

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

SABUGO DE MILHO  
COMO SUPORTE PARA IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE

Autor: Diego Melo Costa.

Orientadores: Dr<sup>a</sup> Cleide Mara F. Soares  
Dr. Álvaro Silva Lima

Co-orientadores: Dr. Daniel Pereira da Silva  
Dr<sup>a</sup> Denise Santos Ruzene

ARACAJU, SE – BRASIL  
OUTUBRO DE 2015

SABUGO DE MILHO  
COMO SUPORTE PARA IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE

Diego Melo Costa

TESE SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE PROCESSOS DA UNIVERSIDADE TIRADENTES COMO REQUISITO NECESSÁRIO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM ENGENHARIA DE PROCESSOS.

Aprovada por:

---

Dr<sup>a</sup> Cleide Mara Faria Soares

---

Dr. Álvaro Silva Lima, Dr.

---

Dr. Daniel Pereira da Silva, Dr.

---

Dr<sup>a</sup> Denise Santos Ruzene, Dr<sup>a</sup>.

---

Dr<sup>a</sup> Rebeca Yndira Cabrera Padilla, Dr<sup>a</sup>.

---

Dr. Renan Tavares Figueiredo

---

Dr<sup>a</sup> Lisiane dos Santos Freitas, Dr<sup>a</sup>.

---

Dr<sup>a</sup> Luciana Cristina Lins de Aquino Santana, Dr<sup>a</sup>.

ARACAJU, SE – BRASIL  
OUTUBRO DE 2015

Resumo da tese apresentada 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.

## SABUGO DE MILHO COMO SUPORTE PARA IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE

Os resíduos lignocelulósicos são os mais abundantes no mundo e tal biomassa apresenta potencial para a obtenção de diferentes produtos de interesse industrial. Neste sentido, estudos e desenvolvimento de biocatalisadores imobilizados em suportes orgânicos naturais é uma alternativa do uso de resíduo visando viabilizar a aplicação de bioprocessos em escala industrial bem como para o desenvolvimento de novos bioprodutos. Como exemplo de resíduos presentes no estado de Sergipe, há os excedentes da indústria de processamento do milho, geralmente usados como combustível de caldeiras, ração animal ou adubo; podendo em determinadas situações serem considerados um problema ambiental e ao mesmo tempo que são fontes renováveis de recursos. Desta forma, o uso desses agro-resíduos em engenharia de processos, como agentes de suporte para imobilização de enzimas, torna-se uma alternativa promissora afim de se aplicar na biocatalise. O objetivo deste trabalho foi avaliar a utilização de sabugo de milho, *in natura* e/ou tratados (por extração de suas frações lignocelulósicas), como suporte para a imobilização de lipase comercial utilizando a técnica de imobilização adsorção física em condições amenas de reação. No processo de extração das frações lignocelulósicas, em sabugo de milho e nas condições avaliadas, a extração de hemiceluloses foi próximo a 50% quando aplicado o tratamento extração alcalina (suporte extração alcalina) e 12% quando aplicado o tratamento auto-hidrólise (suporte auto-hidrólise). Quanto a remoção da lignina, por organosolv (suporte organosolv), este apresentou uma remoção próxima a 70%. A biodegradabilidade do sabugo de milho como suporte, em condições de *in natura* e tratado, no processo de imobilização utilizando lipase, não apresentou nenhum tipo de formação de compostos de degradação nas condições restadas em meio aquoso. Quanto a utilização dos biocatalisadores para a conversão de esteres, foi possível obter uma conversão máxima de cerca de 92% quando utilizado o biocatalisador imobilizado extração alcalina. A lipase foi imobilizada em sabugo de milho *in natura* e tratado (extração alcalina, auto-hidrólise e organosolv) e apresentou um rendimento de imobilização entre 60 a 70% a depender do suporte utilizado. Quanto a estabilidade operacional, na reação de hidrólise do azeite de oliva, o biocatalisador imobilizado em suporte *in natura* apresentou uma redução da atividade a partir do terceiro ciclo, mantendo entre 55 a 60% da sua atividade inicial até o sexto ciclo, dados semelhantes foram apresentados pelo biocatalisador *extração alcalina*. O pH ótimo, a temperatura ótima bem como os parâmetros cinéticos para os biocatalisadores imobilizados nos diferentes suportes foram também avaliados.

**Palavras-chave:** Materiais lignocelulósicos, sabugo de milho, imobilização, lipase.

Abstract of thesis submitted to the Graduate Program in Process Engineering, University Tiradentes as part of the requirements for the degree of Doctor of Engineering Process.

## USE AND PRE-TREATMENT OF CORN COB FOR IMMOBILIZATION OF LIPASE

The lignocellulosic residues are the most abundant in the world and such biomass have potential to obtain product different of industrial interest. In this context, studies and development of immobilized biocatalysts in natural organic media is an alternative to the use of that waste as well as processes for the development of new bioproducts. As an example of residues found in the state of Sergipe, there is the surplus of corn processing industry, usually used as fuel boilers, animal feed or fertilizer; and these are still considered an environmental problem and at the same time they are renewable resources. Thus, the use of these agri-waste engineering process as a support for enzyme immobilization agents has become a promising alternative in order to apply biocatalysis. The objective of this study was to evaluate the use of corn cob, fresh and / or treated (for extraction of its lignocellulosic fractions), as support for the immobilization of commercial lipase using physical adsorption immobilization technique in mild reaction conditions. In the process of extracting the lignocellulosic fraction, corn cob, the hemicellulose extraction was close to 50% when applied to the treatment alkaline extraction (backing alkaline extraction) and 12% when alicado self-hydrolysis treatment (hydrolysis self-support). As the removal of lignin, organosolv by (organosolv support), the next one apresntou removal to 70%. The degradability of corn cobs as support, in terms of raw and treated in the immobilization process using lipase, did not show any formation of degradation compounds in restadas conditions in aqueous media. As the use of biocatalysts for the conversion of esters was possible to obtain a maximum conversion of approximately 92% when using the immobilized biocatalyst alkaline extraction. The lipase was immobilized onto corn cob raw and treated (alkali extraction, hydrolysis and self-organosolv) and presented a yield of immobilisation between 60 and 70% depending on the medium used. The operational stability, reaction of olive oil hydrolysis the biocatalyst immobilized on support in natura showed reduced activity from the third cycle, keeping between 55 to 60% of its initial activity until the sixth cycle, similar data were presented by the biocatalyst alkaline extraction. The optimum pH, optimum temperature and the kinetic parameters for the immobilized biocatalysts in support different were also evaluated.

**Keywords:** lignocellulosic materials, corn cob, immobilization lipase.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	8
2. OBJETIVOS .....	10
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	11
3.1 Lipase .....	11
3.1.1 Estrutura da lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> .....	13
3.2 Imobilização de Enzimas .....	15
3.2.1 Vantagens da imobilização .....	15
3.2.2 Técnicas de imobilização .....	17
3.2.3 Imobilização por Adsorção .....	19
3.3 Suportes para imobilização .....	19
3.3.1 Suportes inorgânicos.....	20
3.3.2 Suportes orgânicos.....	21
3.4 Milho .....	28
3.5 Estrutura Química dos Materiais Lignocelulósicos.....	30
3.5.1 Celulose .....	30
3.5.2 Hemicelulose.....	31
3.5.3 Lignina.....	32
3.6 Etapas de tratamento em Materiais Lignocelulósicos .....	33
3.6.1 Autohidrólise.....	36
3.6.2 Extração Alcalina .....	37
3.6.3 Hidrólise Ácida .....	39
3.6.4 Deslignificação organosolv.....	40
3.7 Uso de enzimas Imobilizadas para produção de ésteres etílicos .....	41
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	41
4.1 – Artigo 01 .....	43
4.2 – Artigo 02 .....	69
4.3 – Patente 01.....	94
4.4 – Patente 02.....	110
4.3 – Patente 03.....	128
6. CONCLUSÕES .....	142
6. REFERÊNCIAS.....	144

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 3.1</b>	Reação de hidrólise catalisada por lipases, indicando a hidrólise de triacilglicerol em glicerol e ácidos graxos.....	11
<b>Figura 3.2</b>	Reações catalisadas por enzimas lipases (Dallas-Vecchiaa <i>et al.</i> , 2004).....	12
<b>Figura 3.3</b>	Representação da estrutura tridimensional da lipase de Burkholderiacepacia, setas verdes representam as fitas $\beta$ e em azul estão representadas as $\alpha$ -Hélices, com a posição do íon $\text{Ca}^{+2}$ indicada em amarelo e os resíduos da tríade catalítica indicados em vermelho (Schrag <i>et al.</i> , 1997).....	14
<b>Figura 3.4</b>	Principais métodos para imobilização de enzimas (Buchholz <i>et al.</i> , 2005)....	17
<b>Figura 3.5</b>	Valores reais e projeções de produção do milho (MAPA, 2011; EMBRAPA, 2012).....	28
<b>Figura 3.6</b>	Estrutura da celulose, parte central da cadeia molecular (Fengel e Wegener, 1989).....	30
<b>Figura 3.7</b>	Estrutura dos monossacarídeos que formam as hemiceluloses (Fengel e Wegener, 1989).....	31
<b>Figura 3.8</b>	Estrutura da lignina de abeto ( <i>PiceaAbies</i> ) proposta por Adler (Fengel e Wegener, 1989).....	32
<b>Figura 3.9</b>	Precursos da biossíntese da lignina. Fonte: (Fengel e Wegener, 1989).....	33
<b>Figura 3.10</b>	Esquema de tratamento em materiais lignocelulósicos.....	34

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 3.1</b>	Resíduos como suporte para imobilização de enzimas.....	<b>25</b>
<b>Tabela 3.2</b>	Tratamentos físicos, químicos e biológicos aplicado em resíduos.....	<b>36</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O uso de enzimas, especialmente as lipases, está crescendo rapidamente pelo fato de apresentarem condições reacionais brandas e poderem ser usadas para diferentes reações. Entretanto, a aplicação de enzimas na sua forma livre é frequentemente dificultada pela desnaturação e inativação e, além disto, não é possível ser facilmente recuperada e reutilizada durante o processo industrial. Por outro lado, a elevada quantidade de resíduos lignocelulósicos obtida de processos agrícolas ou agro-industriais vem despertando o interesse de estudos quanto ao seu potencial como matéria prima para obtenção de produtos de interesse industrial (por exemplo: bioetanol, glicose e biomassa proteica).

Na última década, vários estudos foram desenvolvidos, visando obter um destino para esses resíduos, minimizando os impactos ambientais oriundos do seu descarte. Neste sentido, estudos e desenvolvimento de biocatalisadores imobilizados tem também aumentado visando viabilizar a aplicação de bioprocessos em escala industrial, porém o custo elevado ainda torna este tipo de processo pouco aplicável.

Assim, a busca por suportes alternativos torna-se atraente não somente como ferramenta para a viabilidade de processos como também para o desenvolvimento de novos bioprodutos. A necessidade de suportes alternativos e mais baratos para imobilização tem motivado estudos de imobilização de enzimas em resíduos agroindustriais, no entanto, devido as suas características, ainda existem poucos estudos utilizando estes resíduos como suportes para imobilização.

Além disso, dada a importância das enzimas em diferentes setores industriais, como na indústria de alimentos, cosméticos e outras, a imobilização da lipase é realizada em diferentes tipos de suportes e técnicas, com o objetivo de se obter um biocatalisador imobilizado em condições de maior estabilidade e atividade, bem como por intermédio de um processo com menor custo, entretanto, não sendo ainda possível afirmar a existência de um método ou tipo de suporte ideal para se utilizar em um processo de imobilização.



Entre as técnicas de imobilização disponíveis, adsorção geralmente possui um maior potencial comercial devido a sua simplicidade e baixo custo. Vários trabalhos já foram publicados descrevendo a imobilização de lipase nos mais diversos tipos de suporte, como por exemplo, estireno-divinilbenzeno, Eupergit® C, toyonite, esferas de sílica porosa, polipropileno e poli(óxido de etileno)(Katchalski-Katzir e Kraemer, 2000; Da Silva Crespo *et al.*, 2005; Knezevic *et al.*, 2006; Barbosa *et al.*, 2014).

Visando uma melhora no processo de imobilização, a realização de um tratamento no suporte a ser utilizado torna-se bastante interessante, podendo este ser físico, químico e/ou biológico, e ainda de forma unitária ou integrada, com o uso de duas ou mais técnicas, o que proporciona o aumento da área superficial e modificações químicas na superfície quando em suporte lignocelulósicos, podendo proporcionar um aumento na taxa de imobilização. Assim, o principal objetivo do tratamento dos suportes é desorganizar a estrutura cristalina das macro e microfibrilas, proporcionando o aumento na porosidade dos mesmos e, desta forma, facilitando a penetração da enzima nas fibras e/ou aumentar o número de ligações químicas entre a enzima e o suporte.

Os resíduos agroindustriais utilizados para imobilização de enzimas descritos na literatura atualmente são: grãos processados, coco, bagaço de cana e palha de arroz. Estes suportes podem ser uma alternativa interessante uma vez que existe em abundância no Brasil como rejeito das indústrias de álcool, açúcares e até mesmo de pequenos produtores (Brígida *et al.*, 2009; Cardoso *et al.*, 2009; Cristóvão *et al.*, 2011; Cristóvão *et al.*, 2012; Da Silva *et al.*, 2012). Entretanto, o Brasil tem se tornado um dos maiores produtores e consumidores de milho, na última década a produção de milho obteve um aumento em torno de 23%, equivalente a 10 milhões de toneladas de milho.

Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o resíduo sabugo de milho, *in-natura* e/ou tratados (por extração de frações lignocelulósicas), como suporte para a imobilização de lipase comercial (*Burkholderia cepacia*), visando avaliar o efeito da aplicação de diferentes tratamentos químicos na superfície deste resíduo lignocelulósico frente as características de imobilização da lipase, imobilização estas envolvendo técnicas de adsorção física.

## 2. OBJETIVOS

### Geral

O objetivo principal desse trabalho foi avaliar o sabugo de milho, *in-natura* e tratados (por extração de frações lignocelulósicas), como suporte para a imobilização de lipase comercial de *Burkholderia cepacia*.

### Específicos

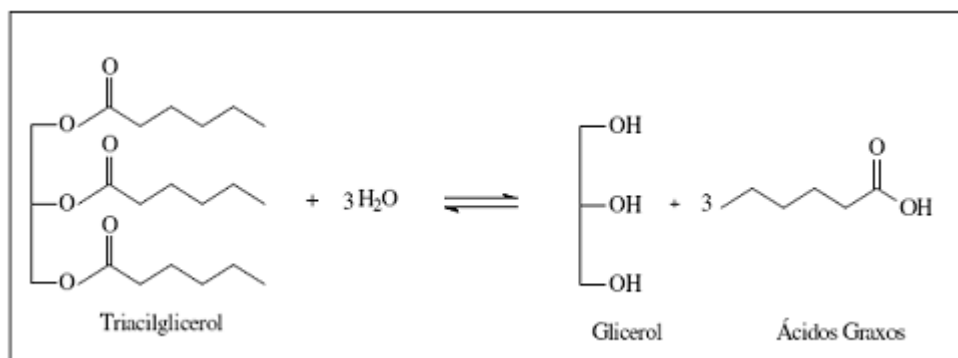
- Caracterizar o resíduo sabugo de milho, quanto ao seu perfil lignocelulósico, visando identificação das características físico-químicas;
- Aplicar o tratamento de extração alcalina no resíduo sabugo de milho visando a obtenção do novo suporte (suporte extração alcalina) para imobilização enzimática;
- Aplicar o tratamento de auto hidrólise no resíduo sabugo de milho visando a obtenção do novo suporte (suporte auto hidrólise) para imobilização enzimática;
- Aplicar o tratamento organosolv no resíduo sabugo de milho visando a obtenção do novo suporte (suporte organosolv) para imobilização enzimática;
- Imobilizar lipase de *Burkholderia cepacia* utilizando a técnica por imobilização adsorção física nos resíduos de sabugo de milho *in natura* e tratados;
- Realizar caracterização bioquímica e morfológica da lipase livre e imobilizada;
- Verificar a eficiência dos biocatalisadores imobilizados em suportes *in natura* e tratados para a conversão de ésteres, visando a produção de biodiesel.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A utilização de técnicas de imobilização enzimática em resíduos agro-industriais visando sua utilização em bioprocessos é foco de estudo nos últimos anos. Deste modo, nesta etapa do presente trabalho são apresentados uma breve revisão da literatura referente aos aspectos mais relevantes não somente sobre a enzima lipase, modelo enzimático a ser aplicado dentro do objetivo em questão, como também fatores envolvidos na imobilização de enzimas, técnicas de imobilização, suportes para imobilização e estrutura lignocelulósica dos resíduos finalizando com etapas de tratamento em frações lignocelulósicas.

#### 3.1 Lipase

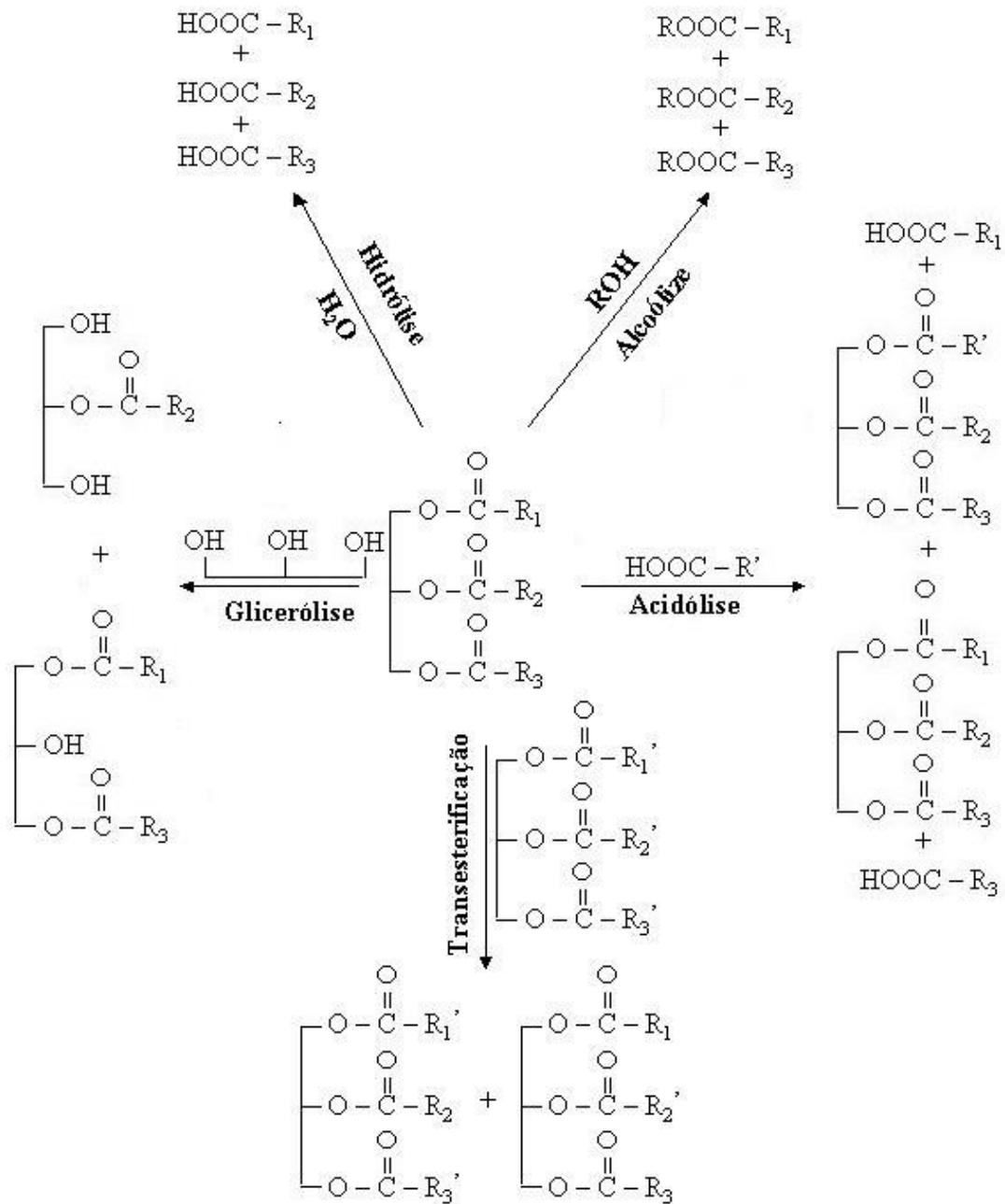
Lipases (triacilglicerolhidrolases, E.C. 3.1.1.3) são carboxilesterases definidas como enzimas que catalisam a hidrólise de triacilgliceróis, cujos ácidos graxos sejam de cadeia longa, liberando ácidos graxos e glicerol (Jaeger e Reetz, 1998), conforme apresentados na Figura 3.1.



**Figura 3.1** – Reação de hidrólise catalisada por lipases, indicando a hidrólise de triacilglicerol em glicerol e ácidos graxos.

Fonte: Dalla-Vecchia *et al.*, 2004.

Além da hidrólise (Figura 3.2), onde é realizada uma combinação de processos básicos em uma sequência lógica, as lipases também são capazes de catalisar reações de interesterificação ou transesterificação, de acordo com o reagente utilizado (Dalla-Vecchia *et al.*, 2004).



**Figura 3.2** - Reações catalisadas por lipases

Fonte: Dallas-Vecchiaa *et al.*, 2004.

Dentro deste contexto, as lipases podem ser de origem animal (pancreática, hepática e gástrica), vegetal (*Bassicanapus*) ou microbiana (bactérias e fungos), esta última sendo considerada como principal fonte em especial para casos de aplicação em escala industrial (Paques e Macedo, 2006). Dentre as diversas enzimas hidrolíticas, a lipase destaca-se por catalisarem a hidrólise de triacilgliceróise a síntese de ésteres formados por glicerol e longas cadeias de ácidos graxos (Castro *et al.*, 2004).

Catalisadores biológicos ou biocatalisadores possuem como função principal a aceleração de reações químicas ou bioquímicas dentro de um contexto de aplicação industrial, podendo ser destacado ainda vantagens na possibilidade de utilização de condições amenas de reação bem como de seletividade quanto ao tipo de reação que catalisam (Paques e Macedo, 2006).

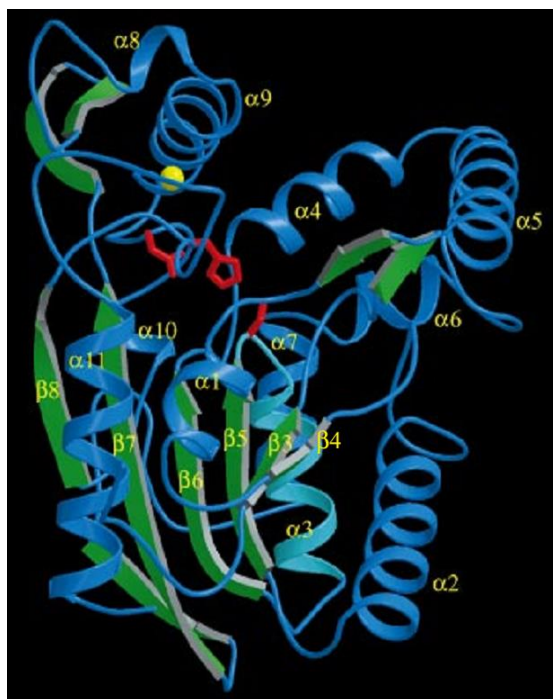
Muitos processos tecnológicos utilizam catalisadores biológicos nas seqüências de conversão química. Dependendo das condições, as lipases também catalisam reações de síntese, como de esterificação, transesterificação (interesterificação, alcólise e acidólise), aminólise (síntese de amidas) e lactonização (esterificação intramolecular), sendo que a atividade de água ( $a_w$ ) do meio reacional é um dos fatores determinantes para o equilíbrio da reação no sentido direto (hidrólise) ou inverso (síntese) (Reis *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2012; Salihu *et al.*, 2014).

No caso das lipases, estas apresentam diferentes graus de seletividade em relação a seus substratos, sendo capazes de catalisar reações com uma ampla gama de substratos, mas com as taxas de reação podendo variar com a estrutura das moléculas do substrato (Hasan *et al.*, 2006). A alta versatilidade de lipases permite suas aplicações em diferentes setores, como alimentos, detergentes, produtos farmacêuticos, couro, têxtil, cosmético, e papel (Andualema e Gessesse, 2012).

### **3.1.1 Estrutura da lipase de *Burkholderia cepacia***

Do ponto de vista estrutural, a topologia da lipase de *Burkholderia cepacia* (antigamente conhecida como *Pseudomonas cepacia*) é muito similar ao protótipo  $\alpha/\beta$  hidrolases. Porém, as duas primeiras fitas  $\beta$  no modelo  $\alpha/\beta$  hidrolase não estão presentes na lipase de *B. cepacia*. Além dos resíduos do sítio ativo, outra região extremamente importante é o sítio de ligação de  $Ca^{+2}$ , acredita-se que este seja um importante sítio para forçar a permanência de algumas ligações peptídicas na conformação *cis*, o que beneficiaria a proteína na manutenção de algumas ligações de hidrogênio intramoleculares (Schrag *et al.*, 1997).

Lipase de *Burkholderia cepacia* possui uma estrutura de três domínios, que podem ser divididos em um domínio maior e dois menores (Figura 3.3).



**Figura 3.3** – Representação da estrutura tridimensional da lipase de *Burkholderiacepacia*, setas verdes representam as fitas  $\beta$  e em azul estão representadas as  $\alpha$ -Hélices, com a posição do íon  $\text{Ca}^{+2}$  indicada em amarelo e os resíduos da tríade catalítica indicados em vermelho

Fonte: (Schrag *et al.*, 1997).

Assim, e de acordo com a Figura 3.3, a primeira fita  $\beta$  é equivalente a  $\beta 3$  no modelo. O resíduo Ser87 catalítico situa-se no final da região C-terminal da fita  $\beta 5$  na fita-volta-hélice. O resíduo ácido, também catalítico, Asp264, faz parte de uma volta que segue a fita  $\beta 7$  e o resíduo His286 está localizado na alça que segue a fita  $\beta 8$ . Existem onze  $\alpha$ -hélices, correspondentes às hélices A-F das  $\alpha/\beta$ hidrolases ( $\alpha 1=A$ ,  $\alpha 2=B$ ,  $\alpha 3=C$ ,  $\alpha 7=D$ ,  $\alpha 10=E$  e  $\alpha 11=F$ ), das quais quatro envolvem a folha  $\beta$ central. As estruturas tridimensionais determinadas por Schrag e colaboradores (1997), da conformação aberta da lipase de *Burkholderia cepacia*, são favorecidas pela presença de solventes ou de interface óleo-água. Ao contrário, em condições aquosas a estrutura fechada é preferida. Estas estruturas indicam que a ativação interfacial resulta de uma mudança conformacional na enzima, pela reorganização da estrutura terciária e de um amplo movimento da tampa hidrofóbica para expor o sítio ativo. A tampa hidrofóbica, por sua vez, tem seu maior contato com o resto da proteína na conformação fechada por interações, quase sempre van der Waals, da hélice  $\alpha 4$  com a hélice  $\alpha 9$  e as duas fitas  $\beta$  antiparalelas (Figura 3.3), englobando os resíduos 214-228 da molécula (Kim *et al.*, 1997; Schrag *et al.*, 1997).

## **3.2 Imobilização de Enzimas**

A imobilização de enzimas tem se mostrado, nos últimos tempos, uma poderosa ferramenta para melhorar quase todas as propriedades enzimáticas, como a alta atividade e seletividade. Deste modo, cabe salientar que enzimas imobilizadas são aquelas que estão confinadas fisicamente em um espaço, onde ocorre o contato entre a enzima e o substrato no meio de reação. Pesquisas sobre este assunto vêm despertando interesse, no sentido de estabelecer métodos eficientes de imobilização, por meios físicos e químicos (Sebrão *et al.*, 2007; Wu e Lia, 2008; Huang *et al.*, 2011; Basak *et al.*, 2014).

O principal interesse em imobilizar enzimas é obter um biocatalisador com boa atividade e estabilidade, e principalmente, que não seja afetado pelo processo no qual será submetido (Bon *et al.*, 2008). Nos últimos anos, a utilização de enzimas nas indústrias cresce sensivelmente devido a vantagens frente aos catalisadores químicos com elevada atividade catalítica (Hasan *et al.*, 2006).

As principais desvantagens de se obter um biocatalisador imobilizado é o custo do suporte e a uma possível perda de atividade durante o processo. Outro fator importante envolvendo técnicas de imobilização é que não devem ocorrer alterações estruturais, bem como alterações no sítio ativo, das enzimas devido aos procedimentos aplicados (Sebrão *et al.*, 2007). Entretanto, o processo de imobilização não é totalmente previsível, podendo este causar a inibição ou o aumento da atividade e/ou da estabilidade na enzima (Mateo *et al.*, 2007).

O processo de imobilização da enzima em um suporte, sem que ocorra perda de sua atividade, permite sua reutilização ou mesmo o uso em reatores contínuos, resultando em economia nos processos industriais. Por outro lado, a utilização de materiais orgânicos como suporte de enzimas para o desenvolvimento de um biocatalisador, diminui ainda mais o custo do processo; salientando-se que aliando aos baixos custos com a possibilidade de reutilização, este tipo de material sendo utilizado para imobilização pode tornar o processo ainda mais ágil. Além disso, a imobilização enzimática facilita a recuperação dos produtos e minimiza a produção de efluente (Mateo *et al.*, 2000).

### **3.2.1 Vantagens da imobilização**

Uma das principais vantagens da imobilização enzimática, é que muitas vezes com o processo de imobilização as propriedades enzimáticas são alteradas de modo positivo, gerando novos biocatalisadores (Sebrão *et al.*, 2007).

Dependendo do tipo de imobilização e da enzima, são gerados biocatalizadores com atividade, especificidade e estabilidade aumentadas (Sebrão *et al.*, 2007). Assim, como visto, dentre as vantagens de se trabalhar com enzimas imobilizadas, as principais são: i. as enzimas podem ser reutilizadas; ii. os processos químicos podem ser continuamente operados e prontamente controlados; iii. em alguns casos, as propriedades enzimáticas (atividade e estabilidade operacionais) podem ser alteradas (Mateo *et al.*, 2007).

Do ponto de vista comercial, a imobilização enzimática apresenta vantagens como facilidade na separação do catalisador e do produto da reação, uma vez que a enzima imobilizada não é solúvel no meio da reação. Como vantagem ainda ocorre redução no volume de reação, devido à enzima imobilizada no biorreator permitir alta concentração enzimática em menor volume de reator, obtendo uma atividade por unidade de volume superior à que seria obtida com a enzima livre (Bon *et al.*, 2008).

Deste modo, a imobilização de enzimas sobre suportes sólidos (sílica, agarose, quitosana, outros), utilizando-se de diferentes métodos (ligação covalente, adsorção, ligação iônica, entre outros), é uma estratégia muito usada para insolubilização e aumento da estabilidade operacional de enzimas, bem como para um melhor controle operacional e uma fácil recuperação do produto, entretanto com a possibilidade de um elevado custo (Mateo *et al.*, 2007).

Assim, atualmente tem-se buscado desenvolver metodologias que permitam imobilizar grandes quantidades de enzima, ativar o suporte com grupos com alta estabilidade e manuseá-lo por períodos prolongados de tempo (Brígida *et al.*, 2010).

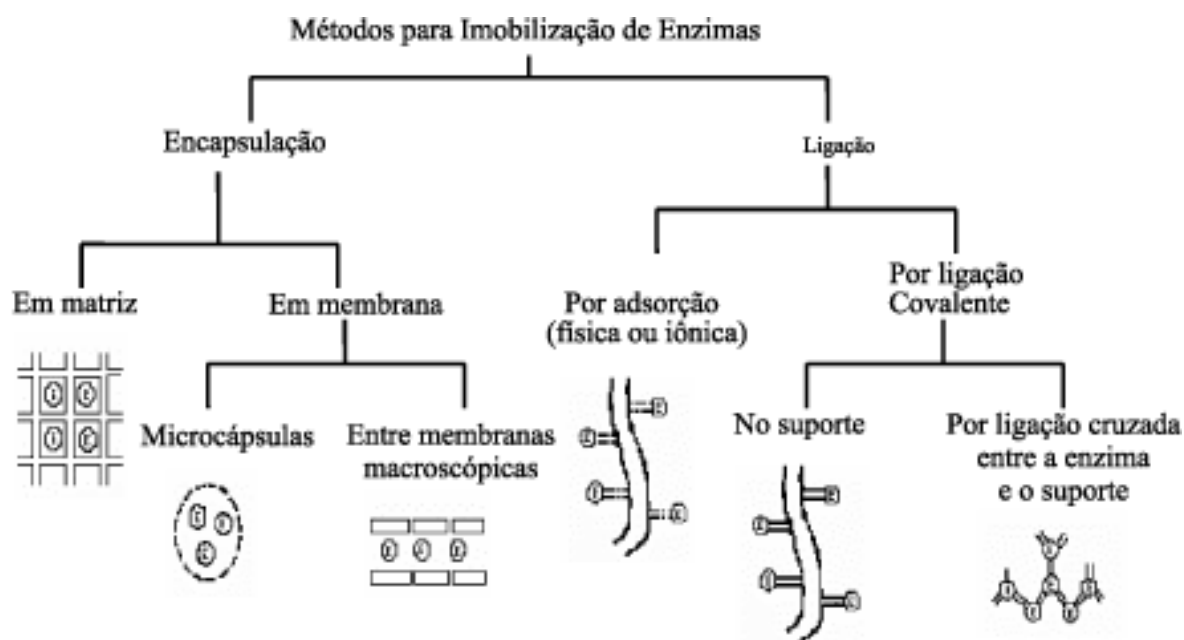
Dentre os vários tipos de suporte, uma das principais características a serem analisadas para a seleção corresponde a técnica de imobilização que será empregada. Enzimas podem ser imobilizadas de diversas maneiras, em diferentes suportes, para isto, torna-se necessária desenvolver novas técnicas de imobilização, como também conhecer as técnicas usualmente empregadas e a natureza do suporte da enzima, para poder selecionar as técnicas que mantêm ou melhoram os níveis de atividade da enzima imobilizada.



### 3.2.2 Técnicas de imobilização

O desenvolvimento de técnicas de imobilização proporciona, na maioria das vezes, a reutilização das enzimas com a intenção de facilitar a separação dos produtos e aumentar a estabilidade em solventes orgânicos, porém, cada método pode influenciar a enzima e suas propriedades, com a atividade, seletividade e estabilidade (Hanefeld *et al.*, 2013).

Os métodos para imobilização podem ser classificados em duas categorias básicas: i. por ligação em suportes, e ii. por encapsulamento; conforme apresentados na Figura 3.4.



**Figura 3.4** - Principais métodos para imobilização de enzimas  
Fonte: (Buchholz *et al.*, 2005).

Contudo, para uma aplicação em escala industrial é necessário torná-la economicamente viável pelo seu reaproveitamento, que pode ser conseguido com sua imobilização, sendo que a técnica possui um importante papel dentro da biotecnologia aplicada. A principal razão para imobilizar enzimas é a habilidade para isolar o biocatalisador do produto da reação e reusá-lo com o objetivo de aumentar a produtividade (Mateo *et al.*, 2007).

A imobilização por encapsulamento pode ser subdividida em separação com matriz ou em membrana. Neste método a enzima encontra-se fisicamente separada do meio da reação por membrana semipermeável, que por sua vez pode ser subdividida em matriz, onde a enzima é imobilizada no interior de esferas não-rígidas, cujo envoltório é constituído por um polímero; ou membranas fibrosas semipermeáveis, que consiste no confinamento da enzima numa dada região da solução (Dalla-Vecchia *et al.*, 2004).

As técnicas de imobilização por ligação em suportes baseiam-se nas ligações físicas e químicas entre a enzima e o suporte. Os mais utilizados são: adsorção física (interações hidrofóbicas e de van de Waals) e química (ligação covalente e iônica), imobilização por confinamento em matriz ou microcápsula e ligação cruzada (Dalla-Vecchia *et al.*, 2004; Cardoso *et al.*, 2009; Cristóvão *et al.*, 2011).

Diferentes tipos de suportes (porosos ou não-porosos) apresentam diferentes características que são fortemente decisivas na escolha da técnica de imobilização. Os materiais porosos apresentam uma grande área superficial interna disponível para imobilização de enzimas, como também, protegendo-a de efeitos de turbulência externa. Neste tipo de suporte, como temos ainda uma maior parte de área disponível para imobilização interna, uma maior atenção deve ser atribuída para os tamanhos dos poros de tal modo que o diâmetro apresentado pelo suporte seja suficiente para passagem da enzima como também para permitir o acesso da mesma ao substrato. Os materiais não-porosos eliminam a resistência interna da massa interna, porém apresentam uma forte diminuição na área superficial disponível para que ocorra o processo de imobilização da enzima (Mateo *et al.*, 2007).

Dentre as várias técnicas de imobilização, a seleção da técnica deve ser baseada levando em consideração parâmetros como atividade global, características de regeneração e inativação, custos de procedimento de imobilização, toxicidade dos reagentes de imobilização e propriedades finais desejadas para o biocatalisador imobilizado (Dalla-Vecchia *et al.*, 2004) .

O método baseado na adsorção física de enzima na superfície do suporte provoca pouca ou nenhuma alteração conformacional da enzima ou destruição do seu sítio ativo (Wu e Lia, 2008) Este método é normalmente simples e barato, se um transportador adequado é usado.

### **3.2.3 Imobilização por Adsorção**

A imobilização enzimática por meio da adsorção ocorre quando a enzima se une ao suporte sólido através de adsorção física, interações iônicas, ligações hidrofóbicas e forças de Wan der Waals, ou ainda por combinações (Brígida *et al.*, 2010).

O processo de adsorção de enzimas por meio desta técnica, embora seja de baixo custo e simples, possui como principal desvantagem a baixa energia de ligação entre o suporte e a enzima. Dallas-Vecchia e colaboradores (2004) observaram que variando diversos fatores como temperatura, pH, força iônica, ocorreu a dessorção da enzima ao suporte.

A imobilização física envolvendo lipase é normalmente realizada em suportes hidrofóbicos devido as características pertinentes a tais materiais (Dalla-Vecchia *et al.*, 2004). A enzima quando imobilizada neste tipo de suporte sofre ativação superficial na presença de interface hidrofóbica e a região do sítio ativo interage por adsorção hidrofóbica com o suporte (Macrae, 1983).

Para que ocorra a imobilização, faz-se necessário o contato entre a solução enzimática e o suporte, em temperatura constante. Os métodos utilizados para a adsorção líquido-sólido são banho finito, cromatográfico e *headspace*, sendo o banho finito o mais utilizado devido sua praticidade (Cristóvão *et al.*, 2011). Neste processo de imobilização a quantidade de enzima adsorvida e sua disposição no suporte influenciam na estabilidade e atividade do biocatalisador (Nakanishi *et al.*, 2001).

A imobilização da enzima pode aumentar seu nível de estabilidade contra a variação do valor de pH e temperatura, como também, o aumento da força de ligação entre a enzima e o suporte pode dificultar o processo de ativação da enzima caso esta apresente conformações distintas ativadas e não ativadas (Mateo *et al.*, 2007)

Para uma análise da eficiência do método de adsorção, deve-se verificar a cinética para cada concentração de enzima estudada até que o equilíbrio seja atingido. Esta análise mostra a afinidade entre o suporte e a enzima (Nakanishi *et al.*, 2001).

### **3.3 Suportes para imobilização**

A imobilização de enzimas em suportes sólidos já é foco de pesquisa por várias décadas (Mateo *et al.*, 2000; Mateo *et al.*, 2007; Da Silva *et al.*, 2012). Com isso, foram utilizados e avaliados diferentes tipos de suportes, incluindo oriundos de materiais orgânicos e polímeros sintéticos.

### 3.3.1 Suportes inorgânicos

Existem diversos materiais que podem ser utilizados como suporte para a imobilização de enzimas, entre os inorgânicos podemos citar: Alumina, Eupergit C, sílica, entre outros (Matsumoto e Ohashi, 2003; Lozano *et al.*, 2004; Wu e Lia, 2008).

A alumina é amplamente utilizada como suporte hidrofílico para adsorção de enzimas devido ao seu baixo custo, disponibilidade, estabilidade em ampla faixa de pH, superfície química e versatilidade na configuração. Além disso, caracteriza-se por ser um material inorgânico, inerte, poroso, transparente, não tóxico e apresentar boa durabilidade (Lozano *et al.*, 2004). Na literatura existem diversos estudos que descrevem este suporte como bastante resistente a altas temperaturas e pHs (Qin *et al.*, 2014). A temperatura e o perfil de atividade enzimática da catalase mostraram-se maior estabilidade para as enzimas imobilizadas em temperatura elevada (Costa *et al.*, 2001).

O Eupergit® C é um transportador composto de grânulos macroporosos, ideal para a imobilização de enzimas, com potencial industrial à produção de química (Katchalski-Katzir e Kraemer, 2000; Ahmad *et al.*, 2013). É muito desejável para imobilização de enzimas em escala industrial porque é comercialmente disponível em todo o mundo, resistente a tensões mecânicas e químicas, e adaptável a uma variedade de configurações e processos específicos, realizada em reatores (Knezevic *et al.*, 2006).

A imobilização enzimática utilizando Eupergit C foi aplicada com sucesso em diversos trabalhos, com uma ampla variedade de enzimas, inclusive a lipase. Este suporte é composto de grânulos macroporosos desenvolvidos através da copolimerização de N,N'-metileno-bis-metacrilamida, glicidilmetacrilato, alil-glicidil-éter e metacrilamida (Katchalski-Katzir e Kraemer, 2000; Knezevic *et al.*, 2006).

Entre as principais vantagens do Eupergit C estão a elevada disponibilidade de compra, a estabilidade química para qualquer valor de pH, ou seja, pode-se imobilizar uma enzima em meio ácido ou básico, como também a sua alta estabilidade mecânica, uma vez que não apresentou nenhum desgaste após 650 ciclos de operação em reatores de mistura com volumes de substrato de até 1000 L (Katchalski-Katzir e Kraemer, 2000; Knezevic *et al.*, 2006).

O estudo comparativo realizado por Matsumoto e Ohashi (2003) entre suportes inorgânicos mostrou que lipase imobilizada neste suporte obteve estabilidade em temperaturas de aproximadamente 60°C.

A Sílica é um produto sintético, produzido pela reação de silicato de sódio e ácido sulfúrico. Ao serem misturados, forma-se um hidrosol que lentamente se contrai para formar uma estrutura sólida de sílica gel, também chamada hidrogel. A sílica gel é bastante utilizada como suporte para a imobilização de enzimas por apresentar as seguintes vantagens: possui alta resistência mecânica, estabilidade térmica e química; possui alta resistência à contaminação e à degradação microbiana; apresenta elevada área superficial porosa (Pereira e Kubota, 2004; David *et al.*, 2006).

Na literatura a sílica foi utilizada como suporte na imobilização das seguintes enzimas: Lipase obtida de *Candida rugosa*, sendo imobilizada e caracterizada (Soares *et al.*, 2006); Lipase obtida de *Candida cylindracea*, que catalisa a hidrólise de triacilglicerol em ácidos graxos livres e glicerol (Carvalho *et al.*, 2003); cloroperoxidase de *Caldariomyces fumago*, que podem ser usadas na degradação oxidativa de clorofenóis e compostos fenólicos presentes em águas residuais de refinaria (Petri *et al.*, 2004); invertase de *Saccharomyces cerevisiae*, utilizada em indústrias alimentícias para produção de adoçantes (David *et al.*, 2006); glicose oxidase, imobilizada em nanotubos de carbono revestido de sílica para avaliar um biosensor de determinação de glicose no soro sintético (Tsai e Tsai, 2009).

A Celite é um suporte sólido amplamente utilizado para a adsorção de biocatalisadores, sendo este disponível comercialmente em diferentes formas, que variam em tamanho de partícula e porosidade (Pace *et al.*, 2010).

