, Q.; CHENG, G. Deconstruction of corncob by steam explosion pretreatment: Correlations between sugar conversion and recalcitrant structures. *Carbohydrate Polymers*. v.156, p.351–356, 2017.

4.2. Artigo 02

Influence of parameters alkaline pretreatment in removal of carbohydrates of sunflower stalk
for utilization in sugar platform in biorrefineries

Jaci L. Vilanova-Neta¹, Sande A. S. Costa¹, Edelvio de Barros Gomes²,
Rita C. M. Miranda³, Daniel. P. Silva⁴, Denise S. Ruzene⁴,
Cleide M. F. Soares¹, Álvaro S. Lima¹

¹ Universidade Tiradentes, Instituto de Tecnologia e Pesquisa

² Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Sergipe, Instituto Federal de
Educação, Ciência e Tecnologia da Bahia

³ Universidade CEUMA, Mestrado em Meio Ambiente

⁴ Universidade Federal de Sergipe, Centro de Ciências Exatas e Tecnologia

Abstract:

Sunflower is a plant of high importance in the food industry since their seeds are the fourth source of oil in the world. However, the rest of the plant is not utilized. This manner, due to the depletion of fossil fuels and growing environmental problems generated by waste produced in obtaining the petro-products, environmental awareness has grown taking with them concern for sustainable development. Soon, lignocellulosic biomass, widely available resource and one of the most promising alternative energy sources, has been considered a sustainable solution to such problems. But, their effective pretreatment is an important and challenging stage for production of bio-based. In this study, alkaline (NaOH) pretreatment of sunflower stalk was explored. Many concentrations of NaOH (1.0 – 4.0%) and reaction times (1 – 3 h) at 55 °C, were tested for removal of carbohydrates, hemicellulose and cellulose, as well as ideal condition for maximum removal. Moreover, lignocellulosic characterization, Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR), Thermogravimetric Analysis (TGA), Scanning Electron Microscopy and Crystallinity Analysis were performed to understand the effect of NaOH pretreatment on sunflower stalk. The results showed the positive effect of NaOH pretreatment in carbohydrates removal and on the structural features of biomass. The increase of sodium hydroxide dosage 1 to 4% caused an increase in the removal of 25 to 70%, in other words, an increase of 66% in the removal of hemicelluloses. The results clearly show the influence that the increase of NaOH loading has on the yield of the retained solids at a given reaction time.

Keywords: lignocellulosic, biomass; sodium hydroxide pretreatment; waste; biorefinery.

1 – Introduction

Sunflower seeds represent the fourth source of oil in the world and about 30–35 million metric tonnes of sunflower are cultivated annually in around the world. On the other hand, it is estimated that each hectare of cultivated sunflower, produces 3-7 tons of dry biomass waste, including heads, stalks and leaves, which remain unutilized after harvesting, causing a negative environmental impact (FORTUNATI *et al.*, 2016; RUIZ *et al.*, 2013).

These lignocellulosic wastes, however, represent a interesting feedstock class for the production of differents bio-based products in biorefineries, because besides be available in large quantities, has benefit of disposal of problematic solid wastes which normally don't have any economic alternative (MONLAU *et al.*, 2012; FORTUNATI *et al.*, 2016).

For these reasons, researches are now focused to the revalorization of wastes after harvesting. Kim *et al.* (2016) related that more than ten chemicals important building block chemicals can be produced from sugars through either biological or chemical conversions. Thus, biorefining technology will play a key role in creating and sustenance a new industrial sector based in lignocellulosic feedstock, to replace fuels and chemicals currently produced from fossil source (KIM *et al.*, 2016).

However, lignocellulosic materials present a complex and resistant combinations of cross-linked layers of cellulose, hemicellulose and lignin, which render structure of biomass highly recalcitrant, limiting, thus, their biodegradability and consequently their commercial usage (MONLAU *et al.*, 2012; MIRMOHAMADSADEGHI *et al.*, 2016).

Thus, in order to reduce recalcitrance of biomass and facilitate their conversion, a preliminary stage, called of the pretreatment process, is necessary and essential to solve this problem, whereas affecting a majority of downstream processes, including enzymatic hydrolysis, fermentation, and final product separation (ZHANG *et al.*, 2016). As an example of this step, and specifically when in processes of obtaining bioethanol cellulosic, the pretreatment causes the opening up the compact lignocellulosic structure, reduce cellulose crystallinity, increase biomass porosity and removes the physical barriers, that is, lignin and hemicellulose, leaving the accessible cellulose (SALEHIAN & KARIMI, 2013).

Various pretreatment methods (mechanical, chemical, thermo-chemical and biological) with the more various reagents and catalysts, have been proposed. Among them, the alkaline pretreatment has emerged as one of the more importants, due to of desirable features of the method such as be carried out under milder conditions, some of them even at ambient temperature, than those needed for acid pretreatment and utilization of reagents non-

polluting and non-corrosive such as ammonia, sodium hydroxide, sodium carbonate, and calcium hydroxide (LI *et al.*, 2012; KIM *et al.*, 2016).

Alkali pretreatment with sodium hydroxide is one of the most effective, feasible and promising technics applied for the treatment of agricultural wastes and hardwoods and the main mechanism for the improvement of biodegradability is deconstruction the lignocellulosic structure, by break the existing ester bonds between lignin and carbohydrates depending on the conditions applied (SAMBUSITI *et al.*, 2012; SALEHIAN & KARIMI, 2013; KIM *et al.*, 2016). This desconstruction alter the DP (degree of polymerization) of each component, causing changes in the physical properties of treated solids such as, changes in surface area, in porosity, and crystallinity (KIM *et al.*, 2016).

However, the effectiveness this pretreatment depend on the physical structure and chemical composition of the substrate as well as the treatment conditions. Thus, in this study, sodium hydroxide was used to pretreat sunflower stalk at different NaOH loadings and different reaction times, in order to evaluate the effect of this parameters on the carbohydrates remotion as well as, chemical and physical structural features of the substrates before and after pretreatments.

2 – Materials and methods

2.1 – Preparation and characterization of stalk sunflower waste

Sunflower stalk waste, it was kindly provided by farmers Jacaré-Curitiba Settlement in the rural area of Poço Redondo municipality, a semi-arid region of Sergipe (latitude: -09°43'55.8 "S, longitude -37°45'31.8" W). The material was separated manually dried at 60 °C in an oven (Biopar 51005), milled, and selecting the particle size of 32-60 mesh.

The untreated and treated material composition was determined according to the National Renewable Energy Laboratory (NREL, Golden, CO) analytical methods for biomass. Initially, approximately 5 g of dry sample was extracted consecutively with water and with ethanol (two-step extraction procedure). After the extractions, the dried sample was hydrolyzed with 72% H₂SO₄ at 30 °C for 1 h (300 mg sample and 3 mL H₂SO₄). Then, the reaction mixture was diluted to 4% H₂SO₄ and autoclaved at 121 °C for 1 h. This hydrolysis liquid was then analysed for sugar content by high performance liquid chromatography (HPLC - Shimadzu – Prominence) with refractive index detector (RID-10A). The concentration of monomeric sugars in the soluble fraction was determined in a carbohydrate analysis column Supelcogel – Pb, 30 cm x 7.8 mm, equipped with a guard column operating

at 85 °C. Deionised water as mobile-phase was used at a flow rate of 0.5 mL/min.

The acetyl group content was evaluated by HPLC with the same system mentioned above with a Bio-Rad Aminex HPX-87H column at 45 °C temperature. The mobile phase was 5 mM H₂SO₄, at a flow rate of 0.6 mL/min. Furfural and hydroxymethylfurfural content was analysed by HPLC in a 1100 HP liquid chromatograph, equipped with a UV-diode-array detector (SPD-M20A); the LiChrospher 100 RP-18 (5µm) de 125 x 4 mm (Hewlett-Packard) column was used. Acetonitrile /water (1:8 (v/v) with 1% acetic acid) as mobile-phase was used at a flow rate of 0.7 mL/min at 25 °C.

The concentration of acid soluble lignin (ASL) in hydrolysis liquor was measured by UV-Visible spectrophotometer at 280 nm. The remaining acid-insoluble residue was considered as acid insoluble lignin (AIL).

2.2 – Alkaline Extraction Pretreatment

An amount of 2 g sunflower stalk waste, dried and milled, was treated with 40 mL dilute NaOH solutions of different concentrations (1 – 4%, w/v) and residence times (1, 2 e 3 h) at temperature 55 °C. After pretreatment, the pH of the liquid fractions was maintained in 7, filtered and stored for later analysis. The filtrate was called hemicellulose liquor and was used for composition analysis, while the precipitate was called cellulose-lignin fraction. The precipitate, was then washed with distilled water and dried at 60 °C overnight. The post-hydrolysis process was carried out in order to convert the oligosaccharides present in the liquor resulting from the treatment into monosaccharides and thus quantifies them. The process consisting in a treatment with sulfuric acid (5% v/v) at a ratio of liquor: acid 4:1 (v/v), at 121 °C and 30 min.

The pre-treatment mass yield was calculated according to the Eq. (1).

$$PM = m_{\text{final}} / m_{\text{initial}} * 100 \quad \text{Eq. (1)}$$

where:

m_{initial} : initial mass of the sunflower stalk (g);

m_{final} : mass of the sunflower stalk after pre-treatment (g);

PM: pre-treatment mass yield.

2.3 – Morphologic and Physicochemical properties

2.3.1 Fourier Transform Infrared (FTIR) Analysis

Analyses were carried out on a FTIR spectrum (spectrophotometer FTIR Agilent) in order to investigate the changes in the functional groups occurred in lignocellulosic biomass before and after pretreatment. The FTIR spectra were recorded over a range of 400–4000 cm⁻¹

2.3.2. Thermogravimetric Analysis

The thermal degradation was determined by thermogravimetric analysis (TGA - 50 Shimadzu – Thermogravimetric Analyser) with heating rate of 10 °C / min, in the temperature range from room temperature to 800 °C, with mass variation 4-6 mg using nitrogen atmosphere during experiments.

2.3.3. Scanning Electron Microscopy

The morphology of sunflower waste before and after treatment were analyzed using a scanning electron microscope (SEM, Hitachi S-3000N).

2.3.4. Crystallinity of Biomass

The crystallinity of the residue was evaluated based on the analysis X-ray diffraction and the crystallinity index calculated according to the Segal *et al.* (1959) method, Eq. (2).

$$\text{CrI} = \frac{I_{(002)} - I_{(\text{am})}}{I_{(002)}} * 100 \quad \text{Eq. (2)}$$

where: CrI - crystallinity index, em porcentagem; $I_{(002)}$ - is the maximum intensity (in arbitrary units) of the 002 lattice diffraction, representing crystalline material at 22,5°; $I_{(\text{am})}$ - is the intensity diffraction at 18.7°, 2θ degrees, representing only amorphous material.

3 – Results and Discussion

3.1 – Composition of *in natura* sunflower stalk

The composition (% dry basis) of the sunflower stalks included 38% de cellulose (as glucose), followed by 18% lignin and 15.5% hemicellulose. Ash and extractives represented 4 and 19%, respectively. These values are similar to those already reported in the literature by other authors, when in studies with sunflower stalk waste (DÍAZ *et al.*, 2011; RUIZ *et al.*, 2008; RUIZ *et al.*, 2013).

3.2 – Study of NaOH Pretreatment

Sodium hydroxide is considered one of the the most effective chemical products for the extraction of hemicellulose fractions from different lignocellulosic feedstocks, including sunflower residue (SOTO *et al.*, 1994). The recovery of solid residue after pretreatment demonstrated that the percentage of treated biomass decreases as the reaction time and concentration of NaOH increased (Table 4.4).

Table 4.4 - Experimental design and yield of the alkaline pretreatments at 55 °C.

Experiment	NaOH Concentration (%)	t (h)	Yield (%)
1	1	1	82.79
2	2	1	81.92
3	3	1	75.10
4	4	1	73.39
5	1	2	81.33
6	2	2	79.70
7	3	2	75.45
8	4	2	72.37
9	1	3	77.53
10	2	3	76.34
11	3	3	75.08
12	4	3	69.58

During the pre-treatment, the mass loss ranged from 17 - 30% providing a yield process of 82.79% in the milder condition process (1% NaOH and 1 h of reaction) and 69.58% in the more severe conditions (4% NaOH and 3 h of reaction). These results demonstrate that high concentration of NaOH was favorable to the solubilization of carbohydrates, mainly hemicellulose, from biomass. Analogous or lower results are reported in the literature for different residues at different NaOH concentrations and reaction times (KATARIA & GHOSH, 2014; ANTONOPOULOU *et al.*, 2015).

The characterization of the liquor (cellulose and hemicellulose) obtained after pre-treatment as a function of NaOH loading and time are shown in Figure 4.7 A. It was possible to find a hemicellulose extraction behavior strongly associated with increased alkali concentration in the process under all conditions studied, since increasing the extraction of hemicellulose was an inherent effect of increasing concentration of NaOH.

The lowest severity treatment at the concentration of 1% NaOH, for example, would need 3 h of reaction for the removal of 40% of hemicelluloses while that, in higher severities,

2% de NaOH, 1 h was the time required for to achieve the same result. Similarly, increasing the concentration of the base 1 to 4% caused an increase in the removal of 25 to 70%, in other words, an increase of 66% in the removal of hemicelluloses. The results clearly show the influence that the increase of NaOH loading has on the yield of the retained solids at a given reaction time.

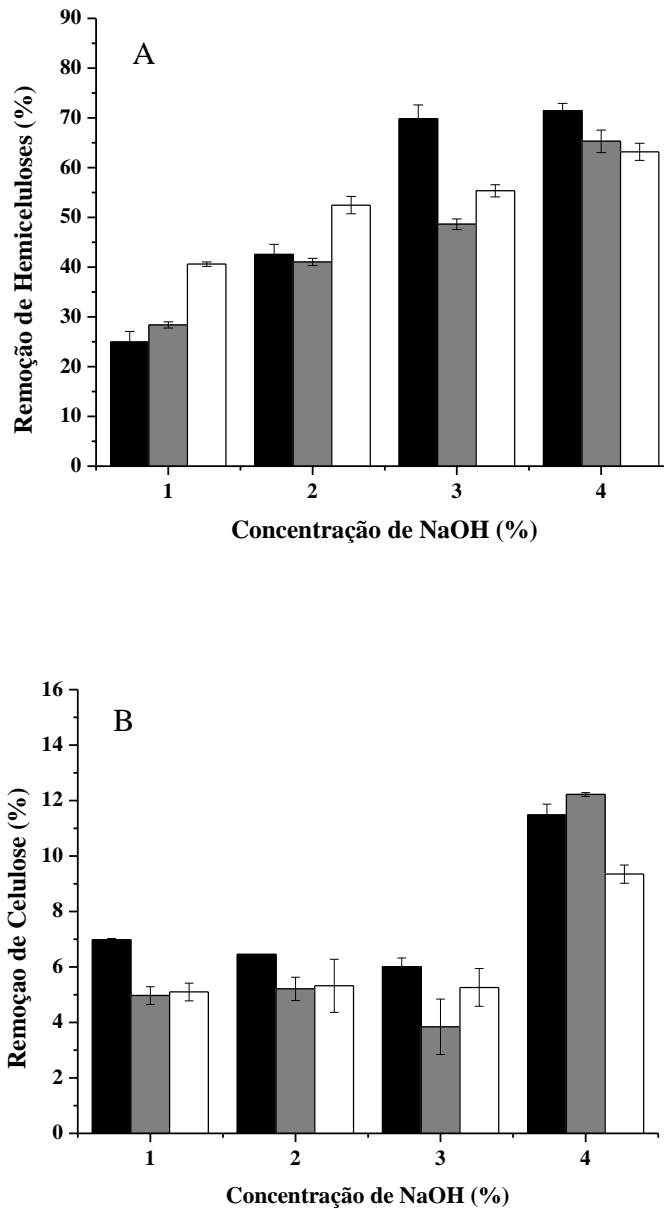


Figure 4.7- Percentage hemicellulose and cellulose removed after alkaline extraction treatment at 55 °C for 1(■) 2 (■) and 3 h (□) at different NaOH concentrations.

This increase in solubilization associated with increasing concentration of NaOH is due to, the alkali pretreatment mechanism act to weaken the hydrogen bond between the cellulose and hemicellulose by saponification and solvation of ester linkages between

polysaccharides and the other components of internal molecular structure as for example, lignin. In addition, these reactions also cause the dissolution of lignin, which ends loosening up and weakening the tough residue structures (ZAKARIA *et al.*, 2014).

Concentrations of 3 and 4% NaOH for 1h treatment promoted the highest removal rate of hemicellulose sugars, 66 and 70%, respectively. Furthermore, in longer treatment times (2 and 3 h) it was observed a lower solubility of these carbohydrates, suggesting the degradation of these, in degradation products such as furfural and hidrometilfurfural (IMMAN *et al.*, 2015).

These behavior profiling corroborate those described in the literature. Silverstein *et al.* (2007) reported 40% solubilization of hemicelluloses as a result of pretreatment of cotton stalks with 2% NaOH, the maximum concentration used by them, for 1.5 h in autoclave. McIntosh & Vancov (2010) used NaOH solution at 0.75%, 1.0% and 2.0% on sorghum straw at 121 °C for 1 h and have concluded that solubilization of the hemicellulose is proportional to the concentration of the alkaline solution, because the treatment of straw resulted 18.5%, 24% and 33% hemicellulose solubilization, respectively.

Similarly, Sambusiti *et al.* (2012) evaluated different alkaline dosages (4 e 10% (m/m), temperatures (40 e 55 °C) and contact times (12 e 24 h), in order to investigate the influence of the pretreatment conditions on the structural features from ensiled sorghum forage and have also confirmed the positive effect of NaOH in the reduction of fiber as well as in the removal of hemicellulose.

Comparing the hemicellulose content and cellulose removed, it is found that the alkaline treatment slightly affected the removal of cellulose of the biomass sunflower, Figure 4.7 B. The removal percentage was 12% in maximum removal condition (4% NaOH) while hemicellulose was approximately 70%. This stark difference between removals due both the interruption and breakage of hydrogen bonds by the alkaline solution, as to low molar mass of hemicellulose which make them easily hydrolysable (ZHANG *et al.*, 2015). In contrast, the cellulose has a highly crystalline structure and less reactive in alkaline solutions which explains thus their low percentage of solubilization (CHEN *et al.*, 2013).

3.3 – Physicochemical and Morphological Characterization of Treated Sunflower Stalk

3.3.1 – Morphological Characterization

The micrographs of sunflower stalk before and after pretreatment were obtained by scanning electron microscopy (SEM), as shown in Figure 4.8. It was observed significant morphological changes.

By the micrographs is possible to verify that the surface of the untreated sunflower stalk is compact, uniform and present rigid and highly ordered fibrils (Figure 4.8 A-B). Already the surface of the pretreated material (Figure 4.8 C-D) exhibits structural changes, the that demonstrates that the pretreatment resulted in peeling of the surface lignin, allowing access the inner cellulose microfibrils by remotion of the lignin-hemicellulose complex (IMMAN *et al.*, 2015). Others studies which removed hemicellulose and/or others componentes as lignin and cellulose also reported similar modifications, in which different lignocellulosic materials lost their highly compact structure and passed to exhibit a greater surface area (YAN *et al.*, 2012; JÚNIOR *et al.*, 2013).

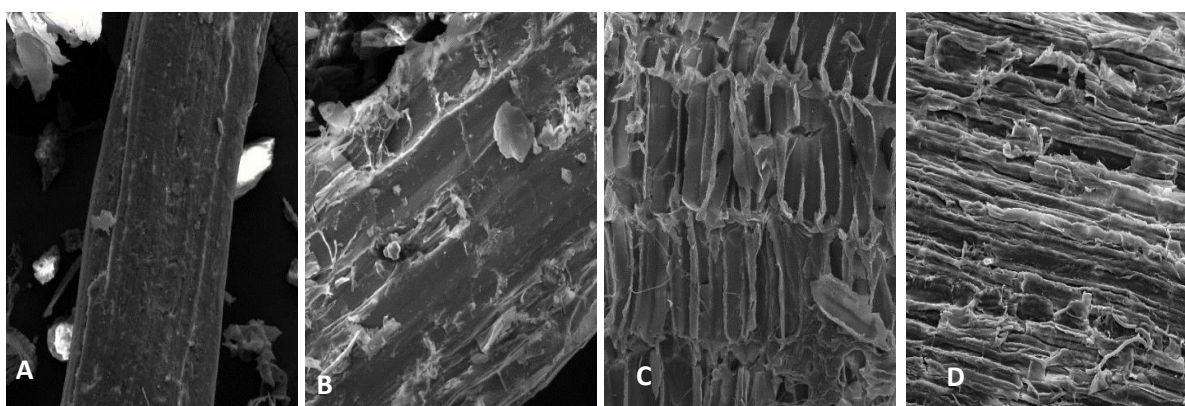


Figure 4.8 - Scanning electron micrographs of the in natura sunflower stalk (A e B) and after alkaline extraction (C e D) pretreatment (magnitude 500X).

3.3.2 – X-ray Diffraction and Crystallinity Analysis

Materials with crystalline structures can diffract and form specific patterns when X-ray is used to irradiate samples. Thus, the measured cristallinity of the in natura sunflower stalk and pretreated is presented in Figure 4.9 and the corresponding crystallinity indexes (CrI). Changes in crystallinity found were relatively significant.

Conform Figure 4.9 shows, the sunflower stalks showed similar X-ray diffraction patterns with two peaks appeared at 2θ of 22° and 18° for the in natura and NaOH treated, respectively. The bigger peak, representing the highly organized “crystalline” cellulose structure and the smaller peak, the less organized “amorphous” cellulose structure. This similarity indicates that the sodium hydroxide only reached the surfaces of amorphism and crystal areas and the swelling only took place between the crystal areas, not changing, therefore, the cellulose crystallinity style, ie the coexistence of crystalline and non crystalline areas was maintained (HE *et al.*, 2008; WU *et al.*, 2016).

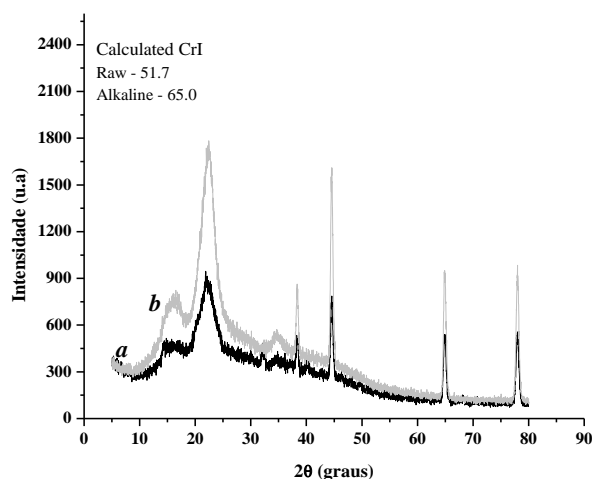


Figure 4.9 - Diffractograms for the sunflower stalk in natura (a) and treated (b).

The data obtained by the diffractograms (Figure 4.9) possibilities the calculation crystallinity index by Equation (2) and the results showed that the o CrI of sunflower stalk increasea from 51.7% to 65.0% after o pretreatment. This increase can be attributed to partial removal of hemicellulose and migration and removal of lignin, both amorphous. (RABELO *et al.*, 2013; ZAKARIA *et al.*, 2014; ZHANG & WU, 2015). Other authors also observed that this reduction in the crystallinity index after heat and/or chemical treatment (HE *et al.*, 2008; KIM *et al.*, 2014; RABELO *et al.*, 2013; ZAKARIA *et al.*, 2014; WU *et al.*, 2016).

3.3.3 – Thermogravimetry analysis (TGA)

The thermal properties of in natura and pretreated sunflower stalk was investigated by TGA analysis in the temperature range of 25 – 800 °C. The results obtained shown that the thermic degradation occurred on three steps conform can be seen in Figure 4.10.

The first one, at 100 °C due to the water evaporation. The second one, which is ascribed to the decomposition of carbohydrates present in the biomass, was observed between 200°C – 400°C, with maximum rate of weight loss was of 52% around 300 °C in both samples, in natura and treated. These results are common to found several authors when analyzed by cellulose-based derivatives (RUZENE *et al.*, 2008; SANTOS *et al.*, 2011; RABETAFIKA *et al.*, 2014; FOLLAIN *et al.*, 2015).

Temperatures below 230 °C prevails thermal decomposition of hemicellulose; in the range of 230-260 °C hemicellulose and cellulose; 260-290 °C, it is considered the end of the decomposition of hemicellulose, predominating then the decomposition of the cellulose. The lignin by having an aromatic structure tends to decompose at higher temperatures than the

carbohydrates. Therefore, to third and final stage is equivalent the decomposition of lignin, which comprises the range of 400 – 550 °C, with weight loss of 28 % in both materials. The waste generated in the end process was of 4%, which was considered ash.

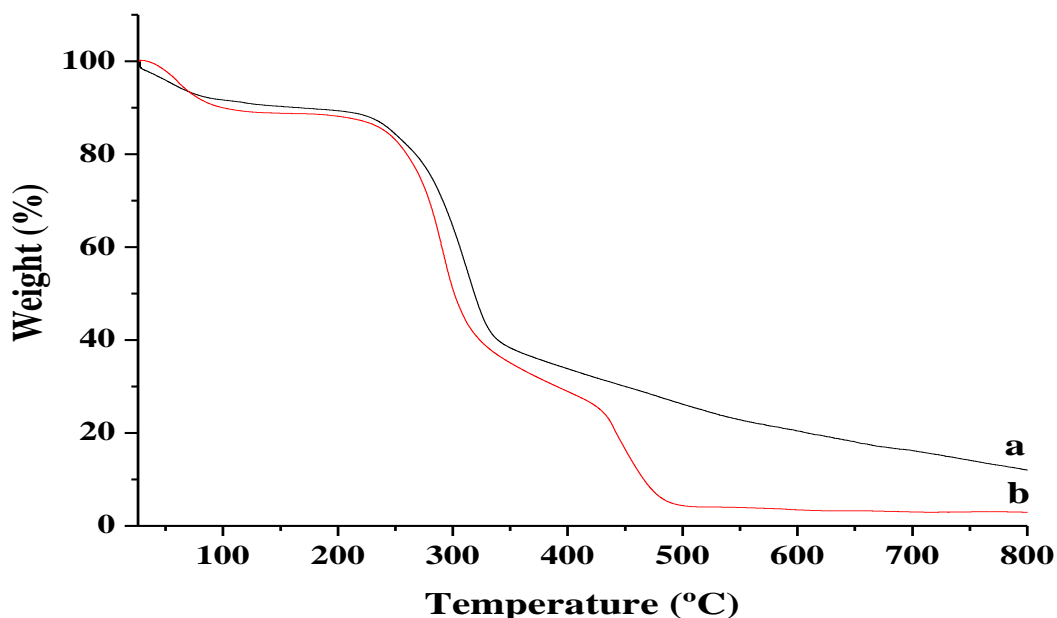


Figure 4.10 - Thermogravimetric (TG) curves obtained for in natura sunflower stalk (a) and after alkaline extraction (b) process at 10 °C/min.

3.3.4 – Fourier Transform Infrared (FTIR) Analysis

The functional groups of in natura and pretreated biomass were characterized using FTIR and spectroscopy analyses showed that the spectral profiles of the bands were rather similar but the relative intensities of the bands were different (Figure 4.11). The analysis was performed in the region 500-4000 cm^{-1} . The broad peak around 3330 cm^{-1} indicates the presence of cellulose in the biomass and is attributed to the stretching of –OH groups and the intermolecular hydrogen bonds in phenolic and aliphatic structures (ÉGUES *et al.*, 2012; SAMBUSITI *et al.*, 2013; MIRMOHAMADSADEGHI *et al.*, 2016).

The band at 2900 cm^{-1} represents the C-H stretching of methyl, methylene or methine group in both, cellulose and hemicellulose; the decrease of the peak indicated that the groups were lightly ruptured (KUMAR *et al.*, 2009; SAMBUSITI *et al.*, 2013).

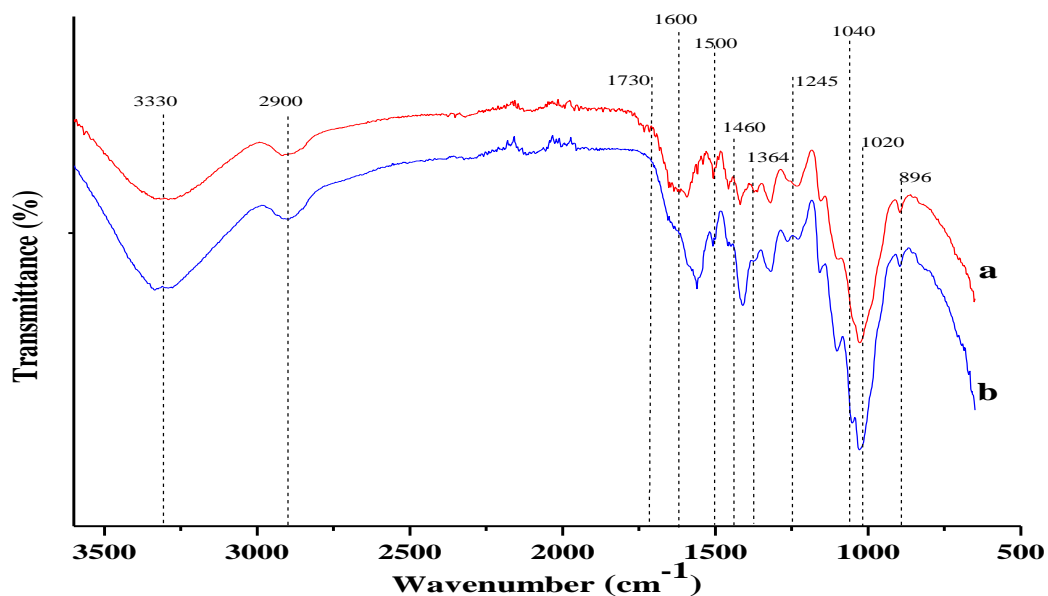


Figure 4.11 – FTIR spectra of in natura (a) and pretreated (b) sunflower stalk.

The disappearance of the band at 1730 cm^{-1} , which correspond to the ester bond, on treated sample indicates that some ester linkages between lignin and carbohydrates were broken during pretreatment, resulting on dissolution of hemicelluloses and some lignin fractions with low molecular weight (SAMBUSITI *et al.*, 2013; MIRMOHAMADSADEGHI *et al.*, 2016).

The pretreatment decreased the intensity of the band at 1600 and 1500 cm^{-1} , which corresponds to aromatic skeletal vibrations and C=C stretching from aromatic rings of lignin. The decrease in the intensity of these peaks after pretreatment were mainly due to lignin solubilization. (KUMAR *et al.*, 2009; SAMBUSITI *et al.*, 2013; MIRMOHAMADSADEGHI *et al.*, 2016). The pretreated sample also showed a strong decrease in band at 1460 cm^{-1} , which represents C-H asymmetric deformations (methyl, methylene, and methyl groups) of the lignin (HE *et al.*, 2008).

The band at 1364 cm^{-1} is attributed to phenol hydroxyl stretching and their disappearing after NaOH treatment is because of the reaction of phenol hydroxyl with NaOH (HE *et al.*, 2008). The band at 1245 cm^{-1} represents uronic ester and acetyl groups of hemicelluloses. The decreased after the pretreatment, showing partial removal of this functional group as a result of alkaline pretreatment (MIRMOHAMADSADEGHI *et al.*, 2016).

The appearance of band at 1040 cm^{-1} after NaOH pretreatment represents aromatic ring deformation in the C-H plane (HE *et al.*, 2008).

It is interesting to highlight that the bands at 1020 cm^{-1} corresponding C-C, C=C e C-C-O stretching of links of the cellulose and hemicellulose (MIRMOHAMADSADEGHI *et al.*, 2016). A band at 896 cm^{-1} is indicative of β -glycosidic linkages between the sugar units in

cellulose and hemicellulose. The slight decreased in the band after NaOH treatment, suggests that the β -glycosidic linkages, were changed and intermolecular degradation occurred in the hemicellulose structure (HE *et al.*, 2008).

