

Avanços Científicos e Tecnológicos em Bioprocessos

Alberdan Silva Santos
(Organizador)



Atena
Editora

Ano 2018

Alberdan Silva Santos
(Organizador)

Avanços Científicos e Tecnológicos em Bioprocessos

Atena Editora
2018

2018 by Atena Editora

Copyright © da Atena Editora

Editora Chefe: Profª Drª Antonella Carvalho de Oliveira

Diagramação e Edição de Arte: Geraldo Alves e Natália Sandrini

Revisão: Os autores

Conselho Editorial

Prof. Dr. Alan Mario Zuffo – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Prof. Dr. Álvaro Augusto de Borba Barreto – Universidade Federal de Pelotas
Prof. Dr. Antonio Carlos Frasson – Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Prof. Dr. Antonio Isidro-Filho – Universidade de Brasília
Profª Drª Cristina Gaio – Universidade de Lisboa
Prof. Dr. Constantino Ribeiro de Oliveira Junior – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Profª Drª Daiane Garabeli Trojan – Universidade Norte do Paraná
Profª Drª Deusilene Souza Vieira Dall’Acqua – Universidade Federal de Rondônia
Prof. Dr. Eloi Rufato Junior – Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Prof. Dr. Fábio Steiner – Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul
Prof. Dr. Gianfábio Pimentel Franco – Universidade Federal de Santa Maria
Prof. Dr. Gilmei Fleck – Universidade Estadual do Oeste do Paraná
Profª Drª Girlene Santos de Souza – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
Profª Drª Ivone Goulart Lopes – Istituto Internazionale delle Figlie de Maria Ausiliatrice
Prof. Dr. Julio Candido de Meirelles Junior – Universidade Federal Fluminense
Prof. Dr. Jorge González Aguilera – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Profª Drª Lina Maria Gonçalves – Universidade Federal do Tocantins
Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte
Profª Drª Paola Andressa Scortegagna – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Profª Drª Raissa Rachel Salustriano da Silva Matos – Universidade Federal do Maranhão
Prof. Dr. Ronilson Freitas de Souza – Universidade do Estado do Pará
Prof. Dr. Takeshy Tachizawa – Faculdade de Campo Limpo Paulista
Prof. Dr. Urandi João Rodrigues Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará
Prof. Dr. Valdemar Antonio Paffaro Junior – Universidade Federal de Alfenas
Profª Drª Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande
Prof. Dr. Willian Douglas Guilherme – Universidade Federal do Tocantins

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) (eDOC BRASIL, Belo Horizonte/MG)

A946 Avanços científicos e tecnológicos em bioprocessos [recurso eletrônico] / Organizador Alberdan Silva Santos. – Ponta Grossa (PR): Atena Editora, 2018.

Formato: PDF

Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader

Modo de acesso: World Wide Web

Inclui bibliografia

ISBN 978-85-85107-47-5

DOI 10.22533/at.ed.475180110

1. Bioprocessos. 2. Bioquímica. 3. Biotecnologia. I. Santos, Alberdan Silva.

CDD 553.7

Elaborado por Maurício Amormino Júnior – CRB6/2422

O conteúdo do livro e seus dados em sua forma, correção e confiabilidade são de responsabilidade exclusiva dos autores.

2018

Permitido o download da obra e o compartilhamento desde que sejam atribuídos créditos aos autores, mas sem a possibilidade de alterá-la de nenhuma forma ou utilizá-la para fins comerciais.

www.atenaeditora.com.br

APRESENTAÇÃO

Avanços Científicos e Tecnológicos em Bioprocessos é uma obra que reúne vinte e três capítulos com temas em pesquisas científicas realizadas no campo da biotecnologia, e que envolve agentes biológicos e bioquímicos na geração de produtos ou processos. Nesta obra se concentram diversos avanços descritos nas metodologias e nos resultados, distribuídos em quatro tópicos principais, envolvendo: processos químicos e biotecnológicos no aproveitamento de resíduos; produção de metabólitos e enzimas; métodos analíticos e de simulação; e biotratamentos envolvidos na geração de energias. Esta obra foi escrita por jovens pesquisadores brasileiros que estão desenvolvendo suas teses e/ou dissertações em instituições nacionais. Por este motivo, os aspectos inovadores e o alcance dos resultados apresentados podem ser um grande estímulo para aqueles que visam conhecer com maior amplitude alguns dos aspectos biotecnológicos estudados em algumas das instituições de nosso país.