Na literatura a Celite foi utilizada como suporte na imobilização das seguintes enzimas: Lipase de *Burkholderia sp.*, imobilizada em Celite via ligação covalente para aumentar a sua viabilidade em aplicações práticas. O biocatalisador celite-lipase permaneceu 83% da sua atividade original depois de ser mantido a 55°C durante 120 minutos, enquanto a lipase livre apresentou uma perda de quase 40% da sua atividade nas mesmas condições, indicando a melhoria da estabilidade térmica da enzima lipase após imobilização (Liu *et al.*, 2009). Peroxidase adsorvida usando glutaraldeído como agente (Satar e Husain, 2009).

### **3.3.2 Suportes orgânicos**

Os suportes orgânicos usados para a imobilização enzimática devem possuir alta resistência química, mecânica e microbiana, termoestabilidade e durabilidade química, baixo custo e regenerabilidade. Atualmente, existe um grande interesse nessa tipologia de suporte, principalmente por serem ecologicamente corretos.

Os suportes orgânicos para ser considerado viável devem ser obtidos com facilidade e abundância, ser de fácil operação em grande escala e resistente a contaminação. Em contrapartida, esses suportes, em alguns casos, podem apresentar como principais desvantagens baixas durabilidade e estabilidade química, dificuldades na limpeza, no controle da porosidade e no processo de esterilização (Mateo *et al.*, 2007; Wu e Lia, 2008).

Os suportes orgânicos podem ser naturais (biopolímeros) ou sintéticos. Dentre os quais, podemos encontrar o caulim, carbonato de cálcio, a quitosana, o carvão ativado, polipropileno e o poliacrilonitrilo (Krajewska, 2004; Rahman *et al.*, 2005; Ye *et al.*, 2006; Ghamgui *et al.*, 2007; Hong, *et al.*, 2008; Macedo *et al.*, 2008).

A demanda por suportes alternativos para utilização de imobilização apresenta uma crescente evolução, motivada pelos avanços na produção de resíduos agro-industriais que por sua vez são motivados pela expansão das áreas cultivadas. Entretanto, o suporte ideal deve adsorver a enzima sem afetar sua atividade e sem interferir na reação enzimática (Brígida *et al.*, 2009; Da Silva *et al.*, 2012).

Um novo suporte para imobilização de enzimas que começou a ser utilizado são os resíduos agro-industriais oriundos do coco, bagaço de cana e palha de arroz, que podem ser uma alternativa interessante devido a sua abundância no Brasil. O Brasil é o maior produtor de cana de açúcar do mundo, conseqüentemente, gerador de um alto subproduto, uma vez que uma usina sucroalcooleira gera cerca de 280 kg de bagaço de cana, para cada tonelada moída (Sun *et al.*, 2004). Por outro lado, como consequência da produção de cocos, ocorre uma geração de casca de coco, como material de descarte, material este que além de ser volumoso e de degradação lenta, ocasiona grandes impactos ambientais (Brígida *et al.*, 2007). Deste modo, o uso da fibra de coco maduro como suporte para imobilização de  $\alpha$ -amilase de *Bacillus circulans* GRS 313 foi analisado. A atividade da enzima livre foi de aproximadamente 40 U/mol nas condições operacionais de pH 4,9 e temperatura de 48°C. A enzima foi imobilizada por meio de adsorção física e manteve 90% do seu potencial catalítico, após 03 ciclos (Dey *et al.*, 2002).

Brígida e colaboradores (2007) investigaram a utilização da fibra de coco verde como suporte de imobilização de Lipase B de *Candida antarctica*, aplicando métodos de imobilização por adsorção física e ligação covalente. Observou-se que a fibra de coco é um material de permuta iônica, devido à influência do pH do meio de acoplamento sobre a adsorção. Os efeitos do carregamento, tempo de contato e pH foram avaliados para o favorecimento da imobilização por adsorção física, sendo inserido o efeito também do

aditivo para a imobilização realizada por meio de ligações covalentes. Neste estudo observou-se que a lipase manteve de 70 a 90% do seu potencial catalítico.

A Lipase B de *Cândida antarctica* foi imobilizada em fibra de coco verde maduro, por adsorção física mostrando-se 92 vezes mais estável, em relação a enzima livre, enquanto a mesma enzima imobilizada em suporte sendo tratado com 3-glicioxiopropil-trimetoxissilano apresentou uma estabilidade 363 vezes mais estável em relação a enzima livre (Brigida *et al.*, 2007).

Utilizando fibra de coco verde, foi realizada uma comparação dos métodos de adsorção física e ligação covalente, Brigida *et al.* (2007), apontam resultados que mostram a eficiência da utilização de biocatalisadores desenvolvidos por meio de ligação covalente em meio aquoso. No entanto, a imobilização por meio de adsorção física é barata e pode-se obter também um biocatalisador que melhor se adequa ao processo.

O bagaço de cana foi utilizado também como suporte alternativo para a imobilização de *Candida tropicalis PHB5* que se apresentou eficiente através da técnica de imobilização por adsorção, apresentando um valor máximo de eficiência de imobilização e retenção celular de aproximadamente 87%. Estudos revelaram que 23,45% das células do imobilizadas em bagaço de cana pôde ser retida eficazmente durante o armazenamento a 4°C até 30 dias, como também ser reutilizado de 4 a 5 vezes, dando resultados quase semelhantes encontrados com células de alginato imobilizada. Apesar do bom rendimento obtido, a quantidade de células desorvidas durante a utilização ou lavagem foi maior no caso de células imobilizadas sabugo de milho, em comparação a mesma célula imobilizadas em alginato (Basak *et al.*, 2014).

Na Tabela 3.1 são listados alguns exemplos da utilização de resíduos agro-industriais como suporte para imobilização de enzimas.

Cristovão e colaboradores (2011) utilizaram fibra de coco verde para imobilizar Lacase comercial utilizando a técnica de imobilização por adsorção física. Os autores avaliaram os efeitos da concentração de enzima e tempo de contato com o suporte. Quando a carga enzimática aumentava, mais moléculas de enzimas eram imobilizadas, conseqüentemente, a área superficial livre do suporte diminuía, resultando em pouca área para a enzima se expandir, o que acarretava na redução de atividade da enzima imobilizada. Elevadas concentrações de enzima gerava camadas de enzimas imobilizadas, devido a fibra de coco não apresentar uma superfície porosa. Diante disso os autores realizaram os experimentos com concentrações de enzima de 0,033 g/mL e tempo de contato de 3 horas e meia. Apesar da avaliação da multicamada, o uso de uma

técnica simples de imobilização, obteve-se a estabilidade operacional do sistema próximo de 70% da atividade inicial da enzima após 5 ciclos e 55% depois de 13 ciclos.

Esta mesma enzima foi imobilizada, laccase comercial, foi imobilizada em fibra de coco verde silanizados com 3-glicidoxipropiltrimetoxisilano. As maiores atividades foram alcançadas após 2 h de tempo de contato. Lacase comercial imobilizada a pH 7,0 apresentou uma maior atividade e afinidade para o substrato. A imobilização por ligação covalente multiponto melhorou a estabilidade térmica biocatalisador a 50°C, quando comparado com a enzima livre. No entanto, a redução de bases de Schiff por boro-hidreto de sódio, causou uma diminuição na actividade da enzima e contribuiu para o aumento da estabilidade operacional (Cristóvão *et al.*, 2012).

A palha de arroz foi utilizada como suporte para imobilização de lipase, utilizando a técnica de imobilização por ligação covalente. Este resíduo foi ativado com glutaraldeído utilizando etileno glicol como agente de estabilização, sendo observado altos rendimentos de imobilização, utilizando cargas medias de enzima (De Castro *et al.*, 2001).

D´Souza e Godbole (2002) efetuaram a imobilização de invertase em casca de arroz, utilizando polietilenamina como agente de funcionalização. Os autores descrevem o trabalho como uma técnica simples para introduzir grupos funcionais na superfície de imobilização. A casca de arroz seca foi submetida por 2 horas em uma solução de polietilenamina.



**Tabela 3.1** - Resíduos como suporte para imobilização de diferentes enzimas.

Enzima	Fonte	Suporte	Agente de ativação	Método de imobilização	Referências
Lipase	<i>Candida rugosa</i>	Palha de Arroz	Glutaraldeído	Ligação covalente	Castro et al., 2001
Alfa-amilase	<i>Bacillus circulans</i>	Fibra de coco maduro	-	Adsorção física	Dey et al., 2002
Invertease	-	Casca de Arroz	Polietilenamina	Adsorção física	D'Souza & Godbole, 2002
			-	Ligação cruzada	
Lipase	<i>Candida antarctica</i>	Coco verde	-	Adsorção física	Pinheiro et al., 2005
			-	Adsorção física	
Tripsina	<i>Pâncreas</i>	Bagaço de malte	DEAE	Ligação iônica	Rocha et al., 2005
			Glutaraldeído	Ligação covalente	
Lipase B	<i>Candida antarctica</i>	Fibra de coco	-	Adsorção física	Brigida et al., 2007
			GPTMS	Ligação covalente	
Lipase B	<i>Candida antarctica</i>	Fibra de coco	-	Adsorção física	Brigida et al., 2008
Lacase	-	Coco verde	-	Adsorção física	Cristóvão et al., 2011
Lacase	-	Coco verde	-	Ligação covalente	Cristóvão et al., 2012

**Tabela 3.1** - Resíduos como suporte para imobilização de diferentes enzimas (continuação).

Enzima	Fonte	Suporte	Agente de ativação	Método de imobilização	Referências
Lacase	-	Bagaço de malte	- Glicidol	Adsorção física Ligação covalente	Silva et al., 2012
Lipase	<i>Candida rugosa</i>	Bagaço de malte	- -	Adsorção física Ligação crosslinking	Pospiskova et al., 2013
Lacase	<i>Trametes versicolor</i>	Fibra de coco verde	Glutaraldeído	Ligação covalente	Bezerra et al., 2014

A imobilização ocorreu por meio de ligação cruzada onde o agente de ativação utilizado foi o glutaraldeído e para evitar grupos aldeídos em excesso a solução foi lavada com etanolamina. Os rendimentos de imobilização da enzima imobilizada foram melhores quando foi utilizado um carregamento de 250 Ag/ml. Enzimas ligadas ao suporte por adsorção apresentaram desligamento do suporte, porém nenhuma dessorção da enzima, a partir das preparações de ligação cruzada, foi observada mesmo após a lavagem com cloreto de sódio. O derivado obtido mostrou-se estável operacionalmente, durante 12 ciclos, não perdendo a sua atividade (D'souza e Godbole, 2002).

Do mesmo modo, bagaço de malte de cevada, resíduo oriundo do processamento em cervejarias, foram utilizados como suporte de imobilização da enzima Tripsina. As metodologias utilizadas foram imobilização por adsorção, ligação iônica e covalente, para a imobilização de tripsina por adsorção física, foi utilizado 50 mg de enzima por 1 g de suporte. No caso da imobilização por ligação covalente foi utilizado glutaraldeído como agente de ativação bifuncional, a enzima imobilizada em suporte tratado com glutaraldeído mostrou-se mais estável obtendo uma atividade no 1º ciclo de 59,7 U/g, 44,2 U/g no 2º ciclo e após 3 ciclos reacionais manteve uma atividade de 80,4% da atividade inicial (Rocha *et al.*, 2005).

O uso do mesmo suporte, bagaço de malte de cevada, utilizando técnicas de imobilização adsorção física e ligação covalente, para o caso de enzima lacase (utilizando glicidol e etilenodiamina como agentes de ativação), verificou-se o efeito do tempo de contato da enzima ao suporte e sua concentração demonstrou que soluções com concentrações de Lacase até 0,005 g/mL apresentaram um rápido aumento e uma alta atividade enzimática, além disso a enzima apresentou boa estabilidade operacional até o sexto ciclo mantendo cerca de 50% de sua atividade (Da Silva *et al.*, 2012).

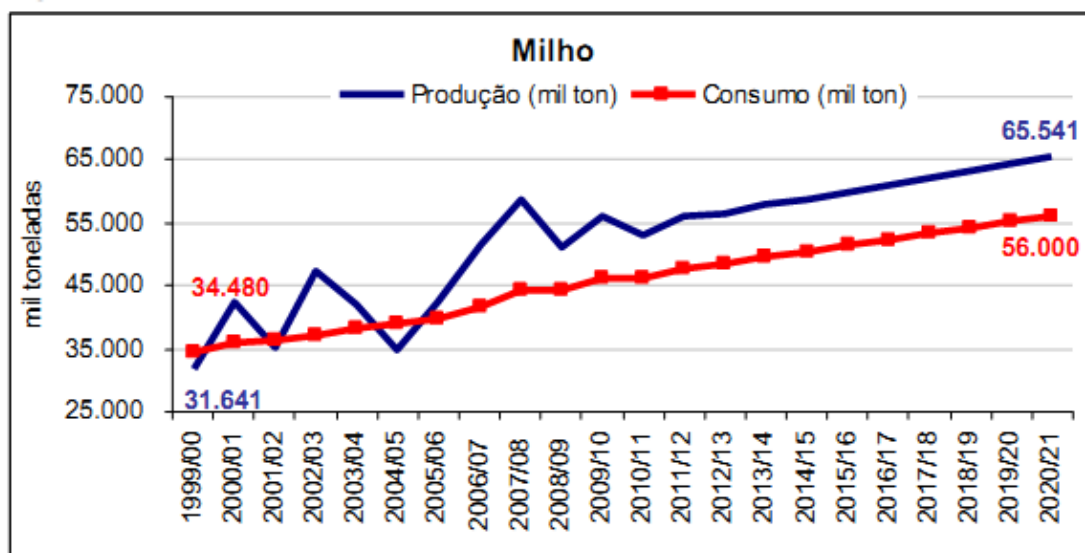
Casca de coco verde foi utilizado para a imobilização da enzima Lacase utilizando como agentes glioxil e glutaraldeído. Enzima imobilizada manteve-se a 60% da actividade inicial e mostraram perfil de imobilização máxima de 98%. A estabilidade térmica foi maior quando lacase foi imobilizada em suporte tratada alcalino. A lacase com glutaraldeído-CF obteve excelentes resultados, mantendo-se a 100% da atividade inicial após 10 vezes de reuso (Bezerra *et al.*, 2014).

Bagaço de malte foram apresentados como um suporte de baixo custo e biocompatível para a imobilização de enzimas. A modificação Magnética do suporte

permítio o uso de técnicas de separação magnética para a sua separação rápida a partir de amostras complexas contendo impurezas (Pospiskova e Safarik, 2013). Os autores mostram ainda que diferentes técnicas de imobilização podem ser utilizado de forma bem sucedida, estratégias mesmo muito simples, tais como adsorção enzima.

### 3.4 Milho

A busca por suportes alternativos e baratos tem despertado o interesse em resíduos agrícolas. Neste contexto de uso e aplicação de resíduos da agro-indústria, resíduos de milho, cultivado em diferentes sistemas produtivos, e plantado no Brasil principalmente nas regiões Centro-Oeste, Sudeste e Sul, surge também como alternativa. Como terceiro país maior produtor mundial de milho, totalizando 53,2 milhões de toneladas na safra 2011/2012 (EMBRAPA, 2013), o Brasil é visto por intermédio de estudos de projeções de produção do cereal, realizado pela Assessoria de Gestão Estratégica do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e a Embrapa (Figura 3.5), como um país que terá sua produção elevada em aproximadamente 19 milhões de toneladas até a safra de 2019/2020, devem do chegar a 65,5 milhões de toneladas.



Fonte: AGE/Mapa e SGE/Embrapa

**Figura 3.5** - Valores reais e projeções de produção do milho no Brasil (MAPA, 2013; EMBRAPA, 2013).

Esses resultados (Figura 3.5) indicam que o Brasil deverá fazer ajustes no seu quadro de suprimentos para garantir o abastecimento do mercado interno e obter excedente para exportação, estimado em 12,6 milhões de toneladas em 2019/2020, suprimindo a cadeia mundial por este produto.

Principalmente, nestas duas ou três últimas safras, a cultura do milho, experimentou um novo patamar de produtividade, só antes alcançado por países considerados desenvolvidos e detentores de alta tecnologia, a exemplo dos Estados Unidos, sendo possível encontrar produtores brasileiros com médias acima das encontradas em países considerados desenvolvidos (Zhang, 2008).

As previsões indicam que nos próximos anos, cerca de 86,0% da produção de milho será destinada ao mercado interno, para o atendimento do consumo humano e fabricação de rações para animais, em especial suínos e aves. Entretanto, com o plantio do milho é obtido basicamente três partes: palha, sabugo e grãos. A palha e o sabugo são os resíduos gerados após o debulhado da espiga de milho. Para cada 100 kg de espigas de milho, aproximadamente 18 kg são sabugos (Tsai *et al.*, 2001), dados estes que indicam uma perspectiva de aplicação de seus resíduos, como já houve nos demais resíduos nacionais ou internacionais oriundos de cultivos agrícolas ou de agro-indústrias, e um dos focos principais deste trabalho.

As previsões indicam que nos próximos anos, cerca de 86,0% da produção de milho será destinada ao mercado interno, para o atendimento do consumo humano e fabricação de rações para animais, em especial suínos e aves. Entretanto, com o plantio do milho é obtido basicamente três partes: palha, sabugo e grãos. A palha e o sabugo são os resíduos gerados após o debulhado da espiga de milho. Para cada 100 kg de espigas de milho, aproximadamente 18 kg são sabugos (Tsai *et al.*, 2001), dados estes que indicam uma perspectiva de aplicação de seus resíduos, como já houve nos demais resíduos nacionais ou internacionais oriundos de cultivos agrícolas ou de agro-indústrias, e um dos focos principais deste trabalho.

Assim, uma das alternativas encontradas pela engenharia é a utilização de resíduos agroindustriais como suporte para imobilização, sendo assim, torna-se necessário detalhar um pouco mais a estrutura morfológica destes, uma vez que tais características podem alterar as características dos biocatalizadores.

### 3.5 Estrutura Química dos Materiais Lignocelulósicos

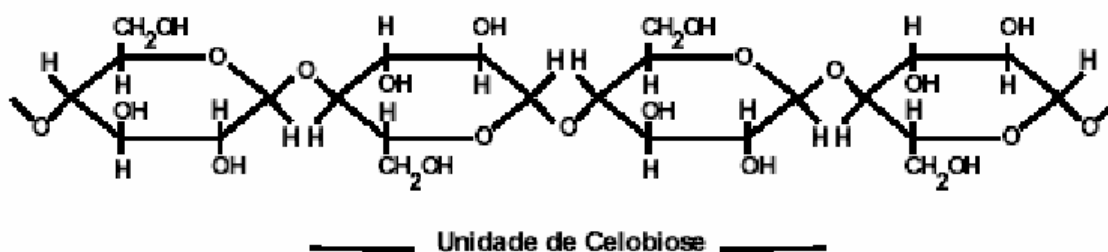
Resíduos agrícolas ou agro-industriais são materiais lignocelulósicos, os quais são constituídos de fibra de celulose envolvidas por uma matriz amorfa de polioses e lignina, que age como uma barreira natural ao ataque de microrganismos e/ou enzimas, tornando estes materiais estruturalmente rígidos e poucos reativos (Fengel e Wegener, 1989).

A composição dos materiais lignocelulósicos é muito variável, porém é observado que o maior componente é a celulose (35-50%), seguida em geral pela presença de hemicelulose (20-35%) e posteriormente pela lignina (10-25%) (Saha, 2003; Reddy e Yang, 2005).

#### 3.5.1 Celulose

A celulose é um polímero de cadeia longa, natural, e podendo ser definido como um homopolissacarídeo linear cuja unidade repetitiva é a celobiose ou anidroglicose sindiotática (Figura 3.6) que é formada por anéis de  $\beta$ -D-glicopiranosose unidas por ligações do tipo  $\beta$ -D (1 $\rightarrow$ 4) glicosídicas, de fórmula geral  $(C_6H_{10}O_5)_n$ , proporcionando assim um crescimento linear da cadeia macromolecular levando a uma elevada massa molecular, considerável grau de cristalinidade, insolubilidade em água e estrutura rígida (Fengel e Wegener, 1989; Zhang, 2008).

As forças que predominam inter e intramoleculares são as pontes de hidrogênio, que são responsáveis pela manutenção das regiões cristalinas e tornam a celulose altamente resistente à hidrólise ácida, alcalina ou enzimática (Junior *et al.*, 2013).



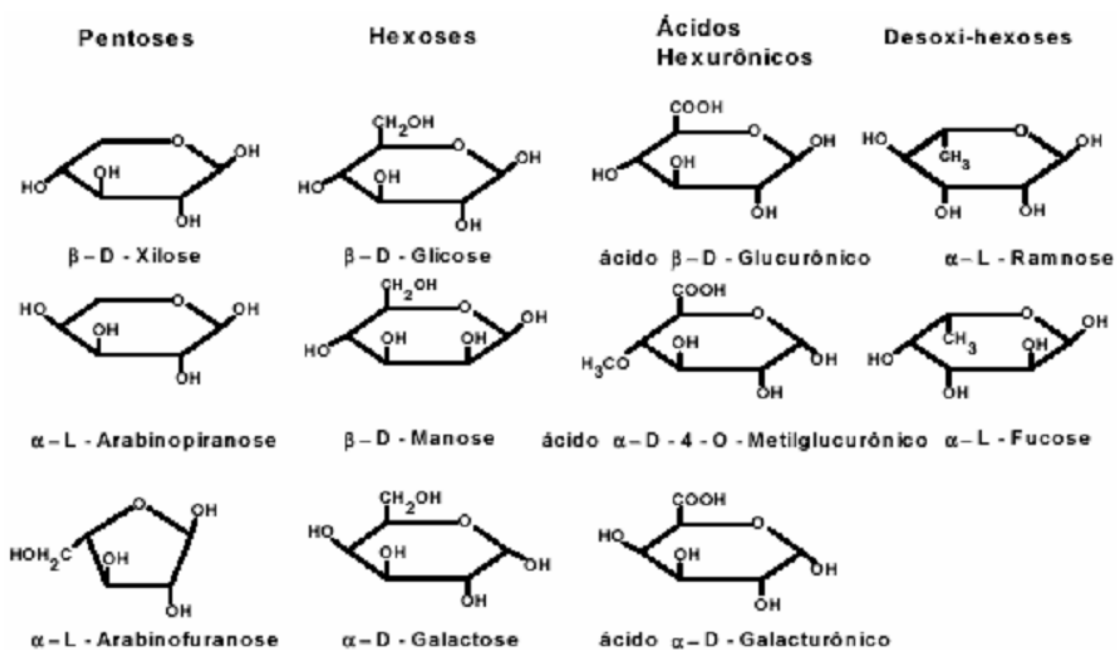
**Figura 3.6** - Estrutura da celulose, parte central da cadeia molecular.

Fonte:(Fengel e Wegener, 1989).

### 3.5.2 Hemicelulose

A principal característica das hemiceluloses é a sua diferenciação da celulose por serem amorfas, com estruturas ramificadas e compostas pela combinação de vários açúcares (Fengel e Wegener, 1989). Essas estruturas dos monossacarídeos que formam as hemiceluloses são mostradas na Figura 3.7.

Por apresentar uma estrutura molecular amorfa e uma combinação de vários açúcares, a hemicelulose torna-se mais solúvel em água, conseqüentemente, mais fácil de ser degradada do que a celulose (Ogeda e Petri, 2010). Nos materiais lignocelulósicos, a hemicelulose encontra-se intimamente ligada à celulose e a lignina, funcionando como uma fase adesiva na estrutura do material.

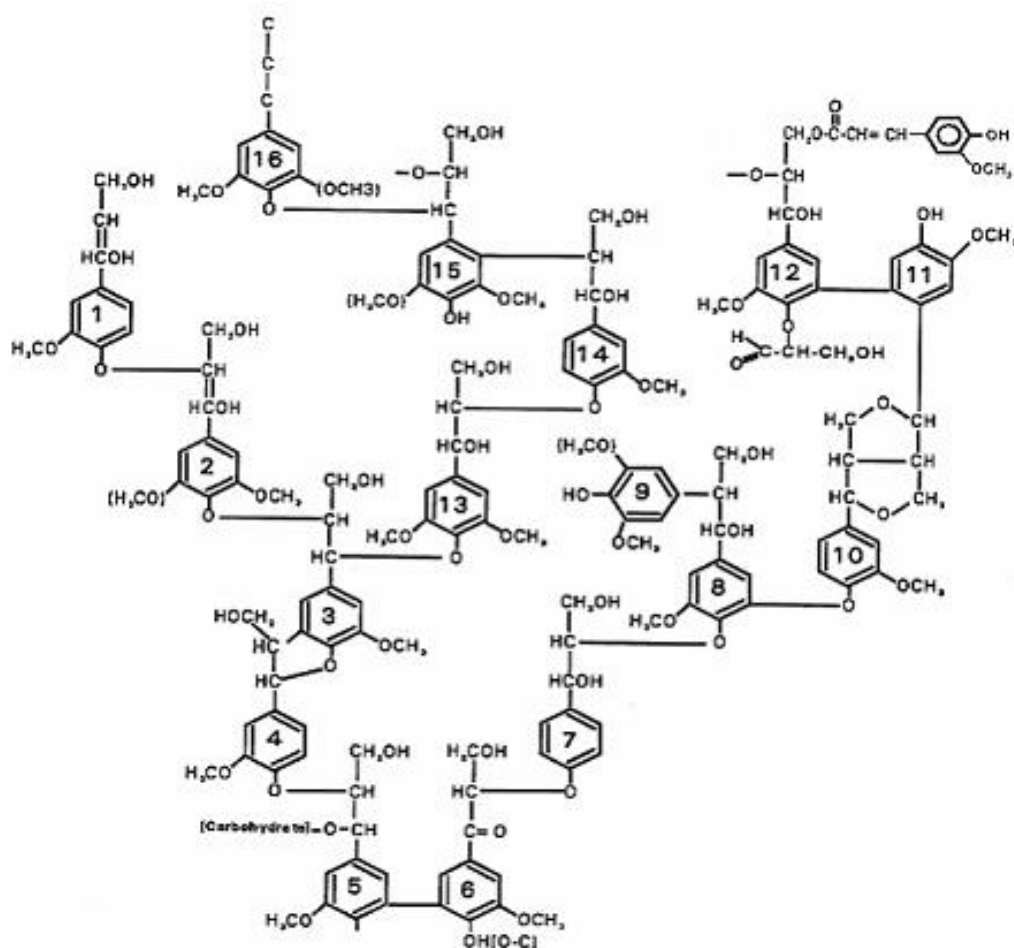


**Figura 3.7** - Estrutura dos monossacarídeos que forma a hemicelulose.

Fonte: (Fengel e Wegener, 1989).

### 3.5.3 Lignina

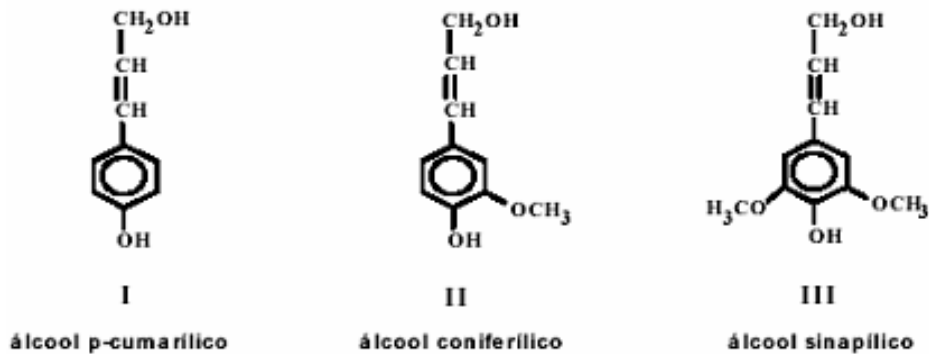
A lignina, depois da celulose, é a macromolécula que possui uma grande importância dentre os materiais lignocelulósicos, representando de 20 a 30% da massa total do material lignocelulósicos. Esta substância (Figura 3.8) vai sendo incorporada durante o crescimento do vegetal, com o acoplamento das unidades fenilpropano não ocorrendo de forma regular e repetitiva, o que é atribuído ao mecanismo da biossíntese da lignina (Fengel e Wegener, 1989). Além disso, torna-se importante salientar que a lignina se processa por via radicalar a partir da reação de três diferentes álcoois cinâmicos precursores (Figura 3.9): álcool p-cumarílico, álcool coniferílico e álcool sinapílico, que geram unidades p-hidroxibenzílicas, guaiacílicas e siringílicas, respectivamente (Rabelo, 2009).



**Figura 3.8** - Estrutura da lignina de abeto (*PiceaAbies*) proposta por Adler.

Fonte: (Fengel e Wegener, 1989).





**Figura 3.9** - Precursores da biossíntese da lignina.  
 Fonte: (Fengel e Wegener, 1989).

Neste sentido, para a manutenção da qualidade do suporte e melhoria do desempenho na atividade de imobilização em resíduos lignocelulósicos, a aplicação de tratamentos químicos e/ou térmicos torna-se promissora. No campo da aplicação atual em ciências exatas quando se trabalha com resíduos lignocelulósicos de modo específico com as frações e sua extração parcial ou total, o tratamento efetuado em geral é denominado de tratamento, termo que também será utilizado neste trabalho, conforme itens a seguir.

### 3.6 Etapas de tratamento em Materiais Lignocelulósicos

Nos estudos iniciais de tratamento em resíduos lignocelulósicos, a principal intenção foi somente hidrolisar suas frações em açúcares para posterior aplicação em processos fermentativos. Entretanto, a hidrólise enzimática dos materiais lignocelulósicos é limitada por vários fatores tais como a cristalinidade da celulose, o grau de polimerização, a umidade do lignocelulósico, a área superficial acessível, entre outros (Fernandes *et al.*, 2009).

Vários pesquisadores apontam que as duas principais causas de resistência dos materiais lignocelulósicos à hidrólise enzimática são: a baixa acessibilidade às fibras celulósicas (micro)-cristalinas, as quais restringem a atividade das celulasas, e a presença de hemicelulose e principalmente de lignina na superfície da celulose, impedindo a ação das celulasas ao substrato (Fernandes *et al.*, 2009).

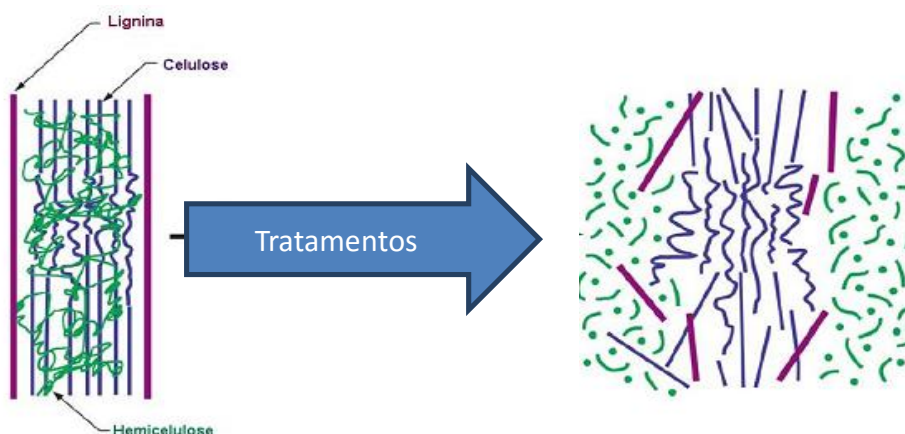
Neste contexto, os tratamentos do material servem para que as enzimas celulasas possam agir sobre a estrutura da celulose, facilitando assim o contato entre as microfibras

da celulose e o complexo enzimático, o que segundo Pereira Jr. (2007) é causado pela geração de uma desorganização do complexo lignocelulósico (Figura 3.10), conseqüentemente, aumentando a área de acesso das enzimas às moléculas de celulose.

O objetivo do tratamento é quebrar o elo da lignina e romper a estrutura cristalina da celulose, buscando de modo conjunto evitar a necessidade de reduzir o tamanho das partículas da biomassa, a formação dos produtos de degradação que inibem o crescimento de microrganismos fermentativos, quando for o caso, e minimizar a demanda de energia (Rabelo, 2010).

Além dessas propriedades, o baixo custo dos reagentes utilizados durante o tratamento, a possibilidade de ser reciclável e a geração de um subproduto da lignina de alto valor agregado são bases para comparação de vários métodos de tratamento (Hendriks e Zeeman, 2009; Brígida *et al.*, 2010).

Assim, o tratamento resulta na ampliação da área superficial interna das partículas do substrato, realizada através da solubilização e/ou pela degradação parcial da hemicelulose e da lignina. Isto conduz ao fracionamento dos três principais componentes e leva à abertura da estrutura da celulose (Hendriks e Zeeman, 2009), o que pode ser aplicado em diversos estudos não necessariamente somente para a obtenção de açúcares passíveis de serem hidrolisados, seja enzimaticamente ou por vias químicas.



**Figura 3.10** - Esquema de tratamento em materiais lignocelulósicos.

O fracionamento, como método para o aproveitamento da biomassa lignocelulósica, tem como objetivo a separação dos seus diferentes componentes poliméricos. A principal limitação desta estratégia está na dificuldade de separação de um

dos componentes sem que ocorra alguma degradação da estrutura química dos outros materiais que compõem os materiais lignocelulósicos. Assim, diversos tipos de tratamento podem ser aplicados visando conceitos de uso integral das frações existentes na composição lignocelulósica de resíduos. No entanto na literatura podemos distinguir dois métodos que degradam a fração: os que solubilizam os polissacarídeos (hidrólise); e os que solubilizam a lignina (deslignificação). Os processos aquosos, à temperatura e pressão elevadas, permitem também o fracionamento da biomassa nos seus constituintes, dos quais a fração hemicelulósica é mais facilmente hidrolisada, entretanto e de modo geral, os polissacarídeos podem ser hidrolisados pela ação de ácidos e enzimas, enquanto as hemiceluloses em particular, podem ainda ser solubilizadas por agentes alcalinos. Deste modo, os métodos de hidrólise de polissacarídeos podem ser classificados em métodos ácidos (diluídos e concentrados), alcalinos, auto-hidrólise e/ou enzimáticos (Van Walsum *et al.*, 1996; Laser *et al.*, 2002; Mosier, Wyman, *et al.*, 2005), sendo este último, de modo geral, não utilizado com finalidades de uso integral da biomassa devido a degradação enzimática de parte das frações quando no uso de enzimas.

O tratamento utilizado pode proporcionar melhoras significativas ao resíduo, podendo-se obter uma maior capacidade de imobilização ou até uma posterior hidrólise enzimática mais eficiente, devido ao aumento da área superficial e das modificações químicas na superfície do suporte (Hendriks e Zeeman, 2009; Alvira *et al.*, 2010; Brígida *et al.*, 2010; Gírio *et al.*, 2010; Brodeur *et al.*, 2011).

Devido as características particulares de cada material, não é recomendável a aplicação de qualquer tratamento de maneira generalizada, conforme mostra a Tabela 3.2, pois cada material lignocelulósico possui suas peculiaridades, sejam estruturais ou químicas. Deste modo, é de suma importância que antes de escolher o tipo de tratamento que seja empregado ao material, haja uma vasta caracterização do tipo de suporte, como também levando em consideração a técnica de imobilização que será utilizada e a reação de hidrólise que será empregado o sistema imobilizado (Sun *et al.*, 2004; Eggeman e Elander, 2005; Mosier, Hendrickson, *et al.*, 2005; Mosier, Wyman, *et al.*, 2005; Hahn-Hägerdal *et al.*, 2006; Cardona e Sánchez, 2007; Galbe e Zacchi, 2007; Hendriks e Zeeman, 2009).

**Tabela 3.2** – Tratamentos físicos, químicos e biológicos aplicado em resíduos.

	Tratamento	Alteração no material lignocelulósico	Vantagem	Desvantagens gerais
Físico	- Irradiação por micro-ondas	Aumento da área superficial	- Baixo custo	- Reduções parciais das frações lignocelulósicas
Químico e Físico-químico	- Autohidrólise - NaOH - H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> - H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> - Organosolv	- Deslignificação - Hidrólise parcial ou completa da hemicelulose	- Reduções significativas das frações lignocelulósicas	- Alto custo - Uso de compostos químicos por um longo período
Biológico	- Enzimas	- Redução do grau de polimerização da celulose e da hemicelulose	- Alto custo - Isento de compostos químicos	- Baixa redução da fração celulósica

### 3.6.1 Autohidrólise

Dentre os processos físico-químicos de tratamento de suportes o interesse pela autohidrólise tem aumentado significativamente, uma vez que limita o uso de produtos químicos (Amendola *et al.*, 2012; Buruiana *et al.*, 2014; Hou *et al.*, 2014; Vallejos *et al.*, 2014; Batalha *et al.*, 2015). Esta técnica, que também é utilizada para a ativação e desnaturação enzimática, quando usada como tratamento de materiais lignocelulósicos remove a maioria da hemicelulose e parte da lignina. (Boussaid *et al.*, 1999; Sun *et al.*, 2004; Varga *et al.*, 2004; Ruiz *et al.*, 2006)

A rápida expansão térmica abre a estrutura do suporte lignocelulósico, hidrolisando os grupos acetil, causando a solubilização da hemicelulose (Mosier, Wyman, *et al.*, 2005; Hendriks e Zeeman, 2009). Além disso, as remoções e redistribuições da hemicelulose e da lignina na superfície das fibras podem aumentar significativamente a área superficial do suporte (Brígida *et al.*, 2010; Gírio *et al.*, 2010; Brodeur *et al.*, 2011).

A temperatura utilizada varia normalmente de 160 a 260°C, sendo o custo de energia moderado neste processo, que geralmente satisfaz todos os requisitos do processo de tratamento em vários tipos de suportes (Garrote *et al.*, 2002; Laser *et al.*, 2002; Ballesteros *et al.*, 2004; Egüés *et al.*, 2012b).

Desde modo, e em geral, as condições operacionais utilizadas nos tratamentos por auto-hidrólise dos materiais lignocelulósicos são muito variáveis, com os principais produtos da auto-hidrólise sendo monossacarídeos, mistura de oligossacarídeos, ácido acético e produtos de degradação dos monossacarídeos, como, furfural e hidroximetilfurfural, os quais podem ainda sofrer reações de decomposição, dando origem ao ácido fórmico e levulínico (Dunlop, 1948). Entre os parâmetros operacionais importantes destacam-se a temperatura (Garrote *et al.*, 1999), o tempo de reação (Carrasco e Roy, 1992), a concentração de sólidos (Garrote *et al.*, 1999) e o tamanho das partículas (Allen *et al.*, 1996).

Já foi observado que durante a aplicação desta técnica, o aumento da temperatura pode efetivamente liberar açúcares hemicelulósicos. Entretanto, a perda de açúcares aumenta ainda mais a temperatura, resultando na redução da taxa de recuperação total de açúcar (Ruiz *et al.*, 2006).

Ruiz *et al.* (2006) estudaram o tratamento por autohidrólise de caules de girassol utilizando uma temperatura entre 180-230 °C. Eles obtiveram um rendimento máximo de glicose em 220 °C, enquanto a recuperação mais elevada de hemicelulose ocorreu em 210°C.

### **3.6.2 Extração Alcalina**

A extração alcalina possui seu efeito dependendo do índice da lignina dos materiais usados. O processo da hidrólise alcalina é acreditado para fazer a saponificação das ligações de éster intermolecular que ligam a hemicelulose da xilana e os outros componentes. O tratamento diluído de materiais lignocelulósicos causa o inchamento, conduzindo a um aumento na área de superfície interna, a uma diminuição na cristalinidade, à separação de enlace estrutural entre a lignina e os hidratos de carbono, e ao rompimento da estrutura da lignina. No entanto, o hidróxido de sódio (NaOH) assim como outros compostos alcalinos são demasiadamente caros e de difícil recuperação, sendo necessário a reciclagem para fazê-los viáveis (Prasad *et al.*, 2007).

O tratamento do bagaço de cana de açúcar com NaOH sozinho não foi muito eficiente em aumentar a digestibilidade enzimática do bagaço por celulases, pelo menos em parte, porque seria necessário elevar níveis de NaOH para melhorar hidrólise de hidratos de carbono poliméricos (Cullis e Mansfield, 2010). Infelizmente, o processo de formação de pasta alcalina de peróxido não é totalmente selectivos para lenhina, e os hidratos de carbono, incluindo celulose, também podem ser degradados (Monte *et al.*, 2011).

O tratamento alcalino é baseado no uso de soluções alcalinas, como NaOH, Ca(OH)<sub>2</sub> ou Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> principalmente para a remoção da lignina ou sua desorganização e parte da hemicelulose, aumentando assim a acessibilidade da enzima ao suporte (Kassim e El-Shahed, 1986; Chang *et al.*, 2001). Geralmente, a adição de oxigênio ou peróxido de hidrogênio (peróxido alcalino) ao processo aumenta significativamente a deslignificação do material (Saha e Cotta, 2006; Oleskowicz-Popiel *et al.*, 2008; Hendriks e Zeeman, 2009). Esse processo pode apresentar como vantagem a possibilidade de ser realizado em baixas temperaturas, porém com um tempo relativamente longo e alta concentração da base. Xu *et al.* (2007) trataram palha de soja através da extração alcalina, utilizando licor amoniacal (10%) durante 24 h em temperatura ambiente. Silverstein *et al.* (2007) realizaram o tratamento de hastes de algodão com ácido sulfúrico, hidróxido de sódio, peróxido de hidrogênio e ozônio. Eles constataram que o tratamento com hidróxido de sódio (2%) resultou na maior remoção de lignina (65%) em 90 min a 121 °C.

As hemiceluloses a partir do bagaço da cana foram isoladas após o tratamento alcalino seguido por extração com solvente orgânico. O tratamento com uma solução aquosa de NaOH a com temperatura variando entre 20-40°C durante 18 h resultou na remoção de cerca de 55 a 62 % das hemiceluloses (Xu *et al.*, 2006).

Sun *et al.* (2005) trataram palha de trigo utilizando dois processos integrados, a explosão a vapor e, em seguida, o tratamento por peróxido alcalino (pH 11,5). Os autores observaram uma remoção de 12% da lignina e de 11% da hemicelulose após a explosão a vapor, enquanto que o tratamento com peróxido alcalino resultou na remoção de 81% e 87% da hemicelulose e da lignina, respectivamente. Alcançando assim, um total de 92% de remoção da hemicelulose e de 99% da lignina originais da palha de trigo.

Três métodos de extração diferentes (ácido acético, ácido sulfúrico e hidróxido de sódio) foram utilizados para o tratamento seguido por tratamentos quimio-

termomecânica, para a hidrólise enzimática de palha de trigo para produzir açúcares fermentáveis. Os resultados mostraram que a extração combinada com os tratamentos quimio-termomecânica encurtaram o tempo de hidrólise enzimática e melhorou o rendimento de glicose nas mesmas cargas de enzima. O tratamento com hidróxido de sódio gerado a maior quantidade de materiais solúveis do que os outros dois métodos (Zhang *et al.*, 2015).

O tratamento com extração alcalina, comparada com tratamentos à base de ácidos ou reagentes oxidativos, parece ser o processo mais eficaz para romper as ligações ésteres dos suportes lignocelulósicos, e com isso evitando a fragmentação dos polímeros hemicelulósicos (Gáspár *et al.*, 2007).

### 3.6.3 Hidrólise Ácida

Os processos de hidrólise por via ácida podem ser classificados em duas categorias distintas: ácido diluído (concentração do ácido menor do que 5% m/v) ou concentrado (concentração do ácido maior do que 5% m/v) (Gurgel, 2010).

A hidrólise com ácidos concentrados, em geral sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) e o clorídrico (HCl), permitem a solubilização da celulose, obtendo-se uma fase sólida constituída essencialmente por lignina, enquanto a hidrólise com ácidos diluídos, também conhecida como hidrólise ácida, é um método para solubilizar as hemiceluloses (Fengel e Wegener, 1983; Mosier e Wyman, 2005).