4 – Conclusion

The concept of sustainable biorefineries opens divers possibilities for scientific, technical and engineering developments since, bioenergy crops like sunflower would provide food, fodder and fuel. In addition would provide additional income to the farmers and would create rural employment opportunities.

In this sense, the alkali pretreatment studies described above satisfy some of the more important requisites for an effective pretreatment process, namely: high carbohydrates recovery under mild reaction conditions, effective reduction the recalcitrance of sunflower stalk and obtention the solids glucose rich, which is a versatile feedstock with numerous biorefinery conversion.

The study also showed that the NaOH loading and reaction time are important variable in process since that, increasing of both significantly improved the solubilization. Furthermore, the analysis performed showed several changes in pretreated biomass in comparison to the untreated sunflower stalk. The linkages of interunits and the functional groups of lignin, cellulose, and hemicellulose were either broken down or destroyed, causing intra- and intermolecular changes of chemical structures. XRD analysis showed that the cristallinity of the pretreated biomass indeed was enhanced and this enhancement was mainly attributed to the removal of amorphous fractions such as hemicelluloses and celluloses. Surface morphology analysis by SEM indicated that the rigid and compact surface structure of the in natura biomass was greatly altered.

Therefore, considering its abundance and sugar potential, sunflower stalk is an excellent feedstock for sugar platform biomass conversion and is ideally suited to the biorefinery concept.

5 – References

ANTONOPOULOU, G.; DIMITRELLOS, G.; BEOBIDE, A. S.; VAYENAS, D.; LYBERATOS, G. Chemical Pretreatment of Sunflower Straw Biomass: The Effect on

Chemical Composition and Structural Changes. *Waste Biomass Valor.* v.6, p.733–746, 2015.

CHEN, Y.; STEVENS, M. A.; ZHU, Y.; HOLMES, J.; XU, H. Understanding of alkaline pretreatment parameters for corn stover enzymatic saccharification. *Biotechnology for Biofuels.* v.6, p.1-10, 2013.

DÍAZ, M. J.; CARA, C.; RUIZ, E.; PÉREZ-BONILLA, M.; CASTRO, E. Hydrothermal pretreatment and enzymatic hydrolysis of sunflower stalks. *Fuel,* v.90, p.3225–3229, 2011.

EGÜÉS, I.; SANCHEZ, C.; MONDRAGON, I.; LABIDI, J. Effect of alkaline and autohydrolysis processes on the purity of obtained hemicelluloses from corn stalks. *Bioresource Technology.* v.103, p.239–248, 2012.

FOLLAIN, N.; SAIHAH, R.; FATYEYEVA, K.; RANDRIANANDRASANA, N.; LEBLANC, N.; MARAIS, S.; LECAMP, L. Hydrophobic surface treatments of sunflower pith using eco-friendly processes. *Cellulose.* v.22, p.245–259, 2015.

FORTUNATI, E.; LUZI, F.; JIMÉNEZ, A.; GOPAKUMAR, D. A.; PUGLIA, D.; THOMAS, S.; KENNY, J. M.; CHIRALT, A.; TORRE, L. Revalorization of sunflower stalks as novel sources of cellulose nanofibrils and nanocrystals and their effect on wheat gluten bionanocomposite properties. *Carbohydrate Polymers,* v.149, p.357–368, 2016.

HE, Y.; PANG, Y.; LIU, Y.; LI, X.; WANG, K. Physicochemical Characterization of Rice Straw Pretreated with Sodium Hydroxide in the Solid State for Enhancing Biogas Production. *Energy & Fuels.* v.22, p.2775–2781, 2008.

IMMAN, S.; ARNTHONG, J.; BURAPATANA, V.; CHAMPREDA, V.; LAOSIRIPOJANA, N. Influence of alkaline catalyst addition on compressed liquid hot water pretreatment of rice straw. *Chemical Engineering Journal.* v.278, p.85–91, 2015.

JUNIOR, C. S.; MILAGRES, A. M. F.; FERRAZ, A.; CARVALHO, W. The effects of lignin removal and drying on the porosity and enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse. *Cellulose.* v.20, p.3165–3177, 2013.

KATARIA, R.; GHOSH, S. NaOH Pretreatment and Enzymatic Hydrolysis of Saccharum

spontaneum for Reducing Sugars Production. *Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects*. v.36:9, p.1028-1035, 2014.

KIM, S. B.; PARK, C.; KIM, S. W. Process design and evaluation of production of bioethanol and b-lactamanti biotic from lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*. v.172, p.194–200, 2014.

KIM, J. S.; LEE, Y. Y.; KIM, T. H. A review on alkaline pretreatment technology for bioconversion of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*. v.199, p.42–48, 2016.

KUMAR, R.; MAGO, G.; VENKATESH BALAN, V.; WYMAN, C. E. Physical and chemical characterizations of corn stover and poplar solids resulting from leading pretreatment technologies. *Bioresource Technology*, v.100, p.3948–3962, 2009.

LI, H.; LI, C.; LIU, W.; ZOU, S. Optimized alkaline pretreatment of sludge before anaerobic digestion. *Bioresource Technology*, v.123, p.189–194, 2012.

MCINTOSH, S.; VANCOV, T. Enhanced enzyme saccharification of sorghum bicolor straw using dilute alkali pretreatment. *Bioresource Technology*, v.101, p.6718–6727, 2010.

MONLAU, F.; BARAKAT, A.; STEYER, J. P.; CARRERE, H. Comparison of seven types of thermo-chemical pretreatments on the structural features and anaerobic digestion of sunflower stalks. *Bioresource Technology*. v.120, p.241–247, 2012.

MIRMOHAMADSADEGHI, S.; CHEN, Z.; WAN, C. Reducing Biomass Recalcitrance via Mild Sodium Carbonate Pretreatment. *Bioresource Technology*, v.209, p.386–390, 2016.

NATIONAL RENEWABLE ENERGY LABORATORY (NREL). Chemical Analysis and Testing Laboratory Analytical Procedures: LAP-002 (1996), LAP-003 (1995), LAP - 004 (1996), LAP-005 (1994), LAP-010 (1994) and LAP 017 (1998). NREL, Golden, CO, USA. <http://www.eere.energy.gov/biomass/analyticalprocedures.html>.

RABELO, S. C.; FILHO, R. M.; COSTA, A. C. Lime Pretreatment and Fermentation of Enzymatically Hydrolyzed Sugarcane. *Applied Biochemical Biotechnology*. v.169, p.1696–1712, 2013.

- RABETAFIKA, H. N.; BCHIR, B.; BLECKER, C.; PAQUOT, M.; WATHELET, B. Comparative study of alkaline extraction process of hemicelluloses from pear pomace. *Biomass and Bioenergy*. v.61, p.254-264, 2014.
- RUIZ, E.; CARA, C.; MANZANARES, P.; BALLESTEROS, M.; CASTRO, E. Evaluation of steam explosion pre-treatment for enzymatic hydrolysis of sunflower stalks. *Enzyme and Microbial Technology*. v.42, p.160–166, 2008.
- RUIZ, E.; ROMERO, I.; MOYA, M.; CARA, C.; VIDAL, J. D.; CASTRO, E. Dilute sulfuric acid pretreatment of sunflower stalks for sugar production. *Bioresource Technology*. v.140, p.292–298, 2013.
- RUZENE, D. S.; SILVA, D. P.; VICENTE, A. A.; GONÇALVES, A. R.; TEIXEIRA, J. A. An Alternative Application to the Portuguese Agro-Industrial Residue: Wheat Straw. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. v.147, p.85–96, 2008.
- SALEHIAN, P.; KARIMI, K. Alkali Pretreatment for Improvement of Biogas and Ethanol Production from Different Waste Parts of Pine Tree. *Industrial & Engineering Chemistry Research*. v.52, p.972–978, 2013.
- SAMBUSITI, C.; FICARA, E.; MALPEI, F.; STEYER, J. P.; CARRÈRE, H. Influence of alkaline pre-treatment conditions on structural features and methane production from ensiled sorghum forage. *Chemical Engineering Journal*. v.211–212, p.488–492, 2012.
- SAMBUSITI, C.; FICARA, E.; MALPEI, F.; STEYER, J. P.; CARRÈRE, H. Effect of sodium hydroxide pretreatment on physical, chemical characteristics and methane production of five varieties of sorghum. *Energy*. v.55, p.449–456, 2013.
- SANTOS, M. L.; LIMA, O. J.; NASSAR, E. J.; CIUFFI, K. J.; CALEFI, P. S. Estudo das condições de estocagem do bagaço de cana-de-açúcar por análise térmica. *Química Nova*. v.34, p.507–511, 2011.
- SEGAL, L.; CREELY, J. J.; MARTIN JR, A. E.; CONRAD, C. M. An Empirical Method for Estimating the Degree of Crystallinity of Native Cellulose Using the X-Ray Diffractometer Textile. *Research Journal*. v.29, p.786–794, 1959.

SILVERSTEIN, R. A.; CHEN, Y.; SHARMA-SHIVAPPA, R. R.; BOYETTEA, M. D.; OSBORNE, J. A comparison of chemical pretreatment methods for improving saccharification of cotton stalks. *Bioresource Technology*. v.98, p.3000–3011, 2007.

SOTO, M. L.; DOMINGUEZ, H.; NTIFIEZ, M. J.; LEMA, J. M. Enzymatic saccharification of alkali-treated sunflower hulls. *Bioresource Technology*. v.49, p.53–59, 1994.

WU, R.; ZHAO, X.; LIU, D. Structural Features of Formiline Pretreated Sugar Cane Bagasse and Their Impact on the Enzymatic Hydrolysis of Cellulose. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*. v.4, p.1255–1261, 2016.

YAN, S.; CHEN, S.; WU, J.; WANG, P. Ethanol production from concentrated food waste hydrolysates with yeast cells immobilized on corn stalk. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. v.94, p.829–838, 2012.

ZAKARIA, M. R.; HIRATA, S.; HASSAN, M. A. Combined pretreatment using alkaline hydrothermal and ball milling to enhance enzymatic hydrolysis of oil palm mesocarp fiber. *Bioresource Technology*. v.169, p.236–243, 2014.

ZHANG, H.; WU, S. Generation of lignin and enzymatically digestible cellulose from ethanol-based organosolv pretreatment of sugarcane bagasse. *Cellulose*. v.22, p.2409–2418, 2015.

ZHANG, Y.; CHEN, X.; GU, Y.; ZHOU, X. A physicochemical method for increasing methane production from rice straw: Extrusion combined with alkali pretreatment. *Applied Energy*. v.160, p.39–48, 2015.

ZHANG, K.; PEI, Z.; WANG, D. Organic solvent pretreatment of lignocellulosic biomass for biofuels and biochemicals: A review. *Bioresource Technology*. v.199, p.21–33, 2014.3.

4.3. Artigo 03

Sunflower stalk in natura and treated as support for lipase immobilization by physical adsorption

Jaci L. Vilanova-Neta¹, Sande A. S. Costa¹, Edelvio de Barros Gomes²,
Rita C. M. Miranda³, Daniel. P. Silva⁴, Denise S. Ruzene⁴,
Cleide M. F. Soares¹, Álvaro S. Lima¹

¹ Universidade Tiradentes, Instituto de Tecnologia e Pesquisa

² Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Sergipe,
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia da Bahia

³ Universidade Ceuma, Mestrado em Meio Ambiente

⁴ Universidade Federal de Sergipe, Centro de Ciências Exatas e Tecnologia

Abstract: The current demands of biotechnological industries aim at improvements in enzymatic productivity and development of new techniques that facilitate the large-scale production of the economic form. In this sense, the immobilization of enzymes on lignocellulosic materials, most abundant waste in the biosphere, becomes favorable since that besides the low cost, show up as adequate source of raw material for immobilization matrices. Thus, the aim of this work was to evaluate the viability of in natura sunflower stalk (*Helianthus annuus* L.) and treated by alkaline extraction and autohydrolysis (hydrothermal), as support for immobilization of commercial lipase by physical adsorption. The thermic stability of immobilized enzyme was 4.28 (alkaline), 3.62 (hydrothermal) and 2.20 times (in natura) bigger than the free with half-life time of 19.95, 16.86 and 10.25 h, respectively. The half-life time of free enzyme was 4.66 h. The treated supports allowed greater use of immobilized enzyme, six (alkaline) and four times (hydrothermal). The value of V_{max} and K_m for immobilized biocatalyst was 625.97 Ug^{-1} and 284.45 mM, 544.19 Ug^{-1} 287.32 mM, 364.74 Ug^{-1} 208.64 mM in alkaline media, and hydrothermal in natura, respectively. While for the free enzyme, V_{max} was 2145.82 Ug^{-1} and K_m 338.09 mM. Therefore, these results suggest that the treatments applied in sunflower stalk, had a positive effect on lipase immobilization process and can therefore be considered a low-cost alternative support and especially adequate for the immobilization of lipase, seen be this study pioneer when in use of sunflower stalk.

Keywords: waste, lignocellulosic compounds, treatment, enzyme, immobilization.

1 – Introduction

The idea of using lignocellulosic wastes as support for immobilization of enzymes is very attractive, because besides have desirable physical and mechanical properties, these materials are cheaper and more sustainable than the traditional synthetic ones, which can contribute to reducing costs immobilization process, allowing, thus, its application at industrial scale. Moreover, the use of agricultural waste that would be eliminated in natura tends to minimize impacts to the environment and adds value to this waste (POSPISKOVA & SAFARIK, 2013; BEZERRA *et al.*, 2015; SOUZA *et al.*, 2016).

Several studies have shown the potential application of these residues as immobilization matrix, such as: sugarcane bagasse (BRÍGIDA *et al.*, 2008; SANTOS *et al.*, 2008), corn stalk (YAN *et al.*, 2012), rice husk (D'SOUZA & GODBOLE, 2002), green coconut fiber (CRISTOVÃO *et al.*, 2011, CRISTOVÃO *et al.*, 2012, BEZERRA *et al.*, 2015), wood cellulignin (GOMES *et al.*, 2006), spent grain (SILVA *et al.*, 2012; POSPISKOVA & SAFARIK, 2013) and cashew apple bagasse (SOUZA *et al.*, 2016).

These biomass have been used both in the original form (without treatment) how in the modified/treated form. Thus, in the last decades numerous treatment researches have been accomplished, seeking to evaluate the advantages and disadvantages of each treatment as well as their effects on the treated biomass, as it fiber surface characteristics make all the difference in obtaining a high quality supports for immobilization of enzymes (ATAIE *et al.*, 2014; RABEMANOLONTSOA & SAKA, 2016).

In this context, the sunflower (*Helianthus annuus L.*), lignocellulosic biomass native to North America, is the fourth most important oilseeds worldwide, with global production of about 40 million tons (USDA, 2016). In the Brazil, the production in 2016 was 62.3 thousand tons (CONAB, 2017) and it is estimated that for each hectare of cultivated sunflower are produced 3-7 tons of dry biomass waste (RUIZ *et al.*, 2013).

Its cultivation is associated mainly to the food industry, but also used in biofuels industry and in the area of bio-lubricants, detergents and cosmetics. However, only the seeds (achenes) are used by the industry while, the rest of the plant (stalk, leaf and chapter) is left in the fields without real industrial use, requiring, therefore, alternative uses (FOLLAIN *et al.*, 2015). Therefore, the possibility of using the sunflower stalk as a support for immobilization of enzymes will give the residue that would be discarded, a noble destination. Moreover, it can help reduce some disadvantages faced by the industry when using free enzymes as industrial catalysts such as, poor stability and non-reusability and high cost (BEZERRA *et al.*, 2015; ANSARI & HUSAIN, 2012).

Enzymes are sustainable natural catalysts, biocompatible and biodegradable, which afford process more environmentally friendly, cost effective and sustainable than conventional organic syntheses seen that, processes occur under mild conditions of pressure, temperature and pH, with high selectivity rates, energy efficiency and less waste (SHELDON & PELT, 2013; ATACAN & OZACAR, 2015)

The lipases (triacylglycerol acylhydrolases, EC 3.1.1.3) are enzymes most commonly used in biocatalysis and in organic chemistry due to its wide substrate specificity coupled to a high region or enantioselectivity or specificity (SOUZA *et al.*, 2016). Moreover, they are characterized mainly by catalytic versatility, simplicity of process, higher quality of the final product, excellent yield and applications in different industrial sectors such as, the production of optically active compounds for the agrochemical and pharmaceutical industries, and biodiesel, cosmetics among others (GOMES *et al.*, 2006; BARBOSA *et al.*, 2012; ITTRAT *et al.*, 2014).

Such characteristics give the lipases a potential biotechnological comparable to proteases and carbohydrases - enzymes used industrially - stimulating research to optimize its production and industrial application (JESIONOWSKI *et al.*, 2013; GOMES *et al.*, 2006).

Thus, in order to produce a low-cost immobilized enzyme, the aim of this study was to evaluate the immobilization of lipase by physical adsorption on “in natura” and treated sunflower waste. It should be noted that there are no reports in the literature of the use of this residue as support for immobilization of enzymes.

2 – Materials and methods

2.1 – Reagents and material

Lipase from *Burkholderia cepacia* (BC) was purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Nominal lipase activity was 2.500 U/g. The sunflower stalk was kindly provided by farmers of the Jacaré-Curituba Settlement in the rural area of Poço Redondo municipality, a semi-arid region of Sergipe (latitude: -09°43'55.8 "S, longitude -37°45'31.8" W).

Hexane and acetone were obtained from Isofar (Rio de Janeiro, Brazil); ethanol 95% was obtained from Vetec (Rio de Janeiro, Brazil); Arabic gum was obtained from Cromoline (São Paulo, Brazil); olive oil was purchased at a local market. Other chemicals were of analytical grade and used as received.

2.2 – Preparation and characterization of the support

Initially sunflower stalk (SW) was washed three times with water, dried at 60 °C for 24 h and milled in a hammer mill in order to obtain an average particle size 32 – 60 mesh, before starting the subsequent experiments. The milled SW was treated with dilute NaOH (4% w/v) at 55 °C during 1h or with water at 185 °C during 25 min, in a ratio of 1:20 and 1:10, respectively. After the treatment, the solid fraction was collected by filtration, washed with distilled water, dried in an oven and stored to be used as support for immobilization of lipase.

2.3 Compositional analysis from in natura and treated SW

The composition of the in natura sunflower stalk and derived from alkaline and hydrothermal treatments, was determined according to the procedure by National Renewable Energy Laboratory (NREL). Initially, 5 g of sample was extracted consecutively with water and with ethanol (two-step extraction procedure). After the extraction, the dried samples were hydrolyzed with 72% sulfuric acid at 30 °C for 1 h (300 mg of sample and 3 mL of sulfuric acid). The reaction mixture was diluted to 4% (w/w) with the addition of 79 mL of water and autoclaved at 121 °C for 1 h.

The concentrations of monomeric sugars in hydrolysis liquid were determined by high-performance liquid chromatography (HPLC - Shimadzu – Prominence) with refractive index detector (RID-10A). A Supelcogel – Pb carbohydrate analysis column operating at 85 °C with deionised water as mobile-phase (0.5 mL/min) was used.

In the hydrolysis liquids the composition in acid soluble lignin (ASL) and acetyl groups is also quantified. ASL is determined based on UV spectrophotometry at 280 nm.

The acetyl group content is evaluated by HPLC with the same system mentioned above with a Bio-Rad Aminex HPX-87H column at 45 °C temperature. The mobile phase was 5 mM H₂SO₄, at a flow rate of 0.6 mL/min. The solid residue remaining after this acid hydrolysis is considered as acid insoluble lignin (AIL)

2.4 – Lipase immobilization on sunflower waste by Physical Adsorption

Lipase from *Burkholderia cepacia* was immobilized by physical adsorption on treated and untreated sunflower waste using a procedure modified from Cabrera-Padilla *et al.* (2012). Briefly, 10 mL hexane was added to 1 g support with vigorous agitation at room temperature for 2 h, then 10 mL enzymatic solution (mass of the enzyme solubilized in 10 mL 0.1 M sodium phosphate buffer pH 7.0) was added to the hexane and support suspension and agitated for 2 h. The enzyme–support system was then incubated for 24 h at 4 °C. Immobilized lipase was

recovered by vacuum filtration coupled with repeated washes with hexane.

The water content (dry weight) and enzyme activity of the immobilized biocatalyst were then quantified. The filtrates and washings were collected and used for determination of the hydrolytic activity of the lipase in olive oil emulsion as described in item 2.5.

2.5 – Lipase activity in hydrolysis of emulsified olive oil

Hydrolytic activities of free and immobilized lipase was assayed by the olive oil–water emulsion method, according to proposed by Soares *et al.* (1999) with modifications. The reaction temperature was maintained at 50 °C in a thermostatic bath for 10 min for the immobilized biocatalyst or 5 min to free enzyme, under constant stirring. One unit (U) of enzyme activity was defined as the number of enzyme that liberated 1 μmol of free fatty acids per min (mol min⁻¹) under assay conditions (37 °C - free e 50 °C - immobilized, pH 7.0, 150 rpm).

The activity yield, Y_a (%) was determined according Eq. 1.

$$Y_a (\%) = \frac{U_s}{U_0} \times 100 \quad \text{Eq. (1)}$$

where: U_s - corresponds to the total enzymatic activity present in the support and U_0 - represents units of activity offered for immobilization.

2.6 – Effects of pH and temperature on activity

The effect of pH on the lipolytic activity of the immobilized lipase in sunflower waste was determined by incubating the biocatalyst in 0.1 M sodium citrate–citric acid buffers (pH 3.0 – 5.0), 0.1 M potassium phosphate (pH 6.0 – 8.0) and 0.1 M bicarbonate-carbonate (pH 9.0) at 50 °C. The optimal temperature for activity of the immobilized lipase was determined at 25 - 80 °C in the same 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.0).

2.7 – Thermal and operational stability

The effect of temperature on thermal stability of the free and immobilized biocatalysts was determined by incubating the samples in aqueous medium (0.1 M phosphate buffer, pH 7.0) for 4 h at different time intervals (15, 30, 60, 120, 180, 240 min) at 60 °C. The residual activity was calculated as the ratio of the enzyme activity measured after incubation and the maximum enzyme activity. The thermal inactivation constant (k_d) and half-life ($t_{1/2}$) for free and immobilized enzyme were calculated using Eqs. 2 and 3, respectively, according to the

Fachin *et al.* (2002) and Soares *et al.* (2003).

$$A_{in} = A_{in0} \cdot \exp(-k_d \cdot t) \quad \text{Eq. (2)}$$

$$t_{1/2} = \ln 0.5 / -k_d \quad \text{Eq. (3)}$$

where: A_{in} - residual activity after heat treatment for a period of incubation (U); A_{in0} - initial enzyme activity (U); k_d - constant of thermal inactivation (h^{-1}); $t_{1/2}$ the half-life (h).

The operational stability (reuse) of the enzyme was determined by conducting hydrolysis reactions in consecutive batches using the same immobilized biocatalyst. Each batch consisted of a hydrolysis reaction for 10 min at 60 °C and pH 7.0. After each batch, the immobilized enzyme was washed with hexane and reused in the next reaction cycle.

2.8 – Determination of kinetic constants

The K_m and V_{max} of free and immobilized lipase were determined by measuring enzyme activity in reaction systems containing fatty acids at different concentrations, ranging from 186 to 3348 mM. These concentrations were obtained from emulsions containing different proportions of olive oil (5 - 90%) and aqueous arabic gum solution (7% w/v). Kinetic constants were calculated by non-linear fitting using the programme Origin 8.0.

2.9 – Morphologic and physicochemical properties of the immobilized biocatalyst and support

The morphology of in natura and treated sunflower stalk was analyzed using scanning electron microscopy (SEM, Hitachi S-3000N). The mass loss was determined by Thermogravimetric Analysis (TGA - 50 Shimadzu, Thermogravimetric Analyser) with a heating rate of 10 °C / min, starting at room temperature and increasing to 800 °C with mass variation 4-6 mg. FTIR analyzes were performed (Spectrophotometer Agilent) with spectra in the wavelength band 400 - 4000 cm^{-1}

3 – Results and discussion

3.1 – Physicochemical and morphological characterization of the residue

Chemical characterization of the in natura sunflower stalk and treated by alkaline extraction and autohydrolysis well as the percentage of recovered solids (solids remaining after treatment divided by the dry weight of the raw material) after treatment are shown in Table 4.5. Sugars are expressed as monomers.

The in natura sunflower stalk used in this study contained 17.83% lignin and 54% of quantified polysaccharides (15.93% hemicellulose and 37.97% cellulose). After the treatment the sunflower stalk exhibited a different chemical composition of the in natura. The content lignin and xylose decreased showing that were removed in both treatments, lignin was mainly removed by alkaline treatment (30%) whereas xylose by treatment of autohydrolysis (70%).

These values show that a significant percentage of polyphenol, lignin and waxy materials were removed by alkaline treatment (NaOH). This is favorable since it leaves exposed cellulose and consequently the hydroxyl groups, which helps the enzyme immobilization process onto the support. Already the fraction of glucose significantly increased in both treatments, which shows retention of cellulose. This modification in chemical composition improved the support structure, providing more hydroxyl groups on the fiber surface, which may facilitate the immobilization by either physical adsorption or covalent bond, facilitating the activation (greater access to the cellulose groups) and the immobilization processes (BRÍGIDA *et al.*, 2010; SOUZA *et al.*, 2016).

The percentage of solids recovered after the alkaline extraction and autohydrolysis pretreatment were 75 and 65% of the raw material, respectively, suggesting that the treatments had good yields of biomass treated. The yield value found for the autohydrolysis treatment is similar to that obtained by Ruiz *et al.* (2008) - 65.1% - using a temperature of 180 °C; they attribute the loss of material mainly to the decrease in the hemicellulose fraction of the residue.

The removal of the lignocellulosic components can also be observed by SEM analysis (Figure 4.12), seen that, while, the untreated material presents an external surface covered homogeneously (Figure 4.12A), the treaties by autohydrolysis (Figure 4.12B) and alkaline extraction (Figure 4.12C) have an irregular surface with cavities. Other authors also observed changes in the fiber after treatment and associated with such changes, especially the removal of waxy material, lignin and a significant fraction of hemicellulose (YAN *et al.*, 2012; JÚNIOR *et al.*, 2013; BEZERRA *et al.*, 2015; SOUZA *et al.*, 2016). These changes in the fiber structure is quite favorable because by virtue of remove external surface layers, increases the surface area, thus favoring the process of immobilization of enzymes.

Table 4.5 - Quantification of chemical constituents of in natura and treated sunflower stalk.

Sample	Total gravimetric recovery (%)	Chemical composition							Mass balance						
		Glucose	Xylose	Arabinose	Mannose	Galactose	Acetyl Group	Total Lignin	Glucose	Xylose	Arabinose	Mannose	Galactose	Acetyl Group	Total Lignin
Untreated (In natura)	100	37.97 ± 0.95	10.30 ± 0.64	1.51 ± 0.6	2.18 ± 0.17	1.94 ± 0.36	1.71 ± 0.05	17.83 ± 0.053	37.97 ± 0.95	10.30 ± 0.64	1.51 ± 0.6	2.18 ± 0.17	1.94 ± 0.36	1.71 ± 0.05	17.83 ± 0.053
Autohydrolysi	73	42.25 ± 0.38	4.67 ± 0.46	0.10 ± 0.09	0.25 ± 0.12	0.67 ± 0.25	0.26 ± 0.12	24.97 ± 0.98	30.84 ± 0.38	3.40 ± 0.46	0.07 ± 0.09	0.18 ± 0.12	0.49 ± 0.25	0.19 ± 0.12	18.22 ± 0.98
Alkaline Extraction	75	43.43 ± 0.86	7.92 ± 0.06	0.35 ± 0.49	1.08 ± 0.57	0.64 ± 0.60	0.24 ± 0.08	16.61 ± 0.51	32.57 ± 0.86	5.94 ± 0.05	0.26 ± 0.49	0.81 ± 0.57	0.48 ± 0.60	0.17 ± 0.08	12.46 ± 0.51

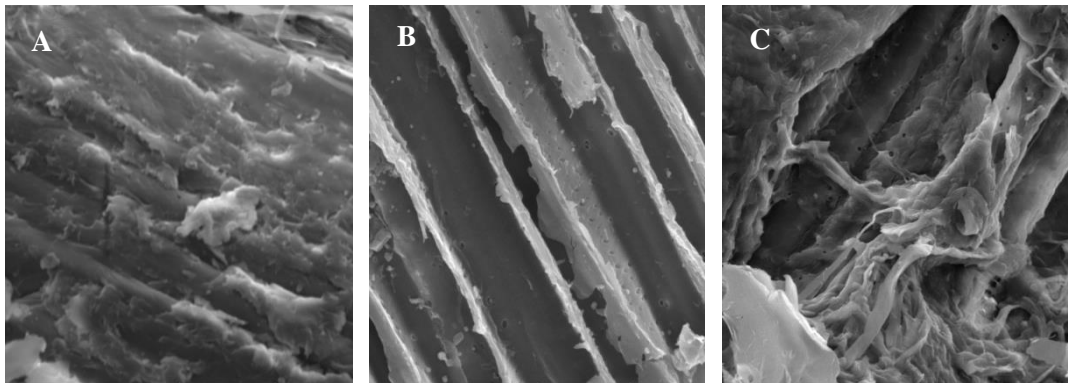


Figure 4.12 - Scanning electron microscopy of sunflower stalk before pretreatments (A) and after pretreatments: autohydrolysis (B) and alkaline extraction (C) (magnitude 2kx).

3.2 – Immobilization of lipase on sunflower stalk by physical adsorption

The determination of the load or the relative amount of enzyme and support for maximum adsorption is directly related to capacity effective immobilization of support as well as its efficiency as a biocatalyst. Therefore, the optimum amount of lipase was determined varying the enzyme/support ratio and checking the activity on the system presented. Figure 4.13 shows the ratio between enzyme/support according to the relative activity after immobilization on in natura sunflower stalk and treated by autohydrolysis and alkaline extraction.

Using 0.15 g enzyme/g support, the relative activity was 30% treated support by autohydrolysis and about 60% untreated and treated by alkaline extraction. When offering 0.30 g enzyme/g support the relative activity increased about 60 - 80% in the supports evaluated. And using 0.35 g enzyme/g support there was obtained maximum relative activity for the immobilized biocatalysts (untreated and treated), which was confirmed with a 12% average loss in the relative activities in the treated support, when the ratio of enzyme/support exceeded 0.35. Already in the untreated support, the activity remained practically constant, due to saturation support with lipase.

In this condition, 0.35 g enzyme/g support, the immobilization yield was 73, 82 and 90% in the untreated support and derivative of pretreatment of alkaline extraction and autohydrolysis, respectively. According Souza *et al.* (2016) and Cristovão *et al.* (2011) this maximum loading observed on all supports could be associated the intrinsic

characteristics of the supports since, lignocellulosic materials surface does not have a porous structure (few pores present) and it has a low surface area. Besides that, should also be related to the complete coating of enzyme molecules on the support surface with the linking groups seeing that, the poor surface area limits the number of enzyme molecules to be immobilized, facilitating the multilayer adsorption of enzymes (CRISTOVÃO *et al.*, 2011; SOUZA *et al.*, 2016).

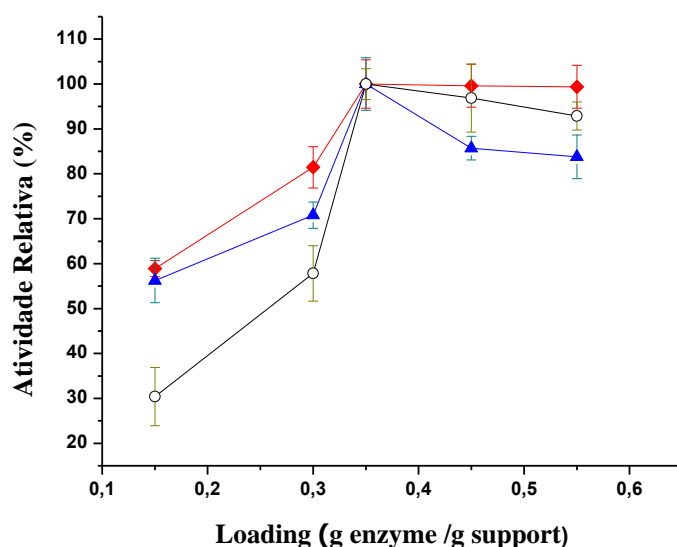


Figure 4.13 - Relative activity of the immobilized enzyme as a function of the ratio obtained of enzyme/support (m/m) after immobilization of lipase on different supports based on sunflower stalk: in natura (—♦—), treated by alkaline extraction (—▲—) and autohydrolysis (—○—).