Alberdan Silva Santos

SUMÁRIO

EIXO 1: PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS APLICADOS NA PRODUÇÃO DE ENZIMAS E PROTEÍNAS

CAPÍTULO 1 1

AMYLASES IN PROTEIN SECRETOME PROFILE FROM *Aspergillus sp* WITH POTENTIAL TO DECONSTRUCT INTEGRAL STARCH

Patrícia Suelene Silva Costa Gobira
Rubens Menezes Gobira
Ricardo Felipe Alexandre de Mello
Hellen Kempfer Phillippsen
Nelson Rosa Ferreira
Alberdan Silva Santos

CAPÍTULO 2 7

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE FRUTOSILTRANSFERASE EXTRACELULAR MICROBIANA PARA A SÍNTESE DE FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS EM ESCALA LABORATORIAL

Rafael Firmani Perna
Josivan de Sousa Cunha
Sergio Andres Villalba Morales
Michelle da Cunha Abreu Xavier
Cristiane Angelica Ottoni
Elda Sabino da Silva
Alfredo Eduardo Maiorano

CAPÍTULO 3 23

ENZYMATIC COCKTAIL PRODUCED BY *Fusarium sp* WITH POTENTIAL TO DECONSTRUCT CRUDE CASSAVA STARCH (*Manihot esculenta Crantz*).

Patrícia Suelene Silva Costa Gobira
Elaine Cristina Souza Medeiros
Rubens Menezes Gobira
Ricardo Felipe Alexandre de Mello
Alberdan Silva Santos

CAPÍTULO 4 28

THE SYSTEMATIC INVESTIGATION OF L-ASPARAGINASE PRODUCED BY FILAMENTOUS FUNGI

Eliane Silva e Silva
Alberdan Silva Santos
Márcia Gleice da Silva Souza
Rubens Menezes Gobira
Maria Inez de Moura Sarquis

CAPÍTULO 5 33

EVALUATION OF METHYLOCYSTIS HIRSUTA GROWTH ON SUPPLEMENTED MINERAL MEDIA USING METHANE AS CARBON SOURCE

Rodrigo Pimentel Fernandes
Ana Cristina Pantoja Simões
Manuela Temtemples de Carvalho
Camila Ruiz Lopes
Nei Pereira Jr

CAPÍTULO 6 37

BIOTECHNOLOGICAL PRODUCTION OF ENZYMATIC EXTRACT WITH CELULOLYTICAL ACTIVITY FROM AGROINDUSTRY RESIDUES

Ivanilton Almeida Nery
Karine Belo Rocha de Lima
Marlon Castro da Silva
Edmir Fernandes Ferreira

EIXO 2: APROVEITAMENTO DE RESÍDUOS EM PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS E QUÍMICOS

CAPÍTULO 7 41

VALORIZAÇÃO DE RESÍDUOS DA PALMA DE ÓLEO (*ELAEIS SP*) PARA PRODUÇÃO DE POLISSACARÍDEOS EXTRACELULARES POR *PLEUROTUS OSTREATUS*

Jhonatas Rodrigues Barbosa
Maurício Madson dos Santos Freitas
Marcos Enê Chaves Oliveira

CAPÍTULO 8 50

AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE *Bacillus subtilis* UFPEDA 86 E DA PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTE UTILIZANDO RESÍDUOS DE FRUTAS COMO SUBSTRATOS

Camylla Carneiro Soares
Adrielly Silva Albuquerque de Andrade
Fábio Cirqueira da Silva
Andréa Farias de Almeida
Janice Izabel Druzian
Ana Katerine de Carvalho Lima Lobato

CAPÍTULO 9 65

ESTUDO DO REAPROVEITAMENTO DOS RESÍDUOS SÓLIDOS DA INDÚSTRIA CACAUEIRA.