Durante a hidrólise, o material lignocelulósico é misturado com um ácido (normalmente o H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) diluído em água e aquecido por certo tempo. Os grupos acetilas ligados às hemiceluloses são quebrados e também atuam como catalisadores do meio reacional, desta forma, grande parte da hemicelulose é removida. Por outro lado, a remoção da lignina ocorre de maneira limitada durante o tratamento (Lloyd e Wyman, 2005; Li *et al.*, 2007). Além disso, mesmo sendo teoricamente mais rápida e de menor complexidade, esta via ainda possui diversas limitações como a corrosão dos equipamentos, a formação de subprodutos tóxicos, a dificuldade em separar o ácido do hidrolisado e o baixo rendimento comparado ao da hidrólise enzimática.

Além disso, o alto custo de implantação e manutenção em escala industrial deste tipo de processo, hidrólise ácida, reduzem o interesse pelo mesmo (Wyman, 1996; Emmel *et al.*, 2003; Sun *et al.*, 2004; Yang e Wyman, 2004; Silverstein *et al.*, 2007; Banerjee *et al.*, 2010). As condições ótimas para o tratamento de suportes lignocelulósicos por

hidrólise ácida não significam, necessariamente, as melhores condições para a hidrólise enzimática. Cara e colaboradores (Cara *et al.*, 2008) relataram a remoção de 83% da hemicelulose de *Olea europaea* (oliveira) em 170 °C e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1%). Entretanto, os autores observaram uma baixa acessibilidade da enzima ao suporte. Com o tratamento a 210 °C e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1,4%) houve o rendimento máximo de hidrólise enzimática de 76,5%, mesmo com uma remoção menor de hemicelulose.

### 3.6.4 Deslignificação organosolv

Entre os métodos de deslignificação, têm sido propostos métodos conhecidos como organosolv, alternativos ao método sulfato ou kraft, este último usado tradicionalmente em indústria de polpa e papel e conhecido pelo seu elevado fator poluente nos efluentes. Assim, métodos organosolv usa solventes orgânicos (metanol, etanol, propanol, acetona, ácido acético, ácido fórmico, acetato de etila), em meios catalisados ou não (principalmente com ácidos, antraquinona ou sais) aplicando temperaturas de 150 a 210 °C para remover a lignina e, geralmente, parte da hemicelulose de materiais lignocelulósicos (Jiménez *et al.*, 2002; Shatalov *et al.*, 2005).

Nestes casos, a deslignificação é mais seletiva, obtendo-se uma lignina menos degradada, possibilitando maior viabilidade quanto ao uso integral dos componentes dos materiais lignocelulósicos, permitindo ainda a recuperação do solvente utilizado (Vázquez *et al.*, 1995). Este processo é ambientalmente mais aceitável e tem um grande potencial para a produção de subprodutos a partir da lignina, além de ter um custo relativamente baixo comparado à outros tipos de tratamentos.

De acordo com Papatheofanous *et al.* (1995), o tratamento por organosolv pode ser utilizado em conjunto com outros processos. Os autores trataram, primeiramente, vários suportes lignocelulósicos com solução aquosa de ácido diluído (ácido sulfúrico 0,5-2,5 N) em 100°C por 10-60 min a fim de remover a fração hemicelulósica do mesmo. Em seguida, os suportes foram tratados em condições ácidas (ácido sulfúrico 2 N) em 81°C por 90 min para a remoção da lignina. Nesta etapa o etanol foi adicionado (63-88%) para fornecer o meio de dissolução e recuperação da lignina gerada sob condições ácidas. Os resultados mostraram uma perda insignificante da celulose original (2%). Entretanto, houve uma remoção de 70% da lignina.



### **3.7 Uso de enzimas Imobilizadas para produção de ésteres etílicos**

A produção do biodiesel por transesterificação é realizada a partir de um triacilglicerol e um álcool (Park *et al.*, 2008). Em seguida um catalisador é adicionado à reação. Nos processos industriais, desenvolvidos atualmente, o catalisador é de origem química (Marchetti *et al.*, 2007). Deste modo, a primeira etapa do trabalho consiste na obtenção do biocatalisador, em seguida caracteriza-o utilizado na reação de transesterificação.

Os triacilgliceróis necessários para a produção do biodiesel podem ser provenientes de diversas fontes, como óleos vegetais (refinados, brutos ou utilizados em fritura), gordura animal e óleo de microalgas (Ranganathan *et al.*, 2008, Li *et al.*, 2015). A transesterificação enzimática utilizando lipases tem potencial para superar os problemas da catálise alcalina. Enzimas não formam sabões e podem esterificar os ácidos graxos livres, o glicerol pode ser facilmente recuperado sem tratamento complexo, o consumo de energia no processo é mais baixo, há uma drástica redução na quantidade de efluentes e as enzimas podem ser reutilizadas (Bon *et al.*, 2008; Harding *et al.*, 2008; Halim *et al.*, 2009). Além disso, a presença de água nas matérias-primas não é deletéria para as lipases, enquanto em um processo alcalino, a água pode hidrolisar o óleo, formando sabão (Robles-Medina *et al.*, 2009). A produção enzimática de biodiesel é possível utilizando tanto lipases extracelulares quanto lipases intracelulares. No caso das lipases intracelulares, as células inteiras podem ser imobilizadas (Ranganathan *et al.*, 2008). Assim, vários estudos têm sido realizados utilizando lipases para a produção de biodiesel. Na maioria dos trabalhos publicados, a transesterificação é realizada em reatores de batelada, onde a enzima é dispersa no meio reacional por meio de agitação em tanques reatores. Estes trabalhos utilizam de diversos suportes orgânicos, como resinas, géis e polímeros, etc, deste modo, outros tipos de suportes alternativos não têm recebido a devida atenção, uma vez que são biodegradáveis e produzidos de fontes naturais, renováveis e se apresentam como bons suportes para imobilização enzimática.

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Neste tópico serão apresentados os resultados e discussão do tema abordado por intermédio de 2 produções científicas, salientando que o referido trabalho também gerou outras 3 produções relacionadas ao desenvolvimento tecnológico e de inovação

representados por 3 depósitos de pedido de patente junto ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI):

#### **4.1 – Artigo 01**

APPLICATION THE AUTOHYDROLYSIS IN CORN COB FOR OBTAINING A NEW SUPPORT FOR IMMOBILIZATION OF LIPASE FROM *Burkholderia cepacia*

#### **4.2 – Artigo 02**

IMMOBILIZATION OF LIPASE FROM *Burkholderia cepacia* IN CORN COB IN NATURE AND TREATMENT

#### **4.3 – Patente 01**

Utilização de sabugo de milho como suporte para o processo de imobilização de Lipases.

#### **4.4 – Patente 02**

Pré-tratamento em sabugo de milho para de imobilização de Lipases.

Patente 03

#### **4.3 – Patente 03**

Imobilização de Lipases em sabugo de milho tratado por organosolv.

Desta forma, demonstrou-se o potencial do uso do sabugo de milho *in natura* ou tratado como suporte de imobilização da lipase de *Burkholderia cepacia*.

## 4.1 – Artigo 01

### APPLICATION THE AUTOHYDROLYSIS IN CORN COB FOR OBTAINING A NEW SUPPORT FOR IMMOBILIZATION OF LIPASE FROM *Burkholderia cepacia*

Como terceiro país maior produtor de milho, o Brasil é visto como um país que terá sua produção elevada de aproximadamente 19 milhões de toneladas entre a safra de 2008/2009 e 2019/2020. A palha e sabugo de milho são os resíduos gerados após o milho debulhado na espiga. Para cada 100 kg de milho em espigas, cerca de 18 kg são sabugos de milho (Tsai *et al.*, 2001). Em vista disto, grandes quantidades de resíduos são gerados ao longo das safras com pouca atenção. Neste trabalho, o sabugo de milho foi fracionado parcialmente, através de tratamento por autohidrólise, técnica considerada amiga do meio ambiente, visando a remoção de partes do seu teor de hemicelulose. Neste contexto, o presente estudo avaliou o uso de resíduos agro-industriais, na sua forma natural ou tratada (por auto-hidrolise), como suporte para a imobilização da lipase comercial utilizando como técnica de imobilização a adsorção física, e analisando sua aplicação em condições amenas de reação.

Artigo a ser submetido.

## IMMOBILIZATION OF LIPASE FROM *Burkholderia cepacia* IN CORN COB IN NATURE AND AFTER TREATMENT

<sup>1</sup>Diego Melo Costa; <sup>1</sup>Raíra Souza de Santana Castro; <sup>1</sup>Erica Rodrigues de Souza;  
<sup>3</sup>Denise Santos Ruzene; <sup>3</sup>Daniel Pereira Silva; <sup>1,2</sup>Álvaro Silva Lima;  
<sup>1,2</sup>Cleide Mara Faria Soares

<sup>1</sup> Universidade Tiradentes, Av. Murilo Dantas, 300, Bairro Farolândia, CEP 49032-490, Aracaju-SE, Brazil

<sup>2</sup> Instituto de Tecnologia e Pesquisa, Av. Murilo Dantas, 300 - Prédio do ITP, Bairro Farolândia, CEP 49032-490, Aracaju-SE, Brazil

<sup>3</sup> Universidade Federal de Sergipe, Av. Marechal Rondon, s/n, Bairro Jardim Rosa Elze, CEP 49100-000, São Cristóvão-SE, Brazil

### Abstract

The lignocellulosic residues are the most abundant in the world and such biomass represents an enormous potential for the production of several products of industrial interest with great attention the last years. However, the use of these agro-residues in process engineering, such as support agents for immobilization of enzymes, becomes important. In this context, this study evaluated the use of agro-industrial residues, corn cob, *in nature* and/or treated (by extraction of lignocellulosic fractions), as support for the immobilization of lipase comercial using the technique of immobilization physical adsorption and applying mild reaction conditions. The lipase immobilized on corn cob support treated by alkaline extraction, sequence alkaline extraction plus organosolv process, and *in nature* residue, showed results of yield equivalent to 72%, 50% and 61%, respectively. The biodegradability of corn cob as support, *in nature* and treated, did not show any formation of degradation compounds conditions in aqueous media in the immobilization process. Besides, the lipase immobilized in the different conditions of support (*in nature* and treated) showed a similar profile in relation the relative activity, depending on the number of cycles, keeping about 95% of its activity during the first three cycles.

**Keywords:** lipase; immobilization; corn cob; adsorption; kinetic parameters.

## 1. Introduction

Recently considerable interest has arisen in developing clean technologies that facilitate the use of products of biotechnological interest and processes with the lowest possible environmental impact (Christopher *et al.*, 2014). According to data from the FAO (Fao, 2014), corn is among the largest commodities in the world, having a significant representation of the main cereal crops worldwide. Thus, corn is configured today as an important activity for the economy, not only by the maize but also by its residue. In the quest for sustainability, several research and work in the area involving agro-industrial and agricultural residues are being conducted to ensure environmental preservation and provide a better standard of living to society (Santos *et al.*, 2008). Among the studies, we highlight the use of corn cobs, lignocellulosic material that can be searched in various industrial and biotechnological processes as well as other residues from the corn crop (Egüés *et al.*, 2012a; b). These agro-residues have been used in their natural forms or after some physical or chemical modification (treatment).

In this context, lignocellulosic material is mainly composed by three compounds (cellulose, hemicellulose, and lignin) and each compound has specific properties. Hemicellulose is made up of amorphous heteropolysaccharides containing five and six carbon units which may contain side groups as arabinose, uronic or acetyl. Because it has an amorphous molecular structure and a combination of multiple sugars, the hemicellulose becomes more soluble in water and, therefore, more easily degraded than that of cellulose. Cellulose is a linear homopolysaccharide polymer whose repeating unit is Syndiotactic anhydroglucose or cellobiose which is formed by rings  $\beta$ -D-glucopyranose linked by  $\beta$ -linkages of the type D (1,4) glycosidic linkages, of formula ( $C_6H_{10}O_5$ ), thereby providing a linear increase of the polymer chain leading to a high molecular weight, a considerable degree of crystallinity, insoluble in water and rigid structure. Lignin, after cellulose, is the macromolecule more abundant from the lignocellulosic materials, incorporated during vegetative growth, being 20 to 35% of the total mass of the lignocellulosic material (Fengel e Wegener, 1983; Egüés *et al.*, 2012b).

On the other hand, enzymatic immobilization refers to the isolation of a biocatalyst, requiring some immobilization support material, making it physically separated from the reaction mixture which can be reused repeatedly and continuously, thus reducing overall production costs (Datta *et al.*, 2013).

In this context, lipases, also known as triacylglycerol hydrolases (EC3.1.1.3), are enzymes that preferably catalyze the hydrolysis of acylglycerols at the oil/water interface. Hydrolytic reactions by lipases are generally reversible and the potential of these enzymes in organic synthesis has been well studied.

The different techniques and supports for the immobilization of lipase have been tried and reviewed by several workers (Datta *et al.*, 2013; Izrael Živković *et al.*, 2015) including deposition onto solid supports (Boncel *et al.*, 2013; Barbosa *et al.*, 2014), covalent binding (Poppe *et al.*, 2013), and entrapment within a polymer matrix or hydrophobic sol-gel materials (De Souza *et al.*, 2013). Although there are numerous immobilization protocols, the various immobilization methods for enzymes are mainly classified into four categories: adsorption, covalent binding, cross linking and entrapment (Adlercreutz, 2013). Among immobilization techniques, adsorption may have the highest commercial potential compared to other techniques due to its relatively low cost, simpleness and it allows retaining of high catalytic activity (Brígida *et al.*, 2009). However, adsorption is not a strong interaction and the protein will desorb from support during washing and other steps. Thus, immobilization via adsorption requires an electrostatic interaction between support and enzyme, and therefore requiring many studies related to different types of support material (Cabrera-Padilla *et al.*, 2013).

In this study, lipase from *Burkholderia cepacia* was immobilized on different materials based on corn cob (residue treated by alkaline extraction and by sequence alkaline extraction plus organosolv process, for removing partial of lignocellulosic fractions, and *in nature*). The characterization of the material was realized before and after treatment, the moisture content, the amount of immobilized lipase, morphological and biochemical characterizations also were examined to determine the better conditions for reaction of the immobilized biocatalyst obtained.

## **2. Materials and Methods**

### *2.1 Enzyme and chemicals*

The lipase used for to develop the experiments was Amano Lipase PS, from *Burkholderia cepacia* commercially purchased from Sigma-Aldrich. Corn cob, used as enzymatic immobilization support, were obtained from Dow 433 hybrid corn planted in the city of Poço Verde (Jureminha, town Jureminha), State of Sergipe/Brazil.

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

## 2.2 Chemical characterization of the raw material - corn cob

The chemical characterization was performed following the procedure reported by (Ruiz *et al.*, 2011). Aliquots were homogenized and subjected to moisture determination. Approximately, 0.3 g of corn cob was treated with 5 mL of 72% (w/w) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> for 1 h at 30°C, followed by a quantitative posthydrolysis with 4% sulfuric acid (adding water until 148.67 g) at 121°C during 60 min. Before HPLC analysis, the solid residue from the posthydrolysis process was recovered by filtration and considered as Klason lignin. For the determination of ash, the solid retained after filtration was taken in a crucible and kept in a muffle furnace at 750°C for 8 h. The monosaccharide sugars and acetic acid contained in the hydrolysates were determined by HPLC, in order to estimate the contents of the samples in glucan, xylan, arabinan and acetyl groups.

## 2.3 Corn cob treatment: alkaline extraction and sequence alkaline + organosolv

Initially, steps of alkaline extraction were performed using samples of ground corn cob with a particle size of 32-60 mesh and 100 mL of NaOH 0.75 mol/L. For this, the system was heated to a temperature of 55°C for 120 min. At the end of the desired reaction time, the pH was adjusted to 7.0 using acetic acid. The solids resultant were separated from the liquid phase (or liquor, hemicellulose-rich fraction) by filtration and then washed with 50 mL of distilled water and used as supports for the immobilization. Both fractions, solid and liquid fractions, were submitted to chemical analysis.

For the attainment of the step sequential of alkaline extraction plus organosolv process, samples of the solid fraction obtained from the alkaline extraction were used in the procedure of organosolv process. For this, 10 g of solid fraction from alkaline extraction, 100 mL of ethanol/water solution at 40% (v/v) (ratio solid / liquid 1:10 w/v) and 1% NaOH (w/v) were mixed, and the reactor was then closed placed in silicon oil bath and heated at 185°C for 20 min.

#### 2.4 HPLC analysis

The chemical characterization, with quantification of the sugars and acetic acid present in the materials *in nature* and one obtained after steps of treatments, were performed with a refractive index (RI) detector in a Jasco chromatograph equipped with a Aminex HPX-87H column (300 × 7.8 mm, Biorad, USA) under the following conditions: mobile phase 0.005 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, flow rate 0.6 mL/min, and column temperature 45°C.

#### 2.5 Enzyme Immobilization

Amano Lipases PS, from *Burkholderia cepacia* were immobilized by physical adsorption on different materials based on corn cob (residue treated by alkaline extraction and by sequence alkaline extraction plus organosolv process, for removing part of its lignocellulosic fraction, and *in nature* residue) using a procedure modified from Soares *et al.* (1999). Thus, in 20 mL of hexane was added 2.0 g of support under vigorous agitation at room temperature for 2.0 h (25°C), then 20 mL of enzymatic solution (mass of the enzyme solubilised in 20 mL, 0.1M sodium phosphate buffer, pH 7.0) also was added to suspension (hexane and support) and agitated for more 2.0 h. The system enzyme-support 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 was then quantified. Filtrates and washes were collected and used for activity determination. The prepared immobilized lipase was then stored at 4°C.

In order to determine the optimal amount of lipase, were tested different amounts of enzyme/support ratios on the immobilization (0.15; 0.30; 0.45, and 0.60).

#### 2.6. Activity of lipase in the hydrolysis

The hydrolytic activities of free and immobilized lipases were assayed by the olive oil–water emulsion method (Soares *et al.*, 1999). The substrate was prepared by mixing 50 mL of olive oil with 50 mL of gum arabic solution (7% w/v). The reaction mixture containing 5 mL of the emulsion, 2 mL of 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.0) and free or immobilized enzymes. The enzyme was incubated for 5 min when in free system and 10 min when in immobilized system, at 37°C under rigorous stirring. The reaction was stopped by addition of 2 mL of acetone solution. Liberated fatty acids were titrated with potassium hydroxide solution 0.037 M using of phenolphthalein as an indicator. One



unit (U) of enzyme activity was defined as the amount of enzyme that liberated 1  $\mu\text{mol}$  of free fatty acid per min ( $\mu\text{mol}/\text{min}$ ) under assay conditions.

The yield of the immobilized lipase activity was defined as the ratio of the adsorbed activity recovered at the end of the immobilization period divided by the total soluble lipase activity initially added to 2 g of the support.

## 2.7 Biochemical properties of immobilized lipase

### 2.7.1 Effect of pH and temperature on activity

The effect of pH on the relative activity of immobilized lipase was assayed in phosphate buffer (0.1M) from pH 4.0 to 9.0, while the effect of temperature on the relative activity of immobilized lipase was determined at pH 7.0 in temperature range varying from 30 to 70°C, in either case using olive oil emulsion as substrate. Relative activities were calculated as the ratio of the enzyme activity measured at different conditions to the maximal activity of the enzyme measured as described in section 2.6.

### 2.7.2 Thermal stability

The thermal inactivation of the free and immobilized lipase was investigated by incubation in phosphate (100 mM), buffer pH 7.0 and optimum temperature. For this purpose 0.1 g of immobilized biocatalyst or free was incubated in a water bath with temperature control. In certain time intervals (15, 30, 60, 120, 180 and 240 minutes) consecutive aliquots were taken up to complete inactivation. The initial activities were compared with the residual activities. The enzyme inactivation rate constant ( $k_d$ ) and half-life time ( $T_{1/2}$ ) were calculated using Eqs. 1 and 2, respectively.

$$A_{in} = A_0 * e^{-k_d * t} \quad (1)$$

$$T_{1/2} = \frac{\ln(0,5)}{-k_d} \quad (2)$$

where:  $A_{in}$  is the residual lipase activity after thermal treatment,  $A_0$  is the initial lipase activity and  $t$  is time in minutes.

### 2.7.3 Determination of $K_m$ and $V_{max}$

The Michaelis-Menten constants ( $K_m$  and  $V_{max}$ ) were calculated using reaction systems containing fatty acids at concentrations ranging from 37-2604 mM, obtained from emulsions with different proportions of olive oil (1-70%) and aqueous solution of gum arabic (7% w/v). Hydrolysis reaction rates, catalysed by Amano Lipase PS from *Burkholderia cepacia*, free and immobilized, were determined according to methodology described in section 2.6.

The apparent values of  $K_m$  and  $V_{max}$  were calculated by nonlinear fitting using the program Origin® 8.0.

### 2.7.4 Stability of immobilized lipase

The operational stability and reusability of the immobilized biocatalyst were determined by conducting hydrolysis reactions in consecutive batches using the same immobilized enzyme. Each batches consisted of 10 min of hydrolysis reaction at a temperature and pH great for biocatalyst.

After each batch, the immobilized enzyme was washed with hexane once and reused for the next cycle of hydrolysis.

### 2.7.5 Enzymatic transesterification reaction

The reactions were performed according to the methodology described previously by Freitas et al. (2009) in closed reactors, containing 3.49 g of substrate with sunflower oil and 1.51 g anhydrous ethanol and without the addition of solvents. The mixtures were incubated with the immobilized lipase in the proportion of 20% in relation to the total weight of reactants involved in the reaction media.

Reactions were performed for a maximum period of 120 h under constant magnetic agitation of 150 rpm. The conversion of product was analyzed by gas chromatogram (Shimazu GC-14A) equipped with silicone SE-30 as a column, taking sample at fixed interval. The column temperature was set at 220°C. The injector and detector temperatures were set at 250 and 260°C, respectively.

## 2.8 Morphological and physico-chemical properties

### 2.8.1 Thermogravimetric analysis (MEV)

Surface morphology of native and the oxide-supported biocatalysts was investigated through scanning electron microscopy analysis with a Philips SEM 505 microscope. The images were digitized under the following conditions: files, 1024 × 1024 pixel; voltage, 25 kV; probe size, 20–50 nm and magnification, 100–1000×.

### 2.8.2 Thermogravimetric analysis (TGA)

The free enzyme, corn cob support treated by alkaline extraction, sequence alkaline extraction plus organosolv process, and *in nature* residue, and also immobilized biocatalyst samples, were all analyzed in a simultaneous DTA-TG apparatus SHIMADZU-Thermogravimetric Analyzer – Model DTG-60 H. Approximately 5 mg of samples were submitted to a heating rate of 10°C/min from room temperature to 900°C, the nitrogen was used as an inert gas at a flow rate of 30 mL/min.

## 3. Results and Discussion

### 3.1 Chemical composition of raw material

The composition of corn cob samples used as raw material in this work is shown in Table 1. Thus, this raw material is defined by its contents of glucan (corresponding to cellulose), xylan (measured as xylose equivalent, which forms the main polymer backbone), xylan substituents (arabinose units, reported as arabinan expressed in sugar equivalent, and acetyl groups), lignin, ashes, and other components. Xylan content in corn cob accounted for about 24.3% of the dry weight of all material. This chemical composition is in good agreement with other values found in the literature for this material (Garrote *et al.*, 2002; Parajó *et al.*, 2004).

The use of acid hydrolysis in the corn cob is identified in the literature as an efficient method to obtain the total composition of lignocellulosic material. However, during the chemical process is common occurs the formation of compounds from the degradation of pentoses and hexoses to hydroxymethylfurfural and furfural, respectively.

According to results shown in Table 1, the value of furfural found during the characterization of corn cobs was approximately 1.2%, while for the levels of hydroxymethylfurfural was of 0.21%.

**Table 1** - Chemical composition (%) of corn cob *in nature*.

Chemical constituents	Composition (%)
Cellulose	27.4 ± 0.8
Hidroximetilfurfural	0.21 ± 0.05
Hemicelluloses	24.3 ± 1.4
Furfural	1.2 ± 0.3
Total Lignin	35.7 ± 1.1
Soluble lignin	11.2 ± 1.6
Klason lignin	24.5 ± 2.1
Total composition	88.8 ± 2.1

### 3.2 Characterization of the fractions obtained after steps of treatment

The procedures of alkaline extraction and sequence of alkaline extraction plus organosolv process allow the obtention of differentiated materials to be used as enzyme immobilization supports, but also possible to obtain by-products (or secondary products) that is the hemicellulose extracted after the alkaline extraction and the lignin extracted after the organosolv process, both from corn cob itself. Table 2 shows the chemical composition of the solid material of the fractions obtained after steps of treatment by alkaline extraction and sequence of alkaline extraction plus organosolv process.

According to results shown in Table 2, chemical composition of the solid fractions and liquid fractions (liquor) obtained after alkaline extraction process and organosolv process, although the treatment methods used in this work were applied for the removal of hemicelluloses and lignin, reduction in the cellulose composition also occurred as observed by the results obtained of 12.9% lignin and 9.3% cellulose in composition of the liquid fractions respectively. This reduction also is reported in the literature by Rout *et al* (2001) and Ruiz *et al* (2011).

**Table 2** - Chemical composition of the solid fractions and liquid fractions obtained after treatment by alkaline extraction (NaOH 0.75 mol/L, 55°C by 120 min) and sequence of alkaline extraction (NaOH 0.75 mol/L, 55°C by 120 min) plus organosolv process (ratio solid / liquid 1:10 w/v and 1% NaOH w/v)

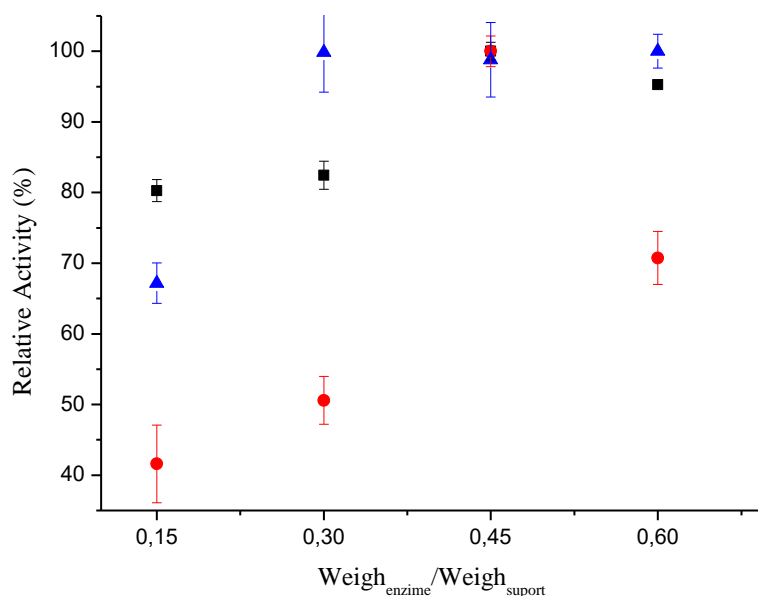
Chemical Constituents	Composition solid fraction (%)		Composition liquid fraction (%)	
	alkaline extraction	organosolv	alkaline extraction	organosolv
Cellulose	21.6 ± 0.9	23.5 ± 0.9	9.3 ± 0.7	17.2 ± 0.5
Hydroxymethylfurfural	0.2 ± 0.1	-	-	-
Hemicelluloses	14.7 ± 1.5	-	49.3 ± 1.7	61.9 ± 1.3
Furfural	1.3 ± 0.5	6.7 ± 1.0	-	-
Total lignin	32.9 ± 0.9	4.2 ± 1.2	-	-
Soluble lignin	10.8 ± 1.9	2.3 ± 0.9	12.9 ± 0.5	18.9 ± 0.2
<i>Klason</i> lignin	22.1 ± 1.3	41.5 ± 2.1	-	-
Total composition	70.6 ± 2.1		-	-

The liquid fractions obtained presented a content approximately 49.3% and 61.0% of hemicelluloses proving the removal hemicellulose from the *in nature* and alkaline extraction corn cob, respectively, as already presented in the literature in the removal of lignocellulosic fraction of other organic residues (Pereira Filho *et al.*, 2003; Brígida *et al.*, 2010).

### 3.3 Immobilization of lipase by physical adsorption on corn cobs

The objective of this study was to immobilize commercial lipase through a simple, effective and low cost process using as support different materials based on corn cob (residue treated by alkaline extraction and by sequence alkaline extraction plus organosolv process, for removing partial of lignocellulosic fractions, and *in nature* residue). The effect of enzyme concentration, pH and contact time between the enzyme solution and the corn cob commercial immobilized lipase activity was studied and optimized.

Figure 1 shown the values of relative activity as a function of ratio obtained of enzyme/support mass during immobilization of lipase in different materials based on corn cob.



**Fig. 1** - Values of relative activity of the immobilized biocatalyst as a function of the ratio obtained of enzyme/support mass during immobilization procedure of lipase in different materials based on corn cob: residue treated by alkaline extraction (red) and by sequence alkaline extraction plus organosolv process (blue), and in nature residue (black).

The corn cob when used in nature showed a relative activity on around 83% in the first charges, reaching its maximum activity on the ratio of 0.45 w/w. The value of the relative activity in residue treated by alkaline extraction was initially low in the initial concentrations, reaching maximum activity on the same conditions when in nature (ratio of 0.45 w/w), while the residue after sequence alkaline extraction plus organosolv process reached its highest relative activity in the ratio of 0.30 w/w.

According to the literature when the enzyme load was increased, more enzyme molecules were immobilized less area of support was available for enzyme spread, which can prevent access to the enzyme active site, leading to loss of activity (Cristóvão *et al.*, 2011).

For these conditions, was obtained a percentage of immobilization of 62% satisfactory result compared to other enzymes immobilized on different supports as coconut fiber and spent grain (Cristóvão *et al.*, 2011; Da Silva *et al.*, 2012).

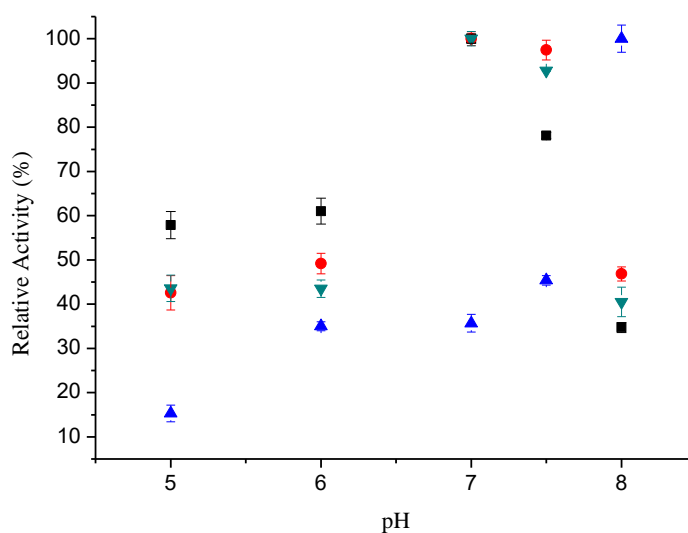
With these results, the relation enzyme/support of 0.45 w/w was selected to continue the studies using the biocatalyst *in nature* and the treated by alkaline extraction. For the organosolv biocatalyst was used 0.30 m/m, since it is the concentration that offers the best immobilization yield.

### 3.4 Biochemical properties of immobilized lipase

#### 3.4.1 Effect of pH and temperature on activity

The process of immobilization of enzymes have a variety of effects on the state of ionization and dissociation of the enzyme. In particular, pH can have a profound effect on hydrolytic activity after the immobilization process. Therefore, it is very important to compare the free and immobilized enzyme as a function of pH.

The effect of pH on the relative activity of free and immobilized enzyme during hydrolysis of emulsified olive oil was determined between pH 4.0 and 8.0, and the results are shown in Figure 2.

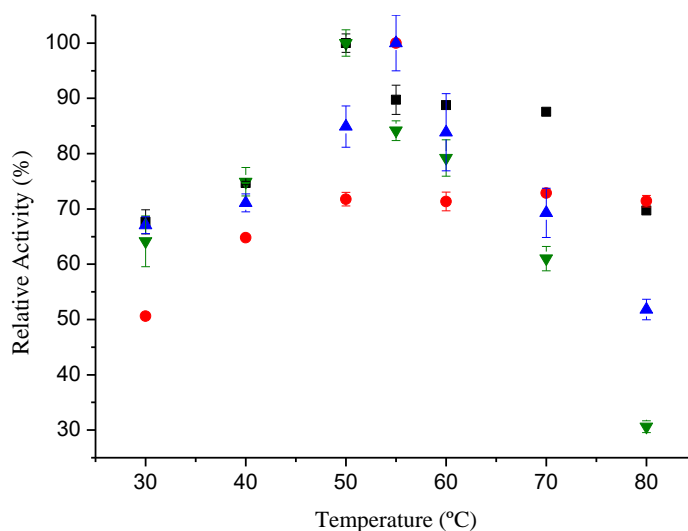


**Fig. 2** - Effect of pH on the relative activity of the free enzyme (green) and immobilized enzymes in different materials based on corn cob: residue treated by alkaline extraction (red) and by sequence of alkaline extraction plus organosolv process (blue), and in *in nature* residue (black).

Figura 2 revealed a maximum of activity at pH 7.0 to the conditions of immobilized biocatalyst in in nature residue, after alkaline extraction as well as in free enzyme, while also revealed a maximum of activity at pH 8.0 to the conditions of immobilized biocatalyst in residue after sequence of alkaline extraction plus organosolv process. (Mendes *et al.*, 2011) also obtained a pH change when changed from free enzyme system for immobilized enzyme.

Values pH below or above of the value around the maximum region (optimums) for each condition of immobilization (Figure 2) no showed abrupt drop in the immobilized enzyme activity in comparison to values of free enzyme activity suggesting that the immobilization technique no caused negative changes to the conformation in the enzymes when immobilized in corn cob. In literature, similar results have been reported for lipase immobilized on different supports and technics (Cabrera-Padilla *et al.*, 2012; Abdulla e Ravindra, 2013; Zubiolo *et al.*, 2014).

In relation to temperature, the resistance of immobilized lipase is an important advantage for practical applications of this enzyme. The temperature dependence of the relative activity of free and immobilized lipase was investigated and compared by measuring hydrolysis of emulsified olive oil at different temperatures, and the results are shown in Figure 3.



**Fig. 3** - Effect of temperature on the relative activity of the free enzyme (green) and immobilized enzymes in different materials based on corn cob: residue treated by alkaline extraction (red) and by sequence of alkaline extraction plus organosolv process (blue), and in in nature residue (black).



The optimum temperature of the free enzyme activity and of the biocatalyst immobilized in *in nature* corn cob was 50°C, as shown in Figure 3. This temperature value was improved when immobilized in corn cob treated by alkaline extraction or by sequence of alkaline extraction plus organosolv process, reaching maximum activity relative to 55°C. In relation to maintenance of the activity at different temperature values, the biocatalyst immobilized in corn cob in nature and also in the material treated remained about 70% of its activity relative until 80°C. Similar results were reported during the study of immobilization of lipase from *Candida rugosa* (Cabrera-Padilla *et al.*, 2012).

### 3.4.2 Thermal stability

The thermal stability is one of the most important features concerning the application of the biocatalyst. Enzyme immobilization often limits its freedom to undergo drastic conformational changes and thus results in increased stability towards denaturation (Cao *et al.*, 2014). The thermal stability of free and immobilized enzyme was investigated and compared by measuring the hydrolysis of emulsified olive oil by lipase at different reaction times.

The data in Table 3 show that the loss of catalytic activity for the free enzyme is much higher than that determined for the immobilized suggesting that the immobilization procedure gave one highest thermal stability. When compared the immobilized biocatalyst in residue treated by alkaline extraction with one in nature there was an improvement in the support justified by the increase in half-life 1.6 times, and a value of about 8 times greater when compared with the free enzyme, suggesting that the lipase immobilization procedure gave the highest thermal stability.

**Table 3** - Thermal deactivation constant ( $k_d$ ) and half-life ( $T_{1/2}$ ) of the free and immobilized enzyme in different materials based on corn cob.

biocatalyst	$k_d$	$T_{1/2}$	$R^2$
free enzyme	0.0117	59.24	0.9895
<i>in nature</i> corn cob	0.0024	288.81	0.9960
alkaline extraction	0.0015	462.10	0.9876
alkaline extraction + organosolv	0.0033	104.16	0.9880

### 3.4.3 Determination of $K_m$ and $V_{max}$

The enzymatic kinetic studies were based on the evaluation of the kinetic parameters from initial velocity data. The kinetics of the hydrolytic activity of the free enzyme and immobilized biocatalyst were investigated at various concentrations of olive oil substrate. The Michaelis–Menten equation was used to fit the kinetic parameters and data from the initial reaction rate to evaluate the constants,  $K_m$  and  $V_{max}$  (Table 4).

**Table 4** - Kinetic parameters  $K_m$  and  $V_{max}$  of the free and immobilized enzyme in different materials based on corn cob.

Biocatalyst	$K_m$ (mM)	$V_{max}$ (mmol min <sup>-1</sup> g <sup>-1</sup> )	$R^2$
Free enzyme	227.96	3246.75	0.98
<i>in nature</i> corn cob	361.38	2000.95	0.99
alkaline extraction	151.43	1980.71	0.97
alkaline extraction plus organosolv	429.00	1234.58	0.97

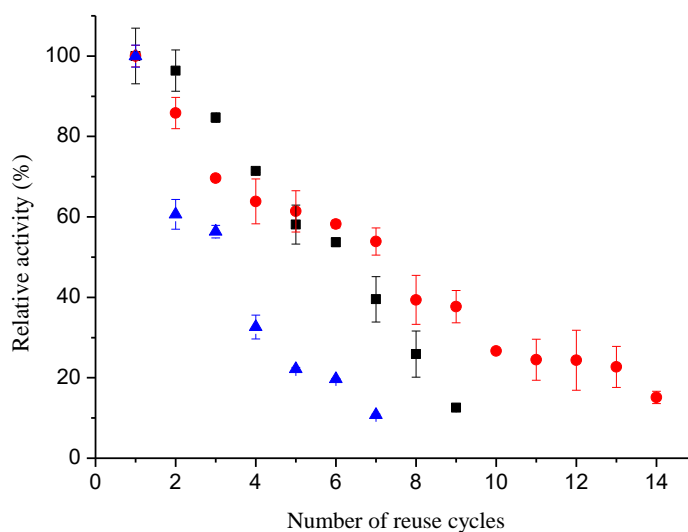
The performance of free and immobilized lipase was different as reported in Table 4. It is well known that the parameter  $K_m$  gives an indication of the affinity of the enzyme to the substrate: a higher  $K_m$  registered for a certain substrate, means a lower affinity for that substrate. Thus, the immobilization of lipase in *in nature* corn cob and treated by alkaline extraction plus organosolv process decreased the affinity of the biocatalyst due to increase of  $K_m$  in 60 and 88% in relation to free enzyme conditions, respectively. Already in the parameter  $K_m$  for the immobilization in corn cob treated by alkaline extraction showed one parameter less to that obtained for free enzyme, 33% lower. This can be due to: (i) some limitations of mass transfer of the substrate to the surface of corn cob; (ii) slight changes in the three-dimensional conformation of the enzymes when they adsorb onto the carrier that, directly or indirectly, affect the active site of the enzyme (Da Silva *et al.*, 2012).

### 3.4.4 Stability of immobilized lipase

The reuse of the enzyme constitutes the main advantage of the process of biocatalysts immobilization. The immobilized enzyme is an important parameter for repeated applications in batch reactors or continuously. The reusing of the lipase for several reactions allowed the reduction of the reaction cost and making an economically

feasible process. Moreover, the use of an immobilized enzyme permits to greatly simplify the design of the reactor and the control of the reaction: the filtration of the enzyme in its support stops the reaction. However, the idea of enzyme reuse implicitly means that the stability of the final enzyme preparation should be enough to permit this reuse (Mateo *et al.*, 2007).

The Figure 4 shows the variation in relative activity of immobilized biocatalysts after multiple cycles of reuse.



**Fig. 4** - Relative activity of the immobilized enzymes in function the reusability of immobilized enzymes in different materials based on corn cob: residue treated by alkaline extraction (red) and by sequence of alkaline extraction plus organosolv process (blue), and in *in nature* residue (black).

As the operational stability during reuses, it was observed that the immobilized biocatalyst *in nature* showed a slight advantage during the initial four cycles compared to immobilized biocatalysts in corn cob treated in extraction alkaline. The immobilized biocatalysts *in nature* reached 50% of its initial activity during the 7th cycle of use, holding about 20% of its activity until the 9th cycle. The immobilized biocatalysts in corn cob treated in extraction alkaline proved to be more efficient, since it reaches 50% of its initial residual activity by the 8th cycle and still retained about 20% of its activity until the 14th reuse.

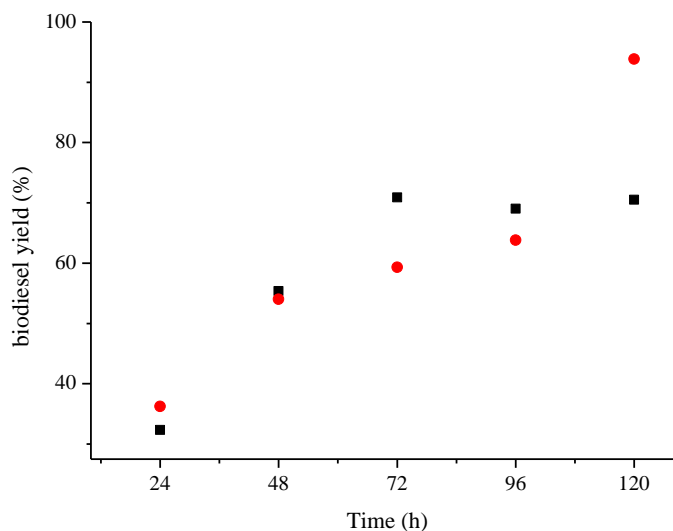
The physical adsorption is known for having only weak bonds involved and, probably, the most pronounced loss of activity is due to enzyme leaching during

washings, also, it can be suggested that the strength of organosolv treatment weakened the support structure, thus facilitating the process of desorption of the enzyme.

In the literature are related decrease of the residual activity during immobilization of lipases on other kinds support, reported that biocatalyst reaches about 30% of its activity after eighth cycles (Huang *et al.*, 2011; Abdulla e Ravindra, 2013).

### 3.4.5 Biodiesel production

The implementation of the evaluation of the ester synthesis catalyst was verified using the biocatalysts obtained. Conditions were found which lead to a higher ester conversion with the passage of time, as shown in Figure 5.



**Fig. 5** - Biodiesel production obtained using immobilized enzymes in *in nature* corn cob and treated by alkaline extraction (red) in different reaction time.