These yield values are considered good when compared with other enzymes immobilized on other lignocellulosic supports such as: D'Souza & Godbole (2002) immobilized invertase in rice husk by physical adsorption and obtained 56% immobilization yield; Brígida *et al.* (2008) and Cristovão *et al.* (2011) immobilized lipase and lacase, respectively in coconut fiber by physical adsorption and obtained immobilization yield de 33 and 45%, respectively.

Thus, with the results obtained, the loading condition of 0.35 g enzyme / g support, was selected as the optimum condition to perform all subsequent trials since, it is the ratio that offers the best relationship among the values of recovered activity and immobilization yield.

3.3 – Biochemical properties

3.3.1 – Effect of pH and temperature on lipase activity

The pH of the medium plays a vital role in the activity of any biological molecule since that, change in pH may cause changes in activity, in structural or even inactivate the enzyme. Likewise, temperature has a high impact on the ability of an enzyme to accelerate a reaction (GRAHAME *et al.*, 2015). Thus, the enzyme immobilization cause a variety of effects on the ionization state and enzyme dissociation, the effect of pH and temperature on the activity of free and immobilized lipase was studied and the results are shown in Figure 4.14.

The maximum enzyme activity in both forms (free and immobilized) was obtained at pH 7.0 and for values lower or higher this pH the activity decreases, suggesting the immobilization changed the ionization state of some amino acids and, consequently, the structure of the enzymes immobilized affecting their function (SILVA *et al.*, 2012)

This result, therefore, indicate that the immobilization process on sunflower stalk at pH 7.0, does not affected the enzyme charge in other words, the immobilization has preserved of the active site native structure of the immobilized lipase, as evidenced by other authors (BRÍGIDA *et al.*, 2008; CRISTOVÃO *et al.*, 2011; CABRERRA-PADILLA *et al.*, 2012; MARTINS *et al.*, 2016).

The hydrolytic activity of free and immobilized lipase in different supports was investigated in the range of 30-80 °C and the results are shown in Figure 4.14 (B). It is can observe that immobilization process influenced the optimum temperature of immobilized lipase in the tested supports, because the maximum relative activity for the free enzyme was obtained at 50 °C, while immobilized occurred at 60 °C.

However, these results are quite favorable given that the temperature has a great influence on the activity and stability of enzymes in free or immobilized form. The increase in temperature provides an increase in reaction velocity seen that increases the kinetic energy of the molecules that make up the system (BALCÃO *et al.*, 1996; JESIONOWSK *et al.*, 2014).

Therefore, free or immobilized enzymes thermally more tolerant become

extremely promising for industrial applications, because they permit working operations in a higher temperature range, as for example, in the detergent industry, which represents the largest application of industrial enzymes (BARBOSA *et al.*, 2012; ES *et al.*, 2015).

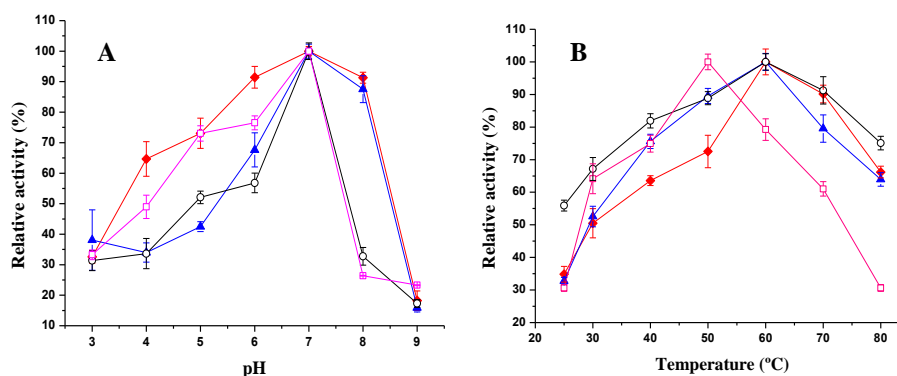


Figure 4.14 – Effect of pH (A) and temperature (B) in the relative activity of free enzyme (—□—) and immobilized on the in natura sunflower stalk (—♦—) and treated by extraction alkaline (—▲—) and autohydrolysis (—○—).

Furthermore, this increase in temperature optimum of the enzyme suggests that the immobilization process resulted in an increase in stiffness of the enzyme structure, which is normally associated with the effective binding of the enzyme to the support, impeding the unfolding of tertiary structure. Therefore, the increase in the optimum temperature is necessary in order to promote the thermal movement and increasing the flexibility essential for its activity (BALCÃO *et al.*, 1996; GOMES *et al.*, 2006). In the literature, there are numerous reports of change in the optimum temperature of the enzyme activity after immobilization (GOMES *et al.*, 2006; ROMDHANE *et al.*, 2011; ITTRAT *et al.*, 2014).

3.3.2 – Thermal stability

The thermal stability of the enzyme is one of the most important parameters for use of biocatalyst in industry because increasing the thermal stability of the enzyme, also increases the potential for industrial application. This is due to the fact that, the biological processes at high temperature are advantageous due to higher diffusion rates, lower

viscosity substrate, increasing the solubility of reagents and reduced risk for microbial contamination (CRISTOVÃO *et al.*, 2012; CABRERA-PADILLA *et al.*, 2013; BEZBRADICA *et al.*, 2014; ATACAN & OZACAR, 2015).

That way, this analysis indicates whether the support can or not be incubated in the presence of the enzyme for long times and high temperatures without denature it quickly since the enzymes are usually more stable at lower temperatures, while higher temperatures tend to rapid thermal denaturation (MONIER *et al.*, 2010; CRISTOVÃO *et al.*, 2012; BEZBRADICA *et al.*, 2014).

Thus, the thermal stability of the free and immobilized enzyme was determined at 60 °C for 240 min as shown in Figure 4.15. It was observed that the immobilization process favored the enzymes since that, all the immobilized were more thermostable the free enzyme, maintaining about 80% (in natura) and 90% (treatment derivatives) of the initial lipase activity after 240 min at 60 °C (pH 7.0), whereas only 50% of the initial activity was maintained in the free enzyme. This probably is due to the protection that the support offered to the enzyme, protecting it from drastic conformational changes, resulting in higher thermal stability (MONIER *et al.*, 2010).

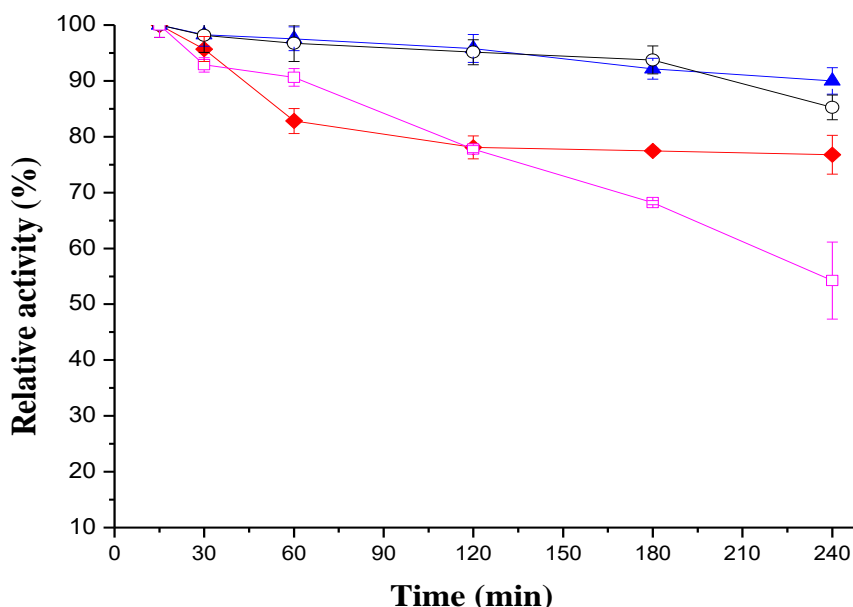


Figure 4.15 - Thermal stability at 60 °C of free enzyme (□) and immobilized on the in natura sunflower stalk (◆) and treated by extraction alkaline (▲) and autohydrolysis (○) a function of temperature at pH 7.0, reaction time 10min.

Immobilized biocatalysts on supports derived from alkali and autohydrolysis processes were 4.28 and 3.62 times more stable than the free enzyme with a half-life 19.95 and 16.86 h, respectively (Table 4.6). Already, the immobilized on the *in natura* support was only 2.20 times more stable with $t_{1/2}$ of 10,25 h. These results, therefore, demonstrate that treatments described in this study influenced positively the parameters of the immobilized.

Table 4.6 - Constant values of thermal inactivation (K_d) and half-life time $t_{(1/2)}$ of the free and immobilized enzyme.

	k (h⁻¹)	t_(1/2) (h)	SF
Free lipase	0.0025	4.66	
Alkaline support	0.0006	19.95	4.28
Autohydrolysi support	0.0007	16.86	3.62
<i>In natura</i> support	0.0011	10.25	2.20

Stabilization factor (SF) is the ratio between the half-life of the immobilized enzyme and that of the corresponding soluble enzyme.

According Mateo *et al.* (2007) and Souza *et al.* (2012), to support internal morphology exerts a considerable influence on the stability of the enzyme. Thus, considering that the pretreatments remove hemicellulose and lignin and leave the fiber structure unordered, more porous and the exposed cellulose fibers, the treated support tends to better adsorb the enzymes and, consequently, the improve the process of immobilization and the stability of the enzyme. Similar result was also observed by other authors, for immobilized derivatives in organic support; who suggested that both the pretreatment as the immobilization methodology utilized, can influence positively the parameters of the biocatalysts (GOMES *et al.*, 2006; BRÍGIDA *et al.*, 2008; MONIER *et al.*, 2010; HUANG *et al.*, 2011; CRISTOVÃO *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2012; BEZERRA *et al.*, 2015).

3.3.3 – Operational stability

The operational stability of lipase immobilized on untreated and treated sunflower

stalk by adsorption was tested in the hydrolysis reaction of olive oil (10 min / 60 °C) and the results obtained are presented in Figure 4.16. It can be observed that enzyme immobilized on treated supports by alkaline extraction and autohydrolysis maintained about 51% of its initial activity, until the sixth and fourth reuse, respectively, while that, the enzyme immobilized on the in natura support loses 50% of its activity already in the third reuse.

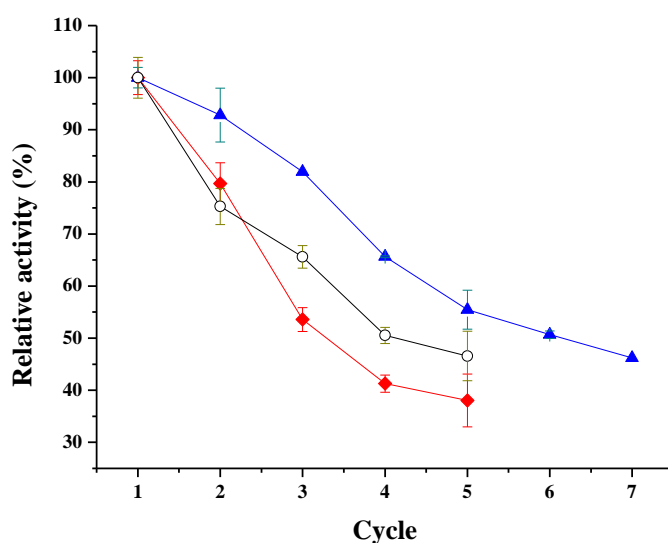


Figure 4.16 - Operational stability of immobilized lipase on the in natura sunflower stalk (—◆—) and treated by extraction alkaline (—▲—) and autohydrolysis (—○—), reaction time 10 min.

A probable explanation for the lower reuse of the immobilized enzyme on the in natura support is that the fiber in natura (untreated) has a natural waxy substance on the surface that contributes immensely to ineffective adsorption of the enzyme on the surface of the fiber, thus promoting leaching of the enzyme. In addition, the natural fibers are strongly hydrophilic materials, which leads to high water absorption and consequently a significant deterioration in their mechanical properties, thus reducing their usefulness for many applications (MOHANTY *et al.*, 2001; RAHMAN & KHAN 2007).

This demonstrates that pretreatments affect directly the activity and stability of immobilized biocatalysts on these supports since they may modify some properties of natural fibers such as porosity, internal area and composition (RAHMAN & KHAN, 2007; BEZERRA *et al.*, 2015).

The alkaline pretreatment removes significant amounts of hemicellulose, a certain amount of lignin, wax and oils covering the external surface of the fiber cell wall and depolymerizes the native cellulose structure (RAHMAN & KHAN, 2007; MOHANTY *et al.*, 2001). Such changes should affect the exposure of important groups, which influence both the activation of fiber as in the activity of the immobilized (BEZERRA *et al.*, 2015).

In contrast, autohydrolysis pretreatment promotes the removal of hemicellulose and degrading or modification lignin (SHAMSUDIM *et al.*, 2012), therefore, leads to a material with higher lignin content and low porosity (BEZERRA *et al.* 2015), which explains the best result for the immobilized on support treated by alkaline extraction. Soon, alkaline pretreatment produces derivatives with higher enzymatic activity and operational stability.

These data are similar to that reported by the literature. Similar results to those obtained in this work, for the immobilization in support in natura, were described by Huang *et al.* (2011), studied the *Candida Rugosa* lipase immobilized on cellulose nanofiber membrane and observed a residual activity of about 50% after the third reuse. Brígida *et al.* (2008), immobilized *Candida Antarctica type B* lipase on coconut fiber by physical adsorption and reported a 50% activity in the second reuse; they attributed the poor operational stability of the immobilized biocatalyst in organic medium, low enzyme load on the support. Ittrat *et al.* (2014) reported loss of 50% of the initial activity early as the second reuse for *Acinetobacter baylyi* lipase immobilized by physical adsorption on *Salacca wallichiana* stalk. This manner, it becomes clear the importance of this study in question, concerning the use of pretreatments in lignocellulosic waste for use as supports for immobilization of enzymes.

3.3.4 – Kinetic parameters

The kinetic of the hydrolytic activity of the immobilized biocatalyst was determined by using olive oil as substrate (at 60 °C, pH 7.0) and the Michaelis-Menten equation was used to adjust the kinetic parameters K_m and V_{max} . Table 4.7 shows the values obtained for K_m and V_{max} for both free enzyme as for the immobilized.

The performances of free and immobilized lipase were very different, which shows that the kinetic parameters of lipase were changed by immobilization. The value K_m , which represents the affinity of the enzyme by the substrate, to free was 338.09 mM and immobilized on the in natura, alkaline and hydrothermal support were 208.64, 284.45 and 287.32mM, respectively. The smaller value of K_m for the immobilized enzymes on the different supports when compared to free, indicates that the treatments improved the affinity of the enzyme by substrate. According to Cabrerra-Padilla *et al.* (2012) this higher affinity for the substrate is due to the microenvironment of the immobilized enzyme being hydrophobic with low water content, so the substrate that is also hydrophobic is attracted, thus justifying the low value of K_m .

Table 4.7 - Kinetic parameters (V_{max} and K_m) of free and immobilized enzyme.

	K_m (mM)	V_{max} (Ug ⁻¹)
Free lipase	338.09	2145.82
Alkaline support	284.45	625.97
Autohidrolisi support	287.32	544.19
In natura support	208.64	364.74

However, when analyzing the value of V_{max} (maximum velocity reaction), note that the free enzyme was most active, 2145.82 Ug⁻¹, that the immobilized enzymes. This has probably occurred as result of changes in the three-dimensional conformation of the enzyme when they was immobilized on support. This can have affected, directly or indirectly, the active site of the enzyme (GOMES *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2012).

Bayramoglu & Arica (2014), also reported higher velocity of reaction to the free enzyme and indicated some reasons for this reduction upon immobilization, including: improper fixation of the enzyme on the support, leading to an inactive conformation of the enzyme; and changes in the properties of the active sites that prevented the binding of substrate to the active site.

3.4 – FTIR analysis

The biocatalysts immobilized on in natura sunflower stalk fresh and treated by alkaline extraction and autohydrolysis were analyzed by FTIR in order to evaluate the efficiency of immobilization of lipase on the support and its characteristic bands. The analysis was performed in the region 500 - 4000 cm^{-1} seen that the peptides groups, the structural repeat unit of proteins, present characteristic bands in this region Figure 4.17 (PORTACCIO *et al.*, 2011).

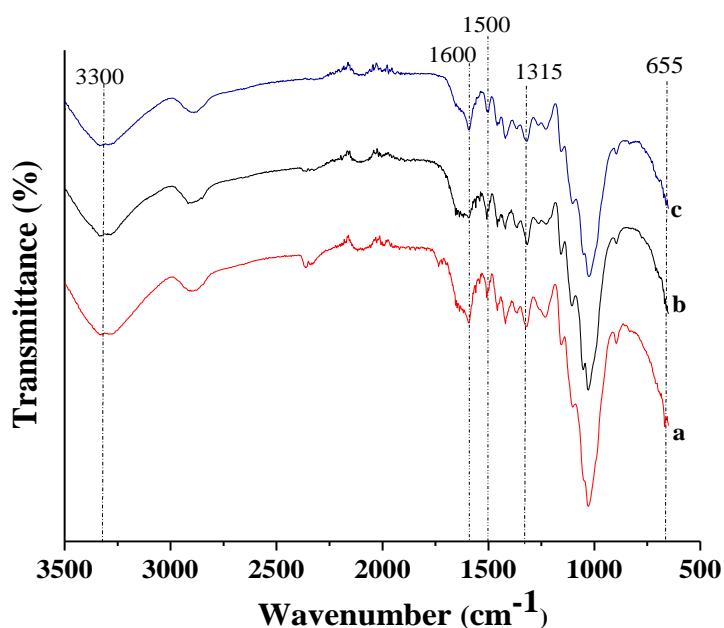


Figure 4.17 - FT-IR of immobilized enzyme on different supports of sunflower stalk: (a) in natura (untreated); (b) autohydrolysis and (c) alkaline extraction

These bands are named Amide A (at about 3300 cm^{-1}), Amide B (at about 3100 cm^{-1}), Amide I (between 1600 – 1690 cm^{-1}), Amide II (between 1480 – 1575 cm^{-1}), Amide III (at about 1300 cm^{-1}), Amide IV (between 625 – 770 cm^{-1}) e Amide IV or Amide V (between 640 – 800 cm^{-1}) (ORREGO *et al.*, 2010; PORTACCIO *et al.*, 2011). Thus, analyzing the spectra (Figure 4.17) showed the contribution amide A (3300 cm^{-1}), amide I (1599 cm^{-1}), amide II (1539 cm^{-1}), amide III (1315 cm^{-1}) e amide IV or Amide V (655 cm^{-1}).

The amide A band corresponding to the N–H stretching vibration. The amide I band results from the C = O stretching vibration of the amide group coupled to the

stretching of the C–N bond. The amide II band involves both in plane N–H bending and C–N stretching.

According Andrade *et al.* (2010) and Portaccio *et al.* (2011) the presence of amide I and amide II bands shows that both the secondary structure and the bioactivity of lipase were preserved after the immobilization of the enzyme on sunflower stalk. However, it was observed a more accentuated vibration in the spectra of the immobilized lipase on sunflower stalk treated by alkaline extraction; this suggests that the treatment favored the immobilization. The amide III band by relying on the force field, nature of the side chains and hydrogen bonding, is very complex. Amide IV and amide V bands are due to OCN bending and out-of-plane NH bending, respectively (PORTACCIO *et al.*, 2011).

It can be noted however that, these contributions of the amides occur at wavelengths compatible with those observed for groups of cellulose, hemicellulose and lignin (Table 4.8) suggesting, thus, interaction between this groups and Amide (NH) of lipase during the immobilization process, seen overlapping of the bands in the spectra (Figure 4.17).

Table 4.8 - Assignments of FTIR absorption bands for sunflower stalk samples.

Wavenumber (cm ⁻¹)	Assignment/functional group	Reference
3300	O-H stretching (related rupture of cellulose hydrogen bonds)	Égues <i>et al.</i> (2012); Sambusiti <i>et al.</i> (2013);
2900	C-H stretching (indicates rupture of methyl/methylene group of cellulose)	Kumar <i>et al.</i> (2009); Sambusiti <i>et al.</i> (2013);
1590	Aromatic ring vibration and C=O stretching group of lignin	Égues <i>et al.</i> (2012); Bezerra <i>et al.</i> (2015)
1500	C-O absorption of guayacyl rings in lignin	Sambusiti <i>et al.</i> (2013) Souza <i>et al.</i> (2016)
1400	C-H deformation of cellulose	Sambusiti <i>et al.</i> (2013);
1315	CH ₂ wagging group of cellulose and hemicellulose	Bezerra <i>et al.</i> (2015)
1020	C-O, C-C and C-C-O stretching of cellulose, hemicellulose and lignin	Bezerra <i>et al.</i> (2015)
800	β-glycosidic bonds between carbohydrates	Kumar <i>et al.</i> (2009); Égues <i>et al.</i> (2012)

Though a detailed assignment is not possible due to the complexity involved, the changes observed in the vibrational spectra corroborate the existence of different modes enzyme binding to the sunflower stalk supports.

3.8 – Conclusions

Based on the obtained results, sunflower stalk is an efficient alternative support for the immobilization of lipase by physical adsorption. The enzymes immobilized on supports resulting from autohydrolysis and alkaline extraction treatments showed to be more active and stable, especially with regard to temperature. However, the derived support by alkaline extraction favors further the immobilization process since, showed a significant improvement in the operational stability of the immobilized lipase.

Thus, it can be inferred that the treatments, especially the alkaline extraction, are an interesting tool for improvement of residue characteristics for use as support since, the process of lipase immobilization on these supports improved the activity, the capability to reusability and stability of the enzyme. Therefore, increases the applicability of the catalyst in bio industrial catalytic reactions. It can be concluded, thus, that the supports from sunflower stalk, constitute very promising supports for lipases immobilization.

3.9 – References

ANDRADE, L. H.; REBELO, L. P.; NETTO, C. G. C. M.; TOMA, H. E. Kinetic resolution of a drug precursor by *Burkholderia cepacia* lipase immobilized by different methodologies on superparamagnetic nanoparticles. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. v.66, p.55–62, 2010.

ANSARI, S. A.; HUSAIN, Q. Potential applications of enzymes immobilized on/in nano materials: A review. *Biotechnology Advances*, v.30, p.512–523, 2012.

ATACAN, K.; OZACAR, M. Characterization and immobilization of trypsin on tannic

acid modified Fe₃O₄ nanoparticles, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. v.128, p.227–236, 2015.

ATAIE, F. F.; RIDING, K. A. Impact of pretreatments and enzymatic hydrolysis on agricultural residue ash suitability for concrete. *Construction and Building Materials*. v.58, p.25–30, 2014.

BALCÃO, V. M.; PAIVA, A. L.; MALCATA, X. F. Bioreactors with immobilized lipases: State of the art. *Enzyme and Microbial Technology*. v.18, p.392-416, 1996.

BARBOSA, J. M. P.; SOUZA, R. L.; MELO, C. M.; FRICKS, A. T.; SOARES, C. M. F.; Lima, A. S. Biochemical characterisation of lipase from a new strain of bacillus sp. itp-001. *Química Nova*, v.35, p.1173-1178, 2012.

BAYRAMOGLU, G.; ARICA, M. Y. Immobilization of *Mucor miehei* Esterase on Core-shell Magnetic Beads via Adsorption and Covalent Binding: *Application in Esters Synthesis. Fibers and Polymers*. v.15, p.2051-2060, 2014.

BEZBRADICA, D. I.; MATEO, C.; GUISAN, J. M. Novel support for enzyme immobilization prepared by chemical activation with cysteine and glutaraldehyde. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. v.102, p.218–224, 2014.

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

BRIGIDA, A. I. S., PINHEIRO, A. D. T., FERREIRA, A. L. O.; GONÇALVES, L. R. B. Immobilization of *Candida antarctica* Lipase B by Adsorption to Green Coconut Fiber. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.146, p.173–18, 2008.

BRÍGIDA, A. I. S.; CALADO, V. M. A.; GONÇALVES, L. R. B.; COELHO, M. A. Z. Effect of chemical treatments on properties of green coconut fiber. *Carbohydrate Polymers*, v.79, p.832–838, 2010.

CABRERA-PADILLA, R. Y.; LISBOA, M. C.; FRICKS, A. T.; FRANCESCHI, E.; LIMA, A. S.; SILVA, D. P.; SOARES, C. M. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on poly(3-hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate): a new eco-friendly support. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, v.32, p.289-98, 2012.

CABRERA-PADILLA, R. Y.; ALBUQUERQUE, M.; FIGUEIREDO, R. T.; FRICKS, A. T.; FRANCESCHI, E.; LIMA, A. S.; SANTOS, O. A.; SILVA, D. P.; SOARES, C. M. Immobilization and characterization of a lipase from a new source, *Bacillus* sp. ITP-001. *Bioprocess Biosyst Eng.* v.36, p.1385–1394, 2013.

CRISTÓVÃO, R. O.; SILVERIO, S. C.; TAVARES, A. P. M.; BRÍGIDA, A. I.; LOUREIRO, J.M.; BOAVENTURA, R. A. R.; EUGÉNIA, A. M.; COELHO, M. A. Z. Immobilization of commercial laccase on to green coconut fiber by adsorption and its application for reactive textile dyes degradation. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.* v.72, p.6–12, 2011.

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

D'SOUZA, S. F.; GODBOLE, S. S. Immobilization of invertase on rice husk using polyethylenimine. *Journal Biochemical and Biophysical Methods.* v.52, p.59–62, 2002.

EGÜÉS, I.; SANCHEZ, C.; MONDRAGON, I.; LABIDI, J. Effect of alkaline and

autohydrolysis processes on the purity of obtained hemicelluloses from corn stalks. *Bioresource Technology*. v.103, p.239–248, 2012.

ES, I.; VIEIRA, J. D. G.; AMARAL, A. C. Principles, techniques, and applications of biocatalyst immobilization for industrial application. *Applied Microbiology Biotechnology*. v.99, p.2065–2082, 2015.

FACHIN, D.; LOEY, A. M. V.; NGUYEN, B. L.; VERLENT, I.; INDRAWATI, M.; HEDRICKS, M. E. *Biotechnology Progress*. v.18, p.739–744, 2002.

FOLLAIN, N.; SAIHAH, R.; FATYEYEVA, K.; RANDRIANANDRASANA, N.; LEBLANC, N.; MARAIS, S.; LECAMP, L. Hydrophobic surface treatments of sunflower pith using eco-friendly processes. *Cellulose*. v.22, p.245–259, 2015.

GOMES, F. M.; PAULA, A. V.; SILVA, G. S.; CASTRO, H. F. Determinação das propriedades catalíticas em meio aquoso e orgânico da lipase de *Candida rugosa* imobilizada em celulignina quimicamente modificada por Carbonildiimidazol. *Química Nova*, v.29, p.710-718, 2006.

GRAHAME, D. A. S.; BRYKSA, B. C.; YADA, R.Y. Factors affecting enzyme activity. In *Improving and Tailoring Enzymes for Food Quality and Functionality* / edited by Rickey Y. Yada. Elsevier Ltda, p.11–55, 2015.

HUANG, X. J.; CHEN, P. C.; HUANG, F.; OU, Y.; CHEN, M. R.; XU, Z. K. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on electrospun cellulose nanofiber membrane. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. v.70, p.95–100, 2011.

ITTRAT. P.; CHACHO, T.; PHOLPRAYOON J.; SUTTIWARAYANON. N.; CHAROENPANICH, J. Application of agriculture waste as a support for lipase immobilization - Original Research Paper. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*.

v.3, p.77–82, 2014.

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

JUNIOR, C. S.; MILAGRES, A. M. F.; FERRAZ, A.; CARVALHO, W. The effects of lignin removal and drying on the porosity and enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse. *Cellulose*. v.20, p.3165–3177, 2013.

KUMAR, R.; MAGO, G.; BALAN, V.; WYMAN, C. E. Physical and chemical characterizations of corn stover and poplar solids resulting from leading pretreatment technologies. *Bioresource Technology*. v.100, p.3948–3962, 2009.

MARTINS, S. R. S.; SANTOS, A.; FRICKS, A. T.; LIMA, A. S.; MATTEDI, S.; SILVA, D. P.; SOARES, C. M. F.; CABRERA-PADILLA, R. Y. Protic ionic liquids influence on immobilization of Lipase *Burkholderia cepacia* on hybrid supports. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 2016. Doi: 10.1002/jctb.5044

MATEO, C.; PALOMO, J. M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUISAN, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques - Review . *Enzyme and Microbial Technology*. v.40, p.1451–1463, 2007.

MOHANTY, A. K.; MISRA, M.; DRZAL, L. T. Surface modifications of natural fibers and performance of the resulting biocomposites: An overview. *Composite Interfaces*, v.8, p.313–343, 2001.

MONIER, M.; WEI, Y.; SARHAN, A. A. Evaluation of the potential of polymeric carriers based on photo-crosslinkable chitosan in the formulation of lipase from *Candida rugosa* immobilization. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. v.63, p.93–101, 2010.

NATIONAL RENEWABLE ENERGY LABORATORY (NREL). Chemical Analysis and Testing Laboratory Analytical Procedures: LAP-002 (1996), LAP-003 (1995), LAP - 004 (1996), LAP-005 (1994), LAP-010 (1994) and LAP 017 (1998). NREL, Golden, CO, USA. <http://www.eere.energy.gov/biomass/analyticalprocedures.html>.

ORREGO, C. E.; SALGADO, N.; VALENCIA, J. S.; GIRALDO, G. I.; GIRALDO, O. H.; CARDONA, C. A. Novel chitosan membranes as support for lipases immobilization: Characterization aspects. *Carbohydrate Polymers*. v.79, p.9–16, 2010.

PORTACCIO, M.; DELLA VENTURA, B.; MITA, D. G.; MANOLOVA, N.; STOILOVA, O.; RASHKOV, I.; LEPORE, M. FT-IR microscopy characterization of sol–gel layers prior and after glucose oxidase immobilization for biosensing applications. *Journal Sol-Gel Science Technology*. v.57, p.204–211, 2011.

POSPISKOVA A, K.; SAFARIK, I. Magnetically modified spent grain as a low-cost, biocompatible and smart carrier for enzyme immobilization. *Journal Science Food Agric*. v.93, p.1598 – 1602, 2013.

RABEMANOLONTSOA, H.; SAKA, S. Various pretreatments of lignocellulosics – Review. *Bioresource Technology*. v.199, p.83–91, 2016.

RAHMAN, M. M.; KHAN, M. A. Surface treatment of coir (*Cocos nucifera*) fibers and its influence on the fibers' physico-mechanical properties. *Composites Science and Technology*. v.67, p.2369–2376, 2007.

ROMDHANE, I. B. B.; ROMDHANE, Z. B.; GARGOURI, A.; BELGHITH, H. Esterification activity and stability of *Talaromyces thermophilus* lipase immobilized onto chitosan. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. v.68, p.230–239, 2011.

RUIZ, E.; CARA, C.; MANZANARES, P.; BALLESTEROS, M.; CASTRO, E.

Evaluation of steam explosion pre-treatment for enzymatic hydrolysis of sunflower stalks. *Enzyme and Microbial Technology*. v.42, p.160 - 166, 2008.

RUIZ, E.; ROMERO, I.; MOYA, M.; CARA, C.; VIDAL, J. D.; CASTRO, E. Dilute sulfuric acid pretreatment of sunflower stalks for sugar production. *Bioresource Technology*. v.140, p.292 – 298, 2013.

SAMBUSITI, C.; FICARA, E.; MALPEI, F.; STEYER, J. P.; CARRÈRE, H. Effect of sodium hydroxide pretreatment on physical, chemical characteristics and methane production of five varieties of sorghum. *Energy*. v.55, p.449-456, 2013.

SANTOS, D. T.; SARROUH, B. F.; RIVALDI, J. D.; CONVERTI, A.; SILVA, S. S. Use of sugarcane bagasse as biomaterial for cell immobilization for xylitol production. *Journal of Food Engineering*. v.86, p.542–548, 2008.