Rhuany de Oliveira Silva
Iara Rebouças Pinheiro
Isabela Nascimento Tavares Ferreira

CAPÍTULO 10 70

BIOPRODUCTS FROM *Trichoderma harzianum* AS INDUCER OF RESISTANCE TO ANTHRACNOSE IN BEANS

Emanuele Junges
Marlove Fátima Brião Muniz
Ângela Diniz Campos
Thiarles Brun
Cleudson José Michelin
Marcio Antônio Mazutti

CAPÍTULO 11 81

ANALYSIS OF PRE-TREATMENT OF PINEAPPLE WASTE WITH HYDROGEN PEROXIDE IN THE OBTENTION OF TOTAL REDUCING SUGARS

Fernanda Ferreira Freitas
Lorena Costa Vasconcelos Macedo

Carlos Alberto Galeano Suarez
Araceli Aparecida Seolato
Inti Doraci Cavalcanti-Montaño,
Paula Rubia Ferreira Rosa

EIXO 3: MÉTODOS ANALÍTICOS, CINÉTICA, SIMULAÇÃO E MODELOS MATEMÁTICOS APLICADOS EM PROCESSOS

CAPÍTULO 12 86

USE OF LINEAR EQUATIONS FOR DETERMINATION OF APPARENT KINETIC PARAMETERS IN CELLULOLYTIC MEDIUM WITH *Trichoderma virens*

Nelson Rosa Ferreira
Suelem Paixão da Silva
Rubens Menezes Gobira
Maria Inez de Moura Sarquis
Alberdan Silva Santos

CAPÍTULO 13 92

PRODUCTION OF COMMON ORANGE FERMENTED BEVERAGE: KINECTIC STUDY AND SENSORY ANALYSIS

Jacqueline de Moraes Campêlo
Olga Martins Marques

CAPÍTULO 14 97

MATHEMATICAL MODELING OF GLUCOSE ACCUMULATION DURING ENZYMATIC HYDROLYSIS OF CARRAGEENAN WASTE

Samuel Conceição Oliveira
Fernando Roberto Paz Cedeno
Fernando Masarin

CAPÍTULO 15 104

PRODUÇÃO DE ESPOROS DE *Metarhizium anisopliae* POR CULTIVO SÓLIDO EM BIORREATOR DE TAMBOR ROTATIVO COM ROTAÇÃO INTERMITENTE: APLICAÇÃO DE MODELOS MATEMÁTICOS PARA PREDIÇÃO DE PERFIS DE TEMPERATURA

Érika Fernanda Rezendes Tada
Lucas Portilho da Cunha
João Cláudio Thoméo

CAPÍTULO 16 121

DETERMINAÇÃO DO FATOR DE EFETIVIDADE PARA ENZIMAS IMOBILIZADAS USANDO MÉTODOS DE REGRESSÃO SIMBÓLICA VIA PROGRAMAÇÃO GENÉTICA

Félix Monteiro Pereira
Luciano Eduardo Gomes Junior
Fabrício Maciel Gomes
Messias Borges Silva
Samuel Conceição Oliveira

CAPÍTULO 17 133

DEVELOPMENT OF ANALYTICAL METHOD, BY SPECTROSCOPY IN THE MIDINFRARED, AND MULTIVARIATE CALIBRATION FOR ETHANOL QUANTIFICATION IN THE FERMENTED MANGO

PULP (*Mangifera indica* L.) VARIETY BACURI.