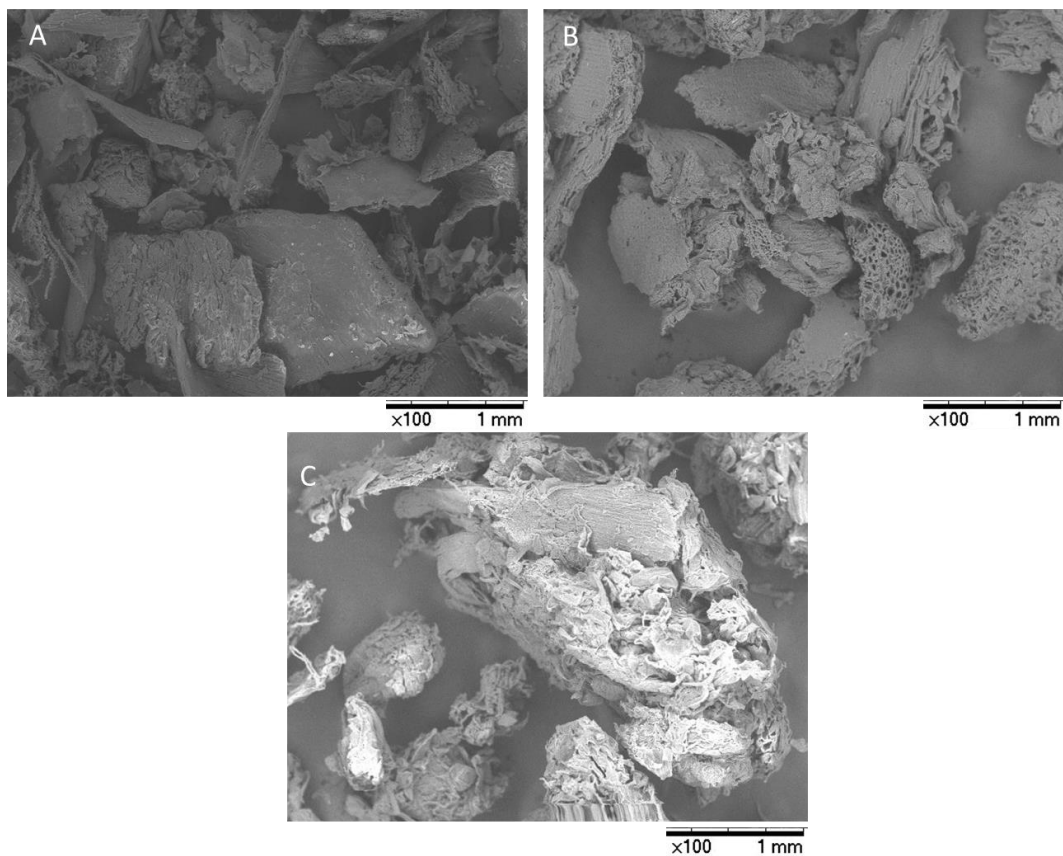
The immobilized biocatalyst in *in nature* corn cob had a conversion rate of 32% in the first 24 hours, reaching 70% conversion after 72 hours reaction. Since the biocatalyst treated showed a similar profile, with about 60% conversion within 72 h of reaction reaching a conversion rate of 93% for 120 hours.

The performance of biocatalysts are satisfactory when compared with performances reported by other lipase preparations, such as *Burkholderia cepacia* immobilized in sol-gel matrix in which was obtained a maximal transesterification yield of 51.9% in the same conditions of this work (Oliveira *et al.*, 2014).

### 3.5 Morphological and physico-chemical properties

### 3.5.1 Scanning electron microscopy (SEM)

SEM was used to characterize the morphology of the corn cob after and before the treatments (Fig 6), of the free enzyme and also of the immobilized biocatalysts (Fig 7).



**Fig. 6** - Scanning electron microscopy of the (a) corn cob *in nature*, (b) residue treated by alkaline extraction and (c) residue treated by sequence of alkaline extraction plus organosolv process.

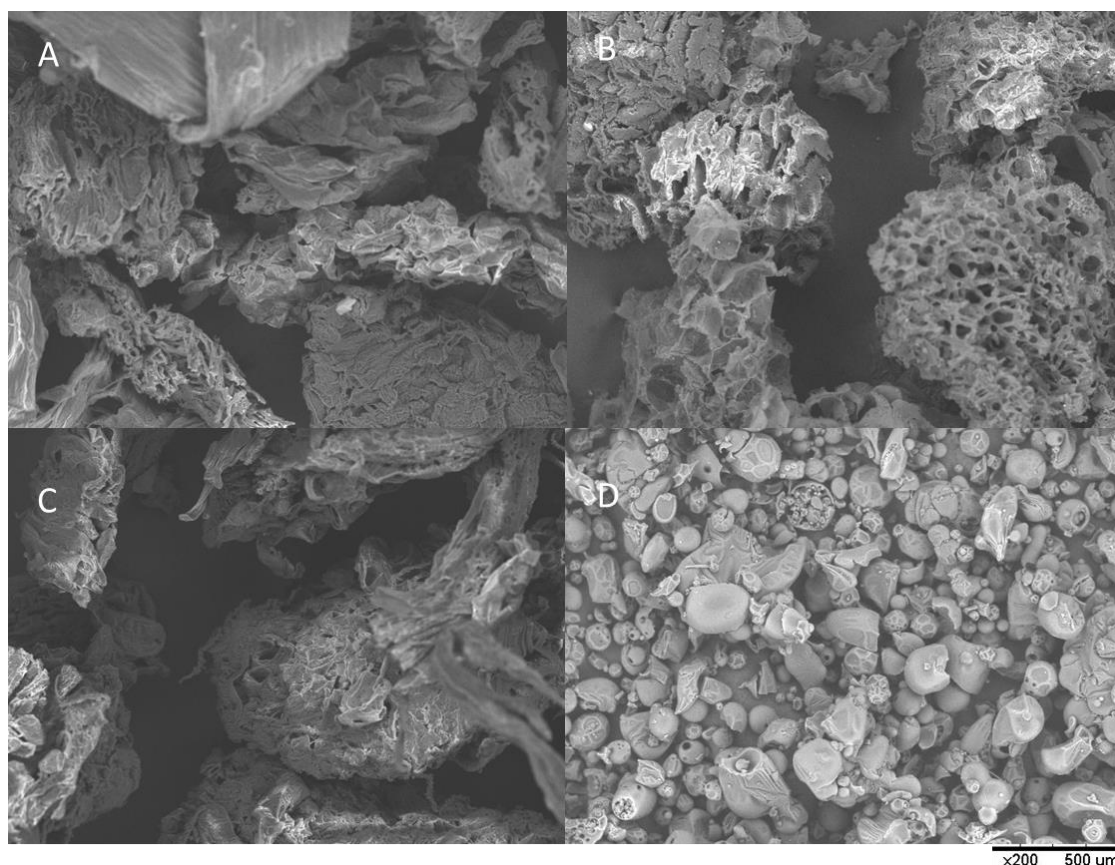
Comparing the corn cob *in nature* and materials treated, in terms of their microstructures it is possible to find similarities since they both have a closed cellular structure type. As expected, the corn cob *in nature* has a much more regular and uniform shape of its closed cellular structure contrasting with the materials treated.

As observed in Table 3, the Figure 6B shows that the alkaline treatment changed the structure of the material and this change can be associated with partial removal of the hemicellulose, thus reducing cellulose crystallinity and increasing the porosity of the support, and increasing the surface of contact for immobilized biocatalyst.

The Figure 6C shows that the residue treated by sequence of alkaline extraction plus organosolv process, with partial remotaion of the lignin of the material, caused a

disorganization, suggesting a decrease in surface area and by consequence decreasing the surface of contact for immobilized biocatalyst and also making the most fragile material.

The Figure 7 shows the particles of the free enzyme, and of the immobilized enzymes in corn cob *in nature*, treated by alkaline extraction and by sequence of alkaline extraction plus organosolv process.



**Fig. 7** - Scanning electron microscopy of the (a) immobilized enzymes in corn cob *in nature*, (b) treated by alkaline extraction, (c) by sequence of alkaline extraction plus organosolv process and (d) particles of the free enzyme.

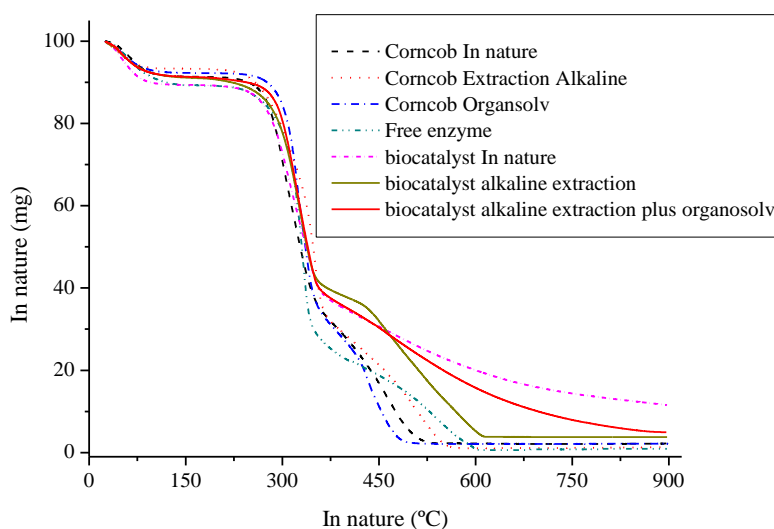
Analyzing the image it is possible to observe that the enzyme may have been immobilized both on the surface, but also to suggest that the process of immobilization occurred pores of the material. Some functional groups such as thiols and those that contain multiple unsaturations during the alkaline pre-treatment, but also during the immobilization may have been significant in their chemical composition and structural, suggesting breaking of the lignocellulosic complex.

Due to the considerable stability presented by biocatalysts, we can suggest that the enzymes during the immobilization process by physical adsorption reacted with thiol groups presents in support.

### 3.5.2 Thermogravimetric analysis (TGA)

Thermogravimetric analysis or TGA is a technique in which the weight loss of a sample is studied with increasing temperature. Samples of the corn cob *in nature*, treated, free enzyme and the biocatalysts were analyzed. It is a highly sensitive technique and is widely used for studying thermal and thermo-oxidative degradation of high temperature polymers (Ruiz *et al.*, 2011). The TGA curves (Fig. 8) show the weight losses of the samples when exposed to heating until 900°C.

All samples present similar TGA curves with three defined mass loss stages (Figure 8 and Table 5). The first one starts at approximately 30°C and corresponds to weight losses of about 7.7-10.1% as a result of the water evaporation (dehydration of the sample), carbon monoxide, carbon dioxide and evaporation of other substances low molecular weight (Rhim *et al.*, 2010). In the second stage occur the largest weight loss starting in approximately 270°C of the 400°C, at this stage, the depolymerization and decomposition of polysaccharides present in the sample occurs, providing weight losses of 54.3-68.3%. The third stage, from 400°C, related to the decomposition of the samples, resulting in weight losses full. These behavior are consistent with those found in the literature (Ruiz *et al.*, 2011; Ballesteros *et al.*, 2014).



**Fig. 8** - TGA curves obtained for the corn cob *in nature*, residues treated, free enzyme and biocatalyst immobilized.

**Table 5** - Characteristics of degradation of corn cob *in nature*, treatment, the free enzyme and immobilized biocatalyst.

Sample	1° stage loss (%) 30°C – 100°C	2° stage loss (%) 270°C – 400°C	3° stage residue (%) 600°C
corn cob <i>in nature</i>	7.74	64.02	2.23
corn cob after extraction alkaline	6.50	64.67	1.07
corn cob after organosolv	7.08	65.65	2.13
free enzyme	8.74	68.34	1.15
biocatalyst <i>in nature</i>	10.08	54.94	20.19
biocatalyst alkaline extraction	7.71	54.30	5.65
biocatalyst alkaline + organosolv	7.73	64.55	15.97

A shift of hemicellulose and cellulose peaks occurred from treatment, this modification may have improved the interaction of the enzyme support, which justifies the increase in the waste compared to fresh biocatalyst. Mass loss above ~400 °C of *in nature* and treated corn cob happened at the same time but the treated corn cob a greater mass solid residue mass (wt %) due to treatment that removed hemicellulose, resulting in a material rich in lignin difficult to pyrolyze (Boonsombuti *et al.*, 2013).

## Conclusions

Corn cob was successfully used to immobilize commercial lipase by adsorption in the optimized conditions, being a simple and inexpensive method with an easily available support. The biocatalysts immobilized displayed a better stability than the free form. Indeed, immobilization of the enzyme enhanced its stability, mainly to the temperature. The immobilization of the enzyme increases the enthalpy of fusion and thus providing a greater thermal stability to the biocatalyst. The TGA profiles clearly showed that the immobilized biocatalyst is more stable than free enzyme. These results indicate that corn cob treated might be used as a support for immobilization of lipase.

The biodiesel yield of production using biocatalyst immobilized was also investigated, resulting in a conversion of 92% for biocatalyst immobilized in corn cob treated by extraction alkaline occurred at 40 °C during 120 h reaction. The key step in enzymatic processes lies in successful immobilization of the enzyme which will allow for its recovery and reuse. In this study the immobilized enzyme transesterification was investigated and future studies and optimization may enhance the results.



## Acknowledgments

The authors acknowledge financial assistance from the Brazilian research funding agencies CAPES, CNPq, and FAPITEC/SE.

## References

- ABDULLA, R.; RAVINDRA, P. **Characterization of cross linked Burkholderia cepacia lipase in alginate and  $\kappa$ -carrageenan hybrid matrix.** Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers, v. 44, n. 4, p. 545-551, 7// 2013.
- ADLERCREUTZ, P. **Immobilisation and application of lipases in organic media.** Chemical Society Reviews, v. 42, n. 15, p. 6406-6436, 2013.
- BALLESTEROS, L.; TEIXEIRA, J.; MUSSATTO, S. **Chemical, Functional, and Structural Properties of Spent Coffee Grounds and Coffee Silverskin.** Food and Bioprocess Technology, v. 7, n. 12, p. 3493-3503, 2014/12/01 2014.
- BARBOSA, A. D. S.; SILVA, M. A. D. O.; CARVALHO, N. B.; MATTEDI, S.; IGLESIAS, M. A.; FRICKS, A. T.; LIMA, Á. S.; FRANCESCHI, E.; SOARES, C. M. F. **Imobilização de lipase por encapsulação em sílica aerogel.** Química Nova, v. 37, p. 969-976, 2014.
- BONCEL, S.; ZNISZCZOŁ, A.; SZYMAŃSKA, K.; MROWIEC-BIAŁOŃ, J.; JARZĘBSKI, A.; WALCZAK, K. Z. **Alkaline lipase from Pseudomonas fluorescens non-covalently immobilised on pristine versus oxidised multi-wall carbon nanotubes as efficient and recyclable catalytic systems in the synthesis of Solketal esters.** Enzyme and Microbial Technology, v. 53, n. 4, p. 263-270, 9/10/ 2013.
- BOONSOMBUTI, A.; LUENGNARUEMITCHAI, A.; WONGKASEMJIT, S. **Enhancement of enzymatic hydrolysis of corn cob by microwave-assisted alkali pretreatment and its effect in morphology.** Cellulose, v. 20, n. 4, p. 1957-1966, 2013/08/01 2013.
- BRÍGIDA, A.; PINTO, D.; SILVEIRA, M.; GONÇALVES, L.; COELHO, M. **Immobilization of Candida antarctica lipase B on NaOCl/NaOH treated green coconut fiber by adsorption.** New Biotechnology, v. 25, Supplement, n. 0, p. S135, 9// 2009.
- 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, n. 4, p. 832-838, 3/17/ 2010.
- CABRERA-PADILLA, R.; ALBUQUERQUE, M.; FIGUEIREDO, R.; FRICKS, A.; FRANCESCHI, E.; LIMA, Á.; A DOS SANTOS, O.; SILVA, D.; SOARES, C. F. **Immobilization and characterisation of a lipase from a new source, Bacillus sp. ITP-001.** Bioprocess and Biosystems Engineering, v. 36, n. 10, p. 1385-1394, 2013/10/01 2013.

CABRERA-PADILLA, R.; LISBOA, M.; FRICKS, A.; FRANCESCHI, E.; LIMA, A.; SILVA, D.; SOARES, C. F. **Immobilization of *Candida rugosa* lipase on poly(3-hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate): a new eco-friendly support**. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, v. 39, n. 2, p. 289-298, 2012/02/01 2012.

CAO, H.; DENG, L.; LEI, M.; WANG, F.; TAN, T. **The role of temperature and solvent microenvironment on the activity of *Yarrowia lipolytica* Lipase 2: Insights from molecular dynamics simulation**. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 109, n. 0, p. 101-108, 11// 2014.

CHRISTOPHER, L. P.; HEMANATHAN, K.; ZAMBARE, V. P. **Enzymatic biodiesel: Challenges and opportunities**. Applied Energy, v. 119, n. 0, p. 497-520, 4/15/ 2014.

CRISTÓVÃO, R. O.; TAVARES, A. P. M.; BRÍGIDA, A. I.; LOUREIRO, J. M.; BOAVENTURA, R. A. R.; MACEDO, E. A.; COELHO, M. A. Z. **Immobilization of commercial laccase onto green coconut fiber by adsorption and its application for reactive textile dyes degradation**. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 72, n. 1-2, p. 6-12, 10// 2011.

DA SILVA, A. M.; 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, n. 7, p. 1095-1101, 7// 2012.

DATTA, S.; CHRISTENA, L. R.; RAJARAM, Y. **Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials**. 3 Biotech, v. 3, n. 1, p. 1-9, 2013/02/01 2013.

DE SOUZA, R. L.; DE FARIA, E. L. P.; FIGUEIREDO, R. T.; FREITAS, L. D. S.; IGLESIAS, M.; MATTEDI, S.; ZANIN, G. M.; DOS SANTOS, O. A. A.; COUTINHO, J. A. P.; LIMA, Á. S.; SOARES, C. M. F. **Protic ionic liquid as additive on lipase immobilization using silica sol-gel**. Enzyme and Microbial Technology, v. 52, n. 3, p. 141-150, 3/5/ 2013.

EGÜÉS, I.; SANCHEZ, C.; MONDRAGON, I.; LABIDI, J. **Antioxidant activity of phenolic compounds obtained by autohydrolysis of corn residues**. Industrial Crops and Products, v. 36, n. 1, p. 164-171, 3// 2012a.

\_\_\_\_\_. **Effect of alkaline and autohydrolysis processes on the purity of obtained hemicelluloses from corn stalks**. Bioresource Technology, v. 103, n. 1, p. 239-248, 1// 2012b.

FAO. **Food and Agriculture Organization of the United Nations** 2014.

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood: chemistry, ultrastructure, reactions**. De Gruyter, ISBN 9783110839654.1983.

GARROTE, G.; DOMÍNGUEZ, AMP; X; NGUEZ, H.; PARAJÓ, J. C. **Autohydrolysis of corn cob: study of non-isothermal operation for xylooligosaccharide production**. Journal of Food Engineering, v. 52, n. 3, p. 211-218, 5// 2002.

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, n. 3–4, p. 95-100, 7// 2011.

IZRAEL ŽIVKOVIĆ, L. T.; ŽIVKOVIĆ, L. S.; BABIĆ, B. M.; KOKUNEŠOSKI, M. J.; JOKIĆ, B. M.; KARADŽIĆ, I. M. **Immobilization of *Candida rugosa* lipase by adsorption onto biosafe meso/macroporous silica and zirconia.** Biochemical Engineering Journal, v. 93, n. 0, p. 73-83, 1/15/ 2015.

MATEO, C.; PALOMO, J. M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUIBAN, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. **Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques.** Enzyme and Microbial Technology, v. 40, n. 6, p. 1451-1463, 5/2/ 2007.

MENDES, A. A.; OLIVEIRA, P. C. D.; CASTRO, H. F. D.; GIORDANO, R. D. L. C. **Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial.** Química Nova, v. 34, p. 831-840, 2011.

OLIVEIRA, M. V. S.; RÓS, P. C. M. D.; MATTEDI, S.; CASTRO, H. F.; SOARES, C. M. F.; LIMA, Á. S. **Transesterification of babassu oil catalyzed by *Burkholderia cepacia* encapsulated in sol-gel matrix employing protic ionic liquid as an additive.** Acta Scientiarum, v. 36, p. 445-451, 2014.

PARAJÓ, J. C.; GARROTE, G.; CRUZ, J. M.; DOMINGUEZ, H. **Production of xylooligosaccharides by autohydrolysis of lignocellulosic materials.** Trends in Food Science & Technology, v. 15, n. 3–4, p. 115-120, 3// 2004.

PEREIRA FILHO, J. M.; VIEIRA, E. D. L.; SILVA, A. M. D. A.; CEZAR, M. F.; AMORIM, F. U. **Efeito do tratamento com hidróxido de sódio sobre a fração fibrosa, digestibilidade e tanino do feno de jurema-preta (*Mimosa tenuiflora*. Wild).** Revista Brasileira de Zootecnia, v. 32, p. 70-76, 2003.

POPPE, J. K.; COSTA, A. P. O.; BRASIL, M. C.; RODRIGUES, R. C.; AYUB, M. A. Z. **Multipoint covalent immobilization of lipases on aldehyde-activated support: Characterization and application in transesterification reaction.** Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 94, n. 0, p. 57-62, 10// 2013.

RHIM, Y.-R.; ZHANG, D.; ROONEY, M.; NAGLE, D. C.; FAIRBROTHER, D. H.; HERMAN, C.; DREWRY III, D. G. **Changes in the thermophysical properties of microcrystalline cellulose as function of carbonization temperature.** Carbon, v. 48, n. 1, p. 31-40, 1// 2010.

ROUT, J.; TRIPATHY, S. S.; NAYAK, S. K.; MISRA, M.; MOHANTY, A. K. **Scanning electron microscopy study of chemically modified coir fibers.** Journal of Applied Polymer Science, v. 79, n. 7, p. 1169-1177, 2001.

RUIZ, H.; RUZENE, D.; SILVA, D.; DA SILVA, F. M.; VICENTE, A.; TEIXEIRA, J. **Development and Characterization of an Environmentally Friendly Process Sequence (Autohydrolysis and Organosolv) for Wheat Straw Delignification.** Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 164, n. 5, p. 629-641, 2011/07/01 2011.

RUIZ, H. A.; RUZENE, D. S.; SILVA, D. P.; QUINTAS, M. A. C.; 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 & Biotechnology, v. 86, n. 1, p. 88-94, 2011.

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, n. 4, p. 542-548, 6// 2008.

SOARES, C. F.; DE CASTRO, H.; DE MORAES, F.; ZANIN, G. **Characterization and utilization of *Candida rugosa* lipase immobilized on controlled pore silica.** Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 79, n. 1-3, p. 745-757, 1999/03/01 1999.

ZUBIOLLO, C.; SANTOS, R.; CARVALHO, N.; SOARES, C.; LIMA, A.; DE AQUINO SANTANA, L. **Encapsulation in a sol–gel matrix of lipase from *Aspergillus niger* obtained by bioconversion of a novel agricultural residue.** Bioprocess and Biosystems Engineering, v. 37, n. 9, p. 1781-1788, 2014/09/01 2014.

## 4.2 – Artigo 02

### IMMOBILIZATION OF LIPASE FROM *Burkholderia cepacia* IN CORN COB *IN NATURE AND TREATMENT*

Os resíduos lignocelulósicos são mais abundantes no mundo e tal biomassa representa um enorme potencial para a produção de diversos produtos de interesse industrial, despertando grande atenção nos últimos anos. No entanto, a utilização destes resíduos nas engenharias, tais como suporte para a imobilização de enzimas por exemplo, torna-se importante. Neste contexto, o presente estudo avaliou o uso de resíduos agro-industriais, na sua forma natural ou tratada (por extração das frações lignocelulósicos), como suporte para a imobilização da lipase comercial utilizando como técnica de imobilização a adsorção física e analisando sua aplicação de condições amenas re reação.

Artigo a ser submetido.

# APPLICATION THE AUTOHYDROLYSIS IN CORN COB FOR LIPASE IMMOBILIZATION FROM *Burkholderia cepacia*

<sup>1</sup>Diego Melo Costa; <sup>1</sup>Raíra Souza de Santana Castro; <sup>1,2</sup>Erica Rodrigues de Souza;  
<sup>3</sup>Denise Santos Ruzene; <sup>3</sup>Daniel Pereira Silva; <sup>1,2</sup>Álvaro Silva Lima;  
<sup>1,2</sup>Cleide Mara Faria Soares

<sup>1</sup> Universidade Tiradentes, Av. Murilo Dantas, 300, Bairro Farolândia, 49032-490, Aracaju-SE, Brazil

<sup>2</sup> Instituto de Tecnologia e Pesquisa, Av. Murilo Dantas, 300 - Prédio do ITP - Bairro Farolândia, 49032-490, Aracaju-SE, Brazil

<sup>3</sup> Universidade Federal de Sergipe, Av. Marechal Rondon, s/n, Bairro Jardim Rosa Elze, 49100-000, São Cristóvão-SE, Brazil

## Abstract

The corn cob was partially successfully fractionated through autohydrolysis process to the removal of parts of its hemicellulose. The residue obtained from the autohydrolysis process was used as supports for lipase immobilization. The average particle size of the corn cob used in this work was of 32-60 mesh with approximately 35% cellulose, 31% hemicellulose and 27% lignin. The immobilized lipase showed a 66% yield and good operational stability with a half-life time of about 155 hours. The optimal pH and temperature for the immobilized biocatalysts were 7.0 and 55°C, respectively. The kinetic parameters for the Michaelis-Lie were 602.57 U/g and 281.59, to Vmax and Km, respectively. The biodiesel yield of production using biocatalyst immobilized was over 75%, occurred at 40°C during 120 h reaction. The biodegradability of support were performed, and this showed no formation of degradation compounds. In conclusion, the corn cob after the autohydrolysis process showed an effect in matrix separation and materials exposition, thus increasing the surface of contact, allowing to be more susceptible to enzymatic immobilization. The TGA curves showed a shift of hemicellulose and cellulose profiles after the treatment, this modification may have improved the interaction of the enzyme with the support, which justifies the increase in the residues compared to *in nature* biocatalyst.

**Keywords:** lipase; *Burkholderia cepacia*; immobilization; corn cob

## 1. Introduction

In recent years studies in that developing clean technologies that facilitate the use of products of biotechnological interest and processes with the lowest possible environmental impact considerable interest has arisen (Christopher *et al.*, 2014). In order to improve the efficiency and cost of the enzymatic process, the enzyme can be reused by an immobilization technique. This capacity to retain the enzyme on a support also allows an easy biocatalyst separation from product permitting continuous processes and prevents the deactivation of protein or loss of activity.

As a third country largest producer of corn (Embrapa, 2013), Brazil is seen as a country which will have its high production by approximately 19 million tons between the harvest of 2008/2009 and 2019/2020. The straw and corn cob are the residues generated after the threshed corn on the cob. For every 100 kg of corn on the cobs, about 18 pounds are corn cobs (Tsai *et al.*, 2001). In view of this, large quantities of residues are generated throughout the year and has received little attention.

As a material lignocellulosic, the corn cob is mainly composed by three compounds (lignin, cellulose and hemicellulose) and each compound has specific properties. The chemical nature of the hemicelluloses are mostly heteropolysaccharides made up of repeating units of pentoses (D-xilose and L-arabinose), hexoses (mainly D-galactose, D-mannose and D-glucose) and uronic acids (Prozil *et al.*, 2012). Because it has an amorphous molecular structure and a combination of multiple sugars, the hemicellulose becomes more soluble in water and, therefore, more easily degraded than that of cellulose. Cellulose is a long chain polymer, cellobiose being the repeating unit of the polymer. This natural polymer is a linear homopolysaccharide whose repeating unit is Syndiotactic anhydroglucose or cellobiose, thereby providing a linear increase of the polymer chain leading to a high molecular weight, a considerable degree of crystallinity, insoluble in water and rigid structure (Fengel e Wegener, 1983). Lignin, after cellulose, is the macromolecule more important from the lignocellulosic materials. This substance is incorporated during vegetative growth, being 20 to 35 % of the total mass of the lignocellulosic material (Fengel e Wegener, 1983)

The physic adsorptive immobilization technique may have a greater commercial potential in relation to other techniques due to its relatively low cost, simple to use and allow high catalytic activity retention (Brígida *et al.*, 2009).

However, this technique has generally simple interaction between the enzyme and the carrier, can be desorbed during washing and other steps. Therefore, immobilization by adsorption requires an electrostatic interaction between the substrate and the enzyme. It is well known that lipases have been immobilized on various types of supports, such as silica (Izrael Živković *et al.*, 2015), activated carbon (Higuita *et al.*, 2014), immobilized onto a polymer network (Omay, 2014), Magnetic nanoparticles (Ziegler-Borowska *et al.*, 2014), alginate (Abdulla e Ravindra, 2013) among others. The main application of corn cob is for animal feed; however, can be find the following applications in the literature: enzymatic conversion of cellulose (Fan *et al.*, 2014), bioconversion of rich hemicellulose hydrolyzate for production xylitol (Li, Z. *et al.*, 2015), ethanol production (Lei *et al.*, 2014), preparation of films plastic (Egüés *et al.*, 2014), and others. Corn cob, as a by-product of the corn industry, which makes it economically attractive, and of composition based in various functional groups such as carboxyl, hydroxyl and amine, makes it a potential support for the immobilization of enzymes (Chai *et al.*, 2010).

To present date, no research about the Lipase immobilization on corn cob *in nature* or treated has been reported. In this study, *Burkholderia cepacia* from lipase was immobilized on corn cob *in nature* and treated. The characterization of the material was realized before and after treatment, the moisture contente the amount of immobilized lipase, morphological and biochemical characterization were examined to determine the best conditions for reaction of the immobilized biocatalyst obtained.

## **2. Materials and Methods**

### *2.1 Enzyme and chemicals*

The lipase used for to develop the experiments was Amano Lipase PS, from *Burkholderia cepacia* commercially purchased from Sigma-Aldrich. Corn cobs, used as enzymatic immobilization support, were obtained from Dow 433 hybrid corn planted in the city of Poço Verde (Jureminha, town Jureminha), State of Sergipe/Brazil. Hexane and acetone were obtained from Isofar (Rio de Janeiro, Brazil); ethanol 95% was obtained from Vetec (Rio de Janeiro, Brazil); and, gum arabic was obtained from Cromoline (São Paulo, Brazil). Olive oil was purchased at a local market, and other chemicals were of analytical grade and used as received.



## 2.2 Chemical characterization of the raw material - corn cob

The chemical characterization was performed following the procedure reported by (Ruiz, Héctor A. *et al.*, 2011). Aliquots were homogenized and subjected to moisture determination. Approximately, 0.3 g of corn cob was treated with 5 mL of 72% (w/w) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> for 1 h at 30°C, followed by a quantitative posthydrolysis with 4% sulfuric acid (adding water until 148.67 g) at 121°C during 60 min. Before HPLC analysis, the solid residue from the posthydrolysis process was recovered by filtration and considered as Klason lignin. For the determination of ash, the solid retained after filtration was taken in a crucible and kept in a muffle furnace at 750°C for 8 h. The monosaccharide sugars and acetic acid contained in the hydrolysates were determined by HPLC, in order to estimate the contents of the samples in glucan, xylan, arabinan and acetyl groups.

## 2.3 Autohydrolysis process

The autohydrolysis process was carried out in 160 mL total volume stainless steel cylinder reactors. Milled corn cobs samples with a particle size of 32-60 mesh and water were mixed in a closed and pressurized vessel in order to obtain a solid/liquid ratio of 1:10 (w/v). The system was submerged in an oil with temperature control at 180 °C during 30 min. At the end of the desired reaction time, the reactor was removed from the oil bath and immediately immersed in an ice bath for 5 min to extinguish the reaction. These conditions were previously evaluated by Ruiz et al. (Ruiz, Héctor A. *et al.*, 2011). The liquid phase or liquor (hemicelluloses rich fraction) was separated from the solids by filtration and the solid phase was used as a support for immobilization.

## 2.4 HPLC analysis

The chemical characterization, with quantification of the sugars and acetic acid present in the materials *in nature* and one obtained after steps of treatments, were performed with a refractive index (RI) detector in a Jasco chromatograph equipped with a Aminex HPX-87H column (300 × 7.8 mm, Biorard, USA) under the following conditions: mobile phase 0.005 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, flow rate 0.6 mL/min, and column temperature 45°C.

## 2.5 Enzyme Immobilization

Amano Lipases PS, from *Burkholderia cepacia* were immobilized by physical adsorption on corn cob (*in nature* and after treatment) using a procedure modified from Soares et al. (1999). Thus, in 20 mL of hexane was added to 2.0 g of support under vigorous agitation at room temperature for 2.0 h (25°C), then 20 mL of enzymatic solution (mass of the enzyme solubilised in 20 mL, 0.1M sodium phosphate buffer, pH 7.0) also was added to suspension (hexane and support) and agitated for more 2.0 h.

The system enzyme-support 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 was then quantified. Filtrates and washes were collected and used for activity determination. The prepared immobilized lipase was then stored at 4°C.

In order to determine the optimal amount of lipase, were tested different amounts of enzyme/support ratios on the immobilization (0.15; 0.30; 0.45, and 0.60).

## 2.6. Activity of lipase in the hydrolysis

The hydrolytic activities of free and immobilized lipases were assayed by the olive oil–water emulsion method (Soares *et al.*, 1999). The substrate was prepared by mixing 50 mL of olive oil with 50 mL of gum arabic solution (7% w/v). The reaction mixture containing 5 mL of the emulsion, 2 mL of 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.0) and free or immobilized enzymes. The enzyme was incubated for 5 min when in free system and 10 min when in immobilized system, at 37°C under rigorous stirring. The reaction was stopped by addition of 2 mL of acetone solution.

Liberated fatty acids were titrated with potassium hydroxide solution 0.037 M using of phenolphthalein as an indicator. One unit (U) of enzyme activity was defined as the amount of enzyme that liberated 1  $\mu\text{mol}$  of free fatty acid per min ( $\mu\text{mol}/\text{min}$ ) under assay conditions.

The yield of the immobilized lipase activity was defined as the ratio of the adsorbed activity recovered at the end of the immobilization period divided by the total soluble lipase activity initially added to 2 g of the support.

## 2.7 Biochemical properties of immobilized lipase

### 2.7.1 Effect of pH and temperature on activity

The effect of pH on the relative activity of immobilized lipase was assayed in phosphate buffer (0.1M) from pH 4.0 to 9.0, while the effect of temperature on the relative activity of immobilized lipase was determined at pH 7.0 in temperature range varying from 30 to 70°C, in either case using olive oil emulsion as substrate. Relative activities were calculated as the ratio of the enzyme activity measured at different conditions to the maximal activity of the enzyme measured as described in section 2.6.

### 2.7.2 Thermal stability

The thermal inactivation of the free and immobilized lipase was investigated by incubation in phosphate (100 mM), buffer pH 7.0 and optimum temperature. For this purpose 0.1 g of immobilized biocatalyst or free was incubated in a water bath with temperature control. In certain time intervals (15, 30, 60, 120, 180 and 240 minutes) consecutive aliquots were taken up to complete inactivation. The initial activities were compared with the residual activities. The enzyme inactivation rate constant ( $k_d$ ) and half-life time ( $T_{1/2}$ ) were calculated using Eqs. 1 and 2, respectively.

$$A_{in} = A_0 * e^{-k_d * t} \quad (1)$$

$$T_{1/2} = \frac{\ln(0,5)}{-k_d} \quad (2)$$

where:  $A_{in}$  is the residual lipase activity after thermal treatment,  $A_0$  is the initial lipase activity and  $t$  is time in minutes.

### 2.7.3 Determination of $K_m$ and $V_{max}$

The Michaelis–Menten kinetic parameters  $K_m$  and  $V_m$  of free and immobilized lipase were determined by measuring the lipase activity using different concentrations of olive oil as substrate in phosphate buffer (0.05 M, pH 7.0) at 55 °C. The parameter values were obtained by non-linear regression of the initial reaction rates versus substrate concentration, using the Michaelis–Menten model. The apparent values of  $K_m$  and  $V_{max}$  were calculated by nonlinear fitting using the program Origin® 8.0.

#### 2.7.4 Stability of immobilized lipase

The operational stability and reusability of the immobilized biocatalyst were determined by conducting hydrolysis reactions in consecutive batches using the same immobilized enzyme. Each batch consisted of 10 min of hydrolysis reaction at a temperature and pH great for biocatalyst. After each batch, the immobilized enzyme was washed with hexane once and reused for the next cycle of hydrolysis.

#### 2.7.5 Enzymatic transesterification reaction

The reactions were performed according to the methodology described previously by Freitas et al. (2009) in closed reactors, containing 3.49 g of substrate with sunflower oil and anhydrous ethanol and without the addition of solvents. The mixtures were incubated with the immobilized lipase in the proportion of 20% in relation to the total weight of reactants involved in the reaction media. Reactions were performed for a maximum period of 120 h under constant magnetic agitation of 150 rpm. The conversion of product was analyzed by gas chromatogram (Shimazu GC-14A) equipped with silicone SE-30 as a column, taking sample at fixed interval. The column temperature was set at 220°C. The injector and detector temperatures were set at 250 and 260°C, respectively.

### 2.8 Morphological and physico-chemical properties

#### 2.8.1 Thermogravimetric analysis (MEV)

Surface morphology of native and the oxide-supported biocatalysts was investigated through scanning electron microscopy analysis with a Philips SEM 505 microscope. The images were digitized under the following conditions: files, 1024 × 1024 pixel; voltage, 25 kV; probe size, 20–50 nm and magnification, 100–1000×.

#### 2.8.2 Thermogravimetric analysis (TGA)

The free enzyme, corn cob support treated by alkaline extraction, sequence alkaline extraction plus organosolv process, and *in nature* residue, and also immobilized biocatalyst samples were analyzed in a simultaneous DTA-TG apparatus SHIMADZU-Thermogravimetric Analyzer – Model DTG-60 H. Approximately 5 mg of samples were submitted to a heating rate of 10°C/min from room temperature to 900°C, the nitrogen was used as an inert gas at a flow rate of 30 mL/min.

### 3. Result and Discussion

#### 3.1 Chemical composition of raw material - corn cob

Average Chemical Composition of corn cob samples used as the raw material in this work contains around 27.4% cellulose, 24.3% hemicellulose and 35.7% lignina (Table 1). Xylan content in corn cob accounted for about 30% of the dry weight of the raw material. This chemical composition is in good agreement with other values found in the literature for this material (Garrote *et al.*, 2002; Parajó *et al.*, 2004). However, during the chemical process is common occurs the formation of compounds from the degradation of pentoses and hexoses (hydroxymethylfurfural and furfural). In this work was observed that the rate of furfural found during the characterization of corn cob was approximately 2.1%, while for the levels of hydroxymethylfurfural was of 0.21%.

**Table 1** - Chemical composition of corn cob *in nature* and obtained after the autohydrolysis process.

Chemical Constituents	Composition (%)	
	Corn cob <i>in nature</i>	Solid fraction obtained after autohidrolysis
Cellulose	27.4 ± 0.8	23.1 ± 2.5
Hidroximetilfurfural	0.1 ± 0.09	0.21 ± 0.05
Hemicelluloses	24.3 ± 1.4	22.1 ± 1.78
Furfural	1.2 ± 0.3	2.1 ± 0.9
Total lignin	35.7 ± 1.1	31.6 ± 0.6
Soluble lignin	11.2 ± 1.6	9.1 ± 1.1
Klason lignin	24.5 ± 2.1	22.5 ± 1.2
Total composition	88.8 ± 2.1	79.1 ± 2.1

Autohydrolysis is a process in which lignocellulosic materials are treated with hot water or steam, and it is an alternative process for the fractionation of lignocellulosic materials. During autohydrolysis, the depolymerization of hemicelluloses is catalyzed by hydronium ions from water and naturally generated compounds such as acetic, uronic and phenolic acids (Liu, 2010).

This process can separate fractions from lignocellulosic materials: an aqueous extract composed mainly of hemicellulose derivatives along with acid soluble lignin, and a residual solid consisting of cellulose, lignin and remaining hemicelluloses (Table 1).

According to results showed in Table 1, the solid fraction obtained after autohidrolisis, used in this work as immobilization support, showed a reduction in content of cellulose compared with the material *in nature*. With respect to lignin, the corn cob was reduced in the rates of soluble lignin and insoluble lignin, thus presenting reduction in total lignin. Although the method is applied for the removal of hemicelluloses, the reduction of the remaining items in the composition occurs and is reported in the literature because there is a similarity between the lignocellulosic fractions and by virtue of pre-treatment (Ruiz *et al.*, 2011).

Table 2 shows the chemical composition of liquid fraction obtained after autohydrolysis process in corn cob. According to results showed in Table 2, the liquid fraction obtained had a content of approximately 17 % of hemicellulose, 13 % lignin and 0.7% cellulose, this behavior could be correlated to the solubilization of hemicellulose components and these results are in agreement with the data reported for the similar feedstock (Chaturvedi and Verma, 2013).

**Table 2** - Chemical composition of liquid fraction obtained after autohydrolysis process.

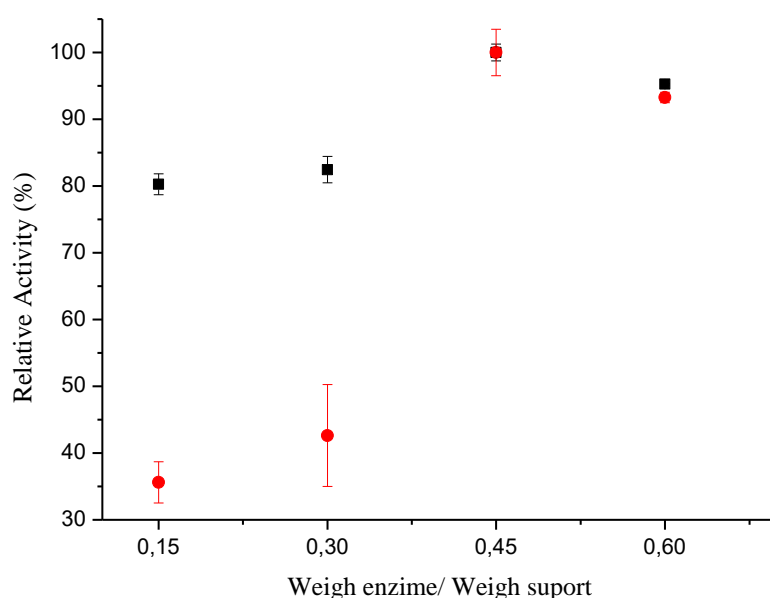
Chemical Constituents	Composition (%)
	Liquid fraction obtained after autohydrolysis process
Cellulose	0.7±0.4
Hidroximetilfurfural	0
Hemicelluloses	17.2 ± 0.6
Furfural	0.3± 0.1
Soluble lignin	12.8± 0.7

This results show that the method caused a desorganization in the structure material, removing portions of a lignocellulosic composition, as also already showed in the literature in the removal of lignocellulosic fraction of other organic residues (Garrote *et al.*, 2002; Garrote *et al.*, 2007; Brígida *et al.*, 2010).

### 3.2 Immobilization of lipase by physical adsorption on corn cob: *in nature* and treated

To evaluate the efficiency of the new obtained supports (corn cob *in nature* and after autohydrolysis process), the commercial Lipase was immobilized through a simple, effective and low cost process. The effect of enzyme concentration, pH and contact time between the enzyme solution and the corn cob commercial immobilized lipase activity was studied and optimized.

In order to determine the optimal concentration to the immobilization, experiments were performed by changing enzyme concentrations ranging from 0.15 – 0.6 m/m. The results are shown in Figure 1.



**Fig. 1** - Values of relative activity of the immobilized biocatalyst as a function of the ratio obtained of enzyme/support mass during immobilization procedure of lipase: corn cob *in nature* (black) and corn cob treated by autohydrolysis process (red).

In Figure 01, the immobilized biocatalyst activity increased with enzyme concentration, however, not always in a linear and increasing fashion. The immobilized biocatalyst in corn cob treated kept a lower relative activity to 50% in ratios of enzyme / support below of 0.45, while immobilized biocatalyst *in nature* kept above of 80% of the activity on the same conditions. In the ratio of enzyme / support of 0.45 was obtained a maximum relative activity for the biocatalysts (*in nature* and treated), which is confirmed with a 7% average loss in the activities when the ratio of enzyme / support exceeds 0.45.

According to the literature, when the enzyme load was increased more enzyme molecules were immobilized and less in the area of support was available for enzyme spread, which can prevent access to the enzyme active site, leading to loss of activity (Cristóvão *et al.*, 2011; Da Silva *et al.*, 2012).