SHAMSUDIN, S.; SHAH, U. K. M.; ZAINUDIN, H.; ABD-AZIZ, S.; KAMAL, S. M. M.; SHIRAI, Y.; HASSAN, M. A. Effect of steam pretreatment on oil palm empty fruit bunch for the production of sugars. *Biomass and Bioenergy*. v.36, p.280-288, 2012.

SHELDON, R. A.; PELT, S. V. Enzyme immobilization in biocatalysis: why, what and how. *Chemical Society Reviews*. v.42, p.6223–6235, 2013

SILVA, A. M. S.; TAVARES, A. P. M.; ROCHA, C. M. R.; CRISTÓVÃO, R. O.; TEIXEIRA, J. A.; MACEDO, E. A. Immobilization of commercial laccase on spent grain. *Process Biochemistry*. v.47, p.1095–1101, 2012.

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

SOARES, C. M. F.; SANTANA, M. H. A.; ZANIN, G. M.; DE CASTRO, H. F. *Química Nova*. v.26, p.832–838, 2003.

SOUZA, T. C.; FONSECA, T. S.; COSTA, J. A.; ROCHA, M. V. P.; MATTOS, M. C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; LUCIANA R. B. G.; SANTOS, J. C. S. Cashew apple bagasse as a support for the immobilization of lipase B from *Candida antarctica*: Application to the chemoenzymatic production of (*R*)-Indanol. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. v.130, p.58-69, 2016.

YAN, S.; CHEN, S.; WU, J.; WANG, P. Ethanol production from concentrated food waste hydrolysates with yeast cells immobilized on corn stalk. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. v.94, p.829–838, 2012.

4.4. Patente 01

17/09/2015  0000221501590060	860150211541 09:10 NPWB  BR 10 2015 023926 2	
Protocolo	Número	Código QR

		INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL Diretoria de Patentes Sistema e-Patentes/Depósito
---	---	---

DIRPA 	Tipo de Documento: Recibo de Peticionamento Eletrônico	DIRPA	Página: 1 / 2
Título do Documento: Recibo	Código: RECIBO		Versão: 01
DIRPA-FQ001 - Depósito de Pedido de Patente ou de Certificado de Adição		Modo: Produção	

O Instituto Nacional da Propriedade Industrial informa:

Este é um documento acusando o recebimento de sua petição conforme especificado abaixo:

Dados do INPI:

Número de processo:	BR 10 2015 023926 2
Número da GRU principal:	00.000.2.2.15.0159006.0 (serviço 200)
Número do protocolo:	860150211541
Data do protocolo:	17 de Setembro de 2015, 09:10 (BRT)
Número de referência do envio:	138512

Dados do requerente ou interessado:

Tipo de formulário enviado:	DIRPA-FQ001 v.006
Referência interna:	BIOMASSA TRAT
Primeiro requerente ou interessado:	INSTITUTO DE TECNOLOGIA E PESQUISA
CNPJ do primeiro requerente ou interessado:	02.886.710/0001-96
Número de requerentes ou interessados:	2
Título do pedido:	PROCESSO DE TRATAMENTO DE BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA DE RESÍDUO DE ABACAXI COM LÍQUIDO IÔNICO PRÓTICO (LI)

Arquivos enviados:

Arquivo enviado	Documento representado pelo arquivo	Número de páginas
[package-data.xml]	Arquivo com informações do pacote em XML	---
[brf101-request.xml]	Formulário de depósito de pedido de patente ou de certificado de adição em XML	---
[application-body.xml]	Arquivo com dados do corpo do conteúdo patentário em XML	---
[brf101-request.pdf]	Formulário de depósito de pedido de patente ou de certificado de adição em PDF	---
RELATÓRIO DESCRITIVO.pdf [DOCUMENTO.pdf]	Arquivo com conteúdo técnico-patentário da petição - Relatório descritivo em formato eletrônico PDF	páginas 1 a 9 9
REINVIDICAÇÕES.pdf [DOCUMENTO-1.pdf]	Arquivo com conteúdo técnico-patentário da petição - Reivindicações em formato eletrônico PDF	páginas 1 a 2 2
RESUMO.pdf [DOCUMENTO-2.pdf]	Arquivo com conteúdo técnico-patentário da petição - Resumo em formato eletrônico PDF	página 1 1
Figuras.pdf [DOCUMENTO-3.pdf]	Arquivo com conteúdo técnico-patentário da petição - Desenhos em formato eletrônico PDF [Número de desenhos: 8, Desenho para resumo: F1, Cor dos desenhos: Preto e Branco]	páginas 1 a 3 3
reivindicação.txt [REIVINDTXT.txt]	Reivindicações em formato eletrônico texto	---
resumo.txt [RESUMOTXT.txt]	Resumo em formato eletrônico texto	---
relatório.txt [RELATDESCTXT.txt]	Relatório descritivo em formato eletrônico texto	---
Ata 2015.pdf [OUTROS-1.pdf]	Documentos de qualquer outra natureza em formato eletrônico PDF	2
Contrato Social UNIT.pdf [INDEXADO-1.pdf]	Contrato social em formato eletrônico PDF	7

GRU Principal: 00.000.2.2.15.0159006.0 (serviço 200)



INPI INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
Diretoria de Patentes
Sistema e-Patentes/Depósito

DIRPA PATENTES	Tipo de Documento: Recibo de Peticionamento Eletrônico	DIRPA	Página: 2 / 2
	Título do Documento: Recibo DIRPA-FQ001 - Depósito de Pedido de Patente ou de Certificado de Adição	Código: RECIBO Modo: Produção	Versão: 01

Arquivo enviado	Documento representado pelo arquivo	Número de páginas
Untitled_20150916_170304.PDF [GRU-1.PDF]	Guia de Recolhimento da União (GRU) paga com comprovante de pagamento em formato eletrônico PDF [Código de serviço: 200, Número: 00.000.2.2.15.0159006.0, Nome do sacado: INSTITUTO DE TECNOLOGIA E PESQUISA]	1

Dados sobre o envio:

Responsável pelo envio:	Ila Natiele Neres dos Santos:3ff8f653232dff5bebcd403c00b02334
Assinatura (Requerente, Interessado ou Procurador):	LEONARDO MAESTRI TEIXEIRA:05242469633,OU=Certificado PF A1,OU=AC SOLUTI Multipla,OU=AC SOLUTI,OU=Autoridade Certificadora Raiz Brasileira v2,O=ICP-Brasil,C=BR
Método de envio:	Eletrônico pela Internet
Código de segurança:	39:B2:E3:74:C4:76:F3:5B:6C:F2:AE:F9:66:CD:45:3F:F7:AE:48:CA

< Uso exclusivo do INPI >

Espaço reservado para o protocolo

Espaço reservado para a etiqueta

Espaço reservado para o código QR



INPI
INSTITUTO
NACIONAL
DA PROPRIEDADE
INDUSTRIAL

INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
Sistema de Gestão da Qualidade
Diretoria de Patentes

DIRPA **PATENTES**

Tipo de Documento: Formulário Eletrônico

DIRPA

Página: 1 / 3

Título do Documento:

Depósito de Pedido de Patente

Código: FQ001

Versão: 6

Procedimento:
Não Aplicável

Ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial:

O requerente solicita a concessão de um privilégio na natureza e nas condições abaixo indicadas

1. Depositante (71):

1.1 Nome: INSTITUTO DE TECNOLOGIA E PESQUISA
1.2 CNPJ: 02.886.710/0001-96
1.3 Endereço Completo: AVENIDA MURILO DANTAS, 300, FAROLÂNDIA, PRÉDIO DO ITP, ARACAJU, Sergipe, Brasil
1.4 CEP: 49032-490
1.5 Telefone: +55(79)32182190
1.6 Fax: ---
1.7 E-mail: agilec@itp.org.br

1.1 Nome: SOCIEDADE DE EDUCAÇÃO TIRADENTES LTDA
1.2 CNPJ: 13.013.263/0001-87
1.3 Endereço Completo: AVENIDA MURILO DANTAS, 300, FAROLÂNDIA, ARACAJU, Sergipe, Brasil
1.4 CEP: 49032-490
1.5 Telefone: +55(79)32182100
1.6 Fax: ---
1.7 E-mail: reitoria@unit.br

2. Natureza: Invenção Modelo de Utilidade Certificado de Adição

3. Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54):

PROCESSO DE TRATAMENTO DE BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA DE RESÍDUO DE ABACAXI COM LÍQUIDO IÔNICO PRÓTICO (LI)

4. Pedido de Divisão: do pedido Nº. ---

5. Prioridade:

Declaração na forma do item 3.2 da Instrução Normativa nº 17/2013:

Declaro que os dados fornecidos no presente formulário são idênticos ao da certidão de depósito ou documento equivalente do pedido cuja prioridade está sendo reivindicada.

O depositante reivindica a(s) seguinte(s) prioridade(s):

Pais ou Organização do depósito	Número do depósito	Data do depósito	Tipo
---	---	---	---

6. Inventor (72):

6.1 Nome: ÁLVARO SILVA LIMA
6.2 Qualificação: DOUTOR
6.3 CPF: 609.558.135-49
6.4 Endereço Completo: Av. Beira Mar 3598 apt 402 Solare Jardins, ARACAJU, Sergipe, Brasil
6.5 CEP: 49025-040
6.6 Telefone: +55(79)88252605
6.7 Fax: ---
6.8 E-mail: aslima2001@yahoo.com.br

6.1 Nome: CLEIDE MARA FARIA SOARES
6.2 Qualificação: DOUTORA
6.3 CPF: 071.228.238-65
6.4 Endereço Completo: Av. Escritor Euraliano Ramos 100 Bloco 01 apt 601, ARACAJU, Sergipe, Brasil
6.5 CEP: 49095-650
6.6 Telefone: +55(79)91322592
6.7 Fax: ---
6.8 E-mail: cleide.soares@pq.cnpq.br

6.1 Nome: SILVANA MATTEDI E SILVA
6.2 Qualificação: DOUTORA
6.3 CPF: 354.240.105-63
6.4 Endereço Completo: Rua Barão de Loreto 369 apt 302 Graça 40150-270, ARACAJU, Sergipe, Brasil
6.5 CEP: 40150-270

GRU - 00.000.2.2.15.0159006.0



DIRPA PATENTES	Tipo de Documento: Formulário Eletrônico	DIRPA	Página: 2 / 3
Título do Documento: Depósito de Pedido de Patente		Código: FQ001	Versão: 6
		Procedimento: Não Aplicável	

6.6 Telefone: +55(71)91059369
6.7 Fax: ---
6.8 E-mail: silvana@ufba.br

6.1 Nome: Rita de Cássia Mendonça de Miranda
6.2 Qualificação: DOUTORA
6.3 CPF: 801.970.944-49
6.4 Endereço Completo: Rua Quirino 1300 Bloco 04 apt 04 Inácio Barbosa, ARACAJU, Sergipe, Brasil
6.5 CEP: 49040-700
6.6 Telefone: +55(79)91647895
6.7 Fax: ---
6.8 E-mail: ritamend30@gmail.com

6.1 Nome: EDELVIO DE BARROS GOMES
6.2 Qualificação: DOUTOR
6.3 CPF: 591.138.634-87
6.4 Endereço Completo: Rua Quirino 1300 Bloco 04 apt 04 Inácio Barbosa, ARACAJU, Sergipe, Brasil
6.5 CEP: 49040-700
6.6 Telefone: +55(79)91278212
6.7 Fax: ---
6.8 E-mail: edelviogomes@gmail.com

6.1 Nome: Jaci Villanova Leite Neta
6.2 Qualificação: MESTRE
6.3 CPF: 006.373.265-39
6.4 Endereço Completo: Av. Tancredo Neves 3515 Edf. Cerejeiras Bloco C apt 103. Ponto Novo, ARACAJU, Sergipe, Brasil
6.5 CEP: 49097-510
6.6 Telefone: +55(79)81138622
6.7 Fax: ---
6.8 E-mail: aci_villanova@yahoo.com.br

6.1 Nome: Walter Alves Gomes Jr
6.2 Qualificação: DOUTOR
6.3 CPF: 734.255.915-68
6.4 Endereço Completo: Rua Miguel Gustavo 510, edf Água Marinha, apt 1304, BROTAS, Bahia, Brasil
6.5 CEP: 40285-010
6.6 Telefone: +55(71)1992238639
6.7 Fax: ---
6.8 E-mail: waltergomes@yahoo.com.br

7. Declaração de divulgação anterior não prejudicial:

Artigo 12 da LPI - Período de Graça.

8. Procurador (74):

8.1 Nome: ---
8.2 Qualificação: ---
8.3 CPF: ---
8.4 API: ---
8.5 OAB: ---
8.6 Endereço Completo: ---
8.7 CEP: ---
8.8 Telefone: ---
8.9 Fax: ---
8.10 E-mail: ---

9. Listagem de seqüências biológicas: (documentos anexados, se houver)

- Código de controle alfanumérico no formato de código de barras (arquivo em formato eletrônico PDF).
 Código de controle alfanumérico no formato de código de barras (arquivo em formato eletrônico XML).
 Listagem de seqüências (arquivo em formato eletrônico TXT).
 Declaração relativa à listagem de seqüências (arquivo em formato eletrônico PDF).

10. Material biológico: (se houver)

10.1 Identificação: ---
10.2 Instituição depositária: ---
10.3 Endereço completo: ---
10.4 Número de adesão: ---

11. Declaração de igualdade de conteúdo técnico entre os arquivos eletrônicos em formato PDF e TXT (texto):

Declaro que todos os documentos de especificação em formato texto têm conteúdo igual ao dos documentos de especificação anexados em formato PDF. Caso haja alguma divergência entre os arquivos PDF e TXT (texto), será considerado o conteúdo do arquivo PDF para fins de exame.



DIRPA e-PATENTES	Tipo de Documento: Formulário Eletrônico	DIRPA	Página: 3 / 3
Título do Documento: Depósito de Pedido de Patente		Código: FQ001	Versão: 6
		Procedimento: Não Aplicável	

12. Dados gerais do conteúdo técnico do depósito (caso aplicável):

Sugestão de desenho a ser publicado com o resumo: F1 (sujeito a avaliação do INPI)
Número de desenhos: 8
Cor dos desenhos: Preto e branco Colorido / Escala de cinza

13. Documentos Anexados: (assinale e indique também o número de folhas)

<input checked="" type="checkbox"/>	Relatório descritivo em formato eletrônico PDF	9 p.
<input checked="" type="checkbox"/>	Reivindicações em formato eletrônico PDF	2 p.
<input checked="" type="checkbox"/>	Resumo em formato eletrônico PDF	1 p.
<input checked="" type="checkbox"/>	Desenhos em formato eletrônico PDF	3 p.
<input checked="" type="checkbox"/>	Relatório descritivo em formato eletrônico texto	--- p.
<input checked="" type="checkbox"/>	Reivindicações em formato eletrônico texto	--- p.
<input checked="" type="checkbox"/>	Resumo em formato eletrônico texto	--- p.
<input checked="" type="checkbox"/>	Guia de Recolhimento da União (GRU) paga com comprovante de pagamento em formato eletrônico PDF [Código de serviço: 200, Número: 00.000.2.2.15.0159006.0, Nome do sacado: INSTITUTO DE TECNOLOGIA E PESQUISA]	1 p.
<input checked="" type="checkbox"/>	Contrato social em formato eletrônico PDF	7 p.
<input checked="" type="checkbox"/>	Documentos de qualquer outra natureza em formato eletrônico PDF [Ata de nomeação da Diretoria do instituto de Tecnologia e Pesquisa]	2 p.

14. Declarações gerais do sistema para depósito eletrônico de pedidos de patente do INPI:

- Declaro que assumo total responsabilidade sobre a integridade, a legibilidade e a fidedignidade dos documentos enviados por meio eletrônico, bem como sua adequação aos requisitos técnicos exigíveis para seu correto processamento pelo sistema e-Patentes/Depósito.
- Declaro ciência de que o envio dos documentos ao INPI só é considerado concretizado após esses serem protocolados e um recibo com assinatura digital do INPI for entregue eletronicamente aos usuários dos serviços. Em qualquer situação de dúvida, o usuário deverá apresentar esse recibo.
- Declaro ciência de que o INPI não é responsável por qualquer perda resultante de falhas externas ao órgão ou quaisquer eventualidades não relacionadas a problemas de infraestrutura do INPI que impeçam o depósito ou o peticionamento eletrônico.
- Declaro ciência de que os documentos enviados por formulários eletrônicos serão considerados recebidos pelo INPI nas exatas data e hora indicadas pelo provedor do INPI, constantes no recibo eletrônico expedido ao usuário.
- Declaro ciência de que o depósito ou o peticionamento eletrônico não eliminam a necessidade da realização do exame formal e/ou de mérito nos depósitos de pedidos de patente ou nas petições, não sendo suficiente para garantir o cumprimento de todas as formalidades e exigências técnicas.
- Declaro que me comprometo a não realizar qualquer modificação capaz de alterar os arquivos automaticamente criados pelo sistema e-Patentes/Depósito, tendo ciência de que qualquer alteração poderá invalidar o depósito ou o peticionamento eletrônico.
- Declaro ciência de que eventuais exigências formais e/ou técnicas serão posteriormente publicadas na Revista Eletrônica da Propriedade Industrial (RPI) disponibilizada no portal do INPI.
- Declaro, sob penas da Lei, que todas as informações prestadas neste formulário eletrônico são completas e verdadeiras.

17 de setembro de 2015

Data

LEONARDO MAESTRI TEIXEIRA:05242469633 (Certificado por: AC SOLUTI Multipla)

Assinatura (Requerente ou Procurador)

PROCESSO DE TRATAMENTO DE BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA DE RESÍDUO DE ABACAXI (coroa) COM LÍQUIDO IÔNICO PRÓTICO.

CAMPO DA INVENÇÃO

001. A presente Patente de Invenção (PI) refere-se a um processo para deslignificação de biomassa de baixo teor de lignina utilizando líquido iônico e com isso eliminando a geração de resíduos indesejáveis pelas indústrias que utilizam a biomassa como matéria prima para obtenção de produtos. Encontrando assim uma alternativa viável do ponto de vista ambiental e econômico quando comparado aos tratamentos convencionais.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

002. As técnicas atuais utilizadas para o processamento de materiais lignocelulósicos (por exemplo, para a indústria de papel e celulose) são baseados em correntes de produto que contêm polissacarídeos isolados onde a celulose é transformada em materiais (por exemplo, papel ou fibras) ou ainda convertida em produtos de base biológica ou bioetanol celulósico (Zhang, 2008; Chakar e Ragauskas de 2004, Ragauska *et al.*, 2006). Outras frações, como a lignina, são geralmente queimadas para gerar energia (Pandey e Kim, 2011).

004. Dessa forma as enormes quantidades de biomassa lignocelulósica podem, potencialmente, ser convertidos em diferentes produtos de alto valor, incluindo os biocombustíveis, servindo de fonte de energia barata para a fermentação microbiana e produção de enzimas (Asgher *et al.*, 2013; Iqbal *et al.*, 2013; Irshad *et al.*, 2013; Isroi *et al.*, 2011).

005. Atualmente os tratamentos utilizados pela indústria podem ser divididos em quatro tipos: físico (Pereira Jr *et al.* 2008); físico-química (explosão a vapor, catalisado ou não); química (hidrólise ácida ou alcalina em condições suaves, ozonólise ou deslignificação oxidante) e biológico (microbiana ou enzimática), de acordo com o agente que atua na alteração estrutural (Anwar *et al.*, 2014).

006. A fim de manter a viabilidade de uma biorrefinaria, o processo total da elaboração do material a produção do biocombustível, incluindo o pré-tratamento, necessitam ser otimizados para minimizar a geração de resíduos e subutilização de recursos. (Sol e Cheng, 2002; Himel *et al.*, 2007, Alvira, 2010; Balat, 2011)

007. Efetivamente a partição da biomassa lignocelulósica em suas várias frações é, essencial, sendo de suma importância que nesta etapa seja utilizado um método que signifique uma economia para a indústria. Em particular, uma técnica de baixo custo, eficiente para a remoção e recuperação de lignina. (Hendriks e Zeeman, 2009; Taherzadeh e Karimi, 2008; Kumar *et al.*, 2009; Mazza e Tamaki, 2010; Lee *et al.*, 2009; Tan *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2009). Esta etapa é necessária pois facilita o acesso para aos polissacarídeos e a produção de fluxos de valiosos produtos (Yuan, 2013).

008. O fracionamento da lignina da biomassa foi demonstrada com os Líquidos Iônicos convencionais (IL) (Sun *et al.*, 2009, Pinkert *et al.*, 2011, Brandt *et al.*, 2013), mas este requer o processamento em alta temperatura (≥ 160 ° C), extrai somente uma fração modesta da lignina na biomassa (<50%) e, o mais problemático, resulta na acumulação de resíduos solúveis (extratores, açúcares, derivados de lignina solúveis, etc.) em ILS durante a sua recuperação e reutilização. Além disso, o elevado custo do ILS exige a recuperar do ILS em sua totalidade, o que é difícil de realizar devido a pequenas perdas de IL durante quantidades menores de processamento e da degradação térmica dos íons, que ocorre durante o manuseamento de LIs a temperaturas elevadas por períodos de tempo longos (Enzinne *et al.*, 2014).

009. Os Líquidos Iônicos Próticos (FIPs) - sais formados numa reação a partir do ácido de baixo custo (ácido acético) e de base (amina), que derretem tipicamente abaixo da temperatura ambiente (MacFarlane *et al.*, 2006) podem ser utilizados a temperaturas mais baixas que os processos com Líquidos iônicos apróticos (até 120°C) como uma alternativa à métodos de remoção de lignina convencionais para o processamento da biomassa (Enzinne *et al.*, 2014).

010. O mecanismo de ação de PLI é baseado na solubilidade da lignina no composto. Esta solubilidade está diretamente relacionada ao íon utilizado responsável pela influência na extração da lignina nesses compostos. Na última década, inúmeros estudos, com foco na dissolução de polímeros biogênicos em LIs, demonstrou um grande potencial desses compostos como solventes (Swatloski *et al.*, 2002). Vários estudos foram realizados demonstrando o poder de dissolução de determinados LIs para lignocelulose (Fort *et al.*, 2007; Singh *et al.*, 2009). De fato, a capacidade de LIS para dissolver a lignina e hidratos

de carbono é considerado como uma interrupção efetiva da rede complexa de interações não covalentes entre estes polímeros (Swatloski *et al.*, 2002). Muito tem sido investigado o mecanismo de ação de líquidos iônicos em lignina. Relatórios anteriores sugeriram que LIPs podem atuar como catalisadores para despolimerizar lignina a partir da biomassa por meio da clivagem das ligações β -O-4 a uma temperatura elevada (130-200 ° C) (Cox *et al.*, 2011; Jia *et al.*, 2010; E Cox Ekerdt, 2012; Cox e Ekerdt, 2013; Long *et al.*, 2011; Long *et al.*, 2012; Long *et al.*, 2013).

011. Já sabendo o potencial dos líquidos iônicos para atuar sobre a lignina, a sua baixa toxicidade em comparação com os solventes orgânicos utilizados em pré-tratamentos de material lignocelulósico e o baixo custo da síntese do líquido iônico prático, faz-se necessária a investigação para a aplicação destes compostos em diferentes materiais.

TÉCNICA RELACIONADA

0012. A literatura técnica especializada revela documentos de patentes que utilizam diversos tipos de técnicas para retirada da lignina da biomassa utilizando diferentes processos químicos, físicos ou físico-químicos.

0013. No contexto patentário, alguns documentos descrevem métodos deslignificação de material lignocelulósico. O documento de patente brasileiro PI 9305760-1 refere-se a um processo para deslignificar material lignocelulósico, tal como polpa de madeira, que compreende tratar o material lignocelulósico sequencial ou simultaneamente com dióxido de cloro gasoso e ozônio que produz material celulósico designificado e efluentes de descarga tendo haletos orgânicos absorvidos reduzidos (AOX).

0014. Logo, a proposta desta patente, Processo de Tratamento de Biomassa Lignocelulósica de Resíduo de Abacaxi com Líquido Iônico Prático para Utilização pela Indústria. Possui o parâmetro de novidade, pois até o presente momento nenhum trabalho científico ou técnico relata a utilização dos líquidos iônicos como agentes deslignificantes.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

015. A presente Patente de Invenção (PI) se trata de um processo de remoção da lignina por líquido iônico, visando a melhoria na especificidade do processo, e minimizando a geração de resíduos tóxicos muito abundantes nos processos de tratamentos

convencionais utilizados atualmente pelas indústrias de biomassa.

Nos últimos anos, tem se considerando uma série de problemas econômicos e ambientais em todo o mundo. Por essa razão tem aumentado o interesse em pesquisas sobre o valor da biomassa lignocelulósica, que consiste em uma biomassa agro-industrial barata, renovável e abundante composta de resíduos lignocelulósicos fornecendo um recurso natural único na geração em grande escala de bio-energia de baixo custo. Para ampliar a gama de recursos biológicos naturais as ferramentas de utilizadas nas indústrias de biotecnologia tem como objetivo reduzir os custos de conversão melhorando o rendimento alvo do produto de interesse. Neste caminho a biotecnologia verde apresenta uma abordagem promissora para converter a maioria dos resíduos sólidos agrícolas, particularmente materiais lignocelulósicos, em produtos de valor agregado como biocombustíveis, suportes para imobilização, celulose microcristalina e xiloligosacarídeos (Anwar *et al.*, 2012).

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

Figura 1 – aspecto micromorfológico da fibra do resíduo de abacaxi.

Figura 2 – aspect micromorfológico da fibra do resíduo de abacaxi após tratamento com os líquidos iônicos HEAA (2.A), HEAPr (2.B), HEAB (2.C) e HEAP (2.D).

Figura 3 – aspect micromorfológico da fibra do resíduo de abacaxi após tratamento com líquido iônico 2-HEAA (3.E), 2-HEAPr (3.F), 2- HEAB (3.G) e 2-HEAP (3.H).

Figura 4 – aspect micromorfológico da fibra do resíduo do abacaxi após tratamento com líquido iônico 2-m-HEAA (4.I), 2-m-HEAPr (4.J), 2- m-HEAB (4.K) e 2-m-HEAP (4.L).

Figura 5 – Difratoograma de raio X (DRX) das biomassas sem tratamento, tratado com os líquidos iônicos próticos e da celulose microcristalina.

Figura 6 – índice de cristalinidade da cellulose microcristalina, do material sem e pós tratamento com líquido iônico prótico.

Figura 7 – percentual de celulose, hemicelulose and lignin total retiradas da biomassa após tratamento com líquido iônico prótico.

Figura 8 – percentual de compostos interemdiários toxics produzidos no tratamento da biomassa com líquido iônico prótico.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

016. Tendo em vista a importância da suficiência descritiva de um relatório de patente, e para que o processo da invenção proposta possa ser mais bem compreendido e avaliado, sua descrição detalhada será feita a seguir.

017. A presente invenção de patente consiste na proposição de um processo de deslignificação de biomassa lignocelulósica do resíduo de abacaxi por líquido iônico, para ser usada na indústria para obtenção de produtos de baixo valor agregado. Esta invenção caracteriza a proposta de um processo de tratamento alternativo aos convencionais, visando a obtenção de uma biomassa sem lignina e com a celulose conservada, gerando ao longo do processo pouco resíduo tóxico e com reutilização do LI e da lignina.

018. Neste processo, foram utilizados doze LIPs, denominados: hidroxietilamônia acetato (HEAA), hidroxietilamônia propionato (HEAPr), hidroxietilamônia butirato (HEAB), hidroxietilamônio pentanoato (HEAP), 2-hidroxietilamônia acetato (2-HEAA), 2-hidroxietilamônia propionato (2-HEAPr), 2-hidroxietilamônia butirato (2-HEAB), 2-hidroxietilamônio pentanoato (2-HEAP), N-metil-2-hidroxietilamônio acetato (m-2-HEAA), N-metil-2-hidroxietilamônia propionato (m-2-HEAPr), N-metil-2-hidroxietilamônio butirato (m-2-HEAB), e N-metil-2-hidroxietilamônia pentanoato (m-2-HEAP). Os LIPs foram sintetizados, através de uma reação equimolar de amina e os respectivos ácidos orgânicos. A pureza dos solventes foi monitorizada ao longo de todo experimento.

019. Com o intuito de comprovar a eficácia do processo de tratamento da biomassa de resíduo de abacaxi testes foram realizados para visualizar a retirada da lignina, bem como a conservação da celulose na biomassa tratada. Nesta primeira etapa o resíduo de abacaxi foi preparado para ser utilizado ao longo de todo processo. Inicialmente foi moído e analisado em um peneirador para controle de granulometria que, em geral, para a utilização deste tipo de material, devem possuir um diâmetro médio de 0,05 a 2,50 mm. Em seguida, o resíduo foi lavado com água destilada para retirada de impurezas, em proporção de 1:1 a 1:100 (gramas de resíduos por mililitros de água destilada) sendo preferencialmente na proporção de 1:25, sendo mantido sobre rigorosa agitação por um intervalo de 30 a 240 minutos. Esta etapa foi realizada várias vezes, preferencialmente,

por três vezes, para que se obtenha um resíduo com o mínimo de impurezas. Cabe ressaltar, que este procedimento de limpeza pode ser realizado com a presença ou ausência de água, com ou sem a agitação. Após a limpeza, o resíduo foi seco em estufa em uma temperatura de 30 a 70°C, preferencialmente a 40°C, por cerca de 06 a 48 horas, podendo, no entanto, esta atividade ser executada em temperatura ambiente a depender das condições climáticas local.

020. Na segunda etapa a biomassa foi colocada em contato com o líquido iônico para solubilização da lignina. Para isto utilizou-se 300 mg (3%) de biomassa misturada a 9,7 mL de LI. A solução foi então aquecida a 100°C em banho-maria durante 1h. Depois do processo de tratamento completado, as amostras foram misturadas a 35ml de água quente para precipitar a biomassa dissolvida. A mistura de LI, água e biomassa foi centrifugada para separar o sólido (biomassa recuperada) e líquido (água e IL). A biomassa recuperada foi lavada quatro vezes com água quente para remover o excesso de IL.

021. Para visualizar se o tratamento proposto tinha sido eficaz foram avaliadas as características química, morfológicas e estruturais da biomassa antes e após o tratamento. Bem como foi avaliado o teor de celulose, hemicelulose e lignina total das amostras antes e após o tratamento com os LIP.

022. A composição química da biomassa não tratada e tratada foi determinada de acordo com os métodos analíticos da *National Renewable Energy Laboratory* (NERL). Antes, aproximadamente, 5g de amostra foi extraída sucessivamente com água e com etanol (procedimento de extração em duas fases). Após o primeiro passo, as amostras secas, foram hidrolisados com 72% (w / w) de ácido sulfúrico a 30 °C durante 1 h (300mg de amostra e 3ml de ácido sulfúrico). Em seguida, a mistura de reação foi diluída a 4% (v/v) e submetido a autoclave a 121 ° C durante 1h. Este líquido de hidrólise foi então analisadas quanto ao teor de açúcar por cromatografia líquida de ultra-rápida (UFLC) em um cromatógrafo líquida acoplado a um detector de índice de refração (RID-10A). As concentrações de açúcares monoméricos na fração solúvel foram determinadas em coluna Supelcogel - Pb, 30cm x 7,8milímetros de coluna; a 85 ° C e uma velocidade de eluição de 0,6 ml/min com água ultrapura como de fase móvel.

023. Os grupos acetilo foi determinada por HPLC com o mesmo sistema mencionado

acima com uma coluna HPX-87H Bio-Rad, à temperatura 45°C. A fase móvel era de H₂SO₄ 5 mM, a um fluxo de 0,5 mL/min. Os sólidos foram secos a peso constante a 105°C e considerado lignina insolúvel (AIL). A concentração de lignina solúveis (ASL) no filtrado foi determinada com base em espectrofotometria UV a 280nm.

024. Pode-se observar na tabela 1 que na composição do material lignocelulósico na biomassa não tratada, havia uma quantidade de hemicelulose e celulose de 34,6% e 25,4%, respectivamente, enquanto que a quantificação da lignina total foi de 5,14%, significativamente inferior do que os outros componentes da porção lignocelulósico. Observou-se também um aumento dos açúcares monoméricos principalmente a xilose. Enquanto que o teor de cinzas, extrativos e grupos acetil diminuíram após o tratamento. Esses resultados demonstram que os LIPs são eficazes na retirada da lignina, sem afetar de forma considerável os outros componentes da biomassa, interessantes para a utilização industrial.