Rubens Menezes Gobira
Patrícia Suelene Silva Costa Gobira
Ricardo Felipe Alexandre de Mello
Graziela Cristiane Telles da Silva
Sanclayton Geraldo Carneiro Moreira
Alberdan Silva Santos

CAPÍTULO 18 138

MÉTODOS DE IMOBILIZAÇÃO PARA ESTABILIZAÇÃO DE ENZIMAS

Anderson dos Santos Barbosa
Danyelle Andrade Mota
Lays Carvalho de Almeida
Juliana Lisboa Santana
Nayára Bezerra Carvalho
Sílvia Regina Soares Martins

CAPÍTULO 19 156

CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO DAS ANTOCIANINAS E DA CORDO EXTRATO DE *Eugênia involucrata* NA PRESENÇA E NA AUSÊNCIA DE AGENTES CONSERVANTES NA TEMPERATURA DE 90°C

Lauren Menegon de Oliveira
Francine Antelo

EIXO 4: BIOTRATAMENTOS PARA GERAÇÃO DE ENERGIA E BIOPRODUTOS

CAPÍTULO 20 163

BIOTRATAMENTO DE VINHAÇA SINTÉTICA E GERAÇÃO DE ELETRICIDADE UTILIZANDO UMA CÉLULA A COMBUSTÍVEL MICROBIANA

Cristiane Angélica Ottoni
Marta Filipa Simões
Jonas Gomes dos Santos
Luciana Peixoto
Rodrigo Fernando Brambilla de Souza
Almir Oliveira Neto
Antônio Guerreiro de Brito
Alfredo Eduardo Maiorano

CAPÍTULO 21 172

RECUPERAÇÃO DE BIOPRODUTOS A PARTIR DA GASEIFICAÇÃO DO LODO DE ESGOTO SANITÁRIO

Renan Barroso Soares
Ricardo Franci Gonçalves

CAPÍTULO 22 179

BIOPROSPECTING CAROTENOIDS PRODUCTION IN THREE BRAZILIAN MICROALGAE SPECIES

Sabrina da Silva Mesquita
Natália Guimarães Figueiredo
Inaiã Costa Cutrim
Simone Carvalho Chiapetta
Cláudia Maria Luz Lapa Teixeira
Eliana Flávia Camporese Sérvulo

CAPÍTULO 23 184

EFFECT OF TEMPERATURE AND SALINITY ON THE PRODUCTION OF CAROTENOIDS AND LIPIDS BY MARINE MICROALGA

Nicéia Chies Da Fré
Alessandro de Oliveira Rios
André Jablonski
Rosane Rech
Nilson Romeu Marcílio

SOBRE O ORGANIZADOR..... 193

MÉTODOS DE IMOBILIZAÇÃO PARA ESTABILIZAÇÃO DE ENZIMAS

Anderson dos Santos Barbosa

Universidade Tiradentes, Pós-graduação em
Biotecnologia Industrial
Aracaju – Sergipe

Danyelle Andrade Mota

Universidade Tiradentes, Pós-graduação em
Biotecnologia Industrial
Aracaju – Sergipe

Lays Carvalho de Almeida

Universidade Tiradentes, Pós-graduação em
Engenharia de Processos
Aracaju – Sergipe

Juliana Lisboa Santana

Universidade Tiradentes, Pós-graduação em
Engenharia de Processos
Aracaju – Sergipe

Nayára Bezerra Carvalho

Universidade Tiradentes, Pós-graduação em
Engenharia de Processos
Aracaju – Sergipe

Sílvia Regina Soares Martins

Universidade Tiradentes, Pós-graduação em
Engenharia de Processos
Aracaju – Sergipe

RESUMO: As enzimas são proteínas que catalisam os processos químicos mais complexos, porém, atuam diferente de alguns catalisadores químicos, sob as condições experimentais brandas. Apesar das excelentes

perspectivas que apresentam as enzimas como catalisadores, sua aplicação industrial não é tão imediata, devido ao seu alto custo e à estabilidade de uma enzima depender de uma série de fatores que limitam sua utilização em escala industrial. Portanto, um dos grandes desafios nas últimas décadas é o uso de conceitos relativos à utilização de diferentes formas nos métodos de imobilização e estabilização da enzima (adsorção, ligação covalente, encapsulação, ligação cruzada, entre outros) procurando aumentar a estabilidade do biocatalisador. Sendo assim, este capítulo trata-se de um referencial teórico a cerca dos principais conceitos e alguns resultados encontrados por diversos autores sobre métodos de imobilização para estabilização de enzimas.