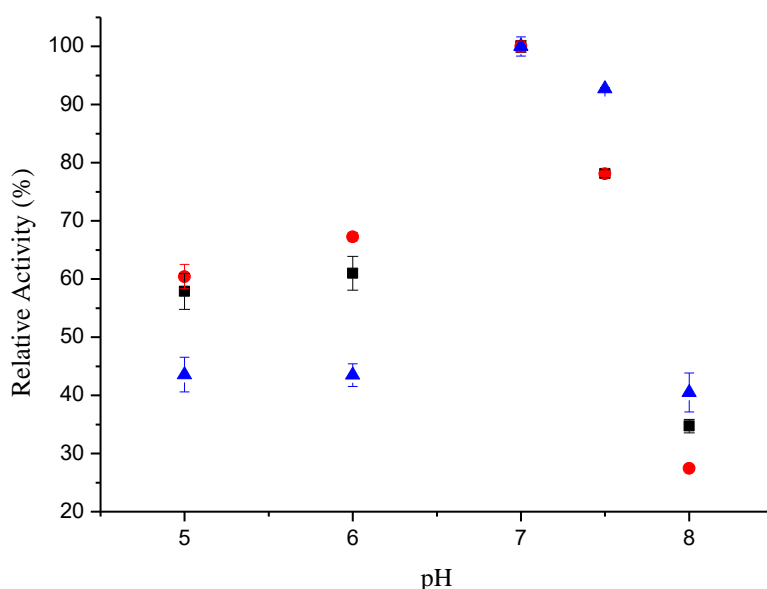
With these results, the relation enzyme/support of 0.45 was selected to continue the studies, since it is the concentration that offers the best immobilization yield.

### 3.3 Biochemical properties of immobilized lipase

#### 3.3.1 Effect of pH and temperature on activity

The process of immobilization of enzymes have a variety of effects on the state of ionization and dissociation of the enzyme. In particular, pH can have a profound effect on hydrolytic activity after the immobilization process (Simões *et al.*, 2011). Therefore, it is very important to compare the free and immobilized enzyme as a function of pH.

The effect of pH on the relative activity of free and immobilized enzyme during hydrolysis of emulsified olive oil was determined between pH 4.0 and 8.0, and the results are shown in Figure 2.



**Fig. 2** - Effect of pH on the relative activity of the free enzymes (blue) and immobilized enzymes in different materials based on corn cob: residue *in nature* (black) and treated by autohydrolysis process (red).



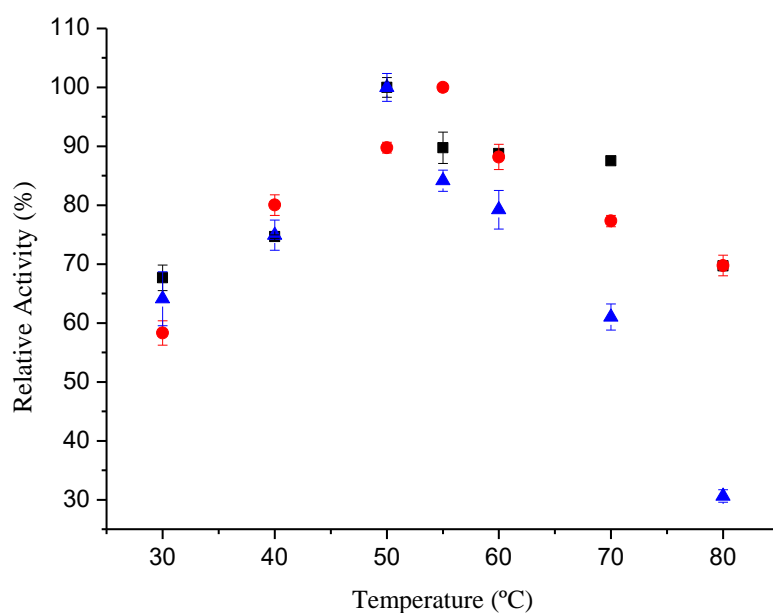
In relation to the effect of pH on the relative activity of the free enzymes and immobilized enzymes was observed a maximum value at pH 7.0. In values of pH higher or lower, the immobilized enzyme activity exhibited an abrupt drop that was not observed around the maximum region of the free enzyme, suggesting that the immobilization technique caused negative changes to the conformation of the enzyme.

In literature, similar results have been reported for lipase immobilized on different supports and technics (Cabrera-Padilla *et al.*, 2012; Abdulla e Ravindra, 2013; Gonçalves *et al.*, 2014).

Most chemical reactions proceeds at a faster rate as the temperature increases. A rise in temperature gives more kinetic energy to the molecules of the reagents, resulting in an increased number of productive collisions per unit time. The resistance of immobilized biocatalyst to temperature, as that obtained in the support treated in this work, is an important advantage for practical applications of this enzyme.

As the temperature rises there is increase in speed resulting from increased collisions between the enzyme and the substrate although with effect in the rate of denaturation. Consequently, the temperature-activity curve is the net result of opposite effects of temperature rise (acceleration of reaction) and increased inactivation (denaturation)(Zanin *et al.*, 2004). The temperature dependence in relation to relative activity of free and immobilized lipase was investigated and compared by measuring hydrolysis of emulsified olive oil at different temperatures, and the results are shown in Figure 3.

According to Figure 3, the free enzyme and immobilized in corn cob *in nature* showed an increase of its activity with increasing temperature until a maximum relative activity at 50°C. A similar profile occurs with the immobilized in corn cob after autohydrolysis process however with a maximum relative activity at 55°C. For higher temperatures the relative activity decreased on both conditions, free enzyme and immobilized in corn cob (*in nature* and treated). However, the overall hydrolytic activity for immobilized lipase was greater than the free lipase for all temperature conditions (50–80°C) investigated. Similar results were obtained by several authors when in studies with mobilized lipase in different support (Brígida *et al.*, 2009; Cabrera-Padilla *et al.*, 2012).



**Fig. 3** - Effect of temperature on the relative activity of the free enzyme (blue) and immobilized enzymes in different materials based on corn cob: residue *in nature* (black) and treated by autohydrolysis process (red).

### 3.3.2 Thermal stability

One of the characteristics desired for the biocatalyst is its resistance to temperature. The Enzyme immobilization often limits its freedom to undergo drastic conformational changes and thus results in increased stability towards denaturation (Cao *et al.*, 2014). Thus, the thermal stability of free and immobilized enzyme were investigated and compared by measuring the hydrolysis of emulsified olive oil in different reaction times (Table 3).

**Table 3** - Thermal deactivation constant ( $k_d$ ) and half-life ( $T_{1/2}$ ) of free enzyme and immobilized enzymes in different materials based on corn cob: residue *in nature* (Immobilized biocatalyst *in nature*) and treated by autohydrolysis process (Immobilized biocatalyst autohydrolysis).

	Free enzyme	R <sup>2</sup>	Immobilized biocatalyst <i>in nature</i>	R <sup>2</sup>	Immobilized biocatalyst autohydrolysis	R <sup>2</sup>
$k_d$	0.0117		0.0027		0.0019	
		0.9895		0.9852		0.9927
$T_{1/2}$	59.24		255.02		356.01	

The data in Table 3 show that the loss of catalytic activity for the free enzyme was much higher than that determined for the immobilized in corn cob after treated by autohydrolysis process, suggesting that the immobilization procedure of lipase resulted the highest thermal stability. The half-life obtained for the immobilized biocatalyst in corn cob *in nature* was approximately four times higher compared to free enzyme, and approximately 6 times higher when compared with immobilized biocatalyst in corn cob after autohydrolysis process. Similar behaviors have been observed for immobilized lipase derivatives in supports. Mihailović *et al.* (2014) showed inactivation curves of lipase immobilized on the modified support and unmodified (in both buffers) with very similar trends and half-lives in range 1–1.4 h (Mihailović *et al.*, 2014).

### 3.3.3 Determination of $K_m$ and $V_{max}$

The Kinetic parameters determination were performed at temperature and pH optimum. Data experimentally obtained allowed for the obtainment of kinetic curve, which demonstrated the influence of oil and water emulsion containing different proportions of olive oil on the hydrolysis velocity. The kinetics of the hydrolytic activity of the free enzyme and immobilized biocatalysts were investigated. The Michaelis–Menten equation was used to fit the kinetic parameters and evaluate the constants,  $K_m$  and  $V_{max}$ , using the program Origin® 8. The values of the Michaelis–Menten kinetic parameter are summarized in Table 4.

**Table 4** - Kinetic parameters  $K_m$  and  $V_{max}$  of the free enzyme and immobilized enzymes in different materials based on corn cob: residue *in nature* and treated by autohydrolysis process.

Biocatalyst	$K_m$ (mM)	$V_{max}$ (mmol min <sup>-1</sup> g <sup>-1</sup> )	$R^2$
Free enzyme	227.96	3246.75	0.9827
<i>In nature</i> corn cob	281.59	2000	0.9842
Autohydrolysis	397.50	1785.71	0.9866

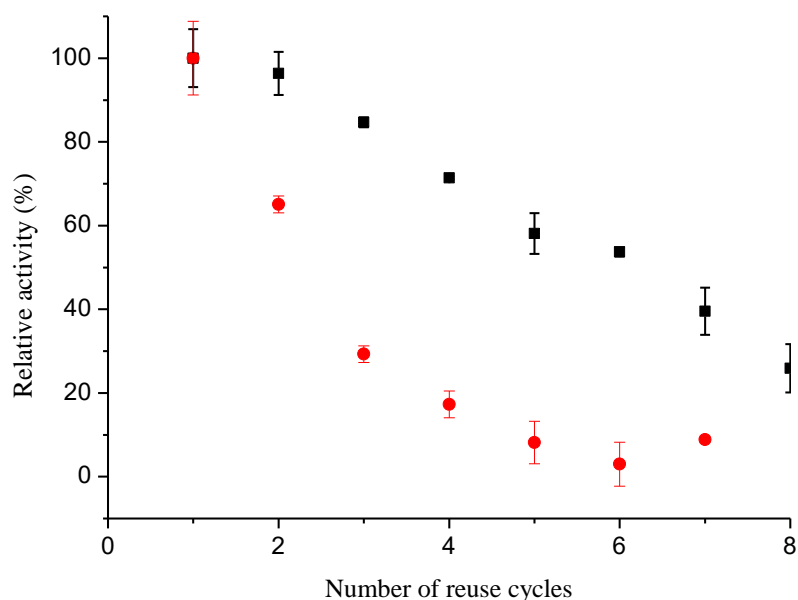
The  $K_m$  values determined indicated a change of the affinity of the lipase substrate when immobilized form. This behavior is usually observed for immobilized enzymes due to the effects of enzyme interaction and support, arising from the immobilization process.

Interactions can be linked by binding of the enzyme on the support, which can result in conformational changes that affect the catalytic function; access of the substrate to the active site of the enzyme can be affected by steric hindrance of the support and the properties of the support, as the hydrophilic or hydrophobic nature or in the presence of fixed charges that affect the enzyme action mode (Simões *et al.*, 2011).

### 3.3.4 Stability of immobilized lipase

The profile of operational stability of the immobilized biocatalysts were estimated by esterification tests (consecutive batch). The reuse of the enzyme constitutes the main advantage of the process of biocatalysts immobilization. The reusing of the lipase for several reactions allows the reduction of the reaction cost, making the economically feasible process. Moreover, the use of an immobilized enzyme permits to greatly simplify the design of the reactor and the control of the reaction. However, the idea of enzyme reuse implicitly means that the stability of the final enzyme preparation should be high enough to permit this reuse (Mateo *et al.*, 2007).

The Figure 4 shows the variation in relative activity of immobilized biocatalysts after multiple cycles of reuse.



**Fig. 4** - Relative activity of the immobilized enzymes in function the reusability of immobilized enzymes (number os reuse cycles) in different materials based on corn cob: residue *in nature* (black) and treated by autohydrolysis process (red).

During the reutilization observed was found that the operating stability of the biocatalyst immobilized in corn cob after autohydrolysis process suffered a great reduction in the third cycle, keeping about 68% of its initial activity not after the second reuse and reaching 32% in the third. On the other cycles, activity reduction rate was slightly lower, keeping about 15% of its initial activity reuse until the sixth cycle. This result suggests that the protocol developed for treatment of support, may have directly affected the enzyme support characteristics, modifying the affinity of an enzyme immobilization.

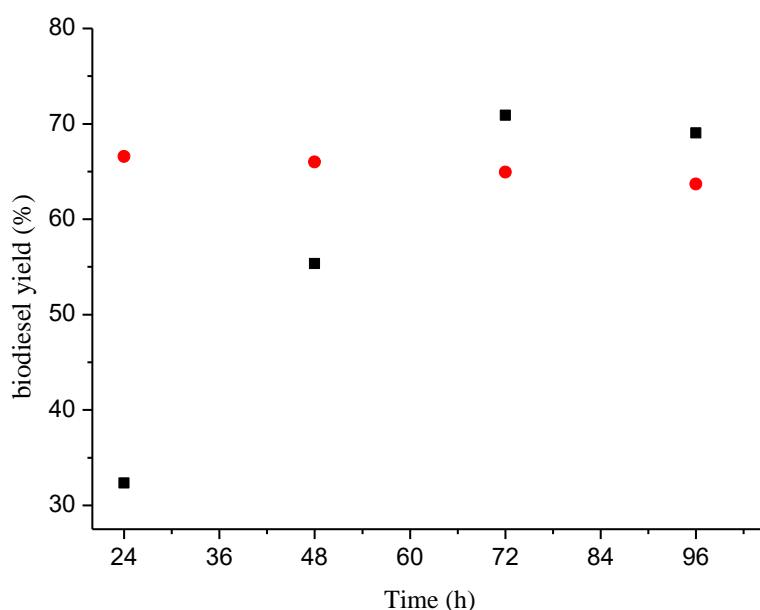
Lipase from *Pseudomonas fluorescens Amano* was immobilized on woolen and presented results showing a rapid loss of residual activity of the biocatalyst, with less than 40% of the initial activity in the second cycle and after five runs about 10% of the initial activity. *Candida rugosa* lipase was encapsulated within a chemically inert sol-gel support prepared by polycondensation with tetraethoxysilane and octyltriethoxysilane in the presence of  $\beta$ -cyclodextrin-based polymer. The results shows that the immobilized lipases continued 26 and 2% of their conversion ratios for  $\beta$ -CD-HMDI- E enc and  $\beta$ -CD-HMDI- E cov after the 5th reuse, respectively (Yilmaz and Sezgin, 2012).

### 3.3.5 Biodiesel production

The biodiesel production yield using biocatalyst immobilized was also investigated. The maximal conversion (over 75 wt%) occurred at 40°C during 120 h reaction. The Figure 5 shows the efficiency of the immobilized biocatalyst immobilized in corn cob after autohydrolysis process which reaches about 63% conversion in 24 hours, keeping about 65% of its conversion for 96 hours.

The immobilized biocatalyst showed a low conversion in the first 24 hours, about 33%, keeping increasing up to a conversion of 73% at 72 h and remained at that level until 96 hours reaction. Therefore, more efforts on further improving the operational stability of biocatalyst immobilized are very important put for biodiesel production in future.

The performance of biocatalysts are satisfactory when compared with performances reported by other lipase preparations, such as *Burkholderia cepacia* immobilized in sol-gel matrix in which was obtained a maximal transesterification yield of 51.9% in the same conditions of this work (Oliveira *et al.*, 2014).



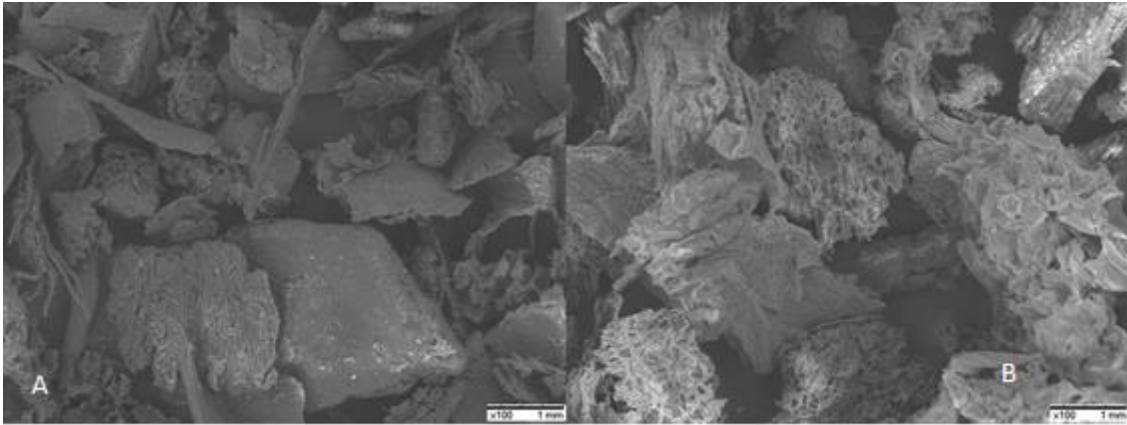
**Fig. 5** - Biodiesel production yield in function of time obtained for the biocatalyst immobilized in different materials based on corn cob: residue *in nature* (black) and treated by autohydrolysis process (red).

### 3.4 Scanning electron microscopy (SEM)

SEM images (Figure 6) were used to complete the analysis of the effect of the autohydrolysis in the process and on the structure. The untreated sample exhibited an ordered surface (Fig. 6A). In contrast, the support obtained after autohydrolysis process appears to be disorganized (Fig. 6B) and increasing the porosity. In Fig. 6B, the corn cob after the process shown an effect in matrix separation and materials exposition, allowing to be more susceptible to enzymatic immobilization.

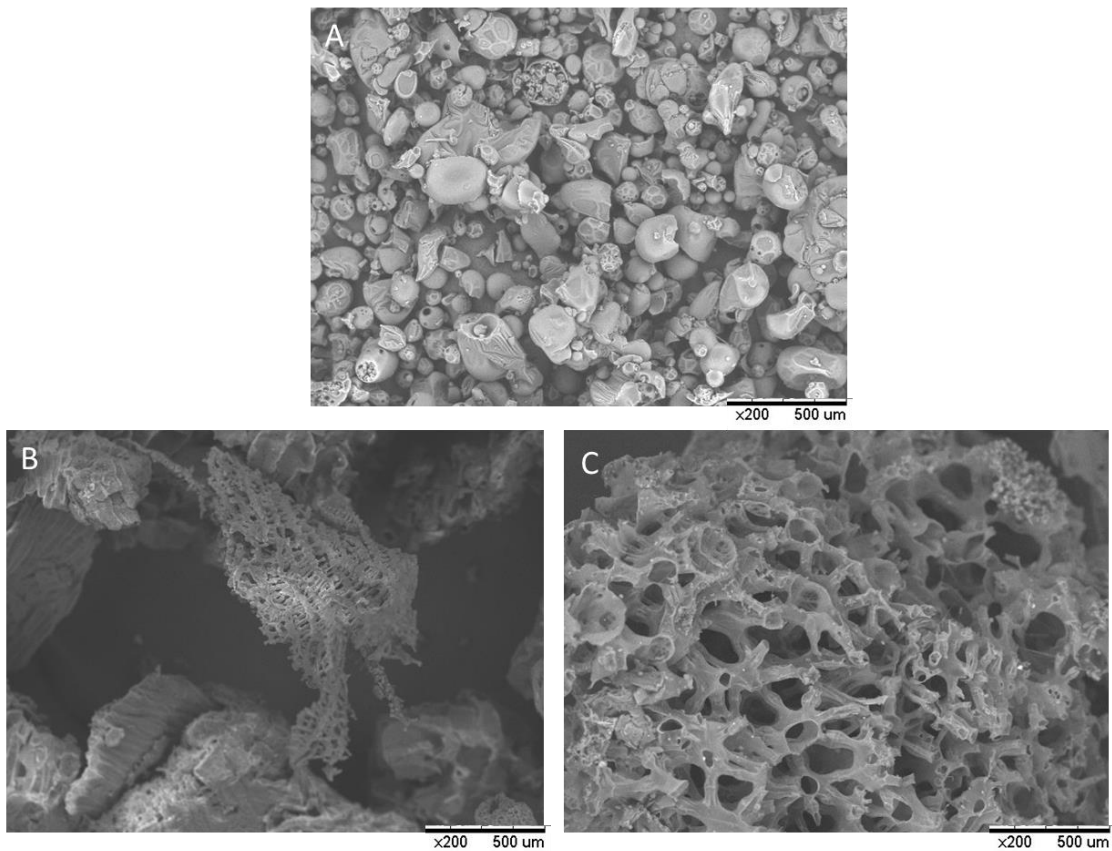
The SEM micrograph obtained for biocatalyst immobilized (Figure 6B) showed an amorphous structure with irregular blocks. These images were used to complete the analysis of the effect of the autohydrolysis process on the structure. The untreated sample exhibited a rigid and ordered fiber. In contrast, the corn cob obtained after autohydrolysis appeared to be distorted (Fig. 6B) because illustrated partition from the initial connected structure, increasing the external surface area and the porosity.

As observed in Table 2 and 3, the Figure 6 showed that the autohydrolysis process changed the structure of the material and this change can be associated with removal of the lignin and hemicellulose, thus reducing cellulose crystallinity and increasing the porosity of the cob corn, increasing the surface of contact for immobilization.



**Fig. 6** - Scanning electron microscopy of the corn cob *in nature* (a) and corn cob treated after autohydrolysis process (b).

The Figure 7 shows the particles of the free enzyme, corn cob carrier without treatment and used as the biocatalyst obtained.

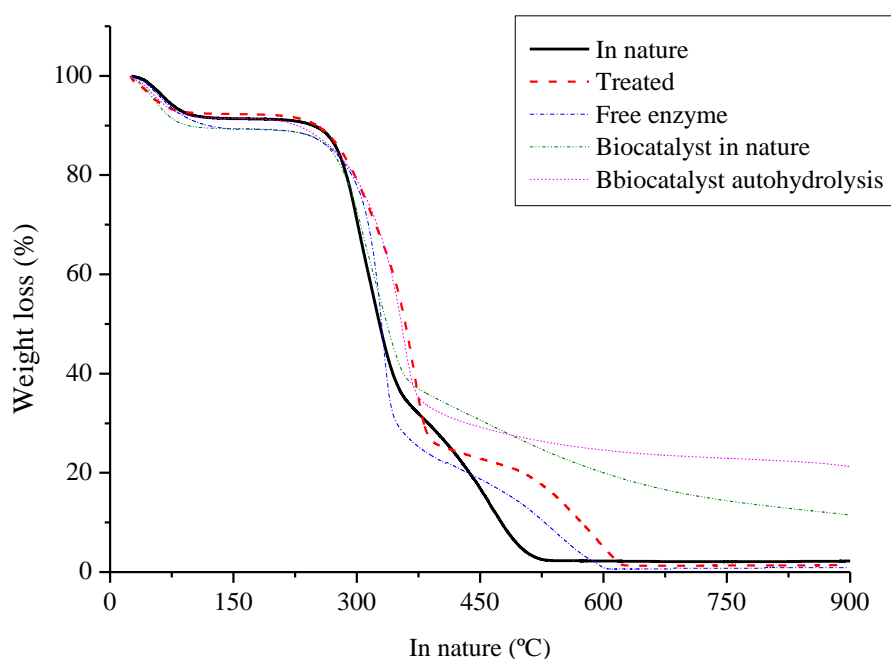


**Fig. 7** - Scanning electron microscopy of the (A) free enzyme, (B) immobilized enzymes in corn cob *in nature* and (C) immobilized enzymes in corn cob after autohydrolysis process.

Analyzing the image it is possible to observe that the enzyme may have been immobilized both on the surface, but also that the process of immobilization occurred in the pores of the material. Some functional groups such as thiols and those containing multiple unsaturations during the treatment, but also during the immobilization alteration may have been significant in their chemical composition and structure, suggesting breaking of extruded in the lignocellulosic complex.

### 3.5 Thermogravimetric analysis (TGA)

The properties of the corn cob *in nature*, treated, free enzyme and biocatalysts were analyzed. Thermogravimetric analysis or TGA is a technique in which the weight loss of a sample is studied with increasing temperature. It is a highly sensitive technique and is widely used for studying thermal and thermo-oxidative degradation of high temperature polymers (Rhim *et al.*, 2010). The TGA curves (Figure 8) show the weight losses of the samples when exposed to heating until 900°C.



**Fig. 8** - TGA curves obtained for the corn cob *in nature*, corn cob treated and biocatalyst free and in corn cob, *in nature* and after autohydrolysis process.

All samples present similar TGA curves with three defined mass loss stages. The first one starts at approximately 30°C and corresponds to weight losses of about 7-9% as



a result of the water evaporation (dehydration of the sample), carbon monoxide, carbon dioxide and evaporation of other substances low molecular weight (Rhim *et al.*, 2010). In the second stage occur the largest weight loss starting in approximately 270°C of the 400°C, at this stage, the depolymerization and decomposition of polysaccharides present in the sample occurs, providing weight losses of 60-70%. The third stage, from 400°C, related to the decomposition of the samples, resulting in weight losses full. These behavior are consistent with those found in the literature (Ballesteros *et al.*, 2014).

The differences between untreated and treated of biocatalyst were clearly seen, as shown in the data presented in Table 5. A shift of hemicellulose and cellulose peaks occurred from treatment, this modification may have improved the interaction of the enzyme support, which justifies the increase in the waste compared to *in nature* biocatalyst (Boonsombuti *et al.*, 2013). Mass loss above ~400 °C of *in nature* and treated corn cob happened at the same time but the treated corn cob a greater mass solid residue mass (wt %) due to treatment that removed hemicellulose, resulting in a material more rich in lignin difficult to pyrolyze (Boonsombuti *et al.*, 2013).

**Table 5** - Characteristics of degradation of corn cob *in nature*, treatment, the free enzyme and immobilized biocatalysts in corn cob *in nature* and after autohydrolysis process.

Sample	1° stage loss (%) 30°C – 100°C	2° stage loss (%) 270°C – 400°C	3° stage residue (%) 600°C
Corn cob	7.74	64.02	2.23
Treated corn cob	7.42	66.79	5.58
Free enzyme	8.74	68.34	1.15
biocatalyst <i>in nature</i>	10.08	54.94	20.19
biocatalyst autohydrolysis	8.11	59.39	24.64

## Conclusion

The lipase from *Burkholderia cepacia* was immobilized on corn cob by physical adsorption with immobilized yield of 65% for immobilized biocatalyst *in nature* and 60% for immobilized biocatalyst in corn cob after treatment with autohydrolysis process. The biocatalyst immobilized showed a better stability than the free form. Indeed, immobilization of the enzyme enhanced its stability towards, mainly, to the temperature. Consequently, the support preserved the biocatalysts during the immobilization.

The results obtained by TG showed that the behavior of the free enzyme is different compared to the immobilized biocatalyst. The immobilization of the enzyme increases the enthalpy of fusion and thus providing a greater thermal stability to the biocatalyst. Indeed, the TGA profiles clearly showed that the immobilized biocatalyst is more stable than free enzyme. These results indicate that corn cob treated might be used as a support for immobilization of lipase. The biodiesel yield of production using biocatalyst immobilized was also investigated, resulting in a conversion of about 63% of conversion in 24 hours, for biocatalyst immobilized in corn cob after autohydrolysis process. In this study the immobilized enzyme transesterification was investigated presenting satisfactory results and future studies the optimization may enhance the results.

## Acknowledgments

The authors acknowledge financial assistance from the Brazilian research funding agencies CAPES, CNPq, and FAPITEC/SE.

## References

- Abdulla, R. and P. Ravindra (2013). "Characterization of cross linked *Burkholderia cepacia* lipase in alginate and  $\kappa$ -carrageenan hybrid matrix." Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers **44**(4): 545-551.
- Ballesteros, L., J. Teixeira and S. Mussatto (2014). "Chemical, Functional, and Structural Properties of Spent Coffee Grounds and Coffee Silverskin." Food and Bioprocess Technology **7**(12): 3493-3503.
- Boonsombuti, A., A. Luengnaruemitchai and S. Wongkasemjit (2013). "Enhancement of enzymatic hydrolysis of corn cob by microwave-assisted alkali pretreatment and its effect in morphology." Cellulose **20**(4): 1957-1966.

Brígida, A., D. Pinto, M. Silveira, L. Gonçalves and M. Coelho (2009). "Immobilization of *Candida antarctica* lipase B on NaOCl/NaOH treated green coconut fiber by adsorption." New Biotechnology **25, Supplement(0)**: S135.

Brígida, A. I. S., V. M. A. Calado, L. R. B. Gonçalves and M. A. Z. Coelho (2010). "Effect of chemical treatments on properties of green coconut fiber." Carbohydrate Polymers **79(4)**: 832-838.

Cabrera-Padilla, R., M. Lisboa, A. Fricks, E. Franceschi, A. Lima, D. Silva and C. F. Soares (2012). "Immobilization of *Candida rugosa* lipase on poly(3-hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate): a new eco-friendly support." Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology **39(2)**: 289-298.

Cao, H., L. Deng, M. Lei, F. Wang and T. Tan (2014). "The role of temperature and solvent microenvironment on the activity of *Yarrowia lipolytica* Lipase 2: Insights from molecular dynamics simulation." Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic **109(0)**: 101-108.

Chai, L., Q. Li, Y. Zhu, Z. Zhang, Q. Wang, Y. Wang and Z. Yang (2010). "Synthesis of thiol-functionalized spent grain as a novel adsorbent for divalent metal ions." Bioresource Technology **101(15)**: 6269-6272.

Chaturvedi, V. and P. Verma (2013). "An overview of key pretreatment processes employed for bioconversion of lignocellulosic biomass into biofuels and value added products." 3 Biotech **3(5)**: 415-431.

Christopher, L. P., K. Hemanathan and V. P. Zambare (2014). "Enzymatic biodiesel: Challenges and opportunities." Applied Energy **119(0)**: 497-520.

Cristóvão, R. O., A. P. M. Tavares, A. I. Brígida, J. M. Loureiro, R. A. R. Boaventura, E. A. Macedo and M. A. Z. Coelho (2011). "Immobilization of commercial laccase onto green coconut fiber by adsorption and its application for reactive textile dyes degradation." Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic **72(1-2)**: 6-12.

da Silva, A. M., A. P. M. Tavares, C. M. R. Rocha, R. O. Cristóvão, J. A. Teixeira and E. A. Macedo (2012). "Immobilization of commercial laccase on spent grain." Process Biochemistry **47(7)**: 1095-1101.

Egüés, I., A. M. Stepan, A. Eceiza, G. Toriz, P. Gatenholm and J. Labidi (2014). "Corn cob arabinoxylan for new materials." Carbohydrate Polymers **102(0)**: 12-20.

EMBRAPA (2013). Brazilian Agricultural Research Corporation.

Fan, X., G. Cheng, H. Zhang, M. Li, S. Wang and Q. Yuan (2014). "Effects of acid impregnated steam explosion process on xylose recovery and enzymatic conversion of cellulose in corn cob." Carbohydrate Polymers **114(0)**: 21-26.

Fengel, D. and G. Wegener (1983). Wood: chemistry, ultrastructure, reactions, De Gruyter.

Garrote, G., Domínguez, H., Parajó, J. C. and Domínguez, H. (2002). "Autohydrolysis of corn cob: study of non-isothermal operation for xylooligosaccharide production." Journal of Food Engineering **52**(3): 211-218.

Garrote, G., Falqué, E., Domínguez, H. and Parajó, J. C. (2007). "Autohydrolysis of agricultural residues: Study of reaction byproducts." Bioresource Technology **98**(10): 1951-1957.

Gonçalves, F. A., Ruiz, H. A., C. d. C. Nogueira, E. S. d. Santos, J. A. Teixeira and G. R. d. Macedo (2014). "Comparison of delignified coconuts waste and cactus for fuel-ethanol production by the simultaneous and semi-simultaneous saccharification and fermentation strategies." Fuel **131**(0): 66-76.

Higuera, M., Bernal, C. and Mesa, M. (2014). "Interplay of carbon–silica sources on the formation of hierarchical porous composite materials for biological applications such as lipase immobilization." Materials Science and Engineering: C **43**(0): 199-206.

Izrael Živković, L. T., L. S. Živković, B. M. Babić, M. J. Kokunešoski, B. M. Jokić and I. M. Karadžić (2015). "Immobilization of *Candida rugosa* lipase by adsorption onto biosafe meso/macroporous silica and zirconia." Biochemical Engineering Journal **93**(0): 73-83.

Lei, C., J. Zhang, L. Xiao and J. Bao (2014). "An alternative feedstock of corn meal for industrial fuel ethanol production: Delignified corn cob residue." Bioresource Technology **167**(0): 555-559.

Li, Z., X. Guo, X. Feng and C. Li (2015). "An environment friendly and efficient process for xylitol bioconversion from enzymatic corn cob hydrolysate by adapted *Candida tropicalis*." Chemical Engineering Journal **263**(0): 249-256.

Liu, S. (2010). "Woody biomass: Niche position as a source of sustainable renewable chemicals and energy and kinetics of hot-water extraction/hydrolysis." Biotechnology Advances **28**(5): 563-582.

Mateo, C., J. M. Palomo, G. Fernandez-Lorente, J. M. Guisan and R. Fernandez-Lafuente (2007). "Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques." Enzyme and Microbial Technology **40**(6): 1451-1463.

Mihailović, M., M. Stojanović, K. Banjanac, M. Carević, N. Prlainović, N. Milosavić and D. Bezbradica (2014). "Immobilization of lipase on epoxy-activated Purolite® A109 and its post-immobilization stabilization." Process Biochemistry **49**(4): 637-646.

Oliveira, M. V. S., P. C. M. D. Rós, S. Mattedi, H. F. Castro, C. M. F. Soares and Á. S. Lima (2014). "Transesterification of babassu oil catalyzed by *Burkholderia cepacia* encapsulated in sol-gel matrix employing protic ionic liquid as an additive." Acta Scientiarum **36**: 445-451.

Omay, D. (2014). "Immobilization of lipase onto a photo-crosslinked polymer network: Characterization and polymerization applications." Biocatalysis and Biotransformation **32**(2): 132-140.

Parajó, J. C., G. Garrote, J. M. Cruz and H. Dominguez (2004). "Production of xylooligosaccharides by autohydrolysis of lignocellulosic materials." Trends in Food Science & Technology **15**(3-4): 115-120.

Prozil, S. O., E. V. Costa, D. V. Evtuguin, L. P. Cruz Lopes and M. R. M. Domingues (2012). "Structural characterization of polysaccharides isolated from grape stalks of *Vitis vinifera* L." Carbohydrate Research **356**(0): 252-259.

Rhim, Y.-R., D. Zhang, M. Rooney, D. C. Nagle, D. H. Fairbrother, C. Herman and D. G. Drewry Iii (2010). "Changes in the thermophysical properties of microcrystalline cellulose as function of carbonization temperature." Carbon **48**(1): 31-40.

Ruiz, H. A., D. S. Ruzene, D. P. Silva, F. F. da Silva, A. A. Vicente and J. A. Teixeira (2011). "Development and characterization of an environmentally friendly process sequence (autohydrolysis and organosolv) for wheat straw delignification." Appl Biochem Biotechnol **164**(5): 629-641.

Ruiz, H. A., D. S. Ruzene, D. P. Silva, M. A. C. Quintas, A. A. Vicente and J. A. Teixeira (2011). "Evaluation of a hydrothermal process for pretreatment of wheat straw—effect of particle size and process conditions." Journal of Chemical Technology & Biotechnology **86**(1): 88-94.

Simões, A. S., R. Y. Mori, R. Faria, H. F. d. Castro and A. A. Mendes (2011). "Desempenho da matriz híbrida SiO<sub>2</sub>-quitosana na imobilização da lipase microbiana de *Candida rugosa*." Química Nova **34**: 33-38.

Soares, C. F., H. De Castro, F. De Moraes and G. Zanin (1999). "Characterization and utilization of *Candida rugosa* lipase immobilized on controlled pore silica." Applied Biochemistry and Biotechnology **79**(1-3): 745-757.

Tsai, W. T., C. Y. Chang, S. Y. Wang, C. F. Chang, S. F. Chien and H. F. Sun (2001). "Preparation of activated carbons from corn cob catalyzed by potassium salts and subsequent gasification with CO<sub>2</sub>." Bioresource Technology **78**(2): 203-208.

Yilmaz, E. and M. Sezgin (2012). "Enhancement of the Activity and Enantioselectivity of Lipase by Sol–Gel Encapsulation Immobilization onto  $\beta$ -cyclodextrin-Based Polymer." Applied Biochemistry and Biotechnology **166**(8): 1927-1940.

Zanin, G., F. d. Moraes, S. Saiad and R. Pietro (2004). "Em Enzimas como Agentes Biotecnológicos." Em Enzimas como Agentes Biotecnológicos.

Ziegler-Borowska, M., T. Siódmiak, D. Chełminiak, A. Cyganiuk and M. P. Marszałł (2014). "Magnetic nanoparticles with surfaces modified with chitosan–poly[N-benzyl-2-(methacryloxy)-N,N-dimethylethanaminium bromide] for lipase immobilization." Applied Surface Science **288**(0): 641-648.

### **4.3 – Patente 01**

#### **UTILIZAÇÃO DE SABUGO DE MILHO COMO SUPORTE PARA O PROCESSO DE IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES**

##### **Campo da invenção**

A presente patente de invenção diz respeito a utilização de sabugo de milho como suporte no processo de imobilização de lipase para obtenção de biocatalisadores imobilizados, como forma de propiciar sua reutilização em processos industriais contínuos ou em batelada. A invenção proposta revela a utilização de um resíduo obtido da cadeia produtiva de grãos (resíduo agrícola) ou do seu processamento (resíduo agro-industrial), o sabugo de milho, na melhoria da estabilidade da enzima lipase e de seu reuso como biocatalisador imobilizado, apresentando vantagens econômicas frente aos suportes convencionais.

Patente depositada: 20 de janeiro de 2014

Protocolo: BR102014001315-6

20/01/2014 860140006200  
09:46 NPWB



0000221400256938



BR 10 2014 001315 6



Protocolo

Número

Código QR



**INPI** INSTITUTO  
NACIONAL  
DA PROPRIEDADE  
INDUSTRIAL

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

<b>DIRPA</b> <b>© PATENTES</b>	<b>Tipo de Documento:</b> Recibo de Peticionamento Eletrônico	<b>DIRPA</b>	<b>Página:</b> 1 / 1
<b>Título do Documento:</b> Recibo DIRPA-FQ001 - Depósito de Pedido de Patente ou de Certificado de Adição		<b>Código:</b> RECIBO	<b>Versão:</b> 01
		<b>Modo:</b> 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 2014 001315 6  
Número da GRU principal: 00.000.2.2.14.0025693.8 (serviço 200)  
Número do protocolo: 860140006200  
Data do protocolo: 20 de Janeiro de 2014, 09:46 (BRST)  
Número de referência do envio: 17724

#### Dados do requerente ou interessado:

Tipo de formulário enviado: DIRPA-FQ001 v.005  
Referência interna: 022014  
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: 1  
Título do pedido: UTILIZAÇÃO DE SABUGO DE MILHO COMO SUPORTE PARA O PROCESSO DE IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES

#### 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	---
Patente-ITP_SuporteEnzimatico.pdf [DOCUMENTO.pdf]	Arquivo com conteúdo técnico-patentário da petição - Relatório descritivo em formato eletrônico PDF - Reivindicações em formato eletrônico PDF - Resumo em formato eletrônico PDF	páginas 1 a 8 páginas 9 a 10 página 11 11
Relatório Descritivo.txt [RELATDESCTXT.txt]	Relatório descritivo em formato eletrônico texto	---
Reivindicações.txt [REIVINDTXT.txt]	Reivindicações em formato eletrônico texto	---
Resumo.txt [RESUMOTXT.txt]	Resumo em formato eletrônico texto	---
GRU 2.pdf [GRU-1.pdf]	Guia de Recolhimento da União (GRU) paga com comprovante de pagamento em formato eletrônico PDF [Código de serviço: 200, Número: 00.000.2.2.14.0025693.8, Nome do sacado: Instituto de Tecnologia e Pesquisa]	1

#### Dados sobre o envio:

Responsável pelo envio: Leonardo Maestri Teixeira:fe54adb21d88cbce62208d68cfa7c5e  
Assinatura (Requerente, Interessado ou Procurador): LEONARDO MAESTRI TEIXEIRA:05242469633,OU=AR SERASA,OU=(EM BRANCO),OU=RFB e-CPF A3,OU=Secretaria da Receita Federal do Brasil - RFB,O=ICP-Brasil,C=BR  
Método de envio: Eletrônico pela Internet  
Código de segurança: 53:2C:27:6D:B4:50:89:AC:E2:DB:98:0E:B9:DF:EE:48:9E:BA:31:4A

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

<b>DIRPA</b> <b>PATENTES</b>	Tipo de Documento: <b>Formulário Eletrônico</b>	<b>DIRPA</b>	Página: <b>1 / 3</b>
Título do Documento: <b>Depósito de Pedido de Patente</b>		Código: <b>FQ001</b>	Versão: <b>5</b>
		Procedimento: <b>Não Aplicável</b>	

**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: Av. Murilo Dantas, nº 300, Bairro Farolândia, Aracaju, Sergipe, Brasil  
1.4 CEP: 49032-490  
1.5 Telefone: +55(79)32182190  
1.6 Fax: +55(79)32182190  
1.7 E-mail: agitec@itp.org.br

**2. Natureza:**  Invenção  Modelo de Utilidade  Certificado de Adição

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

UTILIZAÇÃO DE SABUGO DE MILHO COMO SUPORTE PARA O PROCESSO DE IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES

**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):

<b>País ou Organização do depósito</b>	<b>Número do depósito</b>	<b>Data do depósito</b>	<b>Tipo</b>
---	---	---	---

**6. Inventor (72):**

6.1 Nome: Denise Santos Ruzene  
6.2 Qualificação: Doutora em Biotecnologia Industrial  
6.3 CPF: 252.099.218-24  
6.4 Endereço Completo: Av. Sizino Martins Fontes n.2222 Apto 203 Bloco 3, Bairro Farolândia, Aracaju, Sergipe, Brasil  
6.5 CEP: 49032-510  
6.6 Telefone: +55(79)32321341  
6.7 Fax: ---  
6.8 E-mail: ruzeneds@hotmail.com

6.1 Nome: Daniel Pereira da Silva  
6.2 Qualificação: Doutor em Biotecnologia Industrial  
6.3 CPF: 171.101.568-77  
6.4 Endereço Completo: Av. Sizino Martins Fontes n.2222 Apto 203 Bloco 3, Bairro Farolândia, Aracaju, Sergipe, Brasil  
6.5 CEP: 49032-510  
6.6 Telefone: +55(79)32321341  
6.7 Fax: ---  
6.8 E-mail: silvadp@hotmail.com

6.1 Nome: Cleide Mara Faria Soares  
6.2 Qualificação: Doutor em Engenharia Química  
6.3 CPF: 071.228.238-65  
6.4 Endereço Completo: Rua Franklin Campos Sobral, n.1623, apto.1003-A, Grageru, Aracaju, Sergipe, Brasil  
6.5 CEP: 49000-000  
6.6 Telefone: +55(79)91322592  
6.7 Fax: ---  
6.8 E-mail: cleide.soares@pq.cnpq.br

6.1 Nome: Álvaro Silva Lima  
6.2 Qualificação: Doutor  
6.3 CPF: 609.558.135-49  
6.4 Endereço Completo: Av. Murilo Dantas 300, Farolândia, Aracaju, Sergipe, Brasil  
6.5 CEP: 49032-490





<b>DIRPA</b> <b>PATENTES</b>		Tipo de Documento: <b>Formulário Eletrônico</b>	<b>DIRPA</b>	Página: <b>2 / 3</b>
Título do Documento: <b>Depósito de Pedido de Patente</b>			Código: <b>FQ001</b>	Versão: <b>5</b>
			Procedimento: <b>Não Aplicável</b>	
6.6	Telefone:	+55(79)32182190		
6.7	Fax:	---		
6.8	E-mail:	alvaro_lima@itp.org.br		
6.1	Nome:	Diego Melo Costa		
6.2	Qualificação:	Mestre		
6.3	CPF:	024.232.335-90		
6.4	Endereço Completo:	Rua quatro, 85 Loteamento Saramutaia Bairro Areia Branca - Zona de Expansão, Aracaju, Sergipe, Brasil		
6.5	CEP:	49007-361		
6.6	Telefone:	+55(79)99583028		
6.7	Fax:	---		
6.8	E-mail:	diego.dmc@gmail.com		
6.1	Nome:	Rebeca Yndira Cabrera Padilla		
6.2	Qualificação:	Doutor em Engenharia Química		
6.3	CPF:	015.244.306-17		
6.4	Endereço Completo:	Rua Professora Ofenisia Freire, 55. Apart. 203 - Bloco II. Bairro: Farolândia, Aracaju, Sergipe, Brasil		
6.5	CEP:	49030-213		
6.6	Telefone:	+55(79)91440480		
6.7	Fax:	---		
6.8	E-mail:	yndiracp@gmail.com		
6.1	Nome:	Raira Souza de Santana Castro		
6.2	Qualificação:	Graduanda em Engenharia de Petróleo		
6.3	CPF:	058.769.055-00		
6.4	Endereço Completo:	Av. Dr. José Thomas D'Avila Nabuco -Bloco Tobias Barreto AP 204., Aracaju, Sergipe, Brasil		
6.5	CEP:	49030-270		
6.6	Telefone:	+55(79)91569818		
6.7	Fax:	---		
6.8	E-mail:	raira_s.s.castro@hotmail.com		
6.1	Nome:	Erica Rodrigues de Souza		
6.2	Qualificação:	Graduanda em Biomedicina		
6.3	CPF:	024.232.335-90		
6.4	Endereço Completo:	Av. Dr. José Thomas D'Avila Nabuco -Bloco de Itabaiana AP 203, Aracaju, Sergipe, Brasil		
6.5	CEP:	49030-270		
6.6	Telefone:	+55(79)32232694		
6.7	Fax:	---		
6.8	E-mail:	erica_r_souza@hotmail.com		
6.1	Nome:	José António Couto Teixeira		
6.2	Qualificação:	Doutor		
6.3	CPF:	---		
6.4	Endereço Completo:	Rua Nova de S. Crispim, 516 B, 3ºB, Porto, Porto, Portugal		
6.5	CEP:	4000363		
6.6	Telefone:	+351962980291		
6.7	Fax:	---		
6.8	E-mail:	jateixeira@deb.uminho.pt		
6.1	Nome:	Daniel Delgado Queissada		
6.2	Qualificação:	Doutor em Ciências		
6.3	CPF:	038.414.604-02		
6.4	Endereço Completo:	Rua Sinésio Jacó dos Santos, 170. Centro., Simão Dias, Sergipe, Brasil		
6.5	CEP:	49000-000		
6.6	Telefone:	+55(79)91415562		
6.7	Fax:	---		
6.8	E-mail:	queissada@gmail.com		
<b>7.</b>	<b>Declaração de divulgação anterior não prejudicial:</b>			
	[ ] Artigo 12 da LPI - Período de Graça.			
<b>8.</b>	<b>Procurador (74):</b>			
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:	---		



<b>DIRPA</b> <b>E-PATENTES</b>	Tipo de Documento: <b>Formulário Eletrônico</b>	<b>DIRPA</b>	Página: <b>3 / 3</b>
Título do Documento: <b>Depósito de Pedido de Patente</b>		Código: <b>FQ001</b>	Versão: <b>5</b>
		Procedimento: <b>Não Aplicável</b>	

8.10 E-mail: ---

**9. Listagem de sequências 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 sequências (arquivo em formato eletrônico TXT).  
 Declaração relativa à listagem de sequências (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.