Tabela 2 – Características químicas do resíduo tratado com os líquido iônico próticos..

constituent	LIs												
	In natura	HEAA	HEAPr	HEAB	HEAP	2-HEAA	2-HEAPr	2-HEAB	2-HEAP	m-2-HEAA	m-2-HEAPr	m-2-HEAB	m-2-HEAP
Celulose	34.6 ± 0,9	37.8 ± 0.3	39.3 ± 0.2	37,9 ± 0,9	36,6 ± 0,9	35,6 ± 0,9	38,6 ± 0,9	35,6 ± 0,9	35,9 ± 0,9	35,8 ± 0,9	34,9 ± 0,9	35,7 ± 0,9	35,9 ± 0,9
Hemicelulose	25.4 ± 1,3	29.0 ± 1.3	27.0 ± 0.3	27,3 ± 1,3	32,1 ± 1,3	29,9 ± 1,3	33,3 ± 1,3	30,7 ± 1,3	30,0 ± 1,3	26,1 ± 1,3	29,5 ± 1,3	26,6 ± 1,3	34,9 ± 1,3
Xilose	10.6 ± 0.30	10.6 ± 0.30	11.6 ± 0.30	12,8 ± 0.2	13,6 ± 0.30	13,8 ± 0.30	12,6 ± 0.30	11,3 ± 0.30	11,8 ± 0.30	10,6 ± 0.30	10,6 ± 0.30	10,6 ± 0.30	12,6 ± 0.30
Galactose	8.9 ± 1.1	9.9 ± 0.3	9.9 ± 1.1	9,1 ± 0.1	11,9 ± 1.1	8,9 ± 1.1	13,9 ± 1.1	10,9 ± 1.3	10,6 ± 1.1	8,9 ± 1.1	8,9 ± 1.1	8,9 ± 1.1	11,4 ± 1.1
Arabinose	3.6 ± 0,1	6.6 ± 0.1	4.6 ± 0.1	4,6 ± 0,2	4,6 ± 0,1	4,1 ± 0,1	4,8 ± 0,1	3,6 ± 0,1	4,7 ± 0,1	3,9 ± 0,1	5,6 ± 0,1	3,9 ± 0,1	5,6 ± 0,1
Mannose	1.9 ± 0.6	3.9 ± 0.2	0.9 ± 0.6	0,8 ± 0,05	2,6 ± 0.6	3,1 ± 0.6	1,9 ± 0.6	1,9 ± 0.6	2,9 ± 0.6	2,7 ± 0.6	4,4 ± 0.6	3,2 ± 0.6	4,9 ± 0.6
Lignina total	5.14 ± 0.03	2.14 ± 0.03	1.04 ± 0.03	1,14 ± 0,03	1,25 ± 0,03	1,32 ± 0,03	0,91 ± 0,03	1,24 ± 0,03	1,14 ± 0,03	1,12 ± 0,03	2,04 ± 0,03	1,34 ± 0,03	2,22 ± 0,03
Extrato	21.9 ± 0.6	12.9 ± 0.6	19.9 ± 0.6	15,9 ± 0,6	17,9 ± 0,6	19,9 ± 0,6	18,9 ± 0,6	17,9 ± 0,6	19,9 ± 0,6	21,9 ± 0,6	21,9 ± 0,6	21,9 ± 0,6	17,9 ± 0,6
Cinzas	3.9 ± 0.02	1.9 ± 0.02	1.3 ± 0.02	3,3 ± 0,02	1,9 ± 0,02	2,9 ± 0,02	1,1 ± 0,02	3,9 ± 0,02	2,7 ± 0,02	3,9 ± 0,02	3,9 ± 0,02	3,9 ± 0,02	2,09 ± 0,02
Grupos acetis	2.09±0.05	1.09±0.05	1.9±0.05	0,09±0,01	1,09±0,05	1,22±0,05	1,09±0,05	0,09±0,05	1,29±0,05	2,09±0,05	1,09±0,05	0,09±0,05	1,07±0,05
Total	92.84	92.83	92.04	90,44	90,04	90,84	94	92,4	91	90,1	93,3	90	94,08

025. Para caracterização morfológica antes e após o tratamento com os LIPs, foram realizadas fotomicrografias em microscópio eletrônico de varredura modelo (MEV) JEOL JSM5310 utilizando elétrons secundários, sendo uma amostra coberta por uma fina camada de ouro. Após a observação dessas fotomicrografias pode-se constatar que na amostra não tratada as fibras estavam em forma de bastão, porém não se observou a presença de nenhum pit (poros). Essas estruturas, típicas da celulose, só foram observadas na biomassa tratada com os LIPs, o que denota que foi retirada a lignina e exposta a celulose. Uma observação importante de ser feita, todos os líquidos iônicos testados foram eficientes na retirada da lignina e exposição da celulose.

026. O objetivo da caracterização estrutural foi observar as regiões amorfas e cristalinas do material antes e após tratamento. Para isso foram realizadas análises em Difractômetro de Raios X (DRX), A análise de difracção de raios-X foram efetuadas num difractômetro marca Shimadzu modelo XDR-6000, com fonte de radiação CuK, a tensão de 40 kV, corrente de 40 mA, digitalizar 0,05 (2 θ /5s) com fonte de radiação CuK variando- 2 θ e entre 10 e 90 °. A partir do grau de cristalinidade obtido a partir da análise de DRX foram calculados os índices de cristalinidade de acordo com o modelo empírico de Segal *et al.* (1959). Após esta etapa observou um aumento da região cristalina da biomassa após tratamento com LIPs, bem como um aumento nos Índices de Cristalinidade da biomassa tratada. Este fenômeno se deve a ação dos Líquidos Iônicos Próticos na dissolução da lignina tratada expondo a celulose como pode-se observar nas fotomicrografias.

027. Para complementar as informações já obtidas foi quantificada a celulose, hemicelulose e lignina total da biomassa tratada. Para a quantificação da celulose e da hemicelulose presente na biomassa residual depois de tratamento aliquotas do hidrolisado de ácido foram injectadas num cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE), equipado com detector de índice de refração, coluna Supelcogel - Pb 30 cm x 7,8 milímetros, partícula 9 μ M equipados com pré-coluna. A fase móvel usada foi água deionizada com uma taxa de fluxo de 0,5 ml/min a 85°C. As concentrações de açúcares derivados de hidrólise da celulose e hemicelulose foram determinados a partir de curvas de calibração obtidas com soluções padrão dos compostos puros em diferentes concentrações (Sluiter *et al.*, 2012).

028. Em uma terceira etapa o teor total de lignina da biomassa não tratado e tratada foi medida pelo método de brometo de acetila de acordo Arora *et al.*, 2010. O teor de lignina de ambas as biomassa foi determinada com um método modificado de brometo de acetila. Onde 5 mg do resíduo foi tratado com 25% (v/v) de brometo de acetila em ácido acético glacial (0,2 mL). Os tubos foram selados e incubados a 50°C durante 2h a 500rpm num termomisturador. Após a digestão, as soluções foram diluídas com três volumes de ácido acético, e, em seguida, 0,1ml foi transferido para tubos de centrífuga de 15 mL e 0,5mL de ácido acético foi adicionado a ele. As soluções foram bem misturadas e hidróxido de sódio 0,3M (0,3 mL) foram adicionados a solução. O volume final foi feito para 2 ml com a adição de ácido acético. Os espectros no UV das soluções foram medidos contra um branco preparado usando o mesmo método. O teor de lignina foi determinado com a absorbância a 280 nm. Nesta etapa observou-se que o teor de celulose e hemicelulose aumentaram após tratamento nas biomassas tratadas com os doze líquidos iônicos, corroborando com o resultado da caracterização. Já o teor de lignina cai consideravelmente, chegando quase a zero em algumas biomassas. Esta metodologia confirmou a eficácia do tratamento proposto.

029. Um dos principais problemas nas indústrias que utilizam tratamentos convencionais é a geração de resíduos tóxicos. Por isso, na quarta etapa foi realizada nesta invenção a quantificação do furfural e hidroximetil furfural, os dois principais frutos da degradação dos açúcares. O conteúdo de furfural e hidroximetilfurfural foi analisado por HPLC, equipada com um SPD-M20A detector de díodos; A separação foi realizada com um LiChrospher 100 RP-18 (5 um) 125x4 mm de coluna (Hewlett-Packard), operando a 25 ° C com acetonitrilo / água como eluente com um caudal de 0,5 mL.min⁻¹.

030. O que se observou foi a geração de 5 a 8% de metilfurfural após tratamento com seis líquidos iônicos próticos e 2% de hidroximetilfurfural em tratamentos com dois líquidos iônicos. Esta análise demonstra a baixa toxicidade do processo, sendo ambientalmente amigável e ecologicamente correto.

REINVINDICAÇÕES

1.PROCESSO DE TRATAMENTO DE BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA DE RESÍDUO DE ABACAXI (coroa) COM LÍQUIDO IÔNICO PRÓTICO, caracterizado pelo fato de compreender as seguintes etapas de caracterização do resíduo em (a), hidrolisar o resíduo em (b) e tratamento de resíduo em (c):

- (a) Caracterizar, o resíduo de abacaxi quanto ao teor de celulose, hemicelulose e lignina, em proporção soluto:solvente de 1:1 a 1:100 (gramas de resíduos por mililitros de água destilada), lavar com solvente até exaustão sob temperatura ambiente.
- (b) Hidrolisar, a biomassa com ácido sulfúrico 72%, sob condições de temperatura na faixa de 100°C a 125°C, pressão na faixa de 0,5 a 1,5 atm.
- (c) Tratar, 300 mg (3%) do resíduo lignocelulósico com 9,7 mL Líquido Iônico, sob condições de temperatura na faixa de 80°C a 120°C, sob agitação por 1h, misturar 35ml de água quente para precipitar a biomassa dissolvida, separar o sólido (biomassa recuperada) e líquido (água e IL), lavar quatro vezes com água quente para remover o excesso de IL.

3. PROCESSO DE TRATAMENTO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo resíduo ser a coroa do abacaxi.

4. . PROCESSO DE TRATAMENTO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pela proporção soluto: solvente ser na faixa de 1:1 a 1:100, preferencialmente na proporção de 1:25.

5. PROCESSO DE TRATAMENTO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo solvente utilizado em (a) ser metanol e água.

6. PROCESSO DE TRATAMENTO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado em (b) pela variação da temperatura para o tratamento está entre 100°C a 125°C, preferencialmente 121°C e a pressão está entre 0,5 a 1,5 atm, preferencialmente 1 atm.

7. PROCESSO DE TRATAMENTO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que os líquidos iônicos mencionados em c são próticos e sintetizados por uma reação equimolar e todos possuem um grupamento amina em sua estrutura sendo

denominados: hidroxietilamônia acetato (HEAA), hidroxietilamônia propionato (HEAPr), hidroxietilamônia butirato (HEAB), hidroxietilamônio pentanoato (HEAP), 2-15 hidroxietilamônia acetato (2-HEAA), 2-hidroxietilamônia propionato (2-HEAPr), 2-hidroxietilamônia butirato (2-HEAB), 2-hidroxietilamônio pentanoato (2-HEAP), N-metil-2-hidroxietilamônio acetato (m-2-HEAA), N-metil-2-hidroxietilamônia propionato (m-2-HEAPr), N-metil-2-hidroxietilamônio butirato (m-2-HEAB), e N-metil-2-hidroxietilamônia pentanoato (m-2-HEAP).

8. **PROCESSO DE TRATAMENTO**, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o líquido iônico é adicionado a biomassa diluída em água a uma temperatura de 80°C a 120°C, preferencialmente a 100°C.

9. **PROCESSO DE TRATAMENTO**, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o tempo de contato do líquido iônico com a biomassa para solubilização da lignina é de 1h.

10. **PROCESSO DE TRATAMENTO**, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que ocorre uma remoção da lignina sem danificar a celulose.

11. **PROCESSO DE TRATAMENTO**, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de ocorrer baixa produção de compostos intermediários tóxicos ao longo do processo.

RESUMO**PROCESSO DE TRATAMENTO DE BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA DE RESÍDUO DE ABACAXI (coroa) COM LÍQUIDO IÔNICO PRÓTICO.**

A presente patente de invenção diz respeito a um processo de tratamento para retirada de lignina de resíduo lignocelulósico de abacaxi (coroa) com líquido iônico. O invento possui o caráter inovador pela proposta de utilização do líquido iônico à temperatura de ebulição da água, sob pressão atmosférica em um curto período de tempo. para tratar um resíduo, obtendo um alto valor de remoção de lignina, preservando a celulose. Além disso, o invento, possui vantagens econômicas frente aos tratamentos convencionais pois quase não gera resíduo pois todos os componentes utilizados podem ser reaproveitados, além de produzirem poucos compostos intermediários tóxicos. Esses fatores, portanto, tornam o processo de tratamento por líquido iônico uma alternativa, atraente e promissor dentro do contexto industrial, especialmente, para o setor biotecnológico que visa cada vez mais pela utilização de tecnologias limpas.

4.4. Patente 02



14/03/2017

870170016764
15:25

00.000.2.2.16.0475108.2

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2017 005101 3

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 3

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 13031547000104

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Associação com intuito não econômico

Endereço: Cidade Universitária, "Prof. José Aloísio de Campos", Jardim Rosa Elze, São Cristóvão, Aracaju, Sergipe.

Cidade: São Cristóvão

Estado: SE

CEP: 49100000

País: Brasil

Telefone: (79)2105 6865

Fax:

Email: cinttec.ufs@gmail.com

Depositante 2 de 3

Nome ou Razão Social: INSTITUTO DE TECNOLOGIA E PESQUISA

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 02886710000196

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Associação com intuito não econômico

Endereço: Av. Murilo Dantas, 300, Farolândia

Cidade: Aracaju

Estado: SE

CEP: 49032-490

País: BRASIL

Telefone: (79) 321 82191

Fax:

Email:

Depositante 3 de 3

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE TIRADENTES

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 13013263000187

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Pessoa Jurídica

Endereço: Av. Murilo Dantas, 300, Farolândia

Cidade: Aracaju

Estado: SE

CEP: 49032-490

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email:

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES EM SUPORTE DERIVADO DE TRATAMENTO QUÍMICO

Resumo: A presente invenção diz respeito a obtenção de um suporte alternativo derivado de tratamento químico com NaOH de haste de girassol para imobilização enzimática de lipases. O invento mostra o caráter inovador pela proposta de tratamento e utilização de um subproduto agrícola ou agroindustrial, sem valor agregado, obtido da cadeia produtiva de grãos (setor agrícola) ou do seu processamento (setor agroindustrial), para melhoria da atividade e estabilidade da enzima lipase bem como, o seu reuso como biocatalisador imobilizado. Essas características, portanto, tornam a haste de girassol tratada uma alternativa promissora para o setor industrial, especialmente, para o setor biotecnológico, visto que acarretará redução nos custos dos processos tanto pela possibilidade de recuperação, com maior e melhor reutilização da enzima, como pelo baixo custo do suporte utilizado.

Dados do Inventor (72)

Inventor 1 de 9

Nome: DANIEL PEREIRA DA SILVA

CPF: 17110156877

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Av. Paulo Silva, 2.222, Apto. 203, Bloco 03, Farolândia

Cidade: Aracaju

Estado: SE

CEP: 49032-500

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email:

Inventor 2 de 9

Nome: DENISE SANTOS RUZENE

CPF: 25209921824

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Av. Paulo Silva, 2.222, Apto. 203, Bloco 03, Farolândia

Cidade: Aracaju

Estado: SE

CEP: 49032-500

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email:

Inventor 3 de 9

Nome: CLEIDE MARA FARIA SOARES

CPF: 07122823865

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Av. Euraliano Ramos, 100, Apto. 601, Bl. 1, Jabotiana

Cidade: Aracaju

Estado: SE

CEP: 49095-000

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email:

Inventor 4 de 9

Nome: ÁLVARO SILVA LIMA

CPF: 60955813549

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Av. Murilo Dantas, 300, Farolândia

Cidade: Aracaju

Estado: SE

CEP: 49032-490

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email:

Inventor 5 de 9

JACI LIMA VILANOVA NETA

00637326539

Brasileira

Estudante de Pós Graduação

Av. Tancredo Neves, 3515, Ed. Cerejeiras, Bl. C, Apto. 103, Ponto
Novo

Cidade: Aracaju

Estado: SE

CEP: 49097-510

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email:

Inventor 6 de 9

Nome: RITA DE CASSIA MENDONÇA DE MIRANDA

CPF: 80197094449

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Rua Quirino, 1300, Bl. 04, Apto. 04, Inácio Barbosa

Cidade: Aracaju

Estado: SE

CEP: 49040-700

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email:

Inventor 7 de 9

OSIRIS ASHTON VITAL BRAZIL

85886890734

Brasileira

Estudante de Pós Graduação

Rodovia Ecologista Chico Mendes, 555, Mosqueiro

Cidade: Aracaju

Estado: SE

CEP: 49007-000

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email:

Inventor 8 de 9

Nome: SANDE ANDRADE DE SOUZA COSTA

CPF: 05069962558

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Estudante de Graduação

Endereço: Av. Murilo Dantas, 1409, Cond. Aquarela, Ed. Joel Dantas, Apto.
002, Farolândia

Cidade: Aracaju

Estado: SE

CEP: 49032-490

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email:

Inventor 9 de 9

ISABELA MARIA MONTEIRO VIEIRA

05856192559

Brasileira

Estudante de Graduação

Av. Simeão Sobral, 516, Industrial

Cidade: Aracaju

Estado: SE

CEP: 49065-770

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email:

Documentos anexados

Tipo Anexo	Nome
Comprovante de pagamento de GRU 200	01. GRU - COMPROVANTE PAGAMENTO.pdf
Relatório Descritivo	02. RELATÓRIO DESCRITIVO.pdf
Reivindicação	03. REIVINDICAÇÕES.pdf
Resumo	04. RESUMO.pdf
Procuração	05. Procuração ITP.pdf
Estatuto ITP	06. Estatuto e Alvara ITP.pdf
Ata nomeação ITP	07. ATA DE PRESIDENCIA ITP - DIEGO.PDF
RG ITP	08. RG - Diego ITP.PDF
Procuração	09. Procuração UNIT.PDF
Contrato Social	10. Contrato Social SET - UNIT.pdf
Ata posse UNIT	11. Ata de Posse do Reitor UNIT - 2014-2018.pdf
RG UNIT	12. RG E CPF UCHOA UNIT.pdf

Acesso ao Patrimônio Genético

- Declaração Negativa de Acesso - Declaro que o objeto do presente pedido de patente de invenção não foi obtido em decorrência de acesso à amostra de componente do Patrimônio Genético Brasileiro, o acesso foi realizado antes de 30 de junho de 2000, ou não se aplica.

Declaração de veracidade

- Declaro, sob as penas da lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 14/03/2017 às 15:25, Petição 870170016764

“SUPORTES ALTERNATIVOS PARA IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES”

001.A presente invenção refere-se à imobilização de enzimas lipolíticas utilizando como suporte haste de girassol *in natura* e derivado de tratamento hidrotérmico (auto-hidrólise).

002.Mais especificamente, a invenção refere-se à imobilização de enzimas em haste de girassol, as quais catalisam reações específicas minimizando a geração de subprodutos indesejáveis, o que as torna uma alternativa viável do ponto de vista ambiental e econômico quando comparado aos catalisadores químicos convencionais.

Fundamentos da Invenção

003.Enzimas são um grupo de macromoléculas biológicas que atuam como biocatalisadores naturais, com excelentes perspectivas de utilização nos processos industriais visto a alta atividade, seletividade e especificidade sob condições suaves e ambientalmente corretas. Logo, o seu uso na indústria tem se expandido rapidamente durante as últimas décadas, constituindo-se hoje em um dos grandes mercados a serem explorados (BARBOSA, O.; ORTIZ, C.; BERENGUER-MURCIA, TORRES, R.; RODRIGUES, R. C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Strategies for the one-step immobilization–purification of enzymes as industrial biocatalysts. *Biotechnology Advances*. v.33 435–456, 2015).

004.Entretanto, apesar das vantagens reconhecidas sobre os produtos químicos tradicionais, algumas limitações tais como instabilidade operacional e dificuldade de recuperação e reutilização podem dificultar a sua aplicação (MOHAMADA, N. R.; MARZUKIA, N. H. C.; BUANGA, N. A.; HUYOPB, F.; WAHAB, R. A. Review; agriculture and environmental biotechnology. v.29, p. 205-220, 2015). Desse modo, visando processos biotecnológicos mais favoráveis tanto para a indústria como para o meio-ambiente, diferentes propostas têm sido avaliadas e postas em prática. Entre elas, a imobilização de enzimas, a qual desponta como uma poderosa ferramenta na obtenção de biocatalisadores visto as vantagens por ela propiciadas, tais como: aumento da atividade e estabilidade das enzimas, possibilidade de recuperação da enzima imobilizada por

filtração ou centrifugação no fim da reação e à capacidade de reutilização das enzimas seja no mesmo processo ou em outro, o que resulta em redução de custos nos processos industriais (KHARRAT, N.; ALI, Y. B.; MARZOUK, S.; GARGOURI, Y.; KARRACHÂABOUNI, M. Immobilization of *Rhizopus oryzae* lipase on silica aerogels by adsorption: Comparison with the free enzyme. *Process Biochemistry*. v.46, p.1083–1089, 2011; MILETIC, N.; NASTASOVIC, A.; LOOS, K. Immobilization of biocatalysts for enzymatic polymerizations: Possibilities, advantages, applications. *Bioresource Technology*. v.115, p.126–135, 2012).

005. Assim, tem-se preferido enzimas imobilizadas à livre, devido à sua disponibilidade prolongada que limita posteriores e redundantes processos de purificação (ZHANG, L.; LIU, D. Review: The enzymatic hydrolysis of lignocelluloses. *Biofuels, Bioproducts & Biorefining*. v.6, p.465–482, 2012).

006. O termo imobilização de enzimas, refere-se a enzimas fisicamente confinadas ou localizadas em uma região definida do espaço com retenção de suas atividades catalíticas e que possa ser usada repetida e continuamente (JEGANNATHAN, K. R.; ABANG, S.; PONCELET, D.; CHAN, E. S.; RAVINDRA, P. Production of biodiesel using immobilized lipase - a critical review. *Critical Reviews in Biotechnology*. v.28, p.253–264, 2008).

011. Nesse sentido, a lipase de *Burkholderia cepacia* anteriormente conhecida como *Pseudomonas cepacia* lipase recebe destaque na aplicação industrial por realizar a catálise em ambos os meios aquosos e não aquosos (ABDULLA, R.; RAVINDRA, P. Characterization of cross linked *Burkholderia cepacia* lipase in alginate and k-carrageenan hybrid matrix. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*. v.44, p.545-555, 2013).

007. Cabe ressaltar, contudo, que a maior contribuição para o bom desempenho do biocatalisador imobilizado é fornecida, principalmente, pela estratégia de imobilização e pelas características do suporte (SCHERER, R.P.; DALLAGO, R.L.; PENNA, F.G.; BERTELLA, F.; OLIVEIRA, D.; OLIVEIRA, J.V.; PERGHER, S.B.C. Influence of process parameters on the immobilization of commercial porcine pancreatic lipase using three low-cost supports. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. v.1, p.290–294,

2012), pois, se por um lado o suporte aumenta o tempo de meia-vida da enzima imobilizada, de outro uma escolha inadequada pode afetar nocivamente o desempenho global do sistema (MENDES, A.A.; DE OLIVEIRA, P.C.; DE CASTRO, H.F.; GIORDANO, R.L.C. Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. *Química Nova*, v.34, p.831-840, 2011).

008.Na literatura é possível encontrar diversos materiais inertes com diferentes características, tamanho, forma e densidade, sendo utilizados como suporte para imobilização de enzimas (MILETIC, N.; NASTASOVIC, A.; LOOS, K. Immobilization of biocatalysts for enzymatic polymerizations: Possibilities, advantages, applications. *Bioresource Technology*. v.115, p.126-135, 2012). Porém, a maioria, utiliza suportes inorgânicos porosos de alto custo devido, em parte, a sua resistência ao ataque microbiano e grande área superficial disponível para ligação com a enzima.

009.Nesse contexto, em virtude da busca por suportes alternativos de baixo custo para imobilização de enzimas, torna-se importante a verificação dos materiais lignocelulósicos para tal propósito visto que, os mesmos possuem particularidades bem específicas em especial, quanto as suas características, composição lignocelulósica e disponibilidade como subproduto agroindustrial.

010.Nesse âmbito, o girassol (*Helianthus annuus L.*), uma das oleaginosas mais importantes do mundo (LU, G.; HU, X.; BIDNEY, D.L. *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, v. 61 *Transgenic Crops VI*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2007), apesar de apresentar um bom rendimento de biomassa residual seca (7 – 8 toneladas (subproduto) para cada hectare de girassol cultivado), o que o caracteriza como subproduto abundante e sem valor agregado, poucos relatos de sua utilização de forma alternativa são encontrados na literatura (RUIZ, E.; ROMERO, I.; MOYA, M.; CARA, C.; VIDAL, J. D.; CASTRO, E. Dilute sulfuric acid pretreatment of sunflower stalks for sugar production. *Bioresource Technology*. v.140, p.292–298, 2013).

011.Logo, a sua utilização como suporte para enzimas, torna-se extremamente promissora visto as suas características e disponibilidade podendo ser utilizado tanto na forma *in natura* quanto tratada, o que possibilita maior área superficial disponível para a imobilização.

012. Assim, na presente invenção, é possível constatar a imobilização de lipase em suporte de haste de girassol *in natura* e tratado por auto-hidrólise; procedimento estes que além de melhorar a atividade e a estabilidade da enzima possibilitou, também, a sua reutilização, o que representa vantagens econômicas frente aos suportes convencionais, tornando-o uma alternativa promissora do ponto de vista industrial.

Antecedentes da Invenção

013. A literatura técnica especializada revela documentos de patentes que utilizam diversos tipos de suportes, inorgânicos ou sintéticos, para imobilização de enzimas em diferentes processos ou bioprocessos, no entanto, nenhuma delas diz respeito à tecnologia utilizada neste documento de patente, ou seja, a imobilização de lipase em suporte proveniente de haste de girassol (material orgânico de perfil lignocelulósico específico) *in natura* e após tratamento hidrotérmico.

014. O documento de patente brasileiro PI0706083-1 refere-se a obtenção de um biocatalisador imobilizado em suporte sólido, preferencialmente, o alginato e suportes inorgânicos tais como zircônio e nióbio; enquanto que o documento de patente brasileiro PI0804590-9 encontra-se descrito à imobilização da enzima amilase, extraída do malte do milho, em suporte de gel de alginato de sódio usando os métodos de oclusão em gel. Estes documentos diferem da presente invenção uma vez que, tratam de suportes inorgânicos pouco específico e não orgânico de característica lignocelulósica específica como é o caso da haste de girassol.

015. O documento de patente brasileiro PI0306523-5 descreve um processo de imobilização de microrganismos produtores de etanol utilizando sabugo de milho como suporte, descrevendo a configuração de reatores para a produção contínua de etanol com maior produtividade e eliminação de equipamentos como centrífugas, barateando, assim, os custos de produção. Este documento difere da presente invenção por ser voltado para imobilização de microrganismos produtores de etanol bem como por utilizar um material de perfil lignocelulósico diferente do aqui indicado nesta proposta.

016. O documento de patente WO 2012/085206 revela imobilização de enzimas,

particularmente, a lipase, em suportes poliméricos porosos por técnica de ligação covalente, documento que difere da presente invenção por utilizar um suporte orgânico sintético e não orgânico natural e de perfil lignocelulósico específico.

017. A patente BR 102014028983-6 A2 refere-se a utilização de sabugo de milho pré-tratado por extração alcalina, como suporte para o processo de imobilização de lipases, visando a obtenção de biocatalisadores imobilizados, como forma de propiciar sua reutilização em processos industriais contínuos ou em batelada, diferindo da presente invenção por utilizar pré-tratamento e biomassa diferentes.

017. O documento de patente brasileiro BR 11 2015 026769 6 refere-se a processos de pré-tratamento seja por irradiação, sonicação, oxidação, redução mecânica de tamanho, pirólise ou explosão a vapor para processar a biomassa e produzir intermediários e produtos úteis, tais como ácido amino-alfa, ômega-dicarboxílico e derivados de ácido amino-alfa, omega-dicarboxílico. Estes produtos incluem polímeros e copolímeros de ácido amino-alfa, ômega-dicarboxílico. A patente brasileira BR 11 2016 0009541 revela um processo de fracionamento da biomassa lignocelulósica por organossolve, com a finalidade de reduzir os custos de processo, aumentar a deslignificação, reduzir as reações colaterais, em particular a degradação de hemiceluloses, melhor a hidrólise de celulose e aumentar a natividade da lignina obtida. Patente PI 0802559-2 A2 faz referência a um processo de pré-tratamento com solução de peróxido de hidrogênio alcalino e hidrólise de biomassa vegetal para obtenção de insumos utilizados na produção industrial de etanol e/ou outros álcoois. A patente PI 0516035-9 B1, refere-se a um método para o tratamento de resíduo orgânico ou biomassa lignocelulósica, pela combinação dos tratamentos hidrólise térmica, oxidação úmida e explosão úmida para obtenção de carboidratos mais disponíveis para subsequente hidrólise, por meio da adição de enzimas ou fermentação direta em um ou mais produtos desejados. O documento de patente WO 2014/144588 refere-se ao método e equipamentos utilizados para a produção de açúcares e lignina pelo fracionamento da biomassa lignocelulósica por meio de pré-tratamento com líquido iônico e do pré-tratamento alcalino. Todos estes documentos, portanto, diferem da presente invenção visto que além de utilizar pré-tratamentos diferentes também possuem finalidades diferentes da apresentada.

018. Logo, a proposta desta patente de invenção, imobilização de enzima em suporte de haste de girassol, possui o parâmetro de novidade, pois até o presente momento nenhum trabalho científico ou técnico relata a utilização do subproduto agrícola ou agroindustrial aqui relatado, haste de girassol, para utilização como suporte enzimático. Destaca-se ainda que a tecnologia proposta apresenta atividade inventiva e aplicação industrial, requisitos estes necessários para a concessão da patente requerida.

Sumário da Invenção

018. A presente invenção tem como objetivo fornecer as informações tecnológicas envolvidas na obtenção de um suporte alternativo para imobilização de lipases a partir da haste de girassol, um resíduo da agroindústria do girassol, com melhoria na sua atividade e estabilidade bem como em sua reutilização em processos contínuos ou em batelada.

Descrição Detalhada da Invenção

019. Sabendo-se da importância de uma descrição detalhada do invento, para melhor compreensão e avaliação do processo de invenção proposto, cabe salientar que este documento de patente consiste na imobilização de lipase em suporte oriundo de haste de girassol, caracterizado como um subproduto lignocelulósico constituído de celulose, hemicelulose e lignina, em proporções e características específicas, por técnica de adsorção física.

020. Para o preparo do material, inicialmente a haste de girassol é seca, em temperatura não superior a 60°C, e moída para ajuste granulométrico (moagens para diâmetro de 0,05 a 2,50 mm), com posterior lavagem na proporção de 1:1 a 1:100 gramas de material por mililitros de água destilada, sendo preferencialmente na proporção de 1:25, por sucessivas vezes, com ou sem agitação, preferencialmente sobre rigorosa agitação por um intervalo de 60 minutos por três vezes. Após este procedimento, o material é seco em estufa de 30 a 60°C, preferencialmente a 40°C, por cerca de 6 a 72 horas, preferencialmente 48 h, podendo, no entanto, esta atividade ser executada em temperatura ambiente a depender

das condições climáticas do local.

O tratamento é realizado utilizando uma proporção de 1:5 a 1:80 gramas de haste de girassol por mililitros de água, preferencialmente 1:10, em temperatura de 100 a 200°C, preferencialmente 185°C, por um intervalo de tempo de 5 a 60 minutos, preferencialmente, 25 min, em reator tipo ampola fechado. Após esse procedimento, o material resultante da reação é filtrado utilizando-se de qualquer meio filtrante, preferencialmente nylon, em sucessivas lavagens com água destilada, e seco em temperatura ambiente ou em estufa (30 a 60°C, preferencialmente 40°C) por cerca de 6 a 72 h, preferencialmente 48 h, a fim de se obter um material de suporte para imobilização de lipases.