PALAVRAS-CHAVES: Imobilização, estabilização, enzimas.

ABSTRACT: Enzymes are proteins that catalyze more complex chemical processes, but different from some chemical catalysts under the mild experimental conditions. In spite of the excellent perspectives presented by the enzymes as catalysts, their industrial application is not so immediate due to its high cost and the operational stability of an enzyme depend on a series of factors that limit its use on an industrial scale. Therefore, one of the great

challenges in the last decades is the use of concepts related to the use of different forms in the enzyme immobilization methods (adsorption, covalent bonding, encapsulation, crosslinking, among others), in order to increase the stability of the biocatalyst. Thus, this chapter deals with a theoretical reference to the main concepts and some results found by several authors on methods of immobilization for enzyme stabilization.

KEYWORDS: Immobilization, estabilization, enzymes.

1 | INTRODUÇÃO

As enzimas são proteínas capazes de catalisar os processos químicos mais complexos sob condições experimentais brandas. Desta forma, podem ser excelentes catalisadores para a obtenção de produtos químicos muito mais sustentáveis. Do ponto de vista técnico, as enzimas apresentam diversas características que as tornam interessantes para a indústria, tais como: alta especificidade, capacidade de atuação em condições suaves (temperaturas moderadas e pressão atmosférica) e não causam danos ao meio ambiente, sendo por isso consideradas como “catalisadores ecologicamente corretos” (GUISAN, 2006).

A ampliação ou aumento de escala para uma produção catalisada por enzimas em processos industriais nas mais diversas aplicações, algumas vezes se tornam inviáveis, e este fato se deve a alguns fatores que influenciam cada tipo de sistema imobilizado (enzima-suporte) como, por exemplo: o alto custo da maioria das enzimas comerciais, muitas vezes a baixa atividade catalítica, a dificuldade na separação do produto do meio reacional e o principal, baixa estabilidade dentre elas a operacional que visa a reutilização do mesmo biocatalisador em diversas reações (BARBOSA *et al.*, 2014; RODRIGUES *et al.*, 2016; ASMAT *et al.*, 2017). Porém, ainda que atingida a alta eficiência da atividade catalítica das enzimas alguns fatores como o custo limitam a utilização das mesmas em processos de larga escala (ZARCULA *et al.*, 2009; ZHAO *et al.*, 2015).

Surge então a necessidade de estratégias com a finalidade de diminuir estes obstáculos, como por exemplo, a imobilização de enzimas através de diferentes técnicas e diferentes suportes. E dessa forma conseguir o objetivo de obter a melhora na estabilidade do biocatalisador, separação dos produtos do meio reacional com maior facilidade, além de melhorar a eficiência catalítica da enzima (WANG & HSIEH, 2008; ASGHER *et al.*, 2014; BRITO *et al.*, 2017). A definição mais aceita para enzimas imobilizadas é a recomendada pela Primeira Conferência sobre Engenharia Enzimática, realizada em 1971, que estabelece que “enzimas imobilizadas são enzimas ou sistemas enzimáticos fisicamente confinados ou localizados em uma certa região definida do espaço com retenção de suas atividades catalíticas, e que podem ser usadas repetida e continuamente” (KENNEDY e CABRAL, 1987).

A imobilização de enzimas é uma técnica cuja finalidade é estabilizar as

biomoléculas através de sua fixação por meios químicos (estabelecido, de no mínimo, uma ligação covalente entre um grupo funcional do suporte e os resíduos terminais de uma enzima, ou entre duas ou mais ligações das moléculas de enzima) e físicos (que não envolve nenhum tipo de ligação química, somente forças físicas) em suportes insolúveis inertes ao meio reacional (ZHAO *et al.*, 2015). Dependendo do pH, temperatura ou adição de reagentes químicos, as enzimas podem ser immobilizadas em alguns polímeros solúveis ou insolúveis, mas normalmente são utilizadas matrizes sólidas e insolúveis como sílica e/ou suportes híbridos (MONDAL *et al.*, 2006; SIMÕES *et al.*, 2011). Assim, enzimas immobilizadas são aquelas que estão confinadas em um espaço e separadas por barreira, que em uma reação permite a interação entre a enzima e o substrato, mas que as tornam, em qualquer meio, pouco solúveis (PAIVA *et al.*, 2000; GIRELLI e MATTEI, 2005).