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

- Sugestão de desenho a ser publicado com o resumo: ---  
Número de desenhos: ---  
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	8 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"/>	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: 00.000.2.2.14.0025693.8, Nome do sacado: Instituto de Tecnologia e Pesquisa]	1 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 janeiro de 2014

Data

CN=LEONARDO MAESTRI TEIXEIRA:05242469633, OU=AR SERASA, OU=(EM BRANCO), OU=RFB e-CPF A3, OU=Secretaria da Receita Federal do Brasil - RFB, O=ICP-Brasil, C=BR (Certificado por: CN=AC SERASA RFB v2, OU=Secretaria da Receita Federal do Brasil - RFB, O=ICP-Brasil, C=BR)

Assinatura (Requerente ou Procurador)

## UTILIZAÇÃO DE SABUGO DE MILHO COMO SUPORTE PARA O PROCESSO DE IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES

### CAMPO DA INVENÇÃO

5           A presente Patente de Invenção (PI) diz respeito à utilização do sabugo de milho como suporte para imobilização de enzimas lipases, catalisadores biológicos ou biocatalisadores que possuem como função principal a aceleração de reações químicas ou bioquímicas dentro de um contexto de aplicação industrial, para melhora na manutenção da atividade do biocatalisador imobilizado obtido.

### 10   FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

          Enzimas são biomoléculas que catalisam com grande eficiência as diversas reações. O uso crescente desses biocatalisadores em processos industriais deve-se à alta sensibilidade e especificidade de suas reações químicas, bem como ao avanço das pesquisas em genética, somada à tecnologia de processos fermentativos, na área de  
15   produção de enzimas. Entretanto, sua utilização em escala industrial deve ser analisada quanto à relação custo/benefício.

          Neste sentido, a utilização de enzimas imobilizadas tem atraído um amplo interesse industrial. A imobilização de enzimas tem se mostrado, nos últimos tempos, uma poderosa ferramenta na melhora das propriedades enzimáticas bem como na relação  
20   custo/benefício de sua aplicação. Deste modo, cabe salientar que enzimas imobilizadas são aquelas que estão confinadas fisicamente em um espaço, onde acontece o contato entre a enzima e o substrato no meio de reação [SAID, S.; PIETRO, R. C. L. - Enzimas como agentes biotecnológicos – Ribeirão Preto: Legis Summa, 2004]. O principal interesse em imobilizar enzimas é obter um biocatalisador com boa atividade e  
25   estabilidade, e principalmente, que não seja afetado pelo processo no qual será submetido, tornando possível a reutilização das enzimas, em processos continuamente operados e prontamente controlados, resultando em economia nos processos industriais. Entretanto, o processo de imobilização não é totalmente previsível, podendo este causar a inibição ou o aumento da atividade e/ou da estabilidade na enzima [MATEO, C.; PALOMO, J.M.;  
30   FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUISAN, J.M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. - Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques - *Enzyme and Microbial Technology*, 2007]. Do ponto de vista comercial, a imobilização enzimática

apresenta vantagens como facilidade na separação do catalisador e do produto da reação, uma vez que a enzima imobilizada não é solúvel no meio da reação. Como também redução no volume de reação, devido à enzima imobilizada no biorreator permitir alta concentração enzimática em menor volume de reator ou biorreator, obtendo uma  
5 atividade por unidade de volume superior à que seria obtida com a enzima livre [BOM, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. - Enzimas em Biotecnologia - Rio de Janeiro: Interciência, 2008].

Entretanto, a imobilização de enzimas sobre suportes (sílica, agarose, quitosana, entre outros), utilizando-se de diferentes métodos (ligação covalente, adsorção, ligação  
10 iônica, entre outros), é uma estratégia na maioria das vezes de elevado custo [MATEO, C.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; ABIAN, O.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUIBAN, J. M. - Multifunctional epoxy supports: a new tool to improve the covalent immobilization of proteins. The promotion of physical adsorptions of proteins on the supports before their covalent linkage - *Biomacromolecules*, 2000]. Por outro lado, a utilização de resíduos agrícolas ou agro-  
15 industriais como suporte de enzimas para o desenvolvimento de um biocatalisador imobilizado diminui o custo do processo tornando-o ainda mais promissor dado à integração de condições de baixo custo com a possibilidade de reutilização. Deste modo, a imobilização em suportes alternativos, como resíduos agrícolas ou agro-industriais, além de reduzir o custo do processo, possibilita a obtenção de um biocatalisador  
20 imobilizado que apresente características semelhantes em relação a enzima livre, mesmo depois de ser reutilizado.

Dentro deste contexto, cabe destacar que o Brasil é um dos maiores produtores e consumidores de milho. O cultivo deste cereal no Brasil é visto como um dos mais promissores, com grandes expectativas de aumento na produtividade e com expansão  
25 devido ao mercado externo e sua necessidade como cereal alimentar. Entre os subprodutos da indústria do milho há o sabugo (parte mais densa do milho, parte interna), sendo obtido para cada 100 kg de milho aproximadamente 18 kg de sabugo (TSAI, W. T.; CHANG, C. Y.; WANG, S. Y.; CHANG, C. F.; CHIEN, S.F.; SUN, H. F. - Preparation of activated carbons from corn cob catalyzed by potassium salts and subsequent gasification with  
30 CO<sub>2</sub> - *Bioresource Technology*, 2001).

Entretanto, no processo de seleção de um novo suporte, para uma determinada aplicação industrial, devem ser analisadas as propriedades físicas e químicas do material a ser utilizado, como também a possibilidade de degradação do suporte pela enzima [CABRERA-PADILLA, R.Y.; ALBUQUERQUE, M.; FIGUEIREDO, R.T.; FRICKS, A.T.; 5 FRANCESCHI, E.; LIMA, A.S.; A DOS SANTOS, O.A.; SILVA, D.P.; SOARES, C.M. - Immobilization and characterisation of a lipase from a new source, *Bacillus* sp. ITP-001 - *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2013]. Para selecionar um suporte, as principais características a serem observadas são: morfologia, composição, natureza (hidrofílica ou hidrofóbica), resistência mecânica e custo, dentre outras. A partir das informações 10 disponíveis sobre as características do suporte e o efeito dos métodos empregados, é possível fazer generalizações que permitam selecionar o método de imobilização, podendo ser imobilizadas no interior do suporte (encapsulação ou retenção por meio de membranas), ou imobilizadas na superfície do suporte (adsorção) [SAID, S.; PIETRO, R. C. L. - Enzimas como agentes biotecnológicos – Ribeirão Preto: Legis Summa, 2004].

15 A imobilização por adsorção ocorre quando a enzima se une ao suporte sólido através de adsorção física, interações iônicas, ligações hidrofóbicas e forças de Wan der Waals, ou ainda por combinações destas interações. Este processo é caracterizado por ser de baixo custo e simples e possuir como principal desvantagem a baixa energia de ligação entre o suporte e a enzima [DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. G, e SOLDI, V. - 20 Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros - *Química Nova*, 2004].

Dentro de um contexto de aplicação industrial de enzimas, lipases (triacilglicerol hidrolases, E.C. 3.1.1.3) são carboxilesterases definidas classicamente como enzimas que catalisam a hidrólise de triacilgliceróis, cujos ácidos graxos sejam de cadeia longa, liberando ácidos graxos e glicerol podendo ser imobilizadas em suportes orgânicos e 25 inorgânicos, tornando-as interessantes para aplicações em diferentes segmentos industriais. As lipases podem ser de origem animal (pancreática, hepática e gástrica), vegetal (*Bassica napus*) ou microbiana (bactérias e fungos), esta última sendo considerada como principal fonte em especial para casos de aplicação em escala industrial [MACEDO, G. A.; PASTORE, G. M. - Lipases microbianas na produção 30 de ésteres formadores de aroma - *Ciência e Tecnologia*, 1997; MARTINS, V. G.; KALIL, S. J.; COSTA, J. A. V. - Co-produção de lipase e biossurfactante em estado

sólido para utilização em biorremediação de óleos vegetais e hidrocarbonetos - *Química Nova*, 2008].

Na presente invenção, é constatado a utilização do sabugo de milho como suporte para a imobilização de lipases, uma vez que o processo de imobilização, além de possibilitar a reutilização do biocatalisador, melhorou a estabilidade da enzima e sua atividade, apresentando vantagens econômicas frente aos suportes convencionais. Tais características, além de atribuir valor a um subproduto, tornam o sabugo de milho uma alternativa interessante e promissora dentro de um contexto de aplicação industrial em especial em indústrias do setor de biotecnologia. Ressalta-se que a presente invenção possui um importante caráter socioeconômico, isso por favorecer o uso integral do resíduo sabugo de milho permitindo maior agregação de valor a este subproduto obtido da cadeia produtiva de grãos (resíduo agrícola) ou do seu processamento (resíduo agro-industrial).

#### **TÉCNICA RELACIONADA**

A literatura técnica especializada revela documentos de patentes que utilizam suportes convencionais e alternativos para imobilização de enzimas, bem como a utilização de sabugo de milho em diferentes processos ou bioprocessos, no entanto, nenhuma delas diz respeito à tecnologia utilizada neste documento de patente, ou seja, a obtenção de biocatalisadores imobilizados utilizando sabugo de milho como suporte e enzima lipase.

O documento de patente brasileiro PI0804590-9 refere-se à utilização de gel de alginato de sódio como suporte para imobilização da amilases extraída do malte do milho, de tal forma que se imobilize o máximo de enzima possível, com pouca ou nenhuma perda de atividade por inibição. O documento descrito anteriormente (PI0804590-9) tem ainda como objetivo um processo de hidrólise de amido utilizando-se da enzima imobilizada. O documento de patente internacional US6080402 descreve a imobilização de lipase por aprisionamento em silício como suporte. O objetivo desta invenção foi obter um biocatalisador preparado pela construção de uma matriz hidrofóbica com base em sílica por processamento sol-gel, na presença de lipases. Os documentos citados (PI0804590-9 e US6080402) diferem da presente invenção por ser voltado ao uso de alginato de sódio como suporte de imobilização para enzima amilase, ou por estar utilizando-se da enzima

lipase porém em suporte a base de sílica, diferindo-se do objeto de proteção da presente patente de invenção.

O documento de patente brasileiro PI0706083-1 refere-se a um processo de obtenção de biocatalisador imobilizado em suporte sólido preferencialmente inorgânico, de forma a suportar altas pressões e processos abrasivos. Em relação a este documento, é importante relatarmos que o escopo da presente invenção não se relaciona a um suporte inorgânico, mas somente a aplicação do resíduo de sabugo de milho como suporte.

O documento de patente brasileiro PI0306523-5 descreve a utilização de sabugo de milho como suporte para imobilização de microrganismos produtores de etanol.

Refere-se também ao processo para produção de etanol em regime de processo batelada e continua. No documento de patente citado é mencionada a aplicação pedaços de sabugo de milho, com comprimento na faixa de 5,1 a 9,9 cm e diâmetro entre 2,8 a 3,7 cm, para imobilização de microrganismos, não fazendo nenhuma referência em relação a imobilização de enzimas. Diante disso, e tendo conhecimento a respeito do escopo de proteção conferida a uma patente, ressalta-se que o documento citado anteriormente (PI0306523-5) não pode ser considerado como limitante dos critérios de novidade e atividade inventiva para a proteção que é requerida nessa patente de invenção, ou seja, a utilização do sabugo de milho como suporte na imobilização de enzima lipase para a obtenção de biocatalisadores imobilizados, visto que a utilização do sabugo de milho como suporte enzimático apresenta como vantagem além da reutilização do biocatalisador, uma melhora na estabilidade da enzima e sua atividade, apresentando vantagens econômicas frente aos suportes convencionais.

Com isso, a utilização de sabugo de milho como suporte para imobilização de enzima lipase, proposto neste documento de patente de invenção, possui o parâmetro de novidade, pois até o presente momento nenhum trabalho científico ou técnico relata a utilização deste resíduo agrícola ou agro-industrial 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**

A presente Patente de Invenção (PI) tem como objetivo fornecer as informações tecnológicas envolvidas na obtenção de biocatalisadores imobilizados a partir da

utilização de sabugo de milho, como suporte para imobilização da enzima lipase, como forma de propiciar sua reutilização em processos contínuos ou em batelada, além de melhorar sua estabilidade e atividade, apresentando vantagens econômicas frente aos suportes convencionais.

## 5 DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

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.

10 A invenção proposta neste documento de patente consiste na utilização de sabugo de milho como suporte para imobilização de lipase, resíduo constituído estruturalmente por frações lignocelulósicas como a celulose, hemicelulose e lignina.

Com o intuito de comprovar a eficiência da aplicação de sabugo de milho como suporte e imobilização de lipases, testes foram realizados com a lipase comercial Amano Lipase PS de *Burkholderia cepacia* utilizando-se a adsorção física como técnica de imobilização. Deste modo, salienta-se que no primeiro momento foi realizado a trituração do sabugo de milho para obtenção de partículas menores, analisadas por um peneirador visando seleção e controle de granulometria que, em geral, para a utilização deste tipo de suporte, devem possuir um diâmetro médio de 0,05 a 2,50 mm. Na sequência, o resíduo triturado foi lavado com água destilada para limpeza e 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 por repetidas vezes, preferencialmente por três vezes, para que se obtenha um resíduo com o mínimo de impurezas, salientando-se que pode ser utilizado outras técnicas de limpeza com a presença ou ausência de água, com ou sem a agitação. Após o procedimento de 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 da região.

30 O processo de obtenção do biocatalisador imobilizado consiste na imobilização da lipase no resíduo sabugo de milho previamente triturado, selecionado, limpo e seco, tornando-o a partir deste ponto um suporte enzimático. O procedimento de imobilização



da enzima no suporte, uma vez sendo aplicada a técnica de adsorção física, compreende o simples contato da enzima, ou da solução onde ela estiver sendo mantida, junto ao suporte preparado, no caso o sabugo de milho. Deste modo, uma massa correspondente a 0,05 a 10 g de suporte foi adicionado a 0,5 a 100 mL de hexano, preferencialmente com grau de pureza de 98,5%, na faixa de temperatura de 20-35°C, ou temperatura ambiente, sob agitação de 0,5 a 6 horas. Após este primeiro período de agitação, uma solução concentrada de enzima preparada em solução tampão de pH 6,0 a 8,0, preferencialmente tampão fosfato em pH 7,0 foi adicionado ao meio contendo o suporte sendo mantida sobre agitação por cerca de 0,5 a 6 horas, e posteriormente em condições estáticas por um intervalo de 6 a 48 horas, sobre temperatura controlada de refrigeração (preferencialmente 5°C) ou em temperatura ambiente. Após os procedimentos anteriores, houve a remoção do biocatalisador imobilizado do restante do meio por etapa de filtração utilizando-se de qualquer meio filtrante, preferencialmente papel filtro Wathaman 400, e lavagens com hexano, devendo este último procedimento ser realizado preferencialmente por três vezes em volumes de 1 a 600 mL, respectivamente.

Para verificar a efetiva imobilização da enzima no suporte, o biocatalisador imobilizado teve a sua atividade enzimática quantificada pelo método de hidrólise do azeite de oliva de acordo com o procedimento baseado na literatura específica [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]. O substrato foi preparado pela emulsão de 50 mL de azeite de oliva e 3,5 g de goma arábica dissolvida em 50 mL de água destilada (7,0% m/v). Em frascos Erlenmeyer de 250 mL foram 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 foram incubados em banho termostaticado com agitação a 50°C por 10 minutos, para a enzima imobilizada, e por 5 minutos, para a enzima livre. Decorrido o período de incubação, a reação foi paralisada para determinação da atividade lipolítica. Para isto, 0,3 g de amostra do sistema foi coletado e adicionado em 2 mL de uma mistura de acetona, etanol (99%) e água destilada (1:1:1), sendo na sequência realizado a titulação dos ácidos graxos liberados durante esta reação, com solução de KOH 0,05 N e fenolftaleína como indicador (3 gotas). Uma unidade (U) de lipase foi definida como a quantidade de enzima que

liberou 1  $\mu\text{mol}$  de ácido graxo por minuto de reação, nas condições do ensaio. As análises foram realizadas em triplicata, sendo a atividade lipolítica obtida desta análise em  $\square\text{mol/g}\cdot\text{min}$  (U).

A atividade enzimática do biocatalisador imobilizado obtido foi avaliada além dos  
5 níveis de atividade enzimática, também em função dos números de reuso. Em termos quantitativos o biocatalisador imobilizado em sabugo foi capaz de manter cerca de 100% de sua atividade nos primeiros ciclos de reuso, garantindo a reutilização da enzima por cerca de 10 vezes mantendo-se acima de 50% da sua atividade inicial, com sua total inatividade atingida somente próximo ao décimo quinto ciclo. Tais resultados  
10 demonstram a eficiência do uso do sabugo de milho como suporte para obtenção de lipase imobilizada por meio da técnica aplicada, já descrito e disponível no estado da técnica.

A descrição que se fez até aqui da aplicação do sabugo de milho na obtenção de lipase imobilizada por intermédio de adsorção física visando obter um biocatalisador imobilizado se refere a uma de suas concretizações preferidas. Entretanto, deve-se, mais  
15 uma vez ficar claro, 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.

## REINVINDICAÇÕES

- 5 1. UTILIZAÇÃO DE SABUGO DE MILHO COMO SUPORTE PARA O PROCESSO DE IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES **caracterizado por** utilizar sabugo de milho, oriundo de resíduos agrícolas ou agro-industriais e de outras procedências, como material de suporte para imobilização de lipases, visando a obtenção de um biocatalisador imobilizado, com diminuição no custo de produção e agregando valor a estes resíduos.
- 10 2. UTILIZAÇÃO DE SABUGO DE MILHO COMO SUPORTE PARA O PROCESSO DE IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES, 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.
- 15 3. UTILIZAÇÃO DE SABUGO DE MILHO COMO SUPORTE PARA O PROCESSO DE IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** utilizar preferencialmente nas condições de imobilização suporte previamente triturado e limpo por lavagens com água destilada, na proporção de 1:1 a 1:100 (gramas de resíduos por mililitros de água destilada),  
20 sendo mantido sobre rigorosa agitação por um intervalo de 30 a 240 minutos ou qualquer outro modo de limpeza com a presença ou ausência de água, com ou sem a agitação, com diâmetro médio de partícula de 0,05 a 2,50 mm, e seco em estufa em uma temperatura de 30 a 70°C, por cerca de 06 a 48 horas, podendo no entanto esta atividade ser executada em temperatura ambiente.
- 25 4. UTILIZAÇÃO DE SABUGO DE MILHO COMO SUPORTE PARA O PROCESSO DE IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** utilizar preferencialmente nas condições de imobilização, uma massa correspondente a 0,05 a 10 g de suporte adicionado a 0,5 a 100 mL de hexano, na faixa de temperatura de 20-35°C, ou temperatura ambiente, sob  
30 agitação de 0,5 a 6 horas, em solução tampão de pH 6,0 a 8,0, preferencialmente tampão fosfato em pH 7,0 e, posteriormente em tempo de contato estático entre

a enzima e o suporte de 6 a 48 horas, com posterior filtração para se obter o biocatalisador imobilizado e submetida a um processo de lavagem com hexano preferencialmente por três vezes em volumes de 1 a 600 mL.

5. UTILIZAÇÃO DE SABUGO DE MILHO COMO SUPORTE PARA O PROCESSO DE IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** utilizar para a imobilização da enzima ao suporte sabugo de milho qualquer técnica adequada.

**RESUMO****UTILIZAÇÃO DE SABUGO DE MILHO COMO SUPORTE PARA O PROCESSO DE IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE**

A presente patente de invenção diz respeito a utilização de sabugo de milho como suporte no processo de imobilização de lipase para obtenção de biocatalisadores imobilizados, como forma de propiciar sua reutilização em processos industriais contínuos ou em batelada. A invenção proposta revela a utilização de um resíduo obtido da cadeia produtiva de grãos (resíduo agrícola) ou do seu processamento (resíduo agro-industrial), o sabugo de milho, na melhoria da estabilidade da enzima lipase e de seu reuso como biocatalisador imobilizado, apresentando vantagens econômicas frente aos suportes convencionais. Tais características, além de atribuir valor a um resíduo agrícola e/ou agro-industrial, tornam o sabugo de milho uma alternativa interessante e promissora dentro de um contexto de aplicação industrial em especial em indústrias do setor de biotecnologia.

#### 4.4 – Patente 02

### PRÉ-TRATAMENTO EM SABUGO DE MILHO PARA DE IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES

#### Campo da invenção

A presente invenção refere-se a utilização de sabugo de milho pré-tratado como suporte para o processo de imobilização de lipase, visando a obtenção de biocatalisadores imobilizados, como forma de propiciar sua reutilização em processos industriais contínuos ou em batelada. A invenção proposta revela a utilização de um resíduo obtido da cadeia produtiva de grãos (resíduo agrícola) ou do seu processamento (resíduo agro-industrial), o sabugo de milho, submetidos ao processo de pré-tratamento por meio da extração de partes de sua composição lignocelulósica, visando uma melhoria da estabilidade da enzima lipase e de seu reuso como biocatalisador imobilizado, como também apresentando vantagens econômicas frente aos suportes convencionais.

Patente depositada: 20 de janeiro de 2014

Protocolo: BR102014001321-0

20/01/2014 860140006228  
12:40 NPWB  
0000221400256776

BR 10 2014 001321 0



Protocolo

Número

Código QR



**INPI** INSTITUTO  
NACIONAL  
DA PROPRIEDADE  
INDUSTRIAL

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

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

### 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 2014 001321 0  
Número da GRU principal: 00.000.2.2.14.0025677.6 (serviço 200)  
Número do protocolo: 860140006228  
Data do protocolo: 20 de Janeiro de 2014, 12:40 (BRST)  
Número de referência do envio: 17730

#### Dados do requerente ou interessado:

Tipo de formulário enviado: DIRPA-FQ001 v.005  
Referência interna: 032014  
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: 1  
Título do pedido: PRÉ-TRATAMENTO EM SABUGO DE MILHO PARA IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES

#### 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	
Patente-ITP_SuportePreTratado.pdf [DOCUMENTO.pdf]	Arquivo com conteúdo técnico-patentário da petição - Relatório descritivo em formato eletrônico PDF - Reivindicações em formato eletrônico PDF - Resumo em formato eletrônico PDF	páginas 1 a 10 páginas 11 a 12 página 13 13
Relatório descritivo.txt [RELATDESCTXT.txt]	Relatório descritivo em formato eletrônico texto	---
Reivindicações.txt [REIVINDTXT.txt]	Reivindicações em formato eletrônico texto	---
Resumo.txt [RESUMOTXT.txt]	Resumo em formato eletrônico texto	---
GRU Paga - Depósito de Pedido de Patente - 032014.pdf [GRU-1.pdf]	Guia de Recolhimento da União (GRU) paga com comprovante de pagamento em formato eletrônico PDF [Código de serviço: 200, Número: 00.000.2.2.14.0025677.6, Nome do sacado: Instituto de Tecnologia e Pesquisa]	1

#### Dados sobre o envio:

Responsável pelo envio: Leonardo Maestri Teixeira:fe54adb21d88cbce62208d68cfa7c5e  
Assinatura (Requerente, Interessado ou Procurador): LEONARDO MAESTRI TEIXEIRA:05242469633,OU=AR SERASA,OU=(EM BRANCO),OU=RFB e-CPF A3,OU=Secretaria da Receita Federal do Brasil - RFB,O=ICP-Brasil,C=BR  
Método de envio: Eletrônico pela Internet  
Código de segurança: 40:9F:AA:8E:22:8B:A1:D3:53:8C:37:C8:28:D1:62:36:F6:1A:39:8D

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

<b>DIRPA</b> <b>PATENTES</b>	Tipo de Documento: <b>Formulário Eletrônico</b>	<b>DIRPA</b>	Página: <b>1 / 3</b>
Título do Documento: <b>Depósito de Pedido de Patente</b>		Código: <b>FQ001</b>	Versão: <b>5</b>
		Procedimento: <b>Não Aplicável</b>	

**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: Av. Murilo Dantas, nº 300, Bairro Farolândia, Aracaju, Sergipe, Brasil  
1.4 CEP: 49032-490  
1.5 Telefone: +55(79)32182190  
1.6 Fax: +55(79)32182190  
1.7 E-mail: agitec@itp.org.br

**2. Natureza:**  Invenção  Modelo de Utilidade  Certificado de Adição

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

PRÉ-TRATAMENTO EM SABUGO DE MILHO PARA IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES

**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):

<b>País ou Organização do depósito</b>	<b>Número do depósito</b>	<b>Data do depósito</b>	<b>Tipo</b>
---	---	---	---

**6. Inventor (72):**

6.1 Nome: Daniel Delgado Queissada  
6.2 Qualificação: Doutor em Ciências  
6.3 CPF: 038.414.604-02  
6.4 Endereço Completo: Rua Sinésio Jacó dos Santos, 170. Centro., Simão Dias, Sergipe, Brasil  
6.5 CEP: 49000-000  
6.6 Telefone: +55(79)91415562  
6.7 Fax: ---  
6.8 E-mail: queissada@gmail.com

6.1 Nome: Denise Santos Ruzene  
6.2 Qualificação: Doutora em Biotecnologia Industrial  
6.3 CPF: 252.099.218-24  
6.4 Endereço Completo: Av. Sizino Martins Fontes n.2222 Apto 203 Bloco 3, Bairro Farolândia, Aracaju, Sergipe, Brasil  
6.5 CEP: 49032-510  
6.6 Telefone: +55(79)32321341  
6.7 Fax: ---  
6.8 E-mail: ruzeneds@hotmail.com

6.1 Nome: Daniel Pereira da Silva  
6.2 Qualificação: Doutor em Biotecnologia Industrial  
6.3 CPF: 171.101.568-77  
6.4 Endereço Completo: Av. Sizino Martins Fontes n.2222 Apto 203 Bloco 3, Bairro Farolândia, Aracaju, Sergipe, Brasil  
6.5 CEP: 49032-510  
6.6 Telefone: +55(79)32321341  
6.7 Fax: ---  
6.8 E-mail: silvadp@hotmail.com

6.1 Nome: José António Couto Teixeira  
6.2 Qualificação: Doutor  
6.3 CPF: ---  
6.4 Endereço Completo: Rua Nova de S. Crispim, 516 B, 3ºB, Porto, Porto, Portugal  
6.5 CEP: 4000363





<b>DIRPA</b> <b>GPATENTES</b>	Tipo de Documento: <b>Formulário Eletrônico</b>	<b>DIRPA</b>	Página: <b>2 / 3</b>
Título do Documento: <b>Depósito de Pedido de Patente</b>		Código: <b>FQ001</b>	Versão: <b>5</b>
		Procedimento: <b>Não Aplicável</b>	

6.6 Telefone: +351962980291  
6.7 Fax: ---  
6.8 E-mail: jateixeira@deb.uminho.pt

6.1 Nome: Erica Rodrigues de Souza  
6.2 Qualificação: Graduada em Biomedicina  
6.3 CPF: 024.232.335-90  
6.4 Endereço Completo: Av. Dr. José Thomas D'avila Nabuco -Bloco de Itabaiana AP 203, Aracaju, Sergipe, Brasil  
6.5 CEP: 49030-270  
6.6 Telefone: +55(79)32232694  
6.7 Fax: ---  
6.8 E-mail: erica\_r\_souza@hotmail.com

6.1 Nome: Raira Souza de Santana Castro  
6.2 Qualificação: Graduada em Engenharia de Petróleo  
6.3 CPF: 058.769.055-00  
6.4 Endereço Completo: Av. Dr. José Thomas D'avila Nabuco -Bloco Tobias Barreto AP 204., Aracaju, Sergipe, Brasil  
6.5 CEP: 49030-270  
6.6 Telefone: +55(79)91569818  
6.7 Fax: ---  
6.8 E-mail: raira\_s.s.castro@hotmail.com

6.1 Nome: Rebeca Yndira Cabrera Padilla  
6.2 Qualificação: Doutor em Engenharia Química  
6.3 CPF: 015.244.306-17  
6.4 Endereço Completo: Rua Professora Ofenisia Freire, 55. Apart. 203 - Bloco II. Bairro: Farolândia. , Aracaju, Sergipe, Brasil  
6.5 CEP: 49030-213  
6.6 Telefone: +55(79)91440480  
6.7 Fax: ---  
6.8 E-mail: yndiracp@gmail.com

6.1 Nome: Diego Melo Costa  
6.2 Qualificação: Mestre  
6.3 CPF: 024.232.335-90  
6.4 Endereço Completo: Rua quatro, 85 Loteamento Saramutaia Bairro Areia Branca - Zona de Expansão, Aracaju, Sergipe, Brasil  
6.5 CEP: 49007-361  
6.6 Telefone: +55(79)99583028  
6.7 Fax: ---  
6.8 E-mail: diego.dmc@gmail.com

6.1 Nome: Álvaro Silva Lima  
6.2 Qualificação: Doutor  
6.3 CPF: 609.558.135-49  
6.4 Endereço Completo: Av. Murilo Dantas 300, Farolândia, Aracaju, Sergipe, Brasil  
6.5 CEP: 49032-490  
6.6 Telefone: +55(79)32182190  
6.7 Fax: ---  
6.8 E-mail: alvaro\_lima@itp.org.br

6.1 Nome: Cleide Mara Faria Soares  
6.2 Qualificação: Doutor em Engenharia Química  
6.3 CPF: 071.228.238-65  
6.4 Endereço Completo: Rua Franklin Campos Sobral, n.1623, apto.1003-A, Grageru, Aracaju, Sergipe, Brasil  
6.5 CEP: 49000-000  
6.6 Telefone: +55(79)91322592  
6.7 Fax: ---  
6.8 E-mail: cleide.soares@pq.cnpq.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: ---



<b>DIRPA</b> <b>E-PATENTES</b>	Tipo de Documento: <b>Formulário Eletrônico</b>	<b>DIRPA</b>	Página: <b>3 / 3</b>
Título do Documento: <b>Depósito de Pedido de Patente</b>		Código: <b>FQ001</b>	Versão: <b>5</b>
		Procedimento: <b>Não Aplicável</b>	

8.10 E-mail: ---

**9. Listagem de sequências 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 sequências (arquivo em formato eletrônico TXT).  
 Declaração relativa à listagem de sequências (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.

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

- Sugestão de desenho a ser publicado com o resumo: ---  
Número de desenhos: ---  
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	10 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"/>	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: 00.000.2.2.14.0025677.6, Nome do sacado: Instituto de Tecnologia e Pesquisa]	1 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 janeiro de 2014

Data

CN=LEONARDO MAESTRI TEIXEIRA:05242469633, OU=AR SERASA, OU=(EM BRANCO), OU=RFB e-CPF A3, OU=Secretaria da Receita Federal do Brasil - RFB, O=ICP-Brasil, C=BR (Certificado por: CN=AC SERASA RFB v2, OU=Secretaria da Receita Federal do Brasil - RFB, O=ICP-Brasil, C=BR)

Assinatura (Requerente ou Procurador)

## PRÉ-TRATAMENTO EM SABUGO DE MILHO PARA IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE

### CAMPO DA INVENÇÃO

5 A presente Patente de Invenção (PI) diz respeito a utilização de etapas de pré-tratamentos em sabugo de milho, quando aplicado como suporte na imobilização enzimática de lipase, para melhora da manutenção e estabilidade da atividade enzimática do biocatalisador imobilizado.

### 10 FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

Uma das maiores limitações existentes na obtenção de produtos e intermediários de interesse comercial podem ser associadas aos tipos de catalisadores químicos empregados quando estes são necessários, uma vez que são pouco versáteis, exigem altas temperaturas para atingir razoável velocidade de reação, baixa especificidade, gerando em muitos casos produtos de composição química mista sendo necessária etapa posterior de purificação [Marchetti, J.M., Miguel, V.U., Errazu, A.F. - *Techno-economic study of different alternatives for biodiesel production - Fuel Processing Technology*, 2008]. Neste sentido, como alternativa aos catalisados químicos, e visando superar suas limitações e desvantagens, têm sido aplicado biocatalisadores enzimáticos. As enzimas atuam em condições suaves de temperatura, de pH e pressão atingindo velocidades de reação bastante superior aos catalisadores químicos convencionais, que normalmente são utilizados em condições extremas de reações [CASTRO, H. F.; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C.; AGUIAR, C. L - Modificação de óleo e gorduras por biotransformação - *Química nova*, 2004; HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A - Industrial applications of microbial lipases - *Enzyme and Microbial Technology*, 2006].

Nesse contexto, o interesse industrial por tecnologias enzimáticas vem aumentando gradativamente, sendo os processos enzimáticos aplicados em diversos setores, incluindo construção de biossensores, terapia enzimática, síntese enzimática de compostos bioativos, obtenção de novos biopolímeros, processos em indústrias tradicionais, em especial as de alimento e ração animal, além de industriais como de curtumes, papel e celulose, têxtil, cosméticos, fármacos, dentre outras aplicações [HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A - Industrial applications of microbial lipases - *Enzyme and Microbial Technology*, 2006; BOM, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. - *Enzimas em Biotecnologia* - Rio de Janeiro: Interciência, 2008].

Um exemplo de enzima com forte aplicação industrial é a lipase. As lipases (glicerol éster hidrolases, E.C.3.1.1.3) compreendem um grupo de enzimas hidrolíticas que atuam na interface orgânica – aquosa, catalisando a hidrólise de ligações éster-carboxílicas de acilgliceróis para liberar ácidos orgânicos e glicerol, podendo a reação inversa (síntese) ocorrer em ambientes com baixa concentração de água [CASTRO, H. F.; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C.; AGUIAR, C. L - Modificação de óleo e gorduras por biotransformação - *Química nova*, 2004]. As lipases são muito utilizadas em síntese orgânica devido a sua grande disponibilidade e baixo custo. Além disso, não requerem cofatores, atuam em uma faixa de pH relativamente grande, são muito estáveis nesse meio, apresentam especificidade, regioseletividade, quimiosseletividade e enantioseletividade. Possuem habilidade de catalisar reações de esterificações, interesterificações, aminólise e tiotransesterificação [DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. G, SOLDI, V. - Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. *Química. Nova*, 2004].

A principal aplicação das lipases está relacionada à sua atuação como componente funcional de misturas enzimáticas na formulação de detergentes [SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U.C. - Production, purification, characterization and applications of lipases - *Biotechnology Advances*, v. 19, 2001; HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A - Industrial applications of microbial lipases - *Enzyme and Microbial Technology*, 2006]. Embora novas aplicações vêm se estabelecendo nos mais diversos campos, tais como indústria farmacêutica, química fina, cosméticos, oleoquímica, couros, polpa de celulose e papel, tratamento de resíduos industriais e mais recentemente na produção de combustíveis.

Atualmente, a utilização de lipases para a produção de biodiesel também representa um campo de vasta aplicação para estas enzimas, As lipases vêm, deste modo, conquistando uma faixa crescente do mercado de enzimas industriais[CASTRO, H. F.; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C.; AGUIAR, C. L - Modificação de óleo e gorduras por biotransformação - *Química nova*, 2004; LU, J. K.; CHEN, Y. W.; WANG, F.; TAN, T. W. - Effect of water on methanolysis of glycerol trioleate catalyzed by immobilized lipase *Candida sp 99-125 in organic solvent system. Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, 2009].

Assim, o uso crescente desses biocatalisadores em processos industriais, desperta o interesse em encontrar alternativas para favorecer o desempenho da reação, visto que o uso de enzimas livres em reações químicas e bioquímicas acarreta em elevados custos

pela impossibilidade de reuso aliado a fatores relacionados a inativação por fatores químicos, físicos ou biológicos. Neste sentido, visando catálise mais eficiente, técnicas de imobilização em suportes tem atraído um amplo interesse industrial. Esta estratégia permite a insolubilização da enzima através de sua fixação a um suporte sólido insolúvel sendo possível, assim, reutilizá-la e manter o meio reacional com altas concentrações do catalisador. Essas vantagens tornam a tecnologia de imobilização de enzimas muito atrativa para fins industriais.

A imobilização consiste no confinamento da enzima em um suporte sólido para posterior reutilização do biocatalisador, tornando o processo menos oneroso. Para ser efetivo na imobilização, o suporte deve deixar a enzima acessível aos substratos, manter sua atividade por um longo período e permitir que o sistema (suporte/enzima) seja regenerado ao final do processo, sem que ocorram perdas na atividade enzimática [GUISAN, J. M. - Immobilization of Enzymes and Cells – Totowa: Humana Press, 2006].

As principais vantagens obtidas pelo processo de imobilização são: o aumento da estabilidade térmica do biocatalisador, aplicação em reatores com maior controle do processo, podendo ser usadas elevadas concentrações de enzimas, permitindo a sua reutilização sem perda significativa da sua atividade catalítica (López-Gallego *et al.*, 2005;). As principais desvantagens deste processo são: alteração da conformação nativa da enzima, custo do suporte e perda de atividade durante o processo de imobilização [GUISAN, J. M. - Immobilization of Enzymes and Cells – Totowa: Humana Press, 2006].

A imobilização pode ocorrer através da adsorção ou ligação da enzima em um material insolúvel, pelo uso de um reagente multifuncional através de ligações cruzadas, confinamento em matrizes formadas por géis poliméricos ou encapsulação através de uma membrana polimérica [DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. G, SOLDI, V. - Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. Química. Nova, 2004]. O procedimento de adsorção de uma proteína é muito simples, e é um dos métodos mais utilizados. A enzima é imobilizada em um suporte sólido por ligações de baixa energia, tais como interações de van der Waals ou hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e iônicas, entre outras. Vários materiais podem ser usados para este propósito e a escolha de um deles depende de suas propriedades, como força mecânica, estabilidade física e química, caráter hidrofóbico/hidrofílico, capacidade de adsorção de enzima e custo. Segundo Balcão *et al.*, 1996, vários materiais podem ser utilizados, tais como polietileno, polipropileno, celite, resina sintética, celulose, sefadex, entre outros, podendo ser

classificados de acordo com sua composição e morfologia. Conforme sua composição se classificam em: *orgânicos* (naturais e sintéticos) e *inorgânicos* (minerais e fabricados) e conforme sua morfologia como materiais porosos, não-porosos e de estrutura de gel [DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. G, SOLDI, V. - Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. Química. Nova, 2004].

O sucesso e a eficiência da adsorção de uma enzima em um suporte, que em geral é na superfície, dependem de vários parâmetros, tais como tamanho da proteína a ser adsorvida, área superficial do adsorvente e, principalmente, da porosidade e tamanho do poro [SAID, S.; PIETRO, R. C. L. - Enzimas como agentes biotecnológicos – Ribeirão Preto: Legis Summa, 2004]. Por outro lado, a utilização de resíduos agrícolas ou agro-industriais como suporte de enzimas para o desenvolvimento de um biocatalisador imobilizado diminui o custo do processo tornando-o ainda mais promissor dado a integração de condições de baixo custo com a possibilidade de reutilização.

O Brasil é um dos maiores produtores e consumidores de milho. O cultivo deste cereal no Brasil é visto como um dos mais promissores, com grandes expectativas de aumento na produtividade e com expansão devido ao mercado externo e sua necessidade como cereal alimentar.

O milho é formado por basicamente três partes: Palha, sabugo e grãos. A palha e o sabugo são os resíduos gerados após o debulhado da espiga de milho. Para cada 100kg de espigas de milho, aproximadamente 18kg são sabugos [ TSAI, W. T.; CHANG, C. Y.; WANG, S. Y.; CHANG, C. F.; CHIEN, S.F.; SUN, H. F. - Preparation of activated carbons from corn cob catalyzed by potassium salts and subsequent gasification with CO<sub>2</sub> - Bioresource Technology, 2001].

Resíduos lignocelulósicos são basicamente constituídos por hemicelulose, celulose e lignina. (do milho) A composição desses materiais é muito variável, porém é observado que o maior componente é a celulose (35-50%), a hemicelulose fica variando entre (20-35%) a lignina em torno de 10-25% ([SAHA, B. C - Hemicellulose bioconversion. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2003; 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*, 2008]. As hemicelulose estão inseridas em um grupo misto de polissacarídeos não celulósicos lineares e/ou ramificados, podendo ser constituídas de unidades de pentoses e hexoses. As hemicelulose não exercem influência efetiva sobre as propriedades estruturais do tecido. A celulose é um polímero linear

formado por moléculas de glicose. Nas celuloses naturais, as cadeias se alinham de modo a formar fibrilas organizadas de forma complexa e que apresentam regiões com estrutura cristalina e regiões com estrutura amorfa.