021. Desse modo, com o intuito de comprovar a eficácia da aplicação deste material como suporte para imobilização de lipases, foram realizados testes de imobilização com a lipase comercial Amano Lipase PS de *Burkholderia cepacia*, por técnica de adsorção física com o contato da enzima junto ao suporte preparado, haste de girassol. Para isto, inicialmente, 1:2 a 1:50, preferencialmente 1:10, gramas de suporte por mililitros de hexano, preferencialmente com grau de pureza de 98,5%, são deixados em contato na faixa de temperatura de 20 a 35°C, preferencialmente 25°C, sob agitação por 0,5 a 6 h, preferencialmente 2 h. Após este período, é adicionado ao meio contendo o suporte uma solução concentrada de enzima preparada em solução tampão de pH 6,0 a 8,0, preferencialmente tampão fosfato em pH 7,0, e mantida em agitação por cerca de 0,5 a 6 horas, preferencialmente 2 h, sendo posteriormente mantidas em condições estáticas por um intervalo de 6 a 48 horas, preferencialmente 24 h, em temperatura não superior 25°C, preferencialmente 4°C. A recuperação do biocatalisador imobilizado do meio é realizado por filtração ou centrifugação, utilizando-se de qualquer meio filtrante, preferencialmente papel filtro Wathaman 400, e lavagens com hexano em proporção de 1:1 a 1:100, devendo este último procedimento ser realizado preferencialmente por três vezes em proporção de 1:20.

022. A efetiva imobilização da enzima em ambos os suporte, in natura e tratado por auto-hidrólise, é comprovada pela realização de testes de quantificação da atividade enzimática do biocatalisador imobilizado de acordo com metodologia descrita na

literatura específica (hidrólise da emulsão de azeite de oliva e goma arábica) (SOARES, C. M. F.; CASTRO, H. F.; MORAES, F. F.; ZANIN, G. M. - Characterization and utilization of Candida rugosalipase immobilized on controlled pore sílica - Applied Biochemistry and Biotechnology, 1999). Para isto, o substrato é preparado pela emulsão de 50 mL de azeite de oliva e 3,5 g de goma arábica dissolvida em 50 mL de tampão fosfato de sódio 0,1 M (pH 7,0), onde em frascos Erlenmeyer de 125 mL são adicionados: 5 mL de substrato, 2 mL de solução tampão fosfato de sódio 0,1 M (pH 7,0) e cerca de 0,1 g de enzima imobilizada. Os frascos são incubados em banho termostaticado com agitação a 50°C por 10 min em agitação constante de cerca de 80 rpm. Após esse período, a reação é interrompida para determinação da atividade lipolítica.

023.A determinação da atividade lipolítica, após os procedimentos realizados anteriormente, é realizada com 0,3 g de amostra do sistema sendo coletado e adicionado 2 mL de solução acetanólica (mistura de acetona, etanol 99% e água destilada 1:1:1). Os ácidos graxos liberados durante esta reação, são titulados com solução de KOH 0,03 M, usando fenolftaleína como indicador (3 gotas). Uma unidade (U) de atividade é definida como a quantidade de enzima que libera 1 micromol de ácido graxo por minuto de reação, nas condições do ensaio. As análises são realizadas em triplicata, sendo a atividade lipolítica obtida desta análise representadas em micromol/g.min).

024.Os biocatalisadores imobilizados obtidos são avaliados não só quanto aos seus níveis de atividade enzimática e propriedades bioquímicas, como pH, temperatura, estabilidade térmica e parâmetros cinéticos, mas também, em função da sua estabilidade operacional ou número de reuso. Assim, os estudos de pH (3,0 – 9,0) revelam comportamento semelhante da enzima em ambas as formas, livre e imobilizada, uma vez que, a atividade máxima ótima ocorreu em pH 7,0, demonstrando que a imobilização no material apresentado, e nas condições descritas, não altera o ponto isoelétrico da enzima.

025. O efeito da temperatura na atividade hidrolítica é verificado na faixa de 30 a 80°C, em valor de pH 7,0, e os resultados obtidos sugerem que a imobilização tem um efeito protetor para a enzima visto que a enzima livre apresenta atividade máxima em 50°C enquanto que a imobilizada, em ambos os suportes, apresenta atividade máxima em temperatura de 60°C. A estabilidade térmica é avaliada a 60 e 70°C por 240 min, sendo

observado que as enzimas imobilizadas mantem 88 e 77%, respectivamente, de atividade residual após as 4 horas de exposição, enquanto que a livre apresenta 55% de atividade a 60°C. Comprovando, portanto, que a imobilização obtida com os suportes, seguindo os procedimentos descritos neste trabalho, protegem a enzima impedindo o rompimento da sua estrutura e posterior desnaturação.

026.Quanto a estabilidade operacional, em termos quantitativos, é possível observar que o biocatalisador imobilizado, tanto em haste de girassol *in natura* como tratado, é capaz de manter sua atividade nos primeiros ciclos de reuso, garantindo a reutilização da enzima por cerca de 3 e 4 vezes, respectivamente, mantendo-se cerca de 50% da sua atividade inicial. Esses resultados deixam claro a eficiência do uso da haste de girassol de ambas as formas, *in natura* e tratada, como suporte para obtenção de lipase imobilizada por meio da técnica aplicada, já descrita e disponível no estado da técnica.

027.Entretanto, a descrição apresentada para a obtenção da lipase imobilizada em suporte de resíduo de girassol por técnica de adsorção física, refere-se a uma de suas concretizações preferidas. Contudo, cabe salientar, que a invenção não está limitada à concretização revelada, pois aqueles com habilidades na técnica irão imediatamente perceber que alterações e substituições podem ser feitas dentro deste conceito inventivo aqui descrito, não podendo, de forma alguma, ser considerada como limitante da invenção, a qual está limitada ao escopo das reivindicações que seguem.

REIVINDICAÇÕES

01. **“SUPORTES ALTERNATIVOS PARA IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES”** caracterizado por compreender etapas de preparo e aplicação de haste de girassol *in natura* e tratado via processo hidrotérmico (auto-hidrólise), subproduto agrícola ou agroindustrial, como material de suporte para imobilização de lipases para obtenção de um biocatalisador imobilizado em material alternativo.
02. **“SUPORTES ALTERNATIVOS PARA IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES”**, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por utilizar haste de girassol preferencialmente seca em temperatura não superior a 60°C e moída para granulometria de 0,05 a 2,50 mm, com posterior lavagem na proporção de 1:1 a 1:100 gramas de material por mililitros de água destilada, sendo preferencialmente na proporção de 1:25, por sucessivas vezes, com ou sem agitação, preferencialmente em rigorosa agitação por um intervalo de 60 minutos por três vezes, sendo na sequência seca em temperatura ambiente ou em estufa (30 a 60°C, preferencialmente 40°C) por cerca de 6 a 72 h, preferencialmente 48 h.
03. **“SUPORTES ALTERNATIVOS PARA IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES”**, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por usar biomassa tratada derivada de tratamento hidrotérmico na proporção de 1:5 a 1:80 gramas de haste de girassol por mililitros de água, preferencialmente 1:10, em temperatura de 100 a 200°C, preferencialmente 185°C, por um intervalo de tempo de 5 a 60 minutos, preferencialmente, 25 min, em reator tipo ampola fechado, sendo o material resultante da reação filtrado em qualquer meio filtrante, preferencialmente nylon, com sucessivas lavagens com água destilada, e seco em temperatura ambiente ou em estufa (30 a 60°C, preferencialmente 40°C) por cerca de 6 a 72 h, preferencialmente 48 h, a fim de se obter um material de suporte para imobilização de lipases.
04. **“SUPORTES ALTERNATIVOS PARA IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES”**, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por utilizar preferencialmente Amano Lipase PS de *Burkholderia cepacia*, em meio tamponado ou não.

05. **“SUPORTES ALTERNATIVOS PARA IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES”**, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por utilizar preferencialmente nas condições de imobilização uma massa de suporte na proporção de 1:2 a 1:50, preferencialmente 1:10, gramas de suporte por mililitros de hexano, na faixa de temperatura de 20 a 35°C, preferencialmente 25°C, em agitação por 0,5 a 6 h, preferencialmente 2 h, sendo posteriormente adicionado ao meio uma solução concentrada de enzima preparada em solução tampão de pH 6,0 a 8,0, preferencialmente tampão fosfato em pH 7,0, e mantida em agitação por cerca de 0,5 a 6 h, preferencialmente 2 h, com posterior manutenção em condições estáticas por um intervalo de 6 a 48 h, preferencialmente 24 h, em temperatura não superior 25°C, preferencialmente 4°C, seguida por filtração e processo de sucessivas lavagens do biocatalisador imobilizado com hexano em proporção em volumes de 1:1 a 1:100, preferencialmente por três vezes em proporção de 1:20.
04. **“SUPORTES ALTERNATIVOS PARA IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES”**, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por utilizar para a imobilização da enzima um suporte de haste de girassol *in natura* ou derivado de tratamento hidrotérmico, por qualquer técnica adequada.

RESUMO**“SUPORTES ALTERNATIVOS PARA IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES”**

001.A presente invenção diz respeito a obtenção de um suporte alternativo derivado de haste de girassol *in natura* e tratado por auto-hidrólise, para imobilização enzimática de lipases, visando a possibilidade de reutilização desses biocatalisadores imobilizados em processos industriais contínuos ou em batelada. O invento possui o caráter inovador pela proposta de utilização de um subproduto agrícola ou agroindustrial, de perfil lignocelulósico específico, sem valor agregado, obtido da cadeia produtiva de grãos ou do seu processamento, para melhoria da atividade e estabilidade da enzima lipase bem como o seu reuso como biocatalisador imobilizado, tornando-se atraente e promissor dentro do contexto industrial, especialmente, para o setor biotecnológico.

4.4. Patente 03

“IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES EM SUPORTE DERIVADO DE TRATAMENTO QUÍMICO”

001.A presente invenção refere-se à utilização de haste de girassol submetida a tratamento para obtenção de um suporte para a imobilização de enzimas lipolíticas, a fim de se obter melhorias na manutenção e estabilidade da atividade enzimática do biocatalisador imobilizado.

Fundamentos da Invenção

002.Enzimas são catalisadores naturais sustentáveis, biocompatíveis, biodegradáveis e derivados de recursos renováveis. Desse modo, em virtude dos processos enzimáticos serem conduzidos sob condições moderadas de pressão, temperatura e pH, com altas taxas de seletividade, eficiência energética e menor geração de resíduos, eles são considerados ambientalmente mais amigável, rentável e sustentável que às sínteses orgânicas convencionais (SHELDON, R. A.; PELT, S. V. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. *Chemical Society Reviews*. v. 42, p. 6223-6235, 2013).

003.A Lipase (EC 3.1.1.3) é um exemplo de enzima que têm sido extensivamente utilizada em sínteses orgânicas. Isso se deve ao fato de que, apesar da sua atividade catalítica “original” consistir na hidrólise de ligações de éster carboxílico, a sua notável estabilidade em meios orgânicos, possibilita sua utilização em reações de esterificação (hidrólise reversa), interesterificação e de transesterificação. Essa versatilidade, faz as lipases muito atraentes para um grande número de aplicações industriais tais como, na indústria de alimentos, de detergentes, de produtos farmacêuticos, de couro, têxteis, cosméticos e de papel (BARBE, S.; LAFAQUIÉRE, V.; GUIEYSSE, D.; MONSAN, P.; REMAUD-SIMÉON, M.; ANDRE, I. Insights into lid movements of *Burkholderia cepacia* lipase inferred from molecular dynamics simulations. *Proteins*. v.77, p. 509–523, 2009; KHARRAT, N.; ALI, Y. B.; MARZOUK, S.; GARGOURI, Y.; KARRA-CHÂABOUNI, M. Immobilization of *Rhizopus oryzae* lipase on silica aerogels by adsorption: Comparison with the free enzyme. *Process Biochemistry*. v.46, p.1083–1089, 2011)

004.Entretanto, apesar do uso de enzimas apresentar vantagens já reconhecidas e ter se expandido rapidamente no meio industrial, a sua aplicação muitas vezes se torna difícil pela falta de estabilidade operacional e dificuldade de recuperação e reutilização da mesma

(MILETIC, N.; NASTASOVIC, A.; LOOS, K. Immobilization of biocatalysts for enzymatic polymerizations: Possibilities, advantages, applications. *Bioresource Technology*. v.115, p.126–135, 2012;). Estes inconvenientes, no entanto, podem, normalmente, ser resolvidos com a imobilização da enzima visto que, além de aumentar a estabilidade da enzima possibilita a sua recuperação, seja por filtração ou centrifugação, e reutilização, mesmo que em outras reações (Sheldon; R. A. Enzyme Immobilization: The Quest for Optimum Performance. *Advanced Synthesis & Catalysis*. v. 349, p.1289 – 1307, 2007; KHARRAT, N.; ALI, Y. B.; MARZOUK, S.; GARGOURI, Y.; KARRA-CHÂABOUNI, M. Immobilization of *Rhizopus oryzae* lipase on silica aerogels by adsorption: Comparison with the free enzyme. *Process Biochemistry*. v.46, p.1083–1089, 2011), o que resulta em redução de custos nos processos industriais.

005.O termo imobilização de enzimas, refere-se a enzimas fisicamente confinadas ou localizadas em uma região definida do espaço com retenção de suas atividades catalíticas e que possa ser usada repetida e continuamente (JEGANNATHAN, K. R.; ABANG, S.; PONCELET, D.; CHAN, E. S.; RAVINDRA, P. Production of biodiesel using immobilized lípase - a critical review. *Critical Reviews in Biotechnology*. v.28, p.253–264, 2008). Basicamente, os métodos de imobilização de enzimas podem ser divididos em três categorias: ligação da enzima em um suporte, encapsulamento e ligação cruzada. A técnica de adsorção física se encaixa na primeira categoria, e ocorre via interações hidróbicas e forças de van der Waals entre a enzima e o suporte sólido (SHELDON, R. A.; PELT, S. V. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. *Chemical Society Reviews*. v. 42, p. 6223-6235, 2013).

006.Vários materiais têm sido usados como suportes para imobilização, porém, a maioria são suportes inorgânicos de alto custo (MILETIC, N.; NASTASOVIC, A.; LOOS, K. Immobilization of biocatalysts for enzymatic polymerizations: Possibilities, advantages, applications. *Bioresource Technology*. v.115, p.126–135, 2012). Logo, os resíduos lignocelulósicos (resíduos constituídos principalmente de celulose, hemicelulose e lignina) são uma alternativa à esses materiais tendo em vista sua disponibilidade e baixo custo. Nesse sentido, a haste de girassol é um exemplo proeminente de um subproduto abundante sem usos alternativos (RUIZ, E.; CARA, C.; MANZANARES, P.; BALLESTEROS, M.; CASTRO, E. Evaluation of steam explosion pre-treatment for enzymatic hydrolysis of sunflower stalks. *Enzyme and Microbial Technology*. v. 42, p. 160-166, 2008).

007.Contudo, em virtude dos materiais porosos possuírem uma grande área superficial interna disponível para a imobilização de enzimas, local onde as enzimas ficam protegidas das turbulências externas, torna-se necessário a realização de tratamento os quais, atuam no sentido

de desorganizar do estrutura da fibra do resíduo. Essa desorganização se dá pela quebra da estrutura da lignina o que possibilita a descristalização parcial da celulose e a solubilização parcial das hemicelulose (BARAKAT, A.; CHUETOR, S.; MONLAU, F.; SOLHY, A.; ROUAU, X. Eco-friendly dry chemo-mechanical pretreatments of lignocellulosic biomass: Impact on energy and yield of the enzymatic hydrolysis. *Applied Energy*. v. 113, p. 97–105, 2014).

008. Portanto, na presente invenção, é possível constatar que a haste de girassol após o tratamento aplicado, resultou em um material com maior área superficial e tamanho de poro, favorecendo, assim, o processo de imobilização das enzimas no suporte apresenta-se como um suporte alternativo para a imobilização de lipase, pois melhorou a atividade e estabilidade da enzima imobilizada e possibilitou a sua reutilização o que representa vantagens econômicas frente aos suportes tradicionalmente utilizados. Tais características, além de valorar o subproduto, atribuindo a este uma função, tornam - o uma alternativa promissora do ponto de vista industrial.

Antecedentes da Invenção

009. A literatura técnica especializada revela documentos de patentes que utilizam ou aplicam tratamentos em resíduos agrícolas, porém as etapas, o resíduo e os métodos de tratamento são muito diferentes do que é proposto neste documento, o qual visa um suporte alternativo derivado do tratamento químico em haste de girassol para imobilização de enzimas de lipase. Sendo assim, nenhuma delas diz respeito à tecnologia utilizada neste documento de patente.

010. No âmbito patentário, alguns documentos descrevem métodos de imobilização de enzimas. O documento de patente brasileiro BR 10 2014 015027 7 A2 refere-se ao tratamento do sabugo de milho para obtenção de exopolissacarídeos tipo goma xantana através da utilização do licor resultante do pré-tratamento. A Patente PI 0802559-2 A2 faz referência a um processo de pré-tratamento com solução de peróxido de hidrogênio alcalino e hidrólise de biomassa vegetal para obtenção de insumos utilizados na produção industrial de etanol e/ou outros álcoois. A patente PI 0516035-9 B1, refere-se a um método para o tratamento de resíduo orgânico ou biomassa lignocelulósica, pela combinação dos tratamentos hidrólise térmica, oxidação úmida e explosão úmida para obtenção de carboidratos mais disponíveis para subsequente hidrólise, por meio da adição de enzimas ou fermentação direta em um ou mais produtos desejados. O documento de patente WO 2014/144588 refere-se ao método e

equipamentos utilizados para a produção de açúcares e lignina pelo fracionamento da biomassa lignocelulósica por meio de pré-tratamento com líquido iônico e do pré-tratamento alcalino. Deste modo, fica claro que todos os documentos de patente descritos acima, diferem do objeto de proteção da presente patente de invenção.

011.A patente BR 10 2013 019252 0 A2 refere-se a obtenção de um suporte inerte, bem como seu processo de preparação e imobilização de microrganismos no referido suporte inerte, úteis na produção de biocombustíveis líquidos e destoxificação de hidrolisados hemicelulósicos da cana de açúcar. Logo, difere da presente invenção por ser voltado para imobilização de microrganismos produtores de biocombustíveis.

012. Logo, a proposta desta patente de invenção, imobilização de enzima em suporte de haste de girassol tratado com NaOH, possui o parâmetro de novidade, pois até o presente momento nenhum trabalho científico ou técnico relata a utilização deste tipo de tratamento em resíduo para utilização como suporte enzimático. Destaca-se ainda que a tecnologia proposta apresenta atividade inventiva e aplicação industrial, requisitos estes necessários para a concessão da patente requerida.

Sumário da Invenção

013.A presente invenção tem como objetivo fornecer as informações tecnológicas envolvidas na obtenção de um suporte alternativo derivado de tratamento químico para imobilização de lipases a partir da haste do girassol, um subproduto agrícola ou agroindustrial do cultivo do girassol, visando melhorias na sua atividade e estabilidade bem como em sua reutilização quer seja em processos contínuos quer seja em batelada.

Descrição Detalhada da Invenção

014.A presente invenção consiste na obtenção de um suporte alternativo para imobilização de lipases por intermédio do fracionamento de parte da composição lignocelulósica da haste de girassol por processo de tratamento químico. Para isso, inicialmente a haste de girassol é seca (em temperatura não superior a 60°C) e moída até granulometria de 0,05 a 2,50 mm, com posterior tratamento em proporção de 1:5 a 1:80 de gramas de haste de girassol por mililitros de solução de NaOH, preferencialmente 1:20, em concentração de 0,10 a 2,00 mol/L, preferencialmente 0,75 mol/L, em temperatura de 30 a 80°C, preferencialmente 55°C, por um intervalo de 0,5 a 4 h, preferencialmente 1 h. Após esse procedimento, o pH do meio é ajustado

para 7,0 com ácido acético P.A., ou qualquer outra solução ácida, e o material sólido resultante filtrado utilizando-se de qualquer meio filtrante, preferencialmente nylon, em sucessivas lavagens com água destilada, e seco em temperatura ambiente ou em estufa (30 a 60°C, preferencialmente 40°C) por cerca de 6 a 72 h, preferencialmente 48 h, a fim de se obter um material de suporte para imobilização de lipases.

015. Objetivando comprovar a eficácia da aplicação do material oriundo do tratamento químico na haste de girassol como suporte para imobilização de lipases foram realizados testes de imobilização com a lipase comercial Amano Lipase PS de *Burkholderia cepacia*, por técnica de adsorção física. Para isto, inicialmente é preparado uma proporção de 1:2 a 1:50, preferencialmente 1:10, gramas de suporte por mililitros de hexano, preferencialmente com grau de pureza de 98,5%, na faixa de temperatura de 20 a 35°C, preferencialmente 25°C, em agitação por 0,5 a 6 h, preferencialmente 2 h. Após este período, é adicionado ao meio contendo o suporte uma solução concentrada de enzima preparada em solução tampão de pH 6,0 a 8,0, preferencialmente tampão fosfato em pH 7,0, e mantida em agitação por cerca de 0,5 a 6 horas, preferencialmente 2 h, sendo posteriormente mantidas em condições estáticas por um intervalo de 6 a 48 horas, preferencialmente 24 h, em temperatura não superior 25°C, preferencialmente 4°C. A recuperação do biocatalisador imobilizado do meio é realizado por filtração ou centrifugação, utilizando-se de qualquer meio filtrante, preferencialmente papel filtro Wathaman 400, e lavagens com hexano em proporção de 1:1 a 1:100, devendo este último procedimento ser realizado preferencialmente por três vezes em proporção de 1:20.

016.A efetiva imobilização da enzima no suporte é comprovada por testes de quantificação da atividade enzimática do biocatalisador imobilizado de acordo com metodologia descrita na literatura específica (hidrólise da emulsão de azeite de oliva e goma arábica) (SOARES, C. M. F.; CASTRO, H. F.; MORAES, F. F.; ZANIN, G. M. - Characterization and utilization of *Candida rugosa* lipase immobilized on controlled pore sílica - Applied Biochemistry and Biotechnology, 1999).

017.O desempenho do biocatalisador imobilizado obtido é verificado quanto a estabilidade operacional ou número de reuso, o qual indica em termos quantitativos que o biocatalisador imobilizado em haste de girassol com tratamento químico é capaz de manter sua atividade nos cinco (5) primeiros ciclos de reuso, garantindo a reutilização da enzima por cerca de 6 vezes, mantendo-se cerca de 50% da sua atividade inicial, demonstrando a eficiência do tratamento químico com NaOH, nas condições aqui descritas, em haste de girassol para obtenção de suporte para imobilização de lipase por meio da técnica aplicada, já descrita e disponível no estado da técnica.

REIVINDICAÇÕES

01. “**IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES EM SUPORTE DERIVADO DE TRATAMENTO QUÍMICO**” caracterizado por compreender etapas de obtenção e aplicação de material derivado do tratamento químico por NaOH em haste de girassol, subproduto agrícola ou agroindustrial, como suporte para imobilização de lipases.
02. “**IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES EM SUPORTE DERIVADO DE TRATAMENTO QUÍMICO**”, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por utilizar haste de girassol preferencialmente seca (em temperatura não superior a 60°C) e moída, para granulometria de 0,05 a 2,50 mm, derivada de tratamento químico em proporção de 1:5 a 1:80 gramas de haste de girassol por mililitros de solução de NaOH, preferencialmente 1:20, em concentração de 0,10 a 2,00 mol/L, preferencialmente 0,75 mol/L, a temperatura de 30 a 80°C, preferencialmente 55°C, por um intervalo de 0,5 a 4,0 h, preferencialmente 1 h, posteriormente neutralizada para pH 7,0 com ácido acético P.A., ou qualquer outra solução ácida, sendo o material sólido resultante filtrado utilizando-se de qualquer meio filtrante, preferencialmente nylon, em sucessivas lavagens com água destilada, e seco em temperatura ambiente ou em estufa (30 a 60°C, preferencialmente 40°C) por cerca de 6 a 72 h, preferencialmente 48 h, a fim de se obter um material de suporte para imobilização de lipases.
03. “**IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES EM SUPORTE DERIVADO DE TRATAMENTO QUÍMICO**”, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por utilizar preferencialmente Amano Lipase PS de *Burkholderia cepacia*, em meio tamponado ou não, para a obtenção de um biocatalisador imobilizado.
04. “**IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES EM SUPORTE DERIVADO DE TRATAMENTO QUÍMICO**”, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por utilizar preferencialmente nas condições de imobilização uma massa de suporte na proporção de 1:2 a 1:50, preferencialmente 1:10, gramas de suporte por mililitros de hexano, na faixa de temperatura de 20 a 35°C, preferencialmente 25°C, em agitação por 0,5 a 6 h, preferencialmente 2 h, sendo posteriormente adicionado ao meio uma solução concentrada de enzima preparada em solução tampão de pH 6,0 a 8,0, preferencialmente tampão fosfato em pH 7,0, e mantida em agitação por cerca de 0,5 a 6 h, preferencialmente 2 h, com posterior manutenção em condições estáticas por um intervalo de 6 a 48 h, preferencialmente 24 h, em temperatura não superior 25°C, preferencialmente 4°C, seguida por filtração e processo de sucessivas lavagens do biocatalisador imobilizado com hexano em proporção em volumes de 1:1 a

1:100, preferencialmente por três vezes em proporção de 1:20.

05. “IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES EM SUPORTE DERIVADO DE TRATAMENTO QUÍMICO”, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por utilizar para a imobilização da enzima um suporte de haste de girassol, derivado de tratamento químico com NaOH, por qualquer técnica adequada.

RESUMO**“IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES EM SUPORTE DERIVADO DE TRATAMENTO QUÍMICO”**

001.A presente invenção diz respeito a obtenção de um suporte alternativo derivado de tratamento químico com NaOH de haste de girassol para imobilização enzimática de lipases. O invento mostra o caráter inovador pela proposta de tratamento e utilização de um subproduto agrícola ou agroindustrial, sem valor agregado, obtido da cadeia produtiva de grãos (setor agrícola) ou do seu processamento (setor agroindustrial), para melhoria da atividade e estabilidade da enzima lipase bem como, o seu reuso como biocatalisador imobilizado. Essas características, portanto, tornam a haste de girassol tratada uma alternativa promissora para o setor industrial, especialmente, para o setor biotecnológico, visto que acarretará redução nos custos dos processos tanto pela possibilidade de recuperação, com maior e melhor reutilização da enzima, como pelo baixo custo do suporte utilizado.

5. CONCLUSÕES

- O caule de girassol apresentou, pela técnica de hidrólise ácida, 37,97 % ($\pm 0,95$) de glicose, 15,93 % ($\pm 1,77$) de hemicelulose e 17,83 % ($\pm 0,053$) de lignina total.
- A melhor condição encontrada para a extração alcalina foi a de 3% de NaOH por 1 h. Essa condição foi escolhida por apresentar uma boa relação entre condições brandas de processo, valor obtido de extração de hemiceluloses, próximo a 70% e, principalmente pelo baixo percentual de celulose retirado, 6%;
- O pré-tratamento por auto-hidrólise obteve a melhor condição de processo aos 25 min a 185°C, devido ao maior percentual de remoção de hemicelulose, 84%.
- Os experimentos de biodegradabilidade não apresentaram nenhum efeito de degradação proveniente da enzima lípase para com a estrutura do resíduo de caule de girassol *in natura*;
- Após o processo de imobilização em todos os suportes testados, a temperatura ótima para a lipase livre e imobilizada foi de 50 e 60 °C, respectivamente, e o pH ótimo foi 7,0;
- A imobilização possibilitou uma maior estabilidade térmica e tempo de meia-vida à enzima imobilizada: 4,28 (alcalino), 3,62 (auto-hidrólise) e 2,20 vezes (*in natura*) maior que a livre com tempo de meia-vida de 19,95, 16,86 e 10,25 h, respectivamente. Contudo, fica claro que os suportes tratados propiciaram maior estabilidade e tempo de meio-vida à enzima;
- Os biocatalisadores imobilizados em suportes tratados possibilitaram uma maior reutilização cerca de 6 (alcalino) e 4 (hidrotérmico) reusos enquanto que, no *in natura* conseguiu-se 3 reusos;
- O valor de $V_{\text{máx}}$ e K_m para o biocatalisador imobilizado foi de 625,97 U/g e 284,45 mM, 544,19 U/g e 287,32 mM, 364,74 U/g e 208,64 mM nos suportes alcalino, hidrotérmico e *in natura*, respectivamente.
- Portanto, a partir dos resultados apresentados, o resíduo de girassol pode ser considerado um suporte alternativo de baixo custo e, principalmente, adequado para a imobilização da lipase, visto ser esse estudo pioneiro quando na utilização do resíduo de girassol para esse fim. Além disso, pode-se concluir também, que os tratamentos aplicados no resíduo tiveram efeito positivo no processo de imobilização da lipase.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDULLAH, A. Z.; SULAIMAN, N. S.; KAMARUDDIN, A. H. Biocatalytic esterification of citronellol with lauric acid by immobilized lipase on amino propyl- grafted mesoporous SBA-15, *Biochemical Engineering Journal*. v.44, p.263–270, 2009.

ABDULKHANI, A.; MARVASTA, E. H.; ASHORI, A.; KARIMI, A. N. Effects of dissolution of some lignocellulosic materials with ionic liquids as green solvents on mechanical and physical properties of composite films. *Carbohydrate Polymers*.v.95, p.57–63, 2013.

AGBOR, V. B.; CICEK, N.; SPARLING, R.; BERLIN, A.; LEVIN, D. B. Biomass pretreatment: Fundamentals toward application. *Biotechnology Advances*. v.29, p.675–685, 2011.

AGYEI, D.; SHANBHAG, B. K.; HE, L. Enzyme engineering (immobilization) for food applications. In *Improving and Tailoring Enzymes for Food Quality and Functionality*. **Food Science, Technology and Nutrition**. Elsevier Ltda. p.213–235, 2015

AKHTAR, J.; IDRIS, A.; AZIZ, R. A. Recent advances in production of succinic acid from lignocellulosic biomass. *Applied Microbiology and Biotechnology*. v.98, p.987–1000, 2014.

ALEKHINA, M.; ERSHOVA, O.; EBERT, A.; HEIKKINEN, S.; SIXTA, H. Softwood kraft lignin for value-added applications: Fractionation and structural characterization. *Industrial Crops and Products*. v.66, p.220–228, 2015.

ALVAREZ, V.; VAZQUEZ, A. Thermal degradation of cellulose derivatives/starch blends and sisal fibre biocomposites. *Polymer Degradation and Stability*. v.84, p.13–21, 2004.

ALARU, M.; KUKK, L.; OLT, J.; MENIND, A.; RUTH LAUK, R.; ELIS VOLLMER, E.; ASTOVER, A. Lignin content and briquette quality of different fibre hemp plant types and

energy sunflower. *Field Crops Research*. v.124, p.332–339, 2011.

ALTINKAYNAK, C.; TAVLASOGLU, S.; ODEMIR, N.; OCSOY, I. A new generation approach in enzyme immobilization: organic-inorganic hybrid nanoflowers with enhanced catalytic activity and stability. *Enzyme and Microbial Technology*. v.93-94, p.105-112, 2016.

ALVIRA, P.; TOMÁS-PEJÓ, E.; BALLESTEROS, M.; NEGRO, M. J. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresource Technology*. v.101, p.4851–4861, 2010.

AMENDOLA, D.; DE FAVERI, D. M.; EGÜES, I.; SERRANO, L.; LABIDI, J.; SPIGNO, G. Autohydrolysis and organosolv process for recovery of hemicelluloses, phenolic compounds and lignin from grape stalks. *Bioresource Technology*. v.107, p.267–274, 2012.

AN, N.; ZHOU, C. H.; ZHUANG, X. Y.; TONG, D. S.; YU, W. H. Immobilization of enzymes on clay minerals for biocatalysts and biosensors - Review article. *Applied Clay Science*. v.114, p.283–296, 2015.