2 | MÉTODOS DE IMOBILIZAÇÃO

A escolha criteriosa de uma estratégia de immobilização de enzimas (Figura 1) é baseado na eficácia da utilização da enzima, os custos do procedimento de immobilização, a toxicidade dos reagentes de immobilização e as propriedades finais desejadas do biocatalisador immobilizado (KHARRAT *et al.*, 2011). Por esse motivo a avaliação da caracterização físico-química aliada à caracterização bioquímica destes sistemas immobilizados se intensificou na última década. Os biocatalisadores immobilizados em suportes inorgânicos já foram estudados por diversos grupos (BARBOSA *et al.* 2014; OLIVEIRA *et al.*, 2014; BARBOSA *et al.* 2016), mas poucos relatam a immobilização em suportes orgânicos.

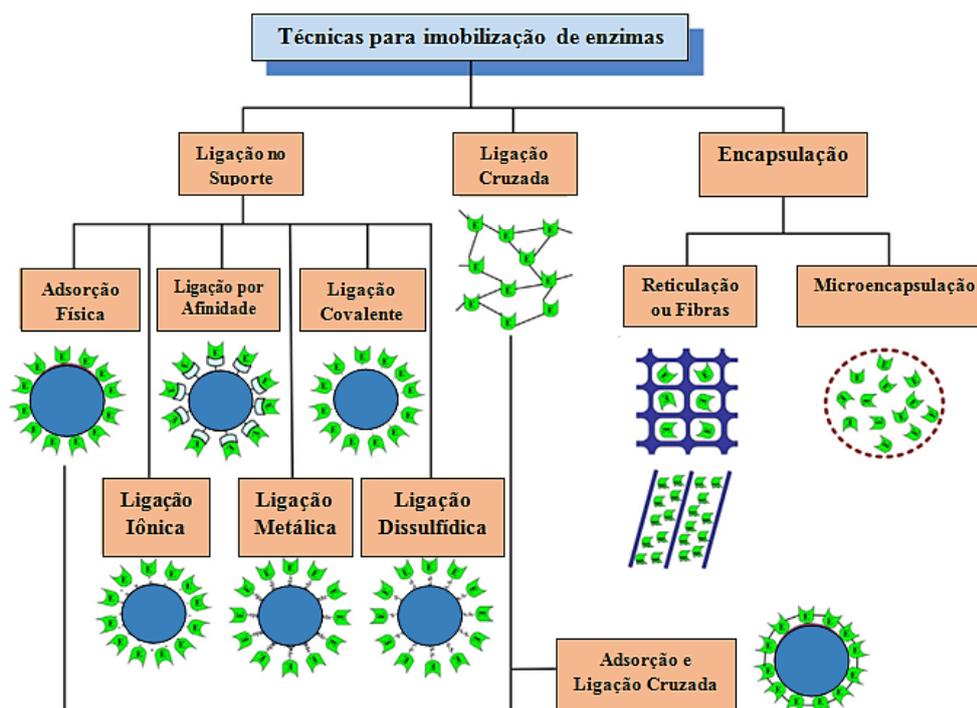


Figura 1 - Diversas técnicas para immobilização de enzimas (Adaptado de ZHAO *et al.*, 2015).

O processo de imobilização envolve diversas variáveis, como tempo e temperatura da reação, natureza do catalisador, concentração de reagentes, entre outros. Estas variáveis determinam as características finais dos sistemas, incluindo a porcentagem de hidrólise e condensação de grupos reativos, densidade de reticulação e homogeneidade do produto (CARVALHO *et al.*, 2015). As lipases, por exemplo, possui um sítio ativo coberto por uma região flexível chamada de tampa ou “*lid*” e a interação com uma superfície hidrofóbica do suporte durante a imobilização desloca a tampa para uma conformação aberta que