Evidencia-se, portanto, que materiais porosos têm grande área superficial interna disponível para a imobilização de enzimas, onde a enzima fica protegida dos efeitos de turbulência externa. Como a maior parte da área disponível para a imobilização está na estrutura interna, deve-se atentar para que o diâmetro do poro seja suficientemente grande para acomodar a enzima e permitir o acesso do substrato (Dalla-Vecchia *et al.*, 2004). Na literatura é conhecido que etapas de pré-tratamento tem por objetivo a alteração das interações nativas entre a celulose, a hemicelulose e a lignina, quebrando o elo existente entre as frações lignocelulósicas, a depender da intensidade do pré-tratamento aplicado, para extração de partes ou totalidade das respectivas frações ou simples alteração na composição estrutural da superfície do material. Deste modo, o pré-tratamento resulta na ampliação da área superficial interna das partículas do substrato, realizada através da solubilização e/ou pela degradação parcial da hemicelulose e da lignina. Isto conduz ao fracionamento dos três principais componentes levando à abertura da estrutura da celulose, de modo a favorecer a imobilização das enzimas ao suporte [RABELO, S. C.; MACIEL FILHO, R.; COSTA, A. C. L. - pretreatment of sugarcane bagasse for bioethanol production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2008; CRISTÓVÃO, R. O., TAVARES, A. P.M., BRÍGIDA, A. I., LOUREIRO, J. M., BOAVENTURA, R. A.R., MACEDO, E. A., COELHO, M. A. Z. -Immobilization of commerciallaccase onto greencoconut fiber by adsorption and its application for reactivetextiledyesdegradation - *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2011].

Neste trabalho foram utilizadas enzimas lipases para teste do novo suporte de imobilização, estas são classificadas como hidrolases (glicerol éster hidrolases E.C. 3.1.1.3), sendo capazes de catalisar reações de hidrólise e síntese em grupamentos ésteres de diversos compostos, podendo ser imobilizadas em suportes orgânicos e inorgânicos, tornando-as interessantes para aplicações em diferentes segmentos industriais [MACEDO, G. A.; PASTORE, G. M. - Lipases microbianas na produção de ésteres formadores de aroma - *Ciência e Tecnologia*, 1997; MARTINS, V. G.; KALIL, S. J.; COSTA, J. A. V. - Co-produção de lipase e biossurfactante em estado sólido para utilização em biorremediação de óleos vegetais e hidrocarbonetos - *Química Nova*, 2008].

Na presente invenção, é constatada constata que a utilização do sabugo obtido após o pré-tratamento apresentou como alternativa de imobilização, que além de possibilitar a reutilização do biocatalisador, melhorou a estabilidade da enzima e sua atividade, apresentando vantagens econômicas frente aos suportes convencionais. Tais características, além de atribuir valor a um subproduto, tornam o sabugo de milho pré-tratado como uma alternativa interessante e promissora dentro de um contexto de aplicação industrial em especial em indústrias do setor de biotecnologia. Ressalta-se que a presente invenção possui um importante caráter socioeconômico, isso por favorecer o uso integral do resíduo sabugo de milho permitindo maior agregação de valor a este subproduto obtido da cadeia produtiva de grãos (resíduo agrícola) ou do seu processamento (resíduo agro-industrial).

### **TÉCNICA RELACIONADA**

A literatura técnica especializada revela documentos de patentes que utilizam o aplicam pré-tratamentos em sabugo de milho, porém as etapas ou métodos de pré-tratamento apontam diferenças marcantes em relação a proposta deste documento que visa buscar suportes alternativos para imobilização de enzimas, bem como a utilização de sabugo de milho pré-tratado em diferentes processos ou bioprocessos, no entanto, nenhuma delas diz respeito à tecnologia utilizada neste documento de patente, ou seja, a obtenção de biocatalisadores imobilizados utilizando sabugo de milho pré-tratado como suporte e enzima lipase.

O documento de patente brasileiro PI0802559-2 descreve o processo de pré-tratamento de biomassa vegetal, reivindicando o que o produto oriundo do referido processo é substancialmente útil como insumo na produção de etanol ou outros álcoois, sendo esta biomassa obtida submetida a um processo de hidrólise enzimática utilizando uma mistura de enzimas compreendendo celulase,  $\beta$ -glicosidases, hemicelulases, ou combinações das mesmas. Diante disso, e tendo conhecimento a respeito do escopo de proteção conferida a uma patente, ressalta-se que o documento citado anteriormente (PI0802559-2) não pode ser considerado como limitante dos critérios de novidade e atividade inventiva para a proteção que é requerida nessa patente de invenção, ou seja, a utilização do sabugo de milho pré-tratado como suporte na imobilização de enzima lipase para a obtenção de biocatalisadores imobilizados.

O documento de patente internacional US8449773 descreve um processo de pré-tratamento em material orgânico, citando como exemplos talos de milho e sabugo de



milho, porém este documento de patente internacional, de acordo com as reivindicações, solicita apenas a conversão de materiais lignocelulosicos em material orgânico para biocombustíveis. O documento internacional US4806475 descreve o tratamento de matéria prima lignocelulosica, para obtenção do fracionamento e posterior utilização dos  
5 resíduos obtidos como fontes de carboidratos na alimentação de ruminantes, como matérias-primas microbianos, e como fontes de fibra dietética para os seres humanos e outros monogástricos. Deste modo, ambos os documento de patentes internacionais diferindo-se do objeto de proteção da presente patente de invenção.

O documento de patente brasileiro PI0306523-5 descreve a utilização de sabugo  
10 de milho como suporte para imobilização de microrganismos produtores de etanol. Refere-se também ao processo para produção de etanol em regime de processo batelada e continua.

O documento de patente brasileiro PI0804590-9 refere-se a utilização de alginato de sódio como suporte para imobilização do amilase extraída do malte do milho usando  
15 como método imobilização a técnica de adsorção física.

O documento de patente brasileiro PI0806416-4 refere-se ao fracionamento de qualquer material lignocelulótico, para obtenção de glicose, lignina e hemicelulose recuperada, como também um método para regenerar a celulose.

## **SUMÁRIO DA INVENÇÃO**

20 A presente Patente de Invenção (PI) tem como objetivo fornecer as informações tecnológicas envolvidas na obtenção de biocatalisadores imobilizados a partir da utilização de sabugo de milho pré-tratado, como suporte para imobilização da enzima lipase, como forma de propiciar sua reutilização em processos contínuos ou em batelada, além de melhorar sua estabilidade e atividade, apresentando vantagens econômicas frente  
25 aos suportes convencionais.

## **DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO**

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.

30 A invenção proposta neste documento de patente consiste no fracionamento do material sabugo de milho, para obtenção de um licor rico em Hemicelulose, celulose e lignina. Esta invenção determinou a caracterização da enzima imobilizada em sabugo de milho após ser submetido a um tratamento químico. Com o intuito de comprovar a eficiência da aplicação de sabugo de milho como suporte e imobilização de lipase, testes

foram realizados com a lipase comercial Amano Lipase PS de *Burkholderia cepacia* utilizando-se a adsorção física como técnica de imobilização, obtendo assim um biocatalisador imobilizado que pode ser utilizado tanto em processos contínuos como em batelada.

5 Deste modo, salienta-se que no primeiro momento foi realizado a trituração do sabugo de milho para obtenção de partículas menores, analisadas por um peneirador para seleção e controle de granulometria que em geral, para a utilização deste tipo de suporte, devem possuir um diâmetro médio um diâmetro médio de 0,05 a 2,50 mm. Na sequencia, o resíduo triturado foi lavado com água destilada para limpeza e 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 por repetidas vezes, preferencialmente por três vezes, para que se obtenha um resíduo com o mínimo de impurezas, salientando-se que pode ser utilizado outras técnicas de limpeza com a presença ou ausência de água, com ou sem a agitação. Após o procedimento de limpeza, 10 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 da região.

Para obtenção do suporte para imobilização de enzimas, o sabugo de milho foi submetido ao processo de extração alcalina para remoção de partes das hemicelulose, este 20 pre-tratamento ocorreu adicionando uma massa correspondente a 5,0 g de sabugo de milho a 100 mL de solução de NaOH (0,75mol/L), a temperatura de 55°C sob agitação por cerca de 120 minutos. Em seguida, o pH foi ajustado até 7,0 utilizando ácido acético PA. Após os procedimentos anteriores, houve a obtenção do suporte do restante do meio por etapa de filtração e lavagens com água destilada. O resíduo foi seco em estufa a 40°C, 25 por cerca de 24-48h, podendo no entanto esta atividade ser executada em temperatura ambiente ou em estufa conforme descrito.

O processo de obtenção do biocatalisador imobilizado consiste na imobilização da lipase no resíduo sabugo de milho previamente triturado, selecionado, limpo e seco, tornando-o a partir deste ponto um suporte enzimático. O procedimento de imobilização 30 da enzima no suporte compreende, uma vez sendo aplicada a técnica de adsorção física, o simples contato da enzima, ou solução onde ela estiver sendo mantida, junto ao suporte preparado, no caso o sabugo de milho. Deste modo, uma massa correspondente a 0,05 a 10 g de suporte foi adicionado a 0,5 a 100 mL de hexano, preferencialmente com grau de

pureza de 98,5%, na faixa de temperatura de 20-35°C, ou temperatura ambiente, sob agitação de 0,5 a 6 horas. Após este primeiro período de agitação, uma solução concentrada de enzima preparada em solução tampão de pH 6,0 a 8,0, preferencialmente tampão fosfato em pH 7,0 foi adicionado ao meio contendo o suporte sendo mantida sobre agitação por cerca de 0,5 a 6 horas, e posteriormente em condições estáticas por um intervalo de 6 a 48 horas, sobre temperatura controlada de refrigeração (preferencialmente 5°C) ou em temperatura ambiente. Após os procedimentos anteriores, houve a remoção do biocatalisador imobilizado do restante do meio por etapa de filtração utilizando-se de qualquer meio filtrante, preferencialmente papel filtro Wathaman 400, e lavagens com hexano, devendo este último procedimento ser realizado preferencialmente por três vezes em volumes de 1 a 600 mL, respectivamente.

Para verificar a efetiva imobilização da enzima no suporte, o biocatalisador imobilizado teve a sua atividade enzimática quantificada pelo método de hidrólise do azeite de oliva de acordo com o procedimento baseado na literatura específica [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]. O substrato foi preparado pela emulsão de 50 mL de azeite de oliva e 3,5 g de goma arábica dissolvida em 50 mL de água destilada (7,0% m/v). Em frascos Erlenmeyer de 250 mL foram 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 foram incubados em banho termostaticado com agitação a 50°C por 10 minutos, para a enzima imobilizada, e por 5 minutos, para a enzima livre. Decorrido o período de incubação, a reação foi paralisada para determinação da atividade lipolítica. Para isto, 0,3 g de amostra do sistema foi coletado e adicionado em 2 mL de uma mistura de acetona, etanol (99%) e água destilada (1:1:1), sendo na sequência realizado a titulação dos ácidos graxos liberados durante esta reação, com solução de KOH 0,05 N e fenolftaleína como indicador (3 gotas). Uma unidade (U) de lipase foi definida como a quantidade de enzima que liberou 1 µmol de ácido graxo por minuto de reação, nas condições do ensaio. As análises foram realizadas em triplicata, sendo a atividade lipolítica obtida desta análise em µmol/g.min (U).

A atividade enzimática do biocatalisador imobilizado obtido foi avaliada além dos níveis de atividade enzimática, também em função dos números de reuso. Em termos quantitativos o biocatalisador imobilizado em sabugo foi capaz de manter cerca de 100% de sua atividade nos primeiros ciclos de reuso, garantindo a reutilização da enzima por

cerca de 06 vezes mantendo cerca de 50% da sua atividade inicial, com sua total inatividade atingida no décimo quarto ciclo. Tais resultados demonstram a eficiência do uso do sabugo de milho como suporte para obtenção de lipase imobilizada por meio da técnica aplicada, já descrito e disponível no estado da técnica.

5           A descrição que se fez até aqui da aplicação do sabugo de milho na obtenção de lipase imobilizada por intermédio de adsorção física visando obter um biocatalisador imobilizado se refere a uma de suas concretizações preferidas. Entretanto, deve-se, mais uma vez ficar claro, 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, 10 de forma alguma, ser considerada como limitante da invenção, a qual está limitada ao escopo das reivindicações que seguem.

## REINVINDICAÇÕES

1. UTILIZAÇÃO DE SABUGO DE MILHO PRÉ-TRATADO COMO SUPORTE PARA O PROCESSO DE IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES **caracterizado por**  
5 utilizar sabugo de milho pré-tratado, oriundo de resíduos agroindustriais e de outras procedências, como fonte para o preparo de suporte para imobilização de lipase, visando a obtenção de um biocatalisador imobilizado, com diminuição no custo de produção e agregando valor a resíduos agroindustrial.
2. UTILIZAÇÃO DE SABUGO DE MILHO PRÉ-TRATADO COMO SUPORTE  
10 PARA O PROCESSO DE IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** utilizar preferencialmente sabugo de milho previamente triturado e limpo por lavagens com água destilada, na proporção de 1:25 (gramas de resíduos por mililitros de água destilada), sendo mantido sobre rigorosa agitação por aproximadamente 120 minutos ou qualquer outro modo de  
15 limpeza com a presença ou ausência de água, com ou sem a agitação, com tamanho médio de partícula na faixa de 32-60 mesh, e seco em estufa a 40°C, por cerca de 24-48h, podendo no entanto esta atividade ser executada em temperatura ambiente ou em estufa conforme descrito.
3. UTILIZAÇÃO DE SABUGO DE MILHO PRÉ-TRATADO COMO SUPORTE  
20 PARA O PROCESSO DE IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** utilizar preferencialmente sabugo de milho pré-tratado por meio da utilização de hidróxido de sódio, visando a obtenção de um suporte com baixo teor de hemicelulose para obtenção de um biocatalisador imobilizado.
- 25 4. UTILIZAÇÃO DE SABUGO DE MILHO PRÉ-TRATADO COMO SUPORTE PARA O PROCESSO DE IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES, 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.
- 30 5. UTILIZAÇÃO DE SABUGO DE MILHO PRÉ-TRATADO COMO SUPORTE PARA O PROCESSO DE IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** utilizar preferencialmente nas condições de imobilização, uma massa correspondente a 0,05 a 10 g de suporte adicionado a 0,5 a 100 mL de hexano, na faixa de temperatura de 20-35°C, ou temperatura

ambiente, sob agitação de 0,5 a 6 horas, em solução tampão de pH 6,0 a 8,0, preferencialmente tampão fosfato em pH 7,0 e, posteriormente em tempo de contato estático entre a enzima e o suporte de 6 a 48 horas, com posterior filtração para se obter o biocatalisador imobilizado e submetida a um processo de lavagem com hexano preferencialmente por três vezes em volumes de 1 a 600 mL.

- 5
6. UTILIZAÇÃO DE SABUGO DE MILHO PRÉ-TRATADO COMO SUPORTE PARA O PROCESSO DE IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** utilizar para a imobilização da enzima ao suporte sabugo de milho qualquer técnica adequada.

**RESUMO****UTILIZAÇÃO DE SABUGO DE MILHO PRÉ-TRATADO COMO SUPORTE PARA O PROCESSO DE IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE**

- 5 A presente invenção refere-se a utilização de sabugo de milho pré-tratado como suporte para o processo de imobilização de lipase, visando a obtenção de biocatalisadores imobilizados, como forma de propiciar sua reutilização em processos industriais contínuos ou em batelada. A invenção proposta revela a utilização de um resíduo obtido da cadeia produtiva de grãos (resíduo agrícola) ou do seu processamento (resíduo agro-
- 10 industrial), o sabugo de milho, submetidos ao processo de pré-tratamento por meio da extração de partes de sua composição lignocelulósica, visando uma melhoria da estabilidade da enzima lipase e de seu reuso como biocatalisador imobilizado, como também apresentando vantagens econômicas frente aos suportes convencionais. Tais características, além de atribuir valor a um resíduo agrícola e/ou agro-industrial, tornam
- 15 o sabugo de milho uma alternativa interessante e promissora dentro de um contexto de aplicação industrial em especial em indústrias do setor de biotecnologia.

## 4.5 – Patente 03

### IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES EM SABUGO DE MILHO TRATADO POR ORGANOSOLV

#### Campo da invenção

A presente invenção refere-se a utilização de sabugo de milho tratado como suporte para o processo de imobilização de lipase, visando a obtenção de biocatalisadores imobilizados, como forma de propiciar sua reutilização em processos industriais contínuos ou em batelada. A invenção proposta revela a utilização de um resíduo sabugo de milho submetido a um processo de tratamento por meio da extração de partes de sua composição lignocelulósica, buscando a remoção de parte da lignina presente no material, visando uma melhoria da estabilidade da enzima lipase e de seu reuso como biocatalisador imobilizado. Tais características, além de atribuir valor a um resíduo agrícola e/ou agro-industrial, tornam o sabugo de milho uma alternativa interessante e promissora dentro de um contexto de aplicação industrial em especial em indústrias do setor de biotecnologia.

Patente depositada: A ser depositada.



## SABUGO DE MILHO COM BAIXO TEOR DE LIGNINA COMO SUPORTE PARA IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE

### CAMPO DA INVENÇÃO

5 A presente Patente de Invenção (PI) diz respeito a utilização de etapas de tratamentos para remoção de partes de sua composição lignocelulósica do sabugo de milho, quando aplicado como suporte na imobilização enzimática de lipase, para melhora da manutenção e estabilidade da atividade enzimática do biocatalisador imobilizado.

### 10 FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

Na atualidade, a maior parte dos biocatalisadores existentes no Brasil e no mundo apresentam limitações existentes na obtenção de produtos e intermediários de interesse comercial. Estes ainda podem ser considerados uma alternativa aos diversos tipos de catalisadores químicos, uma vez que na maioria dos casos são pouco versáteis, exigem  
15 altas temperaturas para atingir razoável velocidade de reação, baixa especificidade, gerando em muitos casos produtos de composição química mista sendo necessária etapa posterior de purificação [Marchetti, J.M., Miguel, V.U., Errazu, A.F. - *Techno-economic study of different alternatives for biodiesel production - Fuel Processing Technology*, 2008]. Neste sentido, a busca por alternativas aos catalisadores químicos têm sido  
20 pesquisada diante da utilização de biocatalisadores enzimáticos, visando superar suas limitações e desvantagens. As enzimas atuam em condições suaves de temperatura, de pH e pressão atingindo velocidades de reação bastante superior aos catalisadores químicos convencionais, uma vez que são normalmente utilizados em condições extremas de reações [CASTRO, H. F.; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C.; AGUIAR, C. L -  
25 Modificação de óleo e gorduras por biotransformação - *Química nova*, 2004; HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A - *Industrial applications of microbial lipases - Enzyme and Microbial Technology*, 2006].

Nesse contexto, a busca das indústrias por tecnologias enzimáticas vem aumentando gradativamente, uma vez que os processos enzimáticos podem ser aplicados  
30 em diversos setores, incluindo construção de biossensores, terapia enzimática, síntese enzimática de compostos bioativos, obtenção de novos biopolímeros, processos em indústrias tradicionais, em especial as de alimento e ração animal, além de industriais como de curtumes, papel e celulose, têxtil, cosméticos, fármacos, dentre outras aplicações [HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A - *Industrial applications of microbial lipases -*

Enzyme and Microbial Technology, 2006; BOM, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. - Enzimas em Biotecnologia - Rio de Janeiro: Interciência, 2008].

As lipases (glicerol éster hidrolases, E.C.3.1.1.3) podem ser consideradas um forte exemplo de interesse industrial. Estas enzimas compreendem um grupo de enzimas hidrolíticas que atuam na interface orgânica – aquosa, catalisando a hidrólise de ligações éster- carboxílicas de acilgliceróis para liberar ácidos orgânicos e glicerol, podendo a reação inversa (síntese) ocorrer em ambientes com baixa concentração de água [CASTRO, H. F.; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C.; AGUIAR, C. L - Modificação de óleo e gorduras por biotransformação - *Química nova*, 2004]. As lipases são muito utilizadas em síntese orgânica devido à sua versatilidade catalítica, disponibilidade comercial e baixo custo. Além disso, não requerem cofatores, atuam em uma faixa de pH relativamente grande, são muito estáveis nesse meio, apresentam especificidade, regioseletividade, quimiosseletividade e enantioseletividade. As reações catalisadas por lipases incluem esterificações, transesterificações, amidação, síntese de peptídeos, entre outras. [DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. G, SOLDI, V. - Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. *Química. Nova*, 2004].

A principal aplicação das lipases está relacionada à sua atuação como componente funcional de misturas enzimáticas na formulação de detergentes [SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U.C. - Production, purification, characterization and applications of lipases - *Biotechnology Advances*, v. 19, 2001; HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A - Industrial applications of microbial lipases - *Enzyme and Microbial Technology*, 2006]. Embora novas aplicações vêm se estabelecendo nos mais diversos campos, tais como indústria farmacêutica, química fina, cosméticos, oleoquímica, couros, polpa de celulose e papel, tratamento de resíduos industriais e mais recentemente na produção de combustíveis.

Atualmente, a utilização de lipases para a produção de biodiesel também representa um campo de vasta aplicação para estas enzimas, As lipases vêm, deste modo, conquistando uma faixa crescente do mercado de enzimas industriais [CASTRO, H. F.; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C.; AGUIAR, C. L - Modificação de óleo e gorduras por biotransformação - *Química nova*, 2004; LU, J. K.; CHEN, Y. W.; WANG, F.; TAN, T. W. - Effect of water on methanolysis of glycerol trioleate catalyzed by immobilized lipase *Candida sp 99-125* in organic solvent system. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, 2009].

Assim, o uso crescente desses biocatalisadores em processos industriais, desperta o interesse em encontrar alternativas para favorecer o desempenho da reação, visto que o uso de enzimas livres em reações químicas e bioquímicas acarreta em elevados custos pela impossibilidade de reuso aliado a fatores relacionados a inativação por fatores químicos, físicos ou biológicos. Deste modo, visando resultados satisfatórios no biocatalisador imobilizado, técnicas de imobilização em suportes tem atraído um amplo interesse industrial. Um olhar mais criterioso nesta etapa do processo de imobilização permite imobilizar a enzima através de sua fixação a um suporte sólido insolúvel, a sua reutilização e manter o meio reacional com altas concentrações do catalisador. Essas vantagens tornam a tecnologia de imobilização de enzimas muito atrativa para fins industriais.

O processo de imobilização de enzimas consiste no confinamento da enzima em um suporte sólido para posterior reutilização do biocatalisador, tornando o processo menos oneroso. Para que se obtenha um biocatalisador eficiente, o suporte deve deixar a enzima acessível aos substratos, manter sua atividade por um longo período e permitir que o sistema (suporte/enzima) seja regenerado ao final do processo, sem que ocorram perdas na atividade enzimática [GUISAN, J. M. - Immobilization of Enzymes and Cells – Totowa: Humana Press, 2006].

As principais vantagens obtidas pelo processo de imobilização são: o aumento da estabilidade térmica do biocatalisador, aplicação em reatores com maior controle do processo, podendo ser usadas elevadas concentrações de enzimas, permitindo a sua reutilização sem perda significativa da sua atividade catalítica (López-Gallego *et al.*, 2005;). As principais desvantagens deste processo são: alteração da conformação nativa da enzima, custo do suporte e perda de atividade durante o processo de imobilização [GUISAN, J. M. - Immobilization of Enzymes and Cells – Totowa: Humana Press, 2006].

A enzima é imobilizada em um suporte sólido por ligações de baixa energia, tais como interações de van der Waals ou hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e iônicas, entre outras. Vários materiais podem ser usados para este propósito e a escolha de um deles depende de suas propriedades, como força mecânica, estabilidade física e química, caráter hidrofóbico/hidrofílico, capacidade de adsorção de enzima e custo. Segundo Balcão *et al.*, 1996, vários materiais podem ser utilizados, tais como polietileno, polipropileno, celite, resina sintética, celulose, sefadex, entre outros, podendo ser classificados de acordo com sua composição e morfologia. Conforme sua composição se classificam em: *orgânicos* (naturais e sintéticos) e *inorgânicos* (minerais e fabricados) e conforme sua

morfologia como materiais porosos, não-porosos e de estrutura de gel [DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. G, SOLDI, V. - Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. Química. Nova, 2004].

5 O sucesso e a eficiência da adsorção de uma enzima em um suporte, que em geral é na superfície, dependem de vários parâmetros, tais como tamanho da proteína a ser adsorvida, área superficial do adsorvente e, principalmente, da porosidade e tamanho do poro [SAID, S.; PIETRO, R. C. L. - Enzimas como agentes biotecnológicos – Ribeirão Preto: Legis Summa, 2004]. Por outro lado, a utilização de resíduos agrícolas ou agro-industriais como suporte de enzimas para o desenvolvimento de um biocatalisador  
10 imobilizado diminui o custo do processo tornando-o ainda mais promissor dado a integração de condições de baixo custo com a possibilidade de reutilização.

O Brasil é um dos maiores produtores e consumidores de milho. O cultivo deste cereal no Brasil é visto como um dos mais promissores, com grandes expectativas de aumento na produtividade e com expansão devido ao mercado externo e sua necessidade  
15 como cereal alimentar.

As previsões indicam que nos próximos anos, cerca de 86,0% da produção de milho será destinada ao mercado interno, para o atendimento do consumo humano e fabricação de rações para animais, em especial suínos e aves. O milho é formado por basicamente três partes: Palha, sabugo e grãos. A palha e o sabugo são os resíduos gerados  
20 após o debulhado da espiga de milho. Para cada 100kg de espigas de milho, aproximadamente 18kg são sabugos [ TSAI, W. T.; CHANG, C. Y.; WANG, S. Y.; CHANG, C. F.; CHIEN, S.F.; SUN, H. F. - Preparation of activated carbons from corn cob catalyzed by potassium salts and subsequent gasification with CO<sub>2</sub> - Bioresource Technology, 2001].

25 Resíduos lignocelulósicos são materiais lignocelulósicos, os quais são constituídos de fibra de celulose envolvidas por uma matriz amorfa de polioses e lignina, que age como uma barreira natural ao ataque de microrganismos e/ou enzimas, tornando estes materiais estruturalmente rígidos e poucos reativos A composição desses materiais é muito variável, porém é observado que o maior componente é a celulose (35-50%), a  
30 hemicelulose fica variando entre (20-35%) a lignina em torno de 10-25% ([SAHA, B. C - Hemicellulose bioconversion. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2003; 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*, 2008]. As hemicelulose estão

inseridas em um grupo misto de polissacarídeos não celulósicos lineares e/ou ramificados, podendo ser constituídas de unidades de pentoses e hexoses. As hemicelulose não exercem influência efetiva sobre as propriedades estruturais do tecido. A celulose é um polímero linear formado por moléculas de glicose. Nas celulosas naturais, as cadeias se alinham de modo a formar fibrilas organizadas de forma complexa e que apresentam regiões com estrutura cristalina e regiões com estrutura amorfa.

Evidencia-se, portanto, que materiais porosos têm grande área superficial interna disponível para a imobilização de enzimas, onde a enzima fica protegida dos efeitos de turbulência externa. Como a maior parte da área disponível para a imobilização está na estrutura interna, deve-se atentar para que o diâmetro do poro seja suficientemente grande para acomodar a enzima e permitir o acesso do substrato (Dalla-Vecchia *et al.*, 2004). Na literatura é conhecido que etapas de tratamento tem por objetivo a alteração das interações nativas entre a celulose, a hemicelulose e a lignina, quebrando o elo existente entre as frações lignocelulósicas, a depender da intensidade do tratamento aplicado, para extração de partes ou totalidade das respectivas frações ou simples alteração na composição estrutural da superfície do material. Deste modo, o tratamento resulta na ampliação da área superficial interna das partículas do substrato, realizada através da solubilização e/ou pela degradação parcial da hemicelulose e da lignina. Isto conduz ao fracionamento dos três principais componentes levando à abertura da estrutura da celulose, de modo a favorecer a imobilização das enzimas ao suporte [RABELO, S. C.; MACIEL FILHO, R.; COSTA, A. C. L. - pretreatment of sugarcane bagasse for bioethanol production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2008; CRISTÓVÃO, R. O., TAVARES, A. P.M., BRÍGIDA, A. I., LOUREIRO, J. M., BOAVENTURA, R. A.R., MACEDO, E. A., COELHO, M. A. Z. -Immobilization of commerciallaccase onto greencoconut fiber by adsorption and its application for reactivetextiledyesdegradation - *Journalof Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2011].

Neste trabalho foram utilizadas enzimas lipases para teste do novo suporte de imobilização, estas são classificadas como hidrolases (glicerol éster hidrolases E.C. 3.1.1.3), sendo capazes de catalisar reações de hidrólise e síntese em grupamentos ésteres de diversos compostos, podendo ser imobilizadas em suportes orgânicos e inorgânicos, tornando-as interessantes para aplicações em diferentes segmentos industriais [MACEDO, G. A.; PASTORE, G. M. - Lipases microbianas na produção de ésteres formadores de aroma - *Ciência e Tecnologia*, 1997; MARTINS, V. G.; KALIL, S. J.; COSTA, J. A. V. - Co-produção de lipase e biossurfactante em estado

sólido para utilização em biorremediação de óleos vegetais e hidrocarbonetos - *Química Nova*, 2008].

Na presente invenção, é constatada constata que a utilização do sabugo obtido após o tratamento apresentou como alternativa de imobilização, que além de possibilitar a reutilização do biocatalisador, melhorou a estabilidade da enzima e sua atividade em 5  
comparação a enzima livre, apresentando vantagens econômicas frente aos suportes convencionais. Tais características, além de atribuir valor a um subproduto, tornam o sabugo de milho tratado como uma alternativa interessante e promissora dentro de um contexto de aplicação industrial em especial em indústrias do setor de biotecnologia. 10  
Ressalta-se que a presente invenção possui um importante caráter socioeconômico, isso por favorecer o uso integral do resíduo sabugo de milho permitindo maior agregação de valor a este subproduto obtido da cadeia produtiva de grãos (resíduo agrícola) ou do seu processamento (resíduo agro-industrial).

#### 15 **TÉCNICA RELACIONADA**

A literatura técnica especializada revela documentos de patentes que utilizam o aplicam tratamentos em sabugo de milho, porém as etapas ou métodos de tratamento apontam diferenças marcantes em relação a proposta deste documento que visa buscar suportes alternativos para imobilização de enzimas, bem como a utilização de sabugo de 20  
milho tratado em diferentes processos ou bioprocessos, no entanto, nenhuma delas diz respeito à tecnologia utilizada neste documento de patente, ou seja, a obtenção de biocatalisadores imobilizados utilizando sabugo de milho tratado como suporte e enzima lipase.

O documento de patente brasileiro PI0802559-2 descreve o processo de pre- 25  
tratamento de biomassa vegetal, reivindicando o que o produto oriundo do referido processo é substancialmente útil como insumo na produção de etanol ou outros álcoois, sendo esta biomassa obtida submetida a um processo de hidrólise enzimática utilizando uma mistura de enzimas compreendendo celulase,  $\beta$ -glicosidases, hemicelulases, ou combinações das mesmas. Diante disso, e tendo conhecimento a respeito do escopo de 30  
proteção conferida a uma patente, ressalta-se que o documento citado anteriormente (PI0802559-2) não pode ser considerado como limitante dos critérios de novidade e atividade inventiva para a proteção que é requerida nessa patente de invenção, ou seja, a utilização do sabugo de milho tratado como suporte na imobilização de enzima lipase para a obtenção de biocatalisadores imobilizados.

O documento de patente internacional US8449773 descreve um processo de pré-tratamento em material orgânico, citando como exemplos talos de milho e sabugo de milho, porém este documento de patente internacional, de acordo com as reivindicações, solicita apenas a conversão de materiais lignocelulosicos em material orgânico para biocombustíveis. O documento internacional US4806475 descreve o tratamento de matéria prima lignocelulosica, para obtenção do fracionamento e posterior utilização dos resíduos obtidos como fontes de carboidratos na alimentação de ruminantes, como matérias-primas microbianos, e como fontes de fibra dietética para os seres humanos e outros monogástricos. Deste modo, ambos os documento de patentes internacionais diferindo-se do objeto de proteção da presente patente de invenção.

O documento de patente brasileiro PI0306523-5 descreve a utilização de sabugo de milho como suporte para imobilização de microrganismos produtores de etanol. Refere-se também ao processo para produção de etanol em regime de processo batelada e continua.

O documento de patente brasileiro PI0804590-9 refere-se a utilização de alginato de sódio como suporte para imobilização do amilase extraída do malte do milho usando como método imobilização a técnica de adsorção física.

O documento de patente brasileiro PI0806416-4 refere-se ao fracionamento de qualquer material lignocelulótico, para obtenção de glicose, lignina e hemicelulose recuperada, como também um método para regenerar a celulose.

## **SUMÁRIO DA INVENÇÃO**

A presente Patente de Invenção (PI) tem como objetivo fornecer as informações tecnológicas envolvidas na obtenção de biocatalisadores imobilizados a partir da utilização de sabugo de milho tratado, como suporte para imobilização da enzima lipase, como forma de propiciar sua reutilização em processos contínuos ou em batelada, além de melhorar sua estabilidade e atividade, apresentando vantagens econômicas frente aos suportes convencionais.

## **DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO**

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.

A invenção proposta neste documento de patente consiste no fracionamento do material sabugo de milho, para obtenção de um licor rico em Hemicelulose, celulose e lignina. Esta invenção determinou a caracterização da enzima imobilizada em sabugo de

milho após ser submetido a um tratamento químico. Com o intuito de comprovar a eficiência da aplicação de sabugo de milho como suporte e imobilização de lipase, testes foram realizados com a lipase comercial Amano Lipase PS de *Burkholderia cepacia* utilizando-se a adsorção física como técnica de imobilização, obtendo assim um biocatalisador imobilizado que pode ser utilizado tanto em processos contínuos como em batelada.

Deste modo, salienta-se que no primeiro momento foi realizado a trituração do sabugo de milho para obtenção de partículas menores, analisadas por um peneirador para seleção e controle de granulometria que em geral, para a utilização deste tipo de suporte, devem possuir um diâmetro médio um diâmetro médio de 0,05 a 2,50 mm. Na sequência, o resíduo triturado foi lavado com água destilada para limpeza e 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 por repetidas vezes, preferencialmente por três vezes, para que se obtenha um resíduo com o mínimo de impurezas, salientando-se que pode ser utilizado outras técnicas de limpeza com a presença ou ausência de água, com ou sem a agitação. Após o procedimento de 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 da região.

Para obtenção do suporte para imobilização de enzimas, o sabugo de milho foi submetido primeiramente a um processo de extração alcalina para remoção de partes das hemiceluloses, este tratamento ocorreu adicionando uma massa correspondente a 5,0 g de sabugo de milho a 100 mL de solução de NaOH (0,75mol/L), a temperatura de 55°C sob agitação por cerca de 120 minutos. Em seguida, o pH foi ajustado até 7,0 utilizando ácido acético PA. Em seguida o materil obtido foi submetido a um processo de organosolv, visando a remoção de partes da lignina, este tratamento ocorreu adicionando uma massa de 5,0 g de sabugo de milho a 100 mL de solução aquosa de Etanol (40%) e 1% NaOH. O reactor foi fechado e em seguida imerso num banho de óleo com aquecimento controlado a 185°C por 30 minutos. Em seguida o reator foi removido do banho de óleo e resfriado por imersão num banho de água-gelo durante 10 min.

Após os etapas anteriores, o suporte foi separado do restante do meio aquoso por etapa de filtração e lavagens com água destilada. O resíduo foi seco em estufa a 40°C, por cerca de 24-48h, podendo no entanto esta atividade ser executada em temperatura



ambiente ou em estufa conforme descrito.

O processo de obtenção do biocatalisador imobilizado consiste na imobilização da lipase no resíduo sabugo de milho previamente triturado, selecionado, limpo e seco, tornando-o a partir deste ponto um suporte enzimático. O procedimento de imobilização da enzima no suporte compreende, uma vez sendo aplicada a técnica de adsorção física, o simples contato da enzima, ou solução onde ela estiver sendo mantida, junto ao suporte preparado, no caso o sabugo de milho. Deste modo, uma massa correspondente a 0,05 a 10 g de suporte foi adicionado a 0,5 a 100 mL de hexano, preferencialmente com grau de pureza de 98,5%, na faixa de temperatura de 20-35°C, ou temperatura ambiente, sob agitação de 0,5 a 6 horas. Após este primeiro período de agitação, uma solução concentrada de enzima preparada em solução tampão de pH 6,0 a 8,0, preferencialmente tampão fosfato em pH 7,0 foi adicionado ao meio contendo o suporte sendo mantida sobre agitação por cerca de 0,5 a 6 horas, e posteriormente em condições estáticas por um intervalo de 6 a 48 horas, sobre temperatura controlada de refrigeração (preferencialmente 5°C) ou em temperatura ambiente. Após os procedimentos anteriores, houve a remoção do biocatalisador imobilizado do restante do meio por etapa de filtração utilizando-se de qualquer meio filtrante, preferencialmente papel filtro Wathaman 400, e lavagens com hexano, devendo este último procedimento ser realizado preferencialmente por três vezes em volumes de 1 a 600 mL, respectivamente.

Como o intuito de verificar o biocatalisador imobilizado, teste de atividade enzimática foram quantificada pelo método de hidrólise do azeite de oliva de acordo com o procedimento descritos na literatura específica [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]. O substrato foi preparado pela emulsão de 50 mL de azeite de oliva e 3,5 g de goma arábica dissolvida em 50 mL de água destilada (7,0% m/v). Em frascos Erlenmeyer de 250 mL foram 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 foram incubados em banho termostatzado com agitação a 50°C por 10 minutos, para a enzima imobilizada, e por 5 minutos, para a enzima livre. Decorrido o período de incubação, a reação foi paralisada para determinação da atividade lipolítica. Para isto, 0,3 g de amostra do sistema foi coletado e adicionado em 2 mL de uma mistura de acetona, etanol (99%) e água destilada (1:1:1), sendo na sequência realizado a titulação dos ácidos graxos liberados durante esta reação, com solução de KOH 0,05 N e fenolftaleína como indicador

(3 gotas). Uma unidade (U) de lipase foi definida como a quantidade de enzima que liberou 1  $\mu\text{mol}$  de ácido graxo por minuto de reação, nas condições do ensaio. As análises foram realizadas em triplicata, sendo a atividade lipolítica obtida desta análise em  $\mu\text{mol/g}\cdot\text{min}$  (U).

5           A atividade enzimática do biocatalisador imobilizado obtido foi avaliada além dos níveis de atividade enzimática, também em função dos números de reuso. Em termos quantitativos o biocatalisador imobilizado em sabugo tratado foi capaz de manter cerca de 20% de sua atividade depois de 06 vezes ciclos de uso. Tais resultados demonstram a eficiência do uso do sabugo de milho como suporte para obtenção de lipase imobilizada  
10 por meio da técnica aplicada, já descrito e disponível no estado da técnica.

          A descrição que se fez até aqui da aplicação do sabugo de milho tratado na obtenção de lípase imobilizada por intermédio de adsorção física visando obter um biocatalisador imobilizado se refere a uma de suas concretizações preferidas. Entretanto, deve-se, mais uma vez ficar claro, que a invenção não está limitada à concretização  
15 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.

## REINVINDICAÇÕES

1. SABUGO DE MILHO COM BAIXO TEOR DE LIGNINA COMO SUPORTE PARA IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE **caracterizado por** utilizar sabugo de milho tratado, oriundo de resíduos agroindustriais e de outras procedências, como fonte para o preparo de suporte para imobilização de lipase, visando a obtenção de um biocatalisador imobilizado, com diminuição no custo de produção e agregando valor a resíduos agroindustrial.
2. SABUGO DE MILHO COM BAIXO TEOR DE LIGNINA COMO SUPORTE PARA IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** utilizar preferencialmente sabugo de milho previamente triturado e limpo por lavagens com água destilada, na proporção de 1:25 (gramas de resíduos por mililitros de água destilada), sendo mantido sobre rigorosa agitação por aproximadamente 120 minutos ou qualquer outro modo de limpeza com a presença ou ausência de água, com ou sem a agitação, com tamanho médio de partícula na faixa de 32-60 mesh, e seco em estufa a 40°C, por cerca de 24-48h, podendo no entanto esta atividade ser executada em temperatura ambiente ou em estufa conforme descrito.
3. SABUGO DE MILHO COM BAIXO TEOR DE LIGNINA COMO SUPORTE PARA IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** utilizar preferencialmente sabugo de milho tratado por meio da utilização de hidróxido de sódio, e posterior tratamento por organosolv, visando a obtenção de um suporte com baixo teor de lignina para obtenção de um biocatalisador imobilizado.
4. SABUGO DE MILHO COM BAIXO TEOR DE LIGNINA COMO SUPORTE PARA IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE, 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.
5. SABUGO DE MILHO COM BAIXO TEOR DE LIGNINA COMO SUPORTE PARA IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** utilizar preferencialmente nas condições de imobilização, uma massa correspondente a 0,05 a 10 g de suporte adicionado a 0,5 a 100 mL de hexano, na faixa de temperatura de 20-35°C, ou temperatura ambiente, sob

agitação de 0,5 a 6 horas, em solução tampão de pH 6,0 a 8,0, preferencialmente tampão fosfato em pH 7,0 e, posteriormente em tempo de contato estático entre a enzima e o suporte de 6 a 48 horas, com posterior filtração para se obter o biocatalisador imobilizado e submetida a um processo de lavagem com hexano preferencialmente por três vezes em volumes de 1 a 600 mL.

5

6. SABUGO DE MILHO COM BAIXO TEOR DE LIGNINA COMO SUPORTE PARA IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** utilizar para a imobilização da enzima ao suporte sabugo de milho tratado por qualquer técnica adequada.

10

**RESUMO****SABUGO DE MILHO COM BAIXO TEOR DE LIGNINA COMO SUPORTE PARA IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE**

- 5 A presente invenção refere-se a utilização de sabugo de milho tratado como suporte para o processo de imobilização de lipase, visando a obtenção de biocatalisadores imobilizados, como forma de propiciar sua reutilização em processos industriais contínuos ou em batelada. A invenção proposta revela a utilização de um resíduo sabugo de milho submetido a um processo de tratamento por meio da extração de partes de sua
- 10 composição lignocelulósica, buscando a remoção de parte da lignina presente no material, visando uma melhoria da estabilidade da enzima lipase e de seu reuso como biocatalisador imobilizado, como também apresentando vantagens econômicas frente aos suportes convencionais. Tais características, além de atribuir valor a um resíduo agrícola e/ou agro-industrial, tornam o sabugo de milho uma alternativa interessante e promissora
- 15 dentro de um contexto de aplicação industrial em especial em indústrias do setor de biotecnologia.

## 6. CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos no decorrer deste trabalho, podemos concluir que:

- O processo de extração alcalina foi mais eficiente na remoção da hemicelulose quando comparado ao processo de auto-hidrólise, reduzindo em cerca de 50% o teor de hemiceluloses presente no sabugo de milho;
- O processo de organosolv foi eficiente na remoção da lignina, reduzindo em cerca de 70% o teor de lignina presente no sabugo de milho, porém essa remoção não favoreceu ao biocatalisador imobilizado obtido, sugerindo que o processo possa ter causado uma desorganização no suporte, dificultando o processo de imobilização como também o acesso da enzima ao substrato.
- Os experimentos de biodegradabilidade não apresentaram nenhum efeito de degradação proveniente da enzima lipase para com a estrutura do sabugo de milho, *in natura* ou tratada;
- O sabugo de milho *in natura* se apresentou como um suporte alternativo na imobilização enzimática da lipase;
- A remoção parcial das hemiceluloses do sabugo de milho, por intermédio do tratamento por extração alcalina, favoreceu os sítios de maiores forças possibilitando uma imobilização mais forte;
- A relação entre a massa da enzima e o substrato alcançou a atividade hidrolítica máxima quando usada uma relação de 0,45 (m/m) para os biocatalisadores *in natura*, pré tratado por extração alcalina ou autohidrolise, e de 0,30 (m/m) para o biocatalisador organosolv;
- Todos os biocatalisadores apresentaram tempo de meia vida superior ao da enzima livre, mostrando que são mais estáveis quando imobilizadas em suporte orgânico.
- O biocatalisador imobilizado em suporte de sabugo de milho *in natura* foi capaz de manter cerca de 100% de sua atividade até o terceiro ciclo de reuso, chegando a manter cerca de 30% de sua atividade até o décimo ciclo. O tempo de meia vida do biocatalisador foi encontrado no sétimo ciclo e a sua total inatividade foi atingida no décimo quarto ciclo.