ANDRADE, L. H.; REBELO, L. P.; NETTO, C. G. C. M.; TOMA, H. E. Kinetic resolution of a drug precursor by *Burkholderia cepacia* lipase immobilized by different methodologies on superparamagnetic nanoparticles. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. v.66, p.55–62, 2010.

ANGAJALA, G.; PAVAN, P.; SUBASHINI, R. Lipases: An overview of its current challenges and prospectives in the revolution of biocatalysis. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. v.7, p.257–270, 2016.

ANSARI, S. A.; HUSAIN, Q. Lactose hydrolysis from milk/whey in batch and continuous processes by concanavalin A-celite 545 immobilized *Aspergillus oryzae* β -galactosidase. *Food and Bioproducts Processing*, v.90, p.351–359, 2012.

ANTONOPOULOU, G.; DIMITRELLOS, G.; BEOBIDE, A. S.; VAYENAS, D.; LYBERATOS, G. Chemical Pretreatment of Sunflower Straw Biomass: The Effect on Chemical Composition and Structural Changes. *Waste Biomass Valor*. DOI 10.1007/s12649-

015-9388-x.

ANWAR, Z.; GULFRAZ, M.; IRSHAD, M. Agro-industrial lignocellulosic biomass key to unlock the future bio-energy: A brief review. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*. v.7, p.163-173, 2014.

ATACAN, K.; OZACAR, M. Characterization and immobilization of trypsin on tannic acid modified Fe₃O₄ nanoparticles, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. v.128, p.227-236, 2015.

ATAIE, F. F.; RIDING, K. A. Impact of pretreatments and enzymatic hydrolysis on agricultural residue ash suitability for concrete. *Construction and Building Materials*. v.58, p.25–30, 2014.

BALCÃO, V. M.; PAIVA, A. L.; MALCATA, X. F. Bioreactors with immobilized lipases: State of the art. *Enzyme and Microbial Technology*. v.18, p.392-416, 1996.

BADIEI, M.; ASIM, N.; JAHIM, J. M.; SOPIAN, K. Comparison of Chemical Pretreatment Methods for Cellulosic Biomass. *APCBEE Procedia*. v.9, p.170–174, 2014.

BARAKAT, A.; CHUETOR, S.; MONLAU, F.; SOLHY, A.; ROUAU, X. Eco-friendly dry chemo-mechanical pretreatments of lignocellulosic biomass: Impact on energy and yield of the enzymatic hydrolysis. *Applied Energy*. v.113, p.97–105, 2014.

BARBOSA, J. M. P.; SOUZA, R. L.; MELO, C. M.; FRICKS, A. T.; SOARES, C. M. F.; Lima, A. S. Biochemical characterisation of lipase from a new strain of bacillus sp. itp-001. *Química Nova*, v.35, p.1173–1178, 2012.

BARBOSA, A. S.; LISBOA, J. A.; SILVA, M. A. O.; CARVALHO, N. B.; PEREIRA, M. M.; FRICKS, A. T.; MATTEDI, S.; LIMA, A. S.; FRANCESCHIC, E.; SOARES, C. M. F. Novel mesoporous silica aerogel modified with protic ionic liquid for lipase immobilization. *Química Nova*. v.39, p.415–422, 2016.

BAYRAMOGLU, G.; ARICA, M. Y. Immobilization of *Mucor miehei* Esterase on Core-shell

Magnetic Beads via Adsorption and Covalent Binding: *Application in Esters Synthesis. Fibers and Polymers*. v.15, p.2051-2060, 2014.

BEHERA, S.; ARORA, R.; NANDHAGOPAL, N.; KUMAR, S. Importance of chemical pretreatment for bioconversion of lignocellulosic biomass. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. v.36, p.91–106, 2014.

BEZBRADICA, D. I.; MATEO, C.; GUISAN, J. M. Novel support for enzyme immobilization prepared by chemical activation with cysteine and glutaraldehyde. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. v.102, p.218–224, 2014.

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

BLANCO, R. M.; TERREROS, P.; FERNANDEZ-PEREZ, M.; OTERO, C.; DIAZ, G. Fictionalization of mesoporous silica for lipase immobilization —characterization of the support and the catalysts. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. v.30, p.83–93, 2004.

BHATIA, L.; SONIA JOHRI, S.; AHMAD, R. An economic and ecological perspective of ethanol production from renewable agro waste: a review. *AMB Express*, v.2. p.65, 2012.

BRAHMACHARI, G. Lipase-Catalyzed Organic Transformations: A Recent Update. In: BRAHMACHARI, G.; DEMAIN, A. L.; ADRIO, J. L. (eds) **Biotechnology of Microbial Enzymes**. 1 ed., chap. 13, London: Copyright©2017 Elsevier Incorporation, 2017.

BRENA, B. M.; BATISTA-VIERA, F. Immobilization of Enzymes: A Literature Survey. In *Immobilization of enzymes and cells/* edited by Jose M. Guisan. — 2nd ed.p. ; cm — (Methods in biotechnology; 22). Totowa, New Jersey: Editora Humana Press Inc. 2006.

BRÍGIDA, A. I. S.; CALADO, V. M. A.; GONÇALVES, L. R. B.; COELHO, M. A. Z. Effect of chemical treatments on properties of green coconut fiber. *Carbohydrate Polymers*, v.79, p.832–838, 2010.

BRIGIDA, A. I. S.; PINHEIRO, A. D. T.; FERREIRA, A. L. O.; PINTO, G. A. S.; GONÇALVES, L. R. B. Immobilization of *Candida Antarctica* Lipase B by Covalent Attachment to Green Coconut Fiber. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. v.136–140, p.67-80, 2007.

BRIGIDA, A. I. S., PINHEIRO, A. D. T., FERREIRA, A. L. O.; GONÇALVES, L. R. B. Immobilization of *Candida Antarctica* Lipase B by Adsorption to Green Coconut Fiber. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.146, p.173–187, 2008.

BRODEUR, G.; YAU, E.; BADAL, K.; COLLIER, J.; K. RAMACHANDRAN, K. B.; RAMAKRISHNAN, S. Chemical and Physico chemical Pretreatment of Lignocellulosic Biomass: A Review. *Enzyme Research*. 2011. <http://dx.doi.org/10.4061/2011/787532>.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Anuário estatístico de agroenergia 2012**: statistical yearbook of agrienergy. Brasília: MAPA/ACS, 2013. 284 p. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Desenvolvimento_Sustentavel/Agroenergia/anuario_agroenergia_web_2012.pdf>. Acesso em: 28 de agosto de 2016.

BUDZIANOWSKI, W. M. POSTAWA, K. Total Chain Integration of sustainable biorefinery systems. *Applied Energy*. v.184, p.1432–1446, 2016.

CABRERA-PADILLA, R. Y.; ALBUQUERQUE, M.; FIGUEIREDO, R. T.; FRICKS, A. T.; FRANCESCHI, E.; LIMA, A. S.; SANTOS, O. A.; SILVA, D. P.; SOARES, C. M. Immobilization and characterisation of a lipase from a new source, *Bacillus* ITP-001. *Bioprocess Biosyst Eng*. v.36, p.1385–1394, 2013.

CABRERA-PADILLA, R. Y.; LISBOA, M. C.; FRICKS, A. T.; FRANCESCHI, E.; LIMA, A. S.; SILVA, D. P.; SOARES, C. M. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on poly(3-hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate): a new eco-friendly support. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, v.32, p.289-98, 2012.

CAPARRÓS, S.; ARIZA, J.; LÓPEZ, F.; NACIMIENTO, J.A.; GARROTE, G.; JIMÉNEZ, L. Hydrothermal treatment and ethanol pulping of sunflower stalks. *Bioresource Technology*. v.99, p.1368–1372, 2008.

CARRIER, M.; LOPPINET-SERANI, A.; DENUX, D.; LASNIER, J. M.; HAMPICHAVANT', F.; CANSELL, F.; AYMONTIER, C. Thermogravimetric analysis as a new method to determine the lignocellulosic composition of biomass. *Biomass and Bioenergy*. v.35, p.298-307, 2011.

CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L.C.; GÍRIO, F.; MONIZ, P. Hydrothermal/Liquid Hot Water Pretreatment (Autohydrolysis): A Multipurpose Process for Biomass Upgrading. In: MUSSATTO, S. I. (eds) **Biomass Fractionation Technologies for a Lignocellulosic Feedstock Based Biorefinery**, 1ed, chap 14, United States of America: Elsevier Incorporation, 2016.

CARVALHO, H. W. L. de; OLIVEIRA, I. R. de; CARVALHO, C. G. P. de; GONCALVES, S. L.; BARROS, I. de; FERREIRA, F. M. de B.; LIRA, M. A.; TABOSA, J. N.; MACEDO, J. J. G. de; MENEZES, V. M. M.; MENESES, M. C.; GOMES, M. C. M.; OLIVEIRA, T. R. A. de; SANTANA, A. de F. **Desempenho de cultivares de girassol no Nordeste brasileiro nos anos agrícolas de 2010 e 2011**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros. (Embrapa Tabuleiros Costeiros. Comunicado Técnico, 123). 4 p., 2012.

CARVALHO, L. M.; OLIVEIRA, I. R. de; CARVALHO, H. W. L. de; CARVALHO, C. G. P. de; LIRA, M. A.; OLIVEIRA, T. R. A. de. **Comportamento de Cultivares de Girassol em Consorciação com o Feijoeiro Comum no Agreste de Sergipe**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros. (Boletim de Pesquisa / Embrapa Tabuleiros Costeiros, ISSN 1678-1961, 91). 27 p., 2015.

CARVALHO, N. B.; LIMA, A. S.; SOARES, C. M. F. Uso de sílicas modificadas para imobilização de lipases. *Química Nova*, v.38, p.399-409, 2015.

CASTRO, C. de; CASTIGLIONI, V. B. R.; BALLA, A.; LEITE, R. M. V. B. de C.; KARAM, D.; MELLO, H. C.; GUEDES, L. C. A.; FARIAS, J. R. B. **A cultura do girassol**. Londrina, EMBRAPA-CNPSo. (EMBRAPA-CNPSo. Circular Técnica, 13). 36 p., 1997.

CHANDRA, R.; TAKEUCHI, H.; HASEGAWA, T. Methane production from lignocellulosic agricultural crop wastes: A review in context to second generation of biofuel production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. v.16, p.1462–1476, 2012.

CHEALI, P.; POSADA, J. A.; GERNAEY, K. V.; SIN, G. Upgrading of lignocellulosic biorefinery to value added chemicals: Sustainability and economics of bioethanol-derivatives. *Biomass and Bioenergy*. v.75, p.282–300, 2015.

CHEN, Y.; STEVENS, M. A.; ZHU, Y.; HOLMES, J.; XU, H. Understanding of alkaline pretreatment parameters for corn stover enzymatic saccharification. *Biotechnology for Biofuels*. v.6, p.1–10, 2013.

CHERUBINI, F. The biorefinery concept: Using biomass in steado foil for producing energy and chemicals. *Energy Conversion and Management*. v.51, p. 1412–1421, 2010.

CHERUBINI, F.; JUNGMEIER, G.; WELLISCH, M.; WILLKE, T.; SKIADAS, I.; VAN, R.; DEJONG, E. Modeling and Analysis: Biorefinery classification. *Biofuels, Bioproducts & Biorefining*. v.3, p.534–546, 2009.

CHERUBINI, F.; STROMMAN, A. H. Modeling and Analysis: Chemicals from lignocellulosic biomass. *Biofuels, Bioproducts & Biorefining*. v.5, p.548–561, 2011.

CHIARAMONTI, D.; PRUSSI, M.; FERRERO, S.; ORIANI, L.; OTTONELLO, P.; TORRE, P.; CHERCHI, F. Review of pretreatment processes for lignocellulosic ethanol production, and development of an innovative method. *Biomass and Bioenergy*. v.46, p. 25–35, 2012.

CHOPDA, V. R.; NAGULA, K. N.; BHAND, D. V.; PANDIT, A. B. Studying the effect of nature of glass surface on immobilization of glucose isomerase. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. v.3, p. 86–89, 2014.

CHUNG, H.; WASHBURN, N. R. Extraction and Types of Lignin. In: FARUK, O.; SAIN, M. (eds) **Lignin in Polymer Composites**, 1 ed, chap. 2, United States of America: Elsevier Incorporation, 2016.

CONAB. COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Conjuntura mensal: girassol período dezembro de 2016. Disponível em: http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/17_01_03_11_26_26_girassol_-_conjuntura_mensal_-_dezembro_de_2016-2.pdf. Acesso em: 03 de fevereiro de 2017.

COSTA-SILVA, T. A.; CARVALHO, A. K. F.; SOUZA, C. R. F.; DE CASTRO, H. F.; SAID, S.; OLIVEIRA, W. P. Enzymatic Synthesis of Biodiesel Using Immobilized Lipase on a Non-commercial Support. *Energy Fuels*, v.30, p.4820-4824, 2016.

CRISTÓVÃO, R. O.; TAVARES, A. P. M.; BRÍGIDA, A. I.; LOUREIRO, J.M.; BOAVENTURA, R. A. R.; EUGÉNIA, A. M.; COELHO, M. A. Z. Immobilization of Commercial laccase onto green coconut fiber by adsorption and its application for active textile dyes degradation. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. v.72, p.6–12, 2011.

CRISTÓVÃO, R. O.; SILVERIO, S. C.; TAVARES, A. P. M.; BRÍGIDA, A. I. S.; LOUREIRO, J. M.; BOAVENTURA, R. A. R.; EUGÉNIA, A. M.; COELHO, M. A. Z. Green coconut fiber: a novel carrier for the immobilization of commercial laccase by covalent attachment for textile dyes decolourization. *World J. Microbiol Biotechnol*. v.28, p.2827–2838, 2012.

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

DALL'AGNOL, A.; VIEIRA, O. V.; LEITE, R. M. V. B. C. Origem e histórico do girassol. In: Girassol no Brasil. Londrina: EMBRAPA/CNPS. p.1–14, 2005.

DATTA, S.; CHRISTENA, R. L.; RAJARAM, Y. R. S. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. *3 Biotech*. v.3, p.1–9, 2013.

DÍAZ, M. J.; CARA, C.; RUIZ, E.; PÉREZ-BONILLA, M.; CASTRO, E. Hydrothermal pre-treatment and enzymatic hydrolysis of sunflower stalks. *Fuel*, v.90, p.3225–3229, 2011.

DIEP, N. Q.; SAKANISHI, K.; NAKAGOSHI, N.; FUJIMOTO, S.; MINOWA, T. Potential for rice straw ethanol production in the Mekong Delta, Vietnam – Review. *Renewable Energy*. v.74, p.456–463, 2015.

DONALDSON, A. A.; KADAKIA, P.; GUPTA, M.; ZHANG, Z. Production of Energy and Activated Carbon from Agri-Residue: Sunflower Seed Example. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. v.168, p.154–162, 2012.

D'SOUZA, S. F.; GODBOLE, S. S. Immobilization of invertase on rice husk using polyethylenimine. *Journal Biochemical and Biophysical Methods*. v.52, p.59–62, 2002.

DYK, J. S. V.; PLETSCHE, B. I. A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes – Factors affecting enzymes, conversion and synergy. *Biotechnology Advances*. v.30, p.1458–1480, 2012.

EGÜÉS, I.; SANCHEZ, C.; MONDRAGON, I.; LABIDI, J. Effect of alkaline and autohydrolysis processes on the purity of obtained hemicelluloses from corn stalks. *Bioresource Technology*. v.103, p.239–248, 2012.

ES, I.; VIEIRA, J. D. G.; AMARAL, A. C. Principles, techniques, and applications of biocatalyst immobilization for industrial application. *Applied Microbiology Biotechnology*. v.99, p.2065–2082, 2015.

FAOSTAT. Food and Agriculture Organization of the United Nations Statistics Division. Statistical databases. FAO, 2016. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org>>. Acesso em: 28 de agosto de 2016.

FACHIN, D.; LOEY, A. M. V.; NGUYEN, B. L.; VERLENT, I.; INDRAWATI, M.; HEDRICKS, M. E. *Biotechnology Progress*. v.18, p.739–744, 2002.

FENGEL, D., WEGENER, G. Wood chemistry, ultrastructure, reactions. Berlin: Walter de Gruyter, 613p., 1989.

FEOLI, C. E.; INGARAMO, J. South America Perspectives on Sunflower Production and Processing. In: FORCE, E. M.; DUNFORD, N. T.; SALAS, J. J. (eds) **Sunflower: chemistry, production, processing, and utilization**, 1 ed. chap. 1, United States of America: AOCS Press, Urbana, Illinois, 2015.

FITZPATRICK, M.; CHAMPAGNE, P.; CUNNINGHAM, M. F.; WHITNEY, R. A. A biorefinery processing perspective: Treatment of lignocellulosic materials for the production of value-added products – Review. *Bioresource Technology*. v.101, p.8915–8922, 2010.

FOLLAIN, N.; SAIHAH, R.; FATYEYEVA, K.; RANDRIANANDRASANA, N.; LEBLANC, N.; MARAIS, S.; LECAMP, L. Hydrophobic surface treatments of sunflower pith using eco-friendly processes. *Cellulose*. v.22, p.245–259, 2015.

FORTUNATI, E.; PUGLIA, D.; MONTI, M.; SANTULLI, C.; MANIRUZZAMAN, M.; KENNY, J. M. Cellulose Nanocrystals Extracted from Okra Fibers in PVA Nanocomposites. *Journal Applied Polymer Science*. DOI: 10.1002/APP.38524. 2012.

FORTUNATI, E.; LUZI, F.; JIMÉNEZ, A.; GOPAKUMAR D. A.; PUGLIA, D.; THOMAS, S.; KENNY, J. M.; CHIRALT, A.; TORRE, L. Revalorization of sunflower stalks as novel sources of cellulose nanofibrils and nanocrystals and their effect on wheat gluten bionanocomposite properties. *Carbohydrate Polymers*. v.149, p.357–368, 2016.

GASPAR, M.; KALMAN G.; RECZEY, K. Corn fiber as a raw material for hemicellulose and ethanol production. *Process Biochemistry*. v.42, p.1135–1139, 2007.

GALBE, M.; ZACCH, G. Pretreatment: The key to efficient utilization of lignocellulosic materials. *Biomass and Bioenergy*. v.46, p.70–78, 2012.

GRAHAME, D. A. S.; BRYKSA, B. C.; YADA, R. Y. **Factors affecting enzyme activity. In Improving and Tailoring Enzymes for Food Quality and Functionality** / edited by Rickey Y. Yada. Elsevier Ltda, p.11–55, 2015.

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

GOLDEMBERG, J. Em Bioenergia no Estado de São Paulo; Nigro, F. E. B.; Coelho, S. T., eds.; Imprensa Oficial do Estado de São Paulo: São Paulo, 2008, p. 110; World Energy Assessment - WEA 2000; Energy and the challenge of sustainability, United Nations Development Programme, United Nations Development of Economic and Social Affairs and World Energy Council.

GOMES, F. M.; PAULA, A. V.; SILVA, G. S.; CASTRO, H. F. Determinação das propriedades

catalíticas em meio aquoso e orgânico da lipase de *Candida rugosa* imobilizada em celulignina quimicamente modificada por Carbonildiimidazol. *Química Nova*. v.29, p.710–718, 2006.

GOMEZ, L. D.; STEELE-KING, C. G.; MCQUEEN-MASON, S. J. Sustainable liquid biofuels from biomass: the writing's on the walls – Tansley review. *New Phytologist*. v.178, p.473–485, 2008.

GUAN, Y.; ZHANG, B.; QI, X-M.; PENG, F.; YAO, C-L.; SUN, R-C. Fractionation of bamboo hemicelluloses by graded saturated ammonium sulphate. *Carbohydrate Polymers*. v.129, p.201–207, 2015.

GUIMARÃES, J. L.; FROLLINI, E.; DA SILVA, C. G.; WYPYCH, F.; SATYANARAYANA, K. G. Characterization of banana, sugarcane bagasse and sponge gourd fibers of Brazil. *Industrial Crops and Products*, v.30, p.407–415, 2009.

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

GUTARRA, M. L. E.; MIRANDA, L. S. M.; SOUZA, R. O. M. A. Enzyme Immobilization for Organic Synthesis. In: GOSWAMI, A.; STEWART, J. D. (eds). **Organic Synthesis Using Biocatalysis**, cap. 4, Amsterdam: Elsevier Incorporation, 2016.

HABIBI, Y.; LUCIA, L. A.; ROJAS, O. J. Cellulose nanocrystals: Chemistry, self assembling, and applications. *Chemical Reviews*, v.110, p.3479–3500, 2010. Disponível em: <http://pubs.acs.org/doi/ipdf/10.1021/cr900339w>.

HAGHDAN, S.; RENNECKAR, S.; SMITH, G. D. Sources of Lignin. In: FARUK, O.; SAIN, M. (eds) **Lignin in Polymer Composites**, 1 ed, chap. 1, United States of America: Elsevier Incorporation, 2016.

HAN, Q.; JIN, Y.; JAMEEL, H.; CHANG, H.; PHILLIPS, R.; PARK, S. Autohydrolysis Pretreatment of Waste Wheat Straw for Cellulosic Ethanol Production in a Co-located Straw Pulp Mill. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. v.175, p.1193–1210, 2015.

HARUN, M. Y.; DAYANGRADIAH, A. B.; ZAINALABIDIN, Z.; YUNUS, R. Effect of physical pretreatment on dilute acid hydrolysis of water hyacinth (*Eichhornia crassipes*). *Bioresource Technology*. v.102, p.5193–5199, 2011.

HASUNUMA, T.; OKAZAKI, F.; OKAI, N.; HARA, K. Y.; ISHII, J.; KONDO, A. A Review of enzymes and microbes for lignocellulosic biorefinery and the possibility of their application to consolidated bioprocessing technology. *Bioresource Technology*, v.135, p.513–522, 2013.

HEGGSET, E. B.; SYVERUD, K.; ØYAAS, K. Novel pretreatment pathways for dissolution of lignocellulosic biomass based on ionic liquid and low temperature alkaline treatment. *Biomass and Bioenergy*. v.93, p.194–200, 2016.

HENDRIKS, A. T. W. M.; ZEEMAN, G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass – Review. *Bioresource Technology*. v. 100, p. 10–18, 2009.

HE, Y.; PANG, Y.; LIU, Y.; LI, X.; WANG, K. Physicochemical Characterization of Rice Straw Pretreated with Sodium Hydroxide in the Solid State for Enhancing Biogas Production. *Energy & Fuels*. v.22, p.2775–2781, 2008.

HO, L. F.; LI, S. Y.; LIN, S. C.; WEN-HWEI, H. Integrated enzyme purification and immobilization processes with immobilized metal affinity adsorbents. *Process Biochemistry*. v.39, p.1573–1581, 2004.

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

HOWARD, R. L., ABOTSI, E., VAN RENSBURG, E. J., HOWARD, S. Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. *African Journal of Biotechnology*, v.2, p.602–619, 2003.

HUANG, L.; CHENG, Z-M. Immobilization of lipase on chemically modified bimodal ceramic foams for olive oil hydrolysis. *Chemical Engineering Journal*. v.144, p.103-109, 2008.

HUANG, X. J.; CHEN, P. C.; HUANG, F.; OU, Y.; CHEN, M. R.; XU, Z. K. Immobilization

of *Candida rugosa* lipase on electrospun cellulose nanofiber membrane. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. v.70, p.95–100, 2011.

HUANG, R.; WU, M.; GOLDMAN, M. J.; LI, Z. Encapsulation of enzyme via one-step template-free formation of stable organic–inorganic capsules: a simple and efficient method for immobilizing enzyme with high activity and recyclability. *Biotechnology and Bioengineering*, v.112, p.1092–1101, 2015.

HUDSON, S.; COONEY, J.; MAGNER, E. Proteins in mesoporous silicates. *Angew Chem*. v.47, p.8582–8594, 2008.

HU, F.; RAGAUSKAS, A. Pretreatment and Lignocellulosic Chemistry. *Bioenergy Resource*. v.5, p.1043–1066, 2012.

IBRAHIM, M. M.; EL-ZAWAWY, W. K.; ABDEL-FATTAH, Y. R.; SOLIMAN, N. A.; AGBLEVOR, F. A. Comparison of alkaline pulping with steam explosion for glucose production from rice straw. *Carbohydr Polym*. v.83, p.720–726, 2011.

IMMAN, S.; ARNTHONG, J.; BURAPATANA, V.; CHAMPREDA, V.; LAOSIRIPOJANA, N. Influence of alkaline catalyst addition on compressed liquid hot water pretreatment of rice straw. *Chemical Engineering Journal*. v.278, p.85–91, 2015.

IROBA, K. L.; TABIL, L. G.; SOKHANSANJ, S.; DUMONCEAUX, T. Pretreatment and fractionation of barley straw using steam explosion at low severity factor. *Biomass and Bioenergy*. v.66, p.286–300, 2014.

ITTRAT. P.; CHACHO, T.; PHOLPRAYOON, J.; SUTTIWARAYANON, N.; CHAROENPANICH, J. Application of agriculture waste as a support for lipase immobilization - Original Research Paper. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. v.3, p.77–82, 2014.

JEGANNATHAN, K. R.; ABANG, S.; PONCELET, D.; CHAN, E. S.; RAVINDRA, P. Production of biodiesel using immobilized lipase-a critical review. *Critical Reviews in Biotechnology*. v.28, p.253–264, 2008.

JEONG, S-Y.; LEE, J-W. Hydrothermal Treatment. In: PANDEY, A.; NEGI, S.; BINOD, P.; LARROCHE, C. (eds) **Pretreatment of Biomass - Processes and Technologies**. 1ed, chap 5. Amsterdam, Netherland. Elsevier B. V., 2015.

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

JIA, F.; NARASIMHAN, B.; MALLAPRAGADA, S. Materials-Based Strategies for Multi-Enzyme Immobilization and Co-Localization: A Review. *Biotechnology and Bioengineering*, v.111, p.209-222, 2014.

JOCIC, S.; MILADINOVIC, D.; KAYA, Y. Breeding and Genetics of Sunflower. In: FORCE, E. M.; DUNFORD, N. T.; SALAS, J. J. (eds). **Sunflower: chemistry, production, processing, and utilization**, 1 ed, chap. 1, United States of America: AOCS Press, Urbana, Illinois, 2015.

JOHN, F.; MONSALVE, G.; MEDINA, P. I. V.; RUIZ, C. A. A. Ethanol production of Bananas hell and cassava starch. *Dyna, Universidad Nacional de Colombia*, v. 73, p. 21 - 27, 2006.

JÚNIOR, D. L.; COLODETTE, J. L. Remoção de hemiceluloses da madeira por tratamento de auto-hidrólise. *Ciência Florestal*, v.21, p.541–550, 2011.

JUNIOR, C. S.; MILAGRES, A. M. F.; FERRAZ, A.; CARVALHO, W. The effects of lignin removal and drying on the porosity and enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse. *Cellulose*. v.20, p.3165–3177, 2013.

JÖNSSON, L. J.; MARTÍN, C. Pretreatment of lignocellulose: Formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects – Review. *Bioresource Technology*. v.199, p.103–112, 2016.

KAMORI, M.; HORI, T.; YAMASHITA, Y.; HIROSE, Y.; NAOSHIMA, Y. Immobilization of lipase on a new inorganic ceramics support, toyonite, and the reactivity and enantioselectivity of the immobilized lipase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. v.9, p.269–274, 2000.

KANDASAMY, R.; KENNEDY, L. J.; VIDYA, C.; BOOPATHY, R.; SEKARAN, G. Immobilization of acidic lipase derived from *Pseudomonas gessardii* onto mesoporous activated carbon for the hydrolysis of olive oil. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. v.62, p.59–66, 2010.

KATARIA, R.; GHOSH, S. NaOH Pretreatment and Enzymatic Hydrolysis of *Saccharum spontaneum* for Reducing Sugars Production. *Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects*. v.36, p.1028–1035, 2014.

KATO, D. M.; ELIA, N.; FLYTHE, M.; LYNN, B. C. Pretreatment of lignocellulosic biomass using Fenton chemistry. *Bioresource Technology*. v.162, p.273–278, 2014.

KAWAGUCHI, H.; HASUNUM, T.; OGINO, C.; KONDO, A. Bioprocessing of bio-based chemicals produced from lignocellulosic feedstocks. *Current Opinion in Biotechnology*. v.42, p.30–39, 2016.

KAUR, S.; DHILLON, G. S.; SARMA, S. J.; BRAR, S. K.; MISRA, K.; OBEROI, H. S. **Waste Biomass: A Prospective Renewable Resource for Development of Bio-Based Economy/Processes** In: BRAR, S. K.; DHILLON, G. S.; SOCCOL, C. R. (eds). *Biotransformation of Waste Biomass into High Value Biochemicals*, 1ed, chap. 1, New York: Springer Singapore, 2014.

KRAJEWSKA, B. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. *Enzyme and Microbial Technology*. v.35, p.126–139, 2004.

KHARRAT, N.; ALI, Y. B.; MARZOUK, S.; GARGOURI, Y.; KARRA-CHÂABOUNI, M. Immobilization of *Rhizopus oryzae* lipase on silica aerogels by adsorption: Comparison with the free enzyme. *Process Biochemistry*. v.46, p.1083–1089, 2011.

KHOO, H. H.; EE, W. L.; ISONI, V. Bio-chemicals from lignocellulose feedstock: sustainability, LCA and the green conundrum. *Green Chemistry*. v.18, p.1912–1922, 2016.

KIM, M.; DAY, D. F. Composition of sugar cane, energy cane, and sweet sorghum suitable for ethanol production at Louisiana sugar mills. *Journal of Industrial Microbiology &*

Biotechnology, v.38, p.803-807, 2011.

KIM, S. B.; PARK, C.; KIM, S. W. Process design and evaluation of production of bioethanol and b-lactamanti biotic from lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*. v.172, p.194–200, 2014.

KIM, J. S.; LEE, Y. Y.; KIM, T. H. A review on alkaline pretreatment technology for bioconversion of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*. v.199, p.42–48, 2016.

KLEIN, M; P.; SCHEEREN, C. W.; LORENZONI, A. S. G.; DUPONT, J.; FRAZZON, J.; HERTZ, P. F. Ionic liquid-cellulose film for enzyme immobilization. *Process Biochemistry*. v.46, p.1375–1379, 2011.

KUMAR, R.; MAGO, G.; VENKATESH BALAN, V.; WYMAN, C. E. Physical and chemical characterizations of corn stover and poplar solids resulting from leading pretreatment technologies. *Bioresource Technology*, v.100, p.3948–3962, 2009.

LAURICHESSE, S.; AVÉROUS, L. Chemical modification of lignins: Towards biobased polymers. *Progress in Polymer Science*. v.39, p.1266–1290, 2014.

LAZZAROTTO, J. J.; ROESSING, A. C.; MELIO, H. C. **O agronegócio do girassol no mundo e no Brasil**. In: Girassol no Brasil. EMBRAPA Soja, p.14–42, 2005.

LI, C.; KNIERIM, B.; MANISSERI, C.; ARORA, R.; SCHELLER, H. V.; AUERA, M.; VOGEL, K. P.; SIMMONS, B. A; SINGH, S. Comparison of dilute acid and ionic liquid pretreatment of switch grass: Biomass recalcitrance, delignification and enzymatic saccharification. *Bioresource Technology*. v.101, p.4900–4906, 2010.

LI, H.; LI, C.; LIU, W.; ZOU, S. Optimized alkaline pretreatment of sludge before anaerobic digestion. *Bioresource Technology*, v.123, p.189–194, 2012.

LI, X.; LU, J.; ZHAO, J.; QU, Y. Characteristics of Corn Stover Pretreated with Liquid Hot Water and Fed-Batch Semi-Simultaneous Saccharification and Fermentation for Bioethanol Production. *PLoS ONE* 9(4): e95455. Doi:10.1371/journal.pone.0095455. 2014.

LIU, C. H.; LIN, Y. H.; CHEN, C. Y.; CHANG, J. S. Characterization of *Burkholderia* lipase immobilized on celite carriers. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, v.40, p.359–363, 2009.

LIU, S.; LUC, H.; HU, R.; SHUPE, A.; LIN, L.; LIANG, B. A sustainable woody biomass biorefinery. *Biotechnology Advances*. v.30, p.785–810, 2012.