- O biocatalisador imobilizado em suporte de sabugo de milho após tratamento com extração alcalina foi capaz de manter cerca de 50% de sua atividade até o sétimo ciclo de reuso, chegando a manter cerca de 30% de sua atividade até o décimo segundo ciclo. O rendimento da produção de ésteres etílicos apresentou conversão máxima de 92% em 40°C durante 120 horas de reacção.
- O biocatalisador imobilizado em suporte de sabugo de milho após tratamento com auto hidrólise foi capaz de manter cerca de 50% de sua atividade por dois ciclos de reuso, chegando a manter cerca de 10% de sua atividade no quinto ciclo. O rendimento da produção de ésteres etílicos apresentou conversão máxima de 78% em 40°C durante 120 horas de reacção, sendo que com 24 horas já apresentou uma conversão de 66% aproximadamente.

## 6. REFERÊNCIAS

- ABDULLA, R.; RAVINDRA, P. **Characterization of cross linked Burkholderia cepacia lipase in alginate and  $\kappa$ -carrageenan hybrid matrix.** Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers, v. 44, n. 4, p. 545-551, 7// 2013.
- ADLERCREUTZ, P. **Immobilisation and application of lipases in organic media.** Chemical Society Reviews, v. 42, n. 15, p. 6406-6436, 2013.
- AHMAD, A. L.; LOW, E. M.; SHUKOR, S. R. A. **Immobilization of phenylalanine dehydrogenase onto Eupergit CM for the synthesis of (S)-2-amino-4-phenylbutyric acid.** Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 88, n. 0, p. 26-31, 4// 2013.
- ALLEN, S. G.; KAM, L. C.; ZEMANN, A. J.; ANTAL, M. J. **Fractionation of Sugar Cane with Hot, Compressed, Liquid Water.** Industrial & Engineering Chemistry Research, v. 35, n. 8, p. 2709-2715, 1996/01/01 1996.
- 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, n. 13, p. 4851-4861, 7// 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, n. 0, p. 267-274, 3// 2012.
- ANDUALEMA, B.; GESSESSE, A. **Microbial lipases and their industrial applications: Review.** Biotechnology, v. 11, n. 3, p. 100-118, 2012.
- BALLESTEROS, L.; TEIXEIRA, J.; MUSSATTO, S. **Chemical, Functional, and Structural Properties of Spent Coffee Grounds and Coffee Silverskin.** Food and Bioprocess Technology, v. 7, n. 12, p. 3493-3503, 2014/12/01 2014.
- BALLESTEROS, M.; OLIVA, J. M.; NEGRO, M. J.; MANZANARES, P.; BALLESTEROS, I. **Ethanol from lignocellulosic materials by a simultaneous saccharification and fermentation process (SFS) with Kluyveromyces marxianus CECT 10875.** Process Biochemistry, v. 39, n. 12, p. 1843-1848, 10/29/ 2004.
- BANERJEE, S.; MUDLIAR, S.; SEN, R.; GIRI, B.; SATPUTE, D.; CHAKRABARTI, T.; PANDEY, R. A. **Commercializing lignocellulosic bioethanol: technology bottlenecks and possible remedies.** Biofuels, Bioproducts and Biorefining, v. 4, n. 1, p. 77-93, 2010.
- BARBOSA, A. D. S.; SILVA, M. A. D. O.; CARVALHO, N. B.; MATTEDI, S.; IGLESIAS, M. A.; FRICKS, A. T.; LIMA, Á. S.; FRANCESCHI, E.; SOARES, C. M. F. **Imobilização de lipase por encapsulação em sílica aerogel.** Química Nova, v. 37, p. 969-976, 2014.



BASAK, B.; BHUNIA, B.; DEY, A. **Studies on the potential use of sugarcane bagasse as carrier matrix for immobilization of *Candida tropicalis* PHB5 for phenol biodegradation.** International Biodeterioration & Biodegradation, v. 93, n. 0, p. 107-117, 9// 2014.

BATALHA, L. A. R.; HAN, Q.; JAMEEL, H.; CHANG, H.-M.; COLODETTE, J. L.; BORGES GOMES, F. J. **Production of fermentable sugars from sugarcane bagasse by enzymatic hydrolysis after autohydrolysis and mechanical refining.** Bioresource Technology, v. 180, n. 0, p. 97-105, 3// 2015.

BEZERRA, T. M. D. S.; BASSAN, J. C.; SANTOS, V. T. D. O.; FERRAZ, A.; MONTI, R. **Covalent immobilization of laccase in green coconut fiber and use in clarification of apple juice.** Process Biochemistry, n. 0, 2014.

BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. **Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado.** Interciência, ISBN 9788571931893.2008.

BONCEL, S.; ZNISZCZOŁ, A.; SZYMAŃSKA, K.; MROWIEC-BIAŁOŃ, J.; JARZĘBSKI, A.; WALCZAK, K. Z. **Alkaline lipase from *Pseudomonas fluorescens* non-covalently immobilised on pristine versus oxidised multi-wall carbon nanotubes as efficient and recyclable catalytic systems in the synthesis of Solketal esters.** Enzyme and Microbial Technology, v. 53, n. 4, p. 263-270, 9/10/ 2013.

BOONSOMBUTI, A.; LUENGNARUEMITCHAI, A.; WONGKASEMJIT, S. **Enhancement of enzymatic hydrolysis of corn cob by microwave-assisted alkali pretreatment and its effect in morphology.** Cellulose, v. 20, n. 4, p. 1957-1966, 2013/08/01 2013.

BOUSSAID, A.; ROBINSON, J.; CAI, Y.-J.; GREGG, D. J.; SADDLER, J. N. **Fermentability of the hemicellulose-derived sugars from steam-exploded softwood (douglas fir).** Biotechnology and Bioengineering, v. 64, n. 3, p. 284-289, 1999.

BRÍGIDA, A.; PINTO, D.; SILVEIRA, M.; GONÇALVES, L.; COELHO, M. **Immobilization of *Candida antarctica* lipase B on NaOCl/NaOH treated green coconut fiber by adsorption.** New Biotechnology, v. 25, Supplement, n. 0, p. S135, 9// 2009.

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, n. 4, p. 832-838, 3/17/ 2010.

BRÍGIDA, A. S.; PINHEIRO, Á. T.; FERREIRA, A. O.; PINTO, G. S.; GONÇALVES, L. B. Immobilization of *Candida antarctica* Lipase B by Covalent Attachment to Green Coconut Fiber. In: MIELENZ, J.; KLASSON, K. T., *et al* (Ed.). **Applied Biochemistry and Biotechnology:** Humana Press cap. 7, p.67-80. (ABAB Symposium). ISBN 978-1-60327-180-6, 2007.

BRODEUR, G.; YAU, E.; BADAL, K.; COLLIER, J.; RAMACHANDRAN, K. B.; RAMAKRISHNAN, S. **Chemical and Physicochemical Pretreatment of Lignocellulosic Biomass: A Review.** Enzyme Research, v. 2011, p. 17, 2011.

BURUIANA, C.-T.; VIZIREANU, C.; GARROTE, G.; PARAJÓ, J. C. **Optimization of corn stover biorefinery for coproduction of oligomers and second generation bioethanol using non-isothermal autohydrolysis.** *Industrial Crops and Products*, v. 54, n. 0, p. 32-39, 3// 2014.

CABRERA-PADILLA, R.; ALBUQUERQUE, M.; FIGUEIREDO, R.; FRICKS, A.; FRANCESCHI, E.; LIMA, Á.; A DOS SANTOS, O.; SILVA, D.; SOARES, C. F. **Immobilization and characterisation of a lipase from a new source, *Bacillus* sp. ITP-001.** *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v. 36, n. 10, p. 1385-1394, 2013/10/01 2013.

CABRERA-PADILLA, R.; LISBOA, M.; FRICKS, A.; FRANCESCHI, E.; LIMA, A.; SILVA, D.; SOARES, C. F. **Immobilization of *Candida rugosa* lipase on poly(3-hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate): a new eco-friendly support.** *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, v. 39, n. 2, p. 289-298, 2012/02/01 2012.

CAO, H.; DENG, L.; LEI, M.; WANG, F.; TAN, T. **The role of temperature and solvent microenvironment on the activity of *Yarrowia lipolytica* Lipase 2: Insights from molecular dynamics simulation.** *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 109, n. 0, p. 101-108, 11// 2014.

CARA, C.; RUIZ, E.; OLIVA, J. M.; SÁEZ, F.; CASTRO, E. **Conversion of olive tree biomass into fermentable sugars by dilute acid pretreatment and enzymatic saccharification.** *Bioresource Technology*, v. 99, n. 6, p. 1869-1876, 4// 2008.

CARDONA, C. A.; SÁNCHEZ, Ó. J. **Fuel ethanol production: Process design trends and integration opportunities.** *Bioresource Technology*, v. 98, n. 12, p. 2415-2457, 9// 2007.

CARDOSO, C. L.; MORAES, M. C. D.; CASS, Q. B. **Imobilização de enzimas em suportes cromatográficos: uma ferramenta na busca por substâncias bioativas.** *Química Nova*, v. 32, p. 175-187, 2009.

CARRASCO, F.; ROY, C. **Kinetic study of dilute-acid prehydrolysis of xylan-containing biomass.** *Wood Science and Technology*, v. 26, n. 3, p. 189-208, 1992/03/01 1992.

CARVALHO, P. D. O.; CAMPOS, P. R. B.; NOFFS, M. D. A.; OLIVEIRA, J. G. D.; SHIMIZU, M. T.; SILVA, D. M. D. **Aplicação de lipases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poliinsaturados.** *Química Nova*, v. 26, p. 75-80, 2003.

CASTRO, H. F. D.; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C. D.; AGUIAR, C. L. D. **Modificação de óleos e gorduras por biotransformação.** *Química Nova*, v. 27, p. 146-156, 2004.

CHAI, L.; LI, Q.; ZHU, Y.; ZHANG, Z.; WANG, Q.; WANG, Y.; YANG, Z. **Synthesis of thiol-functionalized spent grain as a novel adsorbent for divalent metal ions.** *Bioresource Technology*, v. 101, n. 15, p. 6269-6272, 8// 2010.

CHANG, V.; NAGWANI, M.; KIM, C.-H.; HOLTZAPPLE, M. **Oxidative lime pretreatment of high-lignin biomass**. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 94, n. 1, p. 1-28, 2001/04/01 2001.

CHATURVEDI, V.; VERMA, P. **An overview of key pretreatment processes employed for bioconversion of lignocellulosic biomass into biofuels and value added products**. 3 Biotech, v. 3, n. 5, p. 415-431, 09/05 05/27/received 08/13/accepted 2013.

CHRISTOPHER, L. P.; HEMANATHAN, K.; ZAMBARE, V. P. **Enzymatic biodiesel: Challenges and opportunities**. Applied Energy, v. 119, n. 0, p. 497-520, 4/15/ 2014.

CRISTÓVÃO, R.; SILVÉRIO, S.; TAVARES, A. M.; BRÍGIDA, A.; LOUREIRO, J.; BOAVENTURA, R. R.; MACEDO, E.; COELHO, M. **Green coconut fiber: a novel carrier for the immobilization of commercial laccase by covalent attachment for textile dyes decolourization**. World Journal of Microbiology and Biotechnology, v. 28, n. 9, p. 2827-2838, 2012/09/01 2012.

CRISTÓVÃO, R. O.; TAVARES, A. P. M.; BRÍGIDA, A. I.; LOUREIRO, J. M.; BOAVENTURA, R. A. R.; MACEDO, E. A.; COELHO, M. A. Z. **Immobilization of commercial laccase onto green coconut fiber by adsorption and its application for reactive textile dyes degradation**. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 72, n. 1-2, p. 6-12, 10// 2011.

CULLIS, I. F.; MANSFIELD, S. D. **Optimized delignification of wood-derived lignocellulosics for improved enzymatic hydrolysis**. Biotechnology and Bioengineering, v. 106, n. 6, p. 884-893, 2010.

D'SOUZA, S. F.; GODBOLE, S. S. **Immobilization of invertase on rice husk using polyethylenimine**. Journal of Biochemical and Biophysical Methods, v. 52, n. 1, p. 59-62, 6/28/ 2002.

DA SILVA, A. M.; 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, n. 7, p. 1095-1101, 7// 2012.

DA SILVA CRESPO, J.; QUEIROZ, N.; DA GRAÇA NASCIMENTO, M.; SOLDI, V. **The use of lipases immobilized on poly(ethylene oxide) for the preparation of alkyl esters**. Process Biochemistry, v. 40, n. 1, p. 401-409, 1// 2005.

DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. D. G.; SOLDI, V. **Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros**. Química Nova, v. 27, p. 623-630, 2004.

DATTA, S.; CHRISTENA, L. R.; RAJARAM, Y. **Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials**. 3 Biotech, v. 3, n. 1, p. 1-9, 2013/02/01 2013.

DAVID, A. E.; WANG, N. S.; YANG, V. C.; YANG, A. J. **Chemically surface modified gel (CSMG): An excellent enzyme-immobilization matrix for industrial processes.** Journal of Biotechnology, v. 125, n. 3, p. 395-407, 9/18/ 2006.

DE CASTRO, H. F.; DE LIMA, R.; ROBERTO, I. C. **Rice Straw as a Support for Immobilization of Microbial Lipase.** Biotechnology Progress, v. 17, n. 6, p. 1061-1064, 2001.

DE SOUZA, R. L.; DE FARIA, E. L. P.; FIGUEIREDO, R. T.; FREITAS, L. D. S.; IGLESIAS, M.; MATTEDI, S.; ZANIN, G. M.; DOS SANTOS, O. A. A.; COUTINHO, J. A. P.; LIMA, Á. S.; SOARES, C. M. F. **Protic ionic liquid as additive on lipase immobilization using silica sol-gel.** Enzyme and Microbial Technology, v. 52, n. 3, p. 141-150, 3/5/ 2013.

DEY, G.; PALIT, S.; BANERJEE, R.; MAITI, B. R. **Purification and characterization of maltooligosaccharide-forming amylase from Bacillus circulans GRS 313.** Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, v. 28, n. 4, p. 193-200, 2002/04/01 2002.

DUNLOP, A. P. **Furfural Formation and Behavior.** Industrial & Engineering Chemistry, v. 40, n. 2, p. 204-209, 1948/02/01 1948.

EGGEMAN, T.; ELANDER, R. T. **Process and economic analysis of pretreatment technologies.** Bioresource Technology, v. 96, n. 18, p. 2019-2025, 12// 2005.

EGÜÉS, I.; SANCHEZ, C.; MONDRAGON, I.; LABIDI, J. **Antioxidant activity of phenolic compounds obtained by autohydrolysis of corn residues.** Industrial Crops and Products, v. 36, n. 1, p. 164-171, 3// 2012a.

\_\_\_\_\_. **Effect of alkaline and autohydrolysis processes on the purity of obtained hemicelluloses from corn stalks.** Bioresource Technology, v. 103, n. 1, p. 239-248, 1// 2012b.

EGÜÉS, I.; STEPAN, A. M.; ECEIZA, A.; TORIZ, G.; GATENHOLM, P.; LABIDI, J. **Corn cob arabinoxylan for new materials.** Carbohydrate Polymers, v. 102, n. 0, p. 12-20, 2/15/ 2014.

EMBRAPA. **Brazilian Agricultural Research Corporation** 2013.

EMMEL, A.; MATHIAS, A. L.; WYPYCH, F.; RAMOS, L. P. **Fractionation of Eucalyptus grandis chips by dilute acid-catalysed steam explosion.** Bioresource Technology, v. 86, n. 2, p. 105-115, 1// 2003.

FAN, X.; CHENG, G.; ZHANG, H.; LI, M.; WANG, S.; YUAN, Q. **Effects of acid impregnated steam explosion process on xylose recovery and enzymatic conversion of cellulose in corn cob.** Carbohydrate Polymers, v. 114, n. 0, p. 21-26, 12/19/ 2014.

FAO. **Food and Agriculture Organization of the United Nations** 2014.

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood: chemistry, ultrastructure, reactions.** De Gruyter, ISBN 9783110839654.1983.

\_\_\_\_\_. **Wood: Chemistry, Ultrastructure, Reactions.** Walter De Gruyter Incorporated, ISBN 9780899255934.1989.

FERNANDES, T. V.; KLAASSE BOS, G. J.; ZEEMAN, G.; SANDERS, J. P. M.; VAN LIER, J. B. **Effects of thermo-chemical pre-treatment on anaerobic biodegradability and hydrolysis of lignocellulosic biomass.** *Bioresource Technology*, v. 100, n. 9, p. 2575-2579, 5// 2009.

GALBE, M.; ZACCHI, G. Pretreatment of Lignocellulosic Materials for Efficient Bioethanol Production. In: OLSSON, L. (Ed.). **Biofuels:** Springer Berlin Heidelberg, v.108 cap. 70, p.41-65. (Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology). ISBN 978-3-540-73650-9, 2007.

GARROTE, G.; DOMÍNGUEZ, H.; AMP, X.; NGUEZ, H.; PARAJÓ, J. C. **Autohydrolysis of corn cob: study of non-isothermal operation for xylooligosaccharide production.** *Journal of Food Engineering*, v. 52, n. 3, p. 211-218, 5// 2002.

GARROTE, G.; DOMÍNGUEZ, H.; PARAJÓ, J. C. **Hydrothermal processing of lignocellulosic materials.** *Holz als Roh- und Werkstoff*, v. 57, n. 3, p. 191-202, 1999/06/01 1999.

GARROTE, G.; FALQUÉ, E.; DOMÍNGUEZ, H.; PARAJÓ, J. C. **Autohydrolysis of agricultural residues: Study of reaction byproducts.** *Bioresource Technology*, v. 98, n. 10, p. 1951-1957, 7// 2007.

GÁSPÁR, M.; KÁLMÁN, G.; RÉCZEY, K. **Corn fiber as a raw material for hemicellulose and ethanol production.** *Process Biochemistry*, v. 42, n. 7, p. 1135-1139, 7// 2007.

GÍRIO, F. M.; FONSECA, C.; CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L. C.; MARQUES, S.; BOGEL-ŁUKASIK, R. **Hemicelluloses for fuel ethanol: A review.** *Bioresource Technology*, v. 101, n. 13, p. 4775-4800, 7// 2010.

GONÇALVES, F. A.; RUIZ, H. A.; NOGUEIRA, C. D. C.; SANTOS, E. S. D.; TEIXEIRA, J. A.; MACEDO, G. R. D. **Comparison of delignified coconuts waste and cactus for fuel-ethanol production by the simultaneous and semi-simultaneous saccharification and fermentation strategies.** *Fuel*, v. 131, n. 0, p. 66-76, 9/1/ 2014.

HAHN-HÄGERDAL, B.; GALBE, M.; GORWA-GRAUSLUND, M. F.; LIDÉN, G.; ZACCHI, G. **Bio-ethanol – the fuel of tomorrow from the residues of today.** *Trends in Biotechnology*, v. 24, n. 12, p. 549-556, 12// 2006.

HALIM, S. F. A.; KAMARUDDIN, A. H.; FERNANDO, W. J. N. **Continuous biosynthesis of biodiesel from waste cooking palm oil in a packed bed reactor: Optimization using response surface methodology (RSM) and mass transfer studies.** *Bioresource Technology*, v. 100, n. 2, p. 710-716, 1// 2009.

HANEFELD, U.; CAO, L.; MAGNER, E. **Enzyme immobilisation: Fundamentals and application.** *Chemical Society Reviews*, v. 42, n. 15, p. 6211-6212, 2013.

HARDING, K. G.; DENNIS, J. S.; VON BLOTTNITZ, H.; HARRISON, S. T. L. **A life-cycle comparison between inorganic and biological catalysis for the production of biodiesel.** *Journal of Cleaner Production*, v. 16, n. 13, p. 1368-1378, 9// 2008.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. **Industrial applications of microbial lipases.** *Enzyme and Microbial Technology*, v. 39, n. 2, p. 235-251, 6/26/ 2006.

HENDRIKS, A. T. W. M.; ZEEMAN, G. **Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass.** *Bioresource Technology*, v. 100, n. 1, p. 10-18, 1// 2009.

HIGUITA, M.; BERNAL, C.; MESA, M. **Interplay of carbon–silica sources on the formation of hierarchical porous composite materials for biological applications such as lipase immobilization.** *Materials Science and Engineering: C*, v. 43, n. 0, p. 199-206, 10/1/ 2014.

HOU, Q.; WANG, Y.; LIU, W.; LIU, L.; XU, N.; LI, Y. **An application study of autohydrolysis pretreatment prior to poplar chemi-thermomechanical pulping.** *Bioresource Technology*, v. 169, n. 0, p. 155-161, 10// 2014.

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, n. 3–4, p. 95-100, 7// 2011.

IZRAEL ŽIVKOVIĆ, L. T.; ŽIVKOVIĆ, L. S.; BABIĆ, B. M.; KOKUNEŠOSKI, M. J.; JOKIĆ, B. M.; KARADŽIĆ, I. M. **Immobilization of *Candida rugosa* lipase by adsorption onto biosafe meso/macroporous silica and zirconia.** *Biochemical Engineering Journal*, v. 93, n. 0, p. 73-83, 1/15/ 2015.

JAEGER, K.-E.; REETZ, M. T. **Microbial lipases form versatile tools for biotechnology.** *Trends in Biotechnology*, v. 16, n. 9, p. 396-403, 9/1/ 1998.

JIMÉNEZ, L.; PÉREZ, I.; GARCÍA, J. C.; RODRÍGUEZ, A.; FERRER, J. L. **Influence of ethanol pulping of wheat straw on the resulting paper sheets.** *Process Biochemistry*, v. 37, n. 6, p. 665-672, 1/10/ 2002.

JUNIOR, C.; MILAGRES, A.; FERRAZ, A.; CARVALHO, W. **The effects of lignin removal and drying on the porosity and enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse.** *Cellulose*, v. 20, n. 6, p. 3165-3177, 2013/12/01 2013.

KASSIM, E. A.; EL-SHAHED, A. S. **Enzymatic and Chemical hydrolysis of certain cellulosic materials.** *Agricultural Wastes*, v. 17, n. 3, p. 229-233, // 1986.

KATCHALSKI-KATZIR, E.; KRAEMER, D. M. **Eupergit® C, a carrier for immobilization of enzymes of industrial potential.** *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 10, n. 1–3, p. 157-176, 10/4/ 2000.

KIM, K. K.; SONG, H. K.; SHIN, D. H.; HWANG, K. Y.; SUH, S. W. **The crystal structure of a triacylglycerol lipase from *Pseudomonas cepacia* reveals a highly open**

**conformation in the absence of a bound inhibitor.** *Structure*, v. 5, n. 2, p. 173-185, 2/15/ 1997.

KNEZEVIC, Z.; MILOSAVIC, N.; BEZBRADICA, D.; JAKOVLJEVIC, Z.; PRODANOVIC, R. **Immobilization of lipase from *Candida rugosa* on Eupergit® C supports by covalent attachment.** *Biochemical Engineering Journal*, v. 30, n. 3, p. 269-278, 6/25/ 2006.

LASER, M.; SCHULMAN, D.; ALLEN, S. G.; LICHWA, J.; ANTAL JR, M. J.; LYND, L. R. **A comparison of liquid hot water and steam pretreatments of sugar cane bagasse for bioconversion to ethanol.** *Bioresource Technology*, v. 81, n. 1, p. 33-44, 1// 2002.

LEI, C.; ZHANG, J.; XIAO, L.; BAO, J. **An alternative feedstock of corn meal for industrial fuel ethanol production: Delignified corn cob residue.** *Bioresource Technology*, v. 167, n. 0, p. 555-559, 9// 2014.

LI, J.; HENRIKSSON, G.; GELLERSTEDT, G. **Lignin depolymerization/repolymerization and its critical role for delignification of aspen wood by steam explosion.** *Bioresource Technology*, v. 98, n. 16, p. 3061-3068, 11// 2007.

LI, Y.; DU, W.; LIU, D. **Efficient biodiesel production from phospholipids-containing oil: Synchronous catalysis with phospholipase and lipase.** *Biochemical Engineering Journal*, v. 94, n. 0, p. 45-49, 2/15/ 2015.

LI, Z.; GUO, X.; FENG, X.; LI, C. **An environment friendly and efficient process for xylitol bioconversion from enzymatic corn cob hydrolysate by adapted *Candida tropicalis*.** *Chemical Engineering Journal*, v. 263, n. 0, p. 249-256, 3/1/ 2015.

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, n. 4, p. 359-363, 7// 2009.

LIU, S. **Woody biomass: Niche position as a source of sustainable renewable chemicals and energy and kinetics of hot-water extraction/hydrolysis.** *Biotechnology Advances*, v. 28, n. 5, p. 563-582, 9// 2010.

LLOYD, T. A.; WYMAN, C. E. **Combined sugar yields for dilute sulfuric acid pretreatment of corn stover followed by enzymatic hydrolysis of the remaining solids.** *Bioresource Technology*, v. 96, n. 18, p. 1967-1977, 12// 2005.

LOZANO, P.; DE DIEGO, T.; CARRIÉ, D.; VAULTIER, M.; IBORRA, J. L. **Synthesis of glycidyl esters catalyzed by lipases in ionic liquids and supercritical carbon dioxide.** *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, v. 214, n. 1, p. 113-119, 5/18/ 2004.

MACRAE, A. R. **Lipase-catalyzed interesterification of oils and fats.** *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 60, n. 2, p. 291-294, 1983/02/01 1983.

MARCHETTI, J. M.; MIGUEL, V. U.; ERRAZU, A. F. **Possible methods for biodiesel production.** *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 11, n. 6, p. 1300-1311, 8// 2007.

MATEO, C.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; ABIAN, O.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GUISÁN, J. M. **Multifunctional Epoxy Supports: A New Tool To Improve the Covalent Immobilization of Proteins. The Promotion of Physical Adsorptions of Proteins on the Supports before Their Covalent Linkage.** *Biomacromolecules*, v. 1, n. 4, p. 739-745, 2000/12/01 2000.

MATEO, C.; PALOMO, J. M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUISAN, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. **Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques.** *Enzyme and Microbial Technology*, v. 40, n. 6, p. 1451-1463, 5/2/ 2007.

MATSUMOTO, M.; OHASHI, K. **Effect of immobilization on thermostability of lipase from *Candida rugosa*.** *Biochemical Engineering Journal*, v. 14, n. 1, p. 75-77, 4// 2003.

MENDES, A. A.; OLIVEIRA, P. C. D.; CASTRO, H. F. D.; GIORDANO, R. D. L. C. **Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial.** *Química Nova*, v. 34, p. 831-840, 2011.

MIHAILOVIĆ, M.; STOJANOVIĆ, M.; BANJANAC, K.; CAREVIĆ, M.; PRLAINOVIĆ, N.; MILOSAVIĆ, N.; BEZBRADICA, D. **Immobilization of lipase on epoxy-activated Purolite® A109 and its post-immobilization stabilization.** *Process Biochemistry*, v. 49, n. 4, p. 637-646, 4// 2014.

MONTE, J. R.; BRIENZO, M.; MILAGRES, A. M. F. **Utilization of pineapple stem juice to enhance enzyme-hydrolytic efficiency for sugarcane bagasse after an optimized pre-treatment with alkaline peroxide.** *Applied Energy*, v. 88, n. 1, p. 403-408, 1// 2011.

MOSIER, N.; HENDRICKSON, R.; HO, N.; SEDLAK, M.; LADISCH, M. R. **Optimization of pH controlled liquid hot water pretreatment of corn stover.** *Bioresource Technology*, v. 96, n. 18, p. 1986-1993, 12// 2005.

MOSIER, N.; WYMAN, C.; DALE, B.; ELANDER, R.; LEE, Y. Y.; HOLTZAPPLE, M.; LADISCH, M. **Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass.** *Bioresource Technology*, v. 96, n. 6, p. 673-686, 4// 2005.

NAKANISHI, K.; SAKIYAMA, T.; IMAMURA, K. **On the adsorption of proteins on solid surfaces, a common but very complicated phenomenon.** *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 91, n. 3, p. 233-244, // 2001.

OGEDA, T. L.; PETRI, D. F. S. **Hidrólise Enzimática de Biomassa.** *Química Nova*, v. 33, p. 1549-1558, 2010.

OLESKOWICZ-POPIEL, P.; LISIECKI, P.; HOLM-NIELSEN, J. B.; THOMSEN, A. B.; THOMSEN, M. H. **Ethanol production from maize silage as lignocellulosic**



**biomass in anaerobically digested and wet-oxidized manure.** Bioresource Technology, v. 99, n. 13, p. 5327-5334, 9// 2008.

OLIVEIRA, M. V. S.; RÓS, P. C. M. D.; MATTEDI, S.; CASTRO, H. F.; SOARES, C. M. F.; LIMA, Á. S. **Transesterification of babassu oil catalyzed by Burkholderia cepacia encapsulated in sol-gel matrix employing protic ionic liquid as an additive.** Acta Scientiarum, v. 36, p. 445-451, 2014.

OMAY, D. **Immobilization of lipase onto a photo-crosslinked polymer network: Characterization and polymerization applications.** Biocatalysis and Biotransformation, v. 32, n. 2, p. 132-140, 2014.

PACE, V.; SINISTERRA, J. V.; ALCÁNTARA, A. R. **Celite-supported reagents in organic synthesis: An overview.** Current Organic Chemistry, v. 14, n. 20, p. 2384-2408, 2010.

PAQUES, F. W.; MACEDO, G. A. **Lipases de látex vegetais: propriedades e aplicações industriais.** Química Nova, v. 29, p. 93-99, 2006.

PARAJÓ, J. C.; GARROTE, G.; CRUZ, J. M.; DOMINGUEZ, H. **Production of xylooligosaccharides by autohydrolysis of lignocellulosic materials.** Trends in Food Science & Technology, v. 15, n. 3-4, p. 115-120, 3// 2004.

PARK, Y.-M.; LEE, D.-W.; KIM, D.-K.; LEE, J.-S.; LEE, K.-Y. **The heterogeneous catalyst system for the continuous conversion of free fatty acids in used vegetable oils for the production of biodiesel.** Catalysis Today, v. 131, n. 1-4, p. 238-243, 2/29/ 2008.

PEREIRA, A. C.; KUBOTA, L. T. **Otimização da preparação de eletrodo de pasta de carbono contendo riboflavina imobilizada em suporte inorgânico.** Química Nova, v. 27, p. 725-729, 2004.

PEREIRA FILHO, J. M.; VIEIRA, E. D. L.; SILVA, A. M. D. A.; CEZAR, M. F.; AMORIM, F. U. **Efeito do tratamento com hidróxido de sódio sobre a fração fibrosa, digestibilidade e tanino do feno de jurema-preta (Mimosa tenuiflora. Wild).** Revista Brasileira de Zootecnia, v. 32, p. 70-76, 2003.

PETRI, A.; GAMBICORTI, T.; SALVADORI, P. **Covalent immobilization of chloroperoxidase on silica gel and properties of the immobilized biocatalyst.** Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 27, n. 2-3, p. 103-106, 2/2/ 2004.

POPPE, J. K.; COSTA, A. P. O.; BRASIL, M. C.; RODRIGUES, R. C.; AYUB, M. A. Z. **Multipoint covalent immobilization of lipases on aldehyde-activated support: Characterization and application in transesterification reaction.** Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 94, n. 0, p. 57-62, 10// 2013.

POSPISKOVA, K.; SAFARIK, I. **Magnetically modified spent grain as a low-cost, biocompatible and smart carrier for enzyme immobilisation.** Journal of the Science of Food and Agriculture, v. 93, n. 7, p. 1598-1602, 2013.

PRASAD, S.; SINGH, A.; JOSHI, H. C. **Ethanol as an alternative fuel from agricultural, industrial and urban residues**. Resources, Conservation and Recycling, v. 50, n. 1, p. 1-39, 3// 2007.

PROZIL, S. O.; COSTA, E. V.; EVTUGUIN, D. V.; CRUZ LOPES, L. P.; DOMINGUES, M. R. M. **Structural characterization of polysaccharides isolated from grape stalks of Vitis vinifera L.** Carbohydrate Research, v. 356, n. 0, p. 252-259, 7/15/ 2012.

QIN, W.; PENG, C.; LV, M.; WU, J. **Preparation and properties of high-purity porous alumina support at low sintering temperature**. Ceramics International, v. 40, n. 8, Part B, p. 13741-13746, 9// 2014.

RANGANATHAN, S. V.; NARASIMHAN, S. L.; MUTHUKUMAR, K. **An overview of enzymatic production of biodiesel**. Bioresource Technology, v. 99, n. 10, p. 3975-3981, 7// 2008.

REDDY, N.; YANG, Y. **Biofibers from agricultural byproducts for industrial applications**. Trends in Biotechnology, v. 23, n. 1, p. 22-27, 1// 2005.

REIS, P.; HOLMBERG, K.; WATZKE, H.; LESER, M. E.; MILLER, R. **Lipases at interfaces: A review**. Advances in Colloid and Interface Science, v. 147-148, n. 0, p. 237-250, 3// 2009.

RHIM, Y.-R.; ZHANG, D.; ROONEY, M.; NAGLE, D. C.; FAIRBROTHER, D. H.; HERMAN, C.; DREWRY III, D. G. **Changes in the thermophysical properties of microcrystalline cellulose as function of carbonization temperature**. Carbon, v. 48, n. 1, p. 31-40, 1// 2010.

ROBLES-MEDINA, A.; GONZÁLEZ-MORENO, P. A.; ESTEBAN-CERDÁN, L.; MOLINA-GRIMA, E. **Biocatalysis: Towards ever greener biodiesel production**. Biotechnology Advances, v. 27, n. 4, p. 398-408, 7// 2009.

ROUT, J.; TRIPATHY, S. S.; NAYAK, S. K.; MISRA, M.; MOHANTY, A. K. **Scanning electron microscopy study of chemically modified coir fibers**. Journal of Applied Polymer Science, v. 79, n. 7, p. 1169-1177, 2001.

RUIZ, E.; CARA, C.; BALLESTEROS, M.; MANZANARES, P.; BALLESTEROS, I.; CASTRO, E. **Ethanol production from pretreated olive tree wood and sunflower stalks by an SSF process**. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 130, n. 1-3, p. 631-643, 2006/03/01 2006.

RUIZ, H.; RUZENE, D.; SILVA, D.; DA SILVA, F. M.; VICENTE, A.; TEIXEIRA, J. **Development and Characterization of an Environmentally Friendly Process Sequence (Autohydrolysis and Organosolv) for Wheat Straw Delignification**. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 164, n. 5, p. 629-641, 2011/07/01 2011.

RUIZ, H. A.; RUZENE, D. S.; SILVA, D. P.; DA SILVA, F. F.; VICENTE, A. A.; TEIXEIRA, J. A. **Development and characterization of an environmentally friendly**

**process sequence (autohydrolysis and organosolv) for wheat straw delignification.** Appl Biochem Biotechnol, v. 164, n. 5, p. 629-41, Jul 2011.

RUIZ, H. A.; RUZENE, D. S.; SILVA, D. P.; QUINTAS, M. A. C.; 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 & Biotechnology, v. 86, n. 1, p. 88-94, 2011.

SAHA, B. **Hemicellulose bioconversion.** Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, v. 30, n. 5, p. 279-291, 2003/05/01 2003.

SAHA, B. C.; COTTA, M. A. **Ethanol Production from Alkaline Peroxide Pretreated Enzymatically Saccharified Wheat Straw.** Biotechnology Progress, v. 22, n. 2, p. 449-453, 2006.

SALIHU, A.; ALAM, M. Z.; ABDULKARIM, M. I.; SALLEH, H. M. **Esterification for butyl butyrate formation using Candida cylindracea lipase produced from palm oil mill effluent supplemented medium.** Arabian Journal of Chemistry, v. 7, n. 6, p. 1159-1165, 12// 2014.

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, n. 4, p. 542-548, 6// 2008.

SATAR, R.; HUSAIN, Q. **Adsorption of peroxidase on Celite 545 directly from ammonium sulfate fractionated white radish (Raphanus sativus) proteins.** Biotechnology Journal, v. 4, n. 3, p. 408-416, 2009.

SCHRAG, J. D.; LI, Y.; CYGLER, M.; LANG, D.; BURGDORF, T.; HECHT, H.-J.; SCHMID, R.; SCHOMBURG, D.; RYDEL, T. J.; OLIVER, J. D.; STRICKLAND, L. C.; DUNAWAY, C. M.; LARSON, S. B.; DAY, J.; MCPHERSON, A. **The open conformation of a Pseudomonas lipase.** Structure, v. 5, n. 2, p. 187-202, 2/15/ 1997.

SEBRÃO, D.; SILVA, V. D.; NASCIMENTO, M. D. G.; MOREIRA, M. A. **Imobilização de lipases em filme de caseinato de sódio/glicerol: aplicação na síntese de ésteres.** Química Nova, v. 30, p. 1182-1187, 2007.

SHATALOV, A. A.; PEREIRA, H. **Arundo donax L. reed: new perspectives for pulping and bleaching. Part 4. Peroxide bleaching of organosolv pulps.** Bioresource Technology, v. 96, n. 8, p. 865-872, 5// 2005.

SHATALOV, A. A.; PEREIRA, H. **Kinetics of polysaccharide degradation during ethanol-alkali delignification of giant reed—Part 1. Cellulose and xylan.** Carbohydrate Polymers, v. 59, n. 4, p. 435-442, 3/15/ 2005.

SILVA, G. A. M.; DA RÓS, P. C. M.; SOUZA, L. T. A.; COSTA, A. P. O.; CASTRO, H. F. D. **Physico-chemical, spectroscopical and thermal characterization of biodiesel obtained by enzymatic route as a tool to select the most efficient immobilized lipase.** Brazilian Journal of Chemical Engineering, v. 29, p. 39-47, 2012.

SILVERSTEIN, R. A.; CHEN, Y.; SHARMA-SHIVAPPA, R. R.; BOYETTE, M. D.; OSBORNE, J. **A comparison of chemical pretreatment methods for improving saccharification of cotton stalks.** *Bioresource Technology*, v. 98, n. 16, p. 3000-3011, 11// 2007.

SIMÕES, A. S.; MORI, R. Y.; FARIA, R.; CASTRO, H. F. D.; MENDES, A. A. **Desempenho da matriz híbrida SiO<sub>2</sub>-quitosana na imobilização da lipase microbiana de *Candida rugosa*.** *Química Nova*, v. 34, p. 33-38, 2011.

SOARES, C. F.; DE CASTRO, H.; DE MORAES, F.; ZANIN, G. **Characterization and utilization of *Candida rugosa* lipase immobilized on controlled pore silica.** *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 79, n. 1-3, p. 745-757, 1999/03/01 1999.

SOARES, C. M. F.; DOS SANTOS, O. A. A.; DE CASTRO, H. F.; ITAKO, J. E.; DE MORAES, F. F.; ZANIN, G. M. **NMR characterization of the role of silane precursors on the catalytic activity of sol-gel encapsulated lipase.** *Journal of Non-Crystalline Solids*, v. 352, n. 32-35, p. 3469-3477, 9/15/ 2006.

SUN, J. X.; SUN, X. F.; SUN, R. C.; SU, Y. Q. **Fractional extraction and structural characterization of sugarcane bagasse hemicelluloses.** *Carbohydrate Polymers*, v. 56, n. 2, p. 195-204, 6/4/ 2004.

TSAI, M.-C.; TSAI, Y.-C. **Adsorption of glucose oxidase at platinum-multiwalled carbon nanotube-alumina-coated silica nanocomposite for amperometric glucose biosensor.** *Sensors and Actuators B: Chemical*, v. 141, n. 2, p. 592-598, 9/7/ 2009.

TSAI, W. T.; CHANG, C. Y.; WANG, S. Y.; CHANG, C. F.; CHIEN, S. F.; SUN, H. F. **Preparation of activated carbons from corn cob catalyzed by potassium salts and subsequent gasification with CO<sub>2</sub>.** *Bioresource Technology*, v. 78, n. 2, p. 203-208, 6// 2001.

VALLEJOS, M. E.; ZAMBON, M. D.; AREA, M. C.; CURVELO, A. A. D. S. **Low liquid-solid ratio fractionation of sugarcane bagasse by hot water autohydrolysis and organosolv delignification.** *Industrial Crops and Products*, n. 0, 2014.

VAN WALSUM, G. P.; ALLEN, S.; SPENCER, M.; LASER, M.; ANTAL, M.; LYND, L. **Conversion of lignocellulosics pretreated with liquid hot water to ethanol.** *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 57-58, n. 1, p. 157-170, 1996/03/01 1996.

VARGA, E.; KLINKE, H. B.; RÉCZEY, K.; THOMSEN, A. B. **High solid simultaneous saccharification and fermentation of wet oxidized corn stover to ethanol.** *Biotechnology and Bioengineering*, v. 88, n. 5, p. 567-574, 2004.

VÁZQUEZ, G.; ANTORRENA, G.; GONZÁLEZ, J. **Kinetics of acid-catalysed delignification of *Eucalyptus globulus* wood by acetic acid.** *Wood Science and Technology*, v. 29, n. 4, p. 267-275, 1995/06/01 1995.

WU, S.-C.; LIA, Y.-K. **Application of bacterial cellulose pellets in enzyme immobilization.** *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 54, n. 3-4, p. 103-108, 8// 2008.

WYMAN, C. **Handbook on Bioethanol: Production and Utilization.** Taylor & Francis, ISBN 9781560325536.1996.

XU, F.; SUN, J. X.; LIU, C. F.; SUN, R. C. **Comparative study of alkali- and acidic organic solvent-soluble hemicellulosic polysaccharides from sugarcane bagasse.** Carbohydrate Research, v. 341, n. 2, p. 253-261, 2/6/ 2006.

YANG, B.; WYMAN, C. E. **Effect of xylan and lignin removal by batch and flowthrough pretreatment on the enzymatic digestibility of corn stover cellulose.** Biotechnology and Bioengineering, v. 86, n. 1, p. 88-98, 2004.

YILMAZ, E.; SEZGIN, M. **Enhancement of the Activity and Enantioselectivity of Lipase by Sol-Gel Encapsulation Immobilization onto  $\beta$ -cyclodextrin-Based Polymer.** Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 166, n. 8, p. 1927-1940, 2012/04/01 2012.

ZANIN, G.; MORAES, F. D.; SAIAD, S.; PIETRO, R. **Em Enzimas como Agentes Biotecnológicos.** Em Enzimas como Agentes Biotecnológicos, 2004.

ZHANG, J.; LIU, W.; HOU, Q.; CHEN, J.; XU, N.; JI, F. **Effects of different pre-extractions combining with chemi-thermomechanical treatments on the enzymatic hydrolysis of wheat straw.** Bioresource Technology, v. 175, n. 0, p. 75-81, 1// 2015.

ZHANG, Y. H. P. **Reviving the carbohydrate economy via multi-product lignocellulose biorefineries.** Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, v. 35, n. 5, p. 367-375, 2008/05/01 2008.

ZIEGLER-BOROWSKA, M.; SIÓDMIĄK, T.; CHEŁMINIAK, D.; CYGANIUK, A.; MARSZAŁŁ, M. P. **Magnetic nanoparticles with surfaces modified with chitosan-poly[N-benzyl-2-(methacryloxy)-N,N-dimethylethanaminium bromide] for lipase immobilization.** Applied Surface Science, v. 288, n. 0, p. 641-648, 1/1/ 2014.

ZUBIOLO, C.; SANTOS, R.; CARVALHO, N.; SOARES, C.; LIMA, A.; DE AQUINO SANTANA, L. **Encapsulation in a sol-gel matrix of lipase from *Aspergillus niger* obtained by bioconversion of a novel agricultural residue.** Bioprocess and Biosystems Engineering, v. 37, n. 9, p. 1781-1788, 2014/09/01 2014.