LV, J. S.; LIU, X. Y.; DENG, Y. F.; WU, Z.; WANGA, Y. M.; FAN, M. Y.; XU, H. Preparation and properties of adsorption material from corn stalks core when used for enzyme immobilization and the subsequent activities of the adsorbed enzymes. *Industrial Crops and Products*. v.50, p.787–796, 2013.

LV, Y.; LIN, Z.; TAN, T.; SVEC, F. Preparation of Reusable Bioreactors Using Reversible Immobilization of Enzyme on Monolithic Porous Polymer Support With Attached Gold Nanoparticles. *Biotechnology and Bioengineering*. v.111, p.50–58, 2014.

MAHESH, M.; ARIVIZHIVENDHAN, K.V.; MAHARAJA, P.; BOOPATHY, R.; HAMSAVATHANI, V. SEKARAN, G. Production, purification and immobilization of pectinase from *Aspergillus ibericus* onto functionalized nanoporous activated carbon (FNAC) and its application on treatment of pectin containing wastewater. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. v.133, p.43–54, 2016.

MAITY, S. K. Opportunities, recent trends and challenges of integrated biorefinery: Part I. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. v.43, p.1427–1445, 2015.

MALHERBE, S.; CLOETE, T. E. Lignocellulose biodegradation: fundamentals and applications. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, v.1, p.105–114, 2002.

MARCHIS, T.; CERRATO, G.; MAGNACCAA, G.; CROCELLÀ, V.; LAURENTI, E. Immobilization of soybean peroxidase on aminopropyl glass beads: Structural and kinetic studies. *Biochemical Engineering Journal*. v.67, p.28–34, 2012.

MARINOV, I.; GABROVSKA, K.; VELICHKOVA, J.; GODJEVARGOVA, T. Immobilization of acetylchol in esterase on nanostructure polyacrylonitrile membranes.

International Journal of Biological Macromolecules. v.44, p.338–345, 2009.

MARTINS, S. R. S.; SANTOS, A.; FRICKS, A. T.; LIMA, A. S.; MATTEDI, S.; SILVA, D. P.; SOARES, C. M. F.; CABRERA-PADILLA, R. Y. Protic ionic liquids influence on immobilization of Lipase *Burkholderia cepacia* on hybrid supports. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 2016. Doi: 10.1002/jctb.5044.

MATEO, C.; PALOMO, J. M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUISAN, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques - Review. *Enzyme and Microbial Technology*. v.40, p.1451–1463, 2007.

MAURYA, D. P.; SINGLA, A.; NEGI, S. An overview of key pretreatment processes for biological conversion of lignocellulosic biomass to bioethanol. *3 Biotech*, 5:597, 2015. DOI 10.1007/s13205-015-0279-4.

MCKENDRY, P. Energy production from biomass (part 1): overview of biomass. *Bioresource Technology*, v.83, p.37–46, 2002.

MCINTOSH, S.; VANCOV T. Enhanced enzyme saccharification of sorghum bicolor straw using dilute alkali pretreatment. *Bioresource Technology*, v.101, p.6718–6727, 2010.

MEDINA, J. D. C.; WOICIECHOWSKI, A.; FILHO, A. Z.; NOSEDA, M. D.; KAUR, B. S.; SOCCOL, C. R. Lignin preparation from oil palm empty fruit bunches by sequential acid/alkaline treatment – A biorefinery approach. *Bioresource Technology*. v.194, p.172–178, 2015.

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

MENDES, A. A.; CASTRO, H. F.; GIORDANO, R. L. C. Triagem de suportes orgânicos e protocolos de ativação na imobilização e estabilização de lipase de *Thermomyces lanuginosus*.

Quimica Nova. v.36, p.245-251, 2013.

MENON, V.; RAO, M. Review: Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals and biorefinery concept. *Progress in Energy and Combustion Science*. v.38, p.522–550, 2012.

MITCHELL, S.; PÉREZ-RAMÍREZ, J. Mesoporous zeolites as enzyme carriers: Synthesis, characterization, and application in biocatalysis. *Catalysis Today*. v.168, p.28–37, 2011.

MIGNEAULT, C.; DARTIGUENAVE, M. J.; BERTRAND, K. C. Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. *Biotechniques*. v.37, p.790–802, 2004.

MILETIC, N.; NASTASOVIC, A.; LOOS, K. Immobilization of biocatalysts for enzymatic polymerizations: Possibilities, advantages, applications. *Bioresource Technology*. v.115, p.126–135, 2012.

MIRANDA, A. S.; MIRANDA, L. S. M.; SOUZA, R. O. M. A. Lipases: Valuable catalysts for dynamic kinetic resolutions – review. *Biotechnology Advances*. v.33, p.372–393, 2015.

MOOD, S. H.; GOLFESHAN, A. H.; TABATABAEI, M.; JOUZANI, G. S.; NAJAFI, G. H.; GHOLAMIB, M.; ARDJMAND, MEHDI. Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. v.27, p.77–93, 2013.

MIN, K.; YOO, Y. J. Recent Progress in Nanobiocatalysis for Enzyme Immobilization and Its Application. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. v.19, p.553–567, 2014.

MIRMOHAMADSADEGHI, S.; CHEN, Z.; WAN, C. Reducing Biomass Recalcitrance via Mild Sodium Carbonate Pretreatment. *Bioresource Technology*, v.209, p.386–390, 2016.

MOHAMAD, R. N.; MARZUKI, N. H. C.; BUANG, N. A.; HUYOP, F.; WAHA, R. A. An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. v.29, p.205–220, 2015.

MOHANTY, A. K.; MISRA, M.; DRZAL, L. T. Surface modifications of natural fibers and performance of the resulting biocomposites: An overview. *Composite Interfaces*, v.8, p.313–343, 2001.

MONIER, M.; WEI, Y.; SARHAN, A. A. Evaluation of the potential of polymeric carriers based on photo-crosslinkable chitosan in the formulation of lipase from *Candida rugosa* immobilization. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. v.63, p.93–101, 2010.

MONLAU, F.; BARAKAT, A.; STEYER, J. P.; CARRERE, H. Comparison of seven types of thermo-chemical pretreatments on the structural features and anaerobic digestion of sunflower stalks. *Bioresource Technology*. v.120, p.241–247, 2012.

MUSSATO, S. I.; AGUILAR, C. N.; RODRIGUES, L. R.; TEIXEIRA, J. A. Fructooligosaccharides and b-fructofuranosidase production by *Aspergillus japonicus* immobilized on lignocellulosic materials. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. v.59, p.76–81, 2009.

NATIONAL RENEWABLE ENERGY LABORATORY (NREL). Chemical Analysis and Testing Laboratory Analytical Procedures: LAP-002 (1996), LAP-003 (1995), LAP - 004 (1996), LAP-005 (1994), LAP-010 (1994) and LAP 017 (1998). NREL, Golden, CO, USA. <http://www.eere.energy.gov/biomass/analyticalprocedures.html>.

NEGRO, M. J.; MANZANARES, P.; OLIVA, J.M.; BALLESTEROS, I.; BALLESTEROS, M. Changes in various physical/chemical parameters of *Pinus pinaster* wood after steam explosion pretreatment. *Biomass and Bioenergy*. v.25, p.301–308, 2013.

NORGREN, M.; EDLUND, H. Lignin: Recent advances and emerging applications. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. v.19, p.409–416, 2014.

OLIVEIRA, I. R.; CARVALHO, H. W. L.; CARVALHO, C. G. P.; MELO, K. E.; FEITOSA, L. F.; MENEZES, A. F. **Avaliação de cultivares de girassol no estado de Sergipe**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros. (Embrapa Tabuleiros Costeiros. Circular Técnica, ISSN 1678-1945, 53). 5 p. 2008.

OLIVEIRA, M. V. S.; DA RÓS, P. C. M.; MATTEDI, S.; CASTRO, H. F.; SOARES, C. M. F.; LIMA, A. S. Transesterification of babassu oil catalyzed by *Burkholderia Cepacia* encapsulated in sol-gel matrix imploing protic ionic liquid as an additive. *Acta Scientiarum*. v.36, p.445–451, 2014.

ORREGO, C. E.; SALGADO, N.; VALENCIA, J. S.; GIRALDO, G. I.; GIRALDO, O. H.; CARDONA, C. A. Novel chitosan membranes as support for lipases immobilization: Characterization aspects. *Carbohydrate Polymers*. v.79, p.9–16, 2010.

OVEREND, R. P., CHORNET, E. Fractionation of lignocellulosics by steam-aqueous pretreatments. *Philosophical Transactions of The Royal Society Lond.* A321, p. 523–536. 1987.

PALMQVIST, E.; HAHN-HAGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: Inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresource Technology*. v.74, p.25–33, 2000.

PANG, C. H.; GADDIPATTI, S.; TUCKER, G.; LESTER, E.; WU, T. Relation ship between thermal behaviour of lignocellulosic components and properties of biomass. *Bioresource Technology*. v.172, p.312–320, 2014.

PALOMO, J. M.; ORTIZ, C.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; FUENTES, M.; GUISAN, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Lipase–lipase interactions as a new tool to immobilize and modulate the lipase properties. *Enzyme and Microbial Technology*. v.36, p.447–454, 2005.

PARK, S.; KIM, S. H.; KIM, J. H.; YU, H.; KIM, H. J.; YANG, Y.; KIM, H.; KIM, Y. H.; HA, S. H.; LEE, S. H. Application of cellulose/lignin hydrogel beads as novel supports for immobilizing lipase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. v.119, p.33–39, 2015.

PASANGULAPATI, V.; RAMACHANDRIYA, K. D.; AJAY KUMAR, A.; WILKINS, M. R.; JONES, C. L.; HUHNKE, R. L. Effects of cellulose, hemicellulose and lignin on thermochemical conversion characteristics of the selected biomass. *Bioresource Technology*. v.114, p.663–669, 2012.

PENG, F.; PENG, P.; XU, F.; SUN, R-C. Fractional purification and bioconversion of

hemicelluloses - Research review paper. *Biotechnology Advances*. v.30, p.879–903, 2012.

PENG, P.; SHE, D. Isolation, structural characterization, and potential applications of hemicelluloses from bamboo: A review. *Carbohydrate Polymers*. v.112, p.701–720, 2014.

PEREIRA JÚNIOR, N. **Biorrefinarias – Rotas Bioquímicas**. In: *Química verde no Brasil: 2010-2030*. 2. ed. Brasília, DF: Centro de Gestão e Estudos Estratégicos, 2010.

PEREIRA, P. H. F.; VOORWALD, H. C. J. CIOFFI, M. O. H. Preparação e Caracterização de Materiais Híbridos Celulose/ NbOPO₄.nH₂O a partir de Celulose Branqueada de Bagaço de Cana-de-Açúcar. *Polímeros*. v.22, p.88–95, 2012.

PHITSUWAN, P.; SAKKA, K.; RATANAKHANOKCHAI, K. Improvement of lignocellulosic biomass in planta: A review of feedstocks, biomass recalcitrance, and strategic manipulation of ideal plants designed for ethanol production and processability. *Biomass and Bioenergy*. v.58, p.390–405, 2013.

PORTACCIO, M.; DELLA VENTURA, B.; MITA, D. G.; MANOLOVA, N.; STOILOVA, O.; RASHKOV, I.; LEPORE, M. FT-IR microscopy characterization of sol–gel layers prior and after glucose oxidase immobilization for biosensing applications. *Journal Sol-Gel Science Technology*. v.57, p.204–211, 2011.

POSPISKOVA A, K.; SAFARIK, I. Magnetically modified spent grain as a low-cost, biocompatible and smart carrier for enzyme immobilization. *Journal Science Food Agric*. v.93, p. 1598–1602, 2013.

PRASSAD, S.; SINGH, A.; JOSHI, H. C. Ethanol as an alternative fuel from agricultural, industrial and urban residues. *Resources, Conservation and Recycling*, v. 50, p.1-39, 2007.

RABELO, S. C.; FILHO, R. M.; COSTA, A. C. Lime Pretreatment and Fermentation of Enzymatically Hydrolyzed Sugarcane. *Applied Biochemical Biotechnology*. v.169, p.1696–1712, 2013.

RABEMANOLONTSOA, H.; SAKA, S. Various pretreatments of lignocellulosics – Review. *Bioresource Technology*. v.199, p.83–91, 2016.

RABETAFIKA, H. N.; BCHIR, B.; BLECKER, C.; PAQUOT, M.; WATHELET, B. Comparative study of alkaline extraction process of hemicelluloses from pear pomace. *Biomass and Bioenergy*. v.61, p.254–264, 2014.

RAHMAN, M. M.; KHAN, M. A. Surface treatment of coir (*Cocos nucifera*) fibers and its influence on the fibers' physico-mechanical properties. *Composites Science and Technology*. v.67, p.2369–2376, 2007.

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

RAMBO, M. K. D.; SCHMIDT, F. L.; FERREIRA, M. M. C. Analysis of the lignocellulosic components of biomass residues for biorefinery opportunities. *Talanta* v.144, p.696–670, 2015.

RAMOS, L. P. The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials. *Química Nova*, v.26, p.863–871, 2003.

RAVINDRAN, R.; JAISWAL, A. K. A comprehensive review on pre-treatment strategy for lignocellulosic food industry waste: Challenges and opportunities – Review. *Bioresource Technology*. v.99, p.92–102, 2016.

RODRIGUES, R. C.; GODOY, C. A.; VOLPATO, G.; AYUB, M. A. Z.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUIBAN, J. M. Immobilization–stabilization of the lipase from *Thermomyces lanuginosus*: Critical role of chemical amination. *Process Biochemistry*. v.44, p.963–968, 2009.

ROMDHANE, I. B. B.; ROMDHANE, Z. B.; GARGOURI, A.; BELGHITH, H. Esterification activity and stability of *Talaromyces thermophilus* lipase immobilized onto chitosan. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. v.68, p.230–239, 2011.

RUDI, H.; RESALATI, H.; ESHKIKI, R. B.; KERMANIAN, H. Sunflower stalk neutral sulfite semi-chemical pulp: an alternative fiber source for production of fluting paper. *Journal of Cleaner Production*. v.127, p.562-566, 2016.

RUIZ, E.; CARA, C.; MANZANARES, P.; BALLESTEROS, M.; CASTRO, E. Evaluation of steam explosion pre-treatment for enzymatic hydrolysis of sunflower stalks. *Enzyme and Microbial Technology*. v.42, p.160-166, 2008.

RUIZ, H. A.; RUZENE, D. S.; SILVA, D. P.; QUINTAS, M. A. C.; F. F. M.; VICENTE, A. A.; TEIXEIRA, J. A. Evaluation of a hydrothermal process for pretreatment of wheat straw – effect of particle size and process conditions. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. v.86, p.88–94, 2010.

RUIZ, H. A.; SILVA, D. P.; RUZENE, D. S.; SILVA, F. F. M.; VICENTE, A. A.; TEIXEIRA, J. A. Development and Characterization of an Environmentally Friendly Process Sequence (Autohydrolysis and Organosolv) for Wheat Straw Delignification. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. v.164, p.629–641, 2011.

RUIZ, E.; ROMERO, I.; MOYA, M.; CARA, C.; VIDAL, J. D.; CASTRO, E. Dilute sulfuric acid pretreatment of sunflower stalks for sugar production. *Bioresource Technology*. v.140, p.292–298, 2013.

RUZENE, D. S.; SILVA, D. P.; VICENTE, A. A.; GONÇALVES, A. R.; TEIXEIRA, J. A. An Alternative Application to the Portuguese Agro-Industrial Residue: Wheat Straw. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. v.147, p.85–96, 2008.

SAIAH, R.; SREEKUMAR, P. A.; GOPALAKRISHNAN, P.; LEBLANC, N.; GATTIN, R.; SAITER, J. M. Fabrication and characterization of 100 % green composite: thermoplastic based on wheat flour reinforced by flax fibers. *Polymers Composite*. v.30, p.1595–1600, 2009.

SAINI, J. K.; SAINI, R.; TEWARI, L. Lignocellulosic agriculture wastes as biomass feedstocks for second-generation bioethanol production: concepts and recent developments. *3 Biotech*. 5:337, 2014. DOI 10.1007/s13205-014-0246-5.

SALAS, J. J.; MARTÍNEZ-FORCE, E.; HARWOOD, J. L.; VENEGAS-CALERÓN, M.; AZNAR-MORENO, J. A.; MORENO-PÉREZ, A. J.; RUÍZ-LÓPEZ, N.; SERRANO-VEGA, M. J.; GRAHAM, I. A.; MULLEN, R. T.; GARCÉS, R. Biochemistry of high stearic sunflower, a new source of saturated fats. *Progress in Lipid Research*. v.55, p.30–42, 2014

SALEHIAN, P.; KARIMI, K. Alkali Pretreatment for Improvement of Biogas and Ethanol Production from Different Waste Parts of Pine Tree. *Industrial & Engineering Chemistry Research*. v.52, p.972–978, 2013.

SAMBUSITI, C.; FICARA, E.; MALPEI, F.; STEYER, J. P.; CARRÈRE, H. Influence of alkaline pre-treatment conditions on structural features and methane production from ensiled sorghum forage. *Chemical Engineering Journal*. v.211–212, p.488–492, 2012.

SAMBUSITI, C.; FICARA, E.; MALPEI, F.; STEYER, J. P.; CARRÈRE, H. Effect of sodium hydroxide pretreatment on physical, chemical characteristics and methane production of five varieties of sorghum. *Energy*. v.55, p.449-456, 2013.

SANTOS, D. T.; SARROUH, B. F.; RIVALDI, J. D.; CONVERTI, A.; SILVA, S. S. Use of sugarcane bagasse as biomaterial for cell immobilization for xylitol production. *Journal of Food Engineering*. v.86, p.542–548, 2008.

SANTOS, M. L.; LIMA, O. J.; NASSAR, E. J.; CIUFFI, K. J.; CALEFI, P. S. Estudo das condições de estocagem do bagaço de cana-de-açúcar por análise térmica. *Química Nova*. v.34, p.507-511, 2011

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

SANTUCCI, B. S.; MAZIERO, P.; RABELO, S. C.; CURVELO, A. A. S.; PIMENTA, M. T. B Autohydrolysis of Hemicelluloses from Sugarcane Bagasse During Hydrothermal Pretreatment: a Kinetic Assessment. *Bioenergy Resource*. Doi 10.1007/s12155-015-9632-z. 2015.

SAWATDENARUNAT, C.; SURENDRA, K. C., TAKARA, D.; OECHSNER, H.; KHANAL, S. K. Anaerobic digestion of lignocellulosic biomass: Challenges and opportunities – Review. *Bioresource Technology*. v.178, p.178-186, 2015.

SEGAL, L.; CREELY, J. J.; MARTIN JR, A. E.; CONRAD, C. M. An Empirical Method for Estimating the Degree of Crystallinity of Native Cellulose Using the X-Ray Diffractometer Textile. *Research Journal*. v.29, p.786–794, 1959.

SCHERER, R. P.; DALLAGO, R. L.; PENNA, F. G.; BERTELLA, F.; OLIVEIRA, D.; OLIVEIRA, J. V.; PERGHER, S. B. C. Influence of process parameters on the immobilization of commercial porcine pancreatic lipase using three low-cost supports. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. v.1, p.290–294, 2012.

SHAMSUDIN, S.; SHAH, U. K. M.; ZAINUDIN, H.; ABD-AZIZ, S.; KAMAL, S. M. M.; SHIRAI, Y.; HASSAN, M. A. Effect of steam pretreatment on oil palm empty fruit bunch for the production of sugars. *Biomass and Bioenergy*. v.36, p.280-288, 2012.

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

SHARMA, S. K.; KALRA K. L.; GREWAL, H. S. Fermentation of enzymatically saccharified sunflower stalks for ethanol production and its scale up. *Bioresource Technology*. v.85, p.31–33, 2002.

SHARMA, S. K.; KALRA, K. L.; KOCHER, G. S. Fermentation of enzymatic hydrolysate of sunflower hulls for ethanol production and its scale-up. *Biomass and Bioenergy*, v.27. p.399–402, 2004.

SHARMA, N.; NAINWAL, S.; JAIN, S.; JAIN, S. Emerging biorefinery technologies for Indian forest industry to reduce GHG emissions. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. v.121, p.105–109, 2015.

SHELDON, R. A. Enzyme immobilization: the quest for optimum performance. *Advanced Synthesis & Catalysis*. v.349, p.1289–1307, 2007.

SHELDON, R. A.; PELT, S. V. Enzyme immobilization in biocatalysis: why, what and how. *Chemical Society Reviews*. v.42, p.6223–6235, 2013

SHI, J.; PATTATHIL, S.; RAMAKRISHNAN, P.; ANDERSON, N.; KIM, J. I.; VENKATACHALAM, S.; HAHN, M. G.; CHAPPLE, C.; SIMMONS, B.; SINGH, S. Impact of engineered lignin composition on biomass recalcitrance and ionic liquid pretreatment efficiency. *Green Chemistry*. v.18, p.4884–4895, 2016.

SILLS, D. L.; GOSSETT, J. M. Assessment of commercial hemicellulases for saccharification of alkaline pretreated perennial biomass. *Bioresource Technology*. v.102, p.1389–1398, 2011.

SILVA, A. M. S.; TAVARES, A. P. M.; ROCHA, C. M. R.; CRISTÓVÃO, R. O.; TEIXEIRA, J. A.; MACEDO, E. A. Immobilization of commercial laccase on spent grain. *Process Biochemistry*. v.47, p.1095–1101, 2012.

SILVERSTEIN, R. A.; CHEN, Y.; SHARMA-SHIVAPPA, R. R.; BOYETTEA, M. D.; OSBORNE, J. A comparison of chemical pretreatment methods for improving saccharification of cotton stalks. *Bioresource Technology*. v.98, p.3000–3011, 2007.

SINDHU, R.; PANDEY, A.; BINOD, P. Alkaline Treatment. In: PANDEY, A.; NEGI, S.; BINOD, P.; LARROCHE, C. (eds) **Pretreatment of Biomass - Processes and Technologies**. 1ed, chap 4. Amsterdam, Netherland: Elsevier B. V., 2015.

SINGH, J.; SUHAG, M.; DHAKA, A. Augmented digestion of lignocellulose by steam explosion, acid and alkaline pretreatment methods: A review. *Carbohydrate Polymers*. v.117, p.624–631, 2015.

SIRISHA, V. L.; ANKITA JAIN, A.; JAIN, A. Enzyme Immobilization: An Overview on Methods, Support Material, and Applications of Immobilized Enzymes. *Advances in Food and Nutrition Research*. v.79, p.179–211, 2016.

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

SOARES, C. M. F.; SANTANA, M. H. A.; ZANIN, G. M.; DE CASTRO, H. F. Efeito do polietilenoglicol e da albumina na imobilização de lipase microbiana e na catálise em meio orgânico. *Química Nova*. v.26, p.832–838, 2003.

SONG, Y.; ZHANG, J.; ZHANG, X.; TAN, T. The correlation between cellulose allomorphs (I and II) and conversion after removal of hemicellulose and lignin of lignocellulose. *Bioresource Technology*. v.193, p.164–170, 2015.

SOREK, N.; YEATS, T. H.; SZEMENYEI, H.; YOUNGS, H.; SOMERVILLE, C. R. The implications of lignocellulosic biomass chemical composition for the production of advanced biofuels. *BioScience*. v.64, p.192–201, 2014.

SOTO, M. L.; DOMINGUEZ, H.; NTIFIEZ, M. J.; LEMA, J. M. Enzymatic saccharification of alkali-treated sunflower hulls. *Bioresource Technology*. v.49, p.53–59, 1994.

SOUZA, T. C.; FONSECA, T. S.; COSTA, J. A.; ROCHA, M. V. P.; MATTOS, M. C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; LUCIANA R. B. G.; SANTOS, J. C. S. Cashew apple bagasse as a support for the immobilization of lipase B from *Candida antarctica*: Application to the chemoenzymatic production of (*R*)-Indanol. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. v.130, p.58–69, 2016.

SPIRIDON, I.; DARIE-NITA, R. N.; HITRUC, G. E.; LUDWICZAK, J.; CIANGA SPIRIDON, I. A.; NICULAUA, M. New opportunities to valorize biomass wastes into green materials. *Journal of Cleaner Production*. v.133, p.235–242, 2016.

SUN, S-N.; CAO, X-F.; LI, H-Y.; Xu, F.; SUN, R-C. Structural characterization of residual hemicelluloses from hydrothermal pretreated Eucalyptus fiber. *International Journal of Biological Macromolecules*. v.69, p.158–164, 2014.

SUN, H.; MIAO, J.; YU, Y.; ZHANG, L. Dissolution of cellulose with a novel solvent and formation of regenerated cellulose fiber. *Applied Physics A*. v.119, p.539–546, 2015.

SUN, S.; SUN, S.; CAO, X.; SUN, R. The role of pretreatment in improving the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials – Review. *Bioresource Technology*. v.199, p.49–58,

2016.

TAHERZADEH, M. J.; KARIMI, K. Enzymatic-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: A review. *BioResources*. v.2, p.707–738, 2007.

TEIXEIRA, R. S. S.; SILVA, A. S.; MOUTTA, R. O.; FERREIRA-LEITÃO, V. S.; BARROS, R. R. O.; FERRARA, A. M.; BOM, E. P. S. Biomass pretreatment: a critical choice for biomass utilization via biotechnological routes. *BMC Proceedings*. v.8 (Suppl 4):O34, p.1–3, 2014.

TELLI-OKUR, M.; EKEN-SARAÇOĞLU, N. Fermentation of sunflower seed hull hydrolysate to ethanol by *Pichia stipites*. *Bioresource Technology*, v.99, p.2162–2169, 2008.

THOMAS, D.; OCTAVE, S. Biorefinery: toward an industrial metabolism. *Biochimie*, v.21, p.300-303, 2009.

TOLK, J. A.; HOWELL, T. A. Sunflower water productivity in four Great Plains soils. *Field Crops Research*. v.127, p.120–128, 2012.

TOMAS, M.; PAGANI, M. A.; ANDREO, C. S.; CAPDEVILA, M.; ATRIAN, S.; BOFILL, R. Sunflower metallothionein in family characterisation. Study of the Zn (II)- and Cd (II)-binding abilities of the HaMT1 and HaMT2 isoforms. *Journal of Inorganic Biochemistry*. v.148, p.35–48, 2015.

TRODLER, P.; SCHMID, R. D.; PLEISS, J. Modeling of solvent-dependent conformational transitions in *Burkholderia cepacia* lipase. *BMC Structural Biology*. v.9:38, p.1–13, 2009.

VANHAVEREN J.; SCOTT, E.L.; SANDERS, J. Bulk chemicals from biomass. *Biofuels, Bioproducts & Biorefining*. v.2, p.41–57, 2008.

VASCONCELLOS, A.; PAULA, A. S.; LUIZON FILHO, R. A.; FARIAS, L. A.; GOMES, E.; ARANDA, D. A.G.; NERY, J. G. Synergistic effect in the catalytic activity of lipase *Rhizomucor miehei* immobilized on zeolites for the production of biodiesel. *Microporous and Mesoporous Materials*. v.163, p.343–355, 2012.

VIANELLO, F.; ZENNARO, L.; DI PAOLO, M. L.; RIGO, A.; MALACARNE, C.; SCARPA, M. Preparation, morphological characterization and activity of thin films of horseradish peroxidase. *Biotechnology and Bioengineering*, v.68, p.488–495, 2000.

THAKUR, V. K.; THAKUR, M. K. Recent advances in green hydrogels from lignin: a review. *International Journal of Biological Macromolecules*. v.72, p.834–847, 2015.

USDA. United States Department of Agriculture. World Agricultural Production: Circular Series WAP 8-16. August 2016. Disponível em: <http://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/production.pdf>. Acesso em: 28 de agosto de 2016.

VITOLO, M. Imobilização de enzimas. In: **Biotecnologia Industrial-Processo Fermentativos e enzimáticos** – Urgel de Almeida Lima – outros coordenadores: Eugênio Aquarone, Walter Borzani, Willibaldo Schmidell – v.3. São Paulo: Blucher, 2001.

XIANG, L. Y.; MOHAMMED, M. A. P.; BAHARUDDIN, A. S. Characterisation of microcrystalline cellulose from oil palm fibres for food applications. *Carbohydrate Polymers*. v.148, p.11–20, 2016.

XU, Z.; HUANG, F. Pretreatment Methods for Bioethanol Production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. v.174, p.43–62, 2014.

WU, R.; ZHAO, X.; LIU, D. Structural Features of Formiline Pretreated Sugar Cane Bagasse and Their Impact on the Enzymatic Hydrolysis of Cellulose. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*. v.4, p.1255–1261, 2016.

YABUSHITA, M. General Introduction. In: YABUSHITA, M. (eds) **A Study on Catalytic Conversion of Non-Food Biomass into Chemicals**. 1 ed., chap 1. Japan: Springer Science+Business Media Singapore Pte Ltd. 2016.

YAN, S.; CHEN, S.; WU, J.; WANG, P. Ethanol production from concentrated food waste hydrolysates with yeast cells immobilized on corn stalk. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. v.94, p.829–838, 2012.

YIN, J.; YUAN, T.; LU, Y.; SONG, K.; LI, H.; ZHAO, G.; YIN, Y. Effect of compression combined with steam treatment on the porosity, chemical composition and cellulose crystalline structure of wood cell walls. *Carbohydrate Polymers*. v.155, p.163–172, 2017.

ZAKARIA, M. R.; HIRATA, S.; HASSAN, M. A. Combined pretreatment using alkaline hydrothermal and ball milling to enhance enzymatic hydrolysis of oil palm mesocarp fiber. *Bioresource Technology*. v.169, p.236–243, 2014.

ZHANG, L.; LIU, D. Review: The enzymatic hydrolysis of lignocelluloses. *Biofuels, Bioproducts & Biorefining*. v.6, p.465–482, 2012.

ZHANG, H.; WU, S. Generation of lignin and enzymatically digestible cellulose from ethanol-based organosolv pretreatment of sugarcane bagasse. *Cellulose*. v.22, p.2409–2418, 2015.

ZHANG, K.; PEI, Z.; WANG, D. Organic solvent pretreatment of lignocellulosic biomass for biofuels and biochemicals: A review. *Bioresource Technology*. v.199, p.21–33, 2016.

ZHANG, X.; YUAN, Q.; CHENG, G. Deconstruction of corncob by steam explosion pretreatment: Correlations between sugar conversion and recalcitrant structures. *Carbohydrate Polymers*. v.156, p.351–356, 2017.

ZHANG, Y.; CHEN, X.; GU, Y.; ZHOU, X. A physicochemical method for increasing methane production from rice straw: Extrusion combined with alkali pretreatment. *Applied Energy*. v.160, p.39–48, 2015.

ZHENG, Y.; ZHAO, J.; XU, F.; LI, Y. Pretreatment of lignocellulosic biomass for enhanced biogas production – Review. *Progress in Energy and Combustion Science*. v.42, p.35–53, 2014.

ZHU, Y.; LEE, Y. Y.; ELANDER, R. T. Optimization of dilute acid pretreatment of corn stover using a high-solids percolation reactor. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, p.1045–1054, 2005.

ZHU, J.; SUN, G. Lipase immobilization on glutaraldehyde-activated nanofibrous membranes

for improved enzyme stabilities and activities. *Reactive & Functional Polymers*, v.72, p.839–845, 2012.

ZHU, J. Y.; PAN, X. J. Woody biomass pretreatment for cellulosic ethanol production: Technology and energy consumption evaluation. *Bioresource Technology*. v.101, p.4992–5002, 2010.

ZIEBELL, A. L.; BARB, J. G.; SANDHU, S.; MOYERS, B. T.; SYKES, R. W.; DOEPPKE, C.; GRACOM, K. L.; CARLILEA, M.; MAREK, L. F.; DAVIS, M. F.; KNAPP, S. J.; BURKE, J. M.; Sunflower as a biofuels crop: An analysis of lignocellulosic chemical properties. *Biomass and Bioenergy*, v.59, p.1–10, 2013.

ZUCCA, P.; SANJUST, E. Inorganic Materials as Supports for Covalent Enzyme Immobilization: Methods and Mechanisms – Review. *Molecules*. v.19, p.14139–14194, 2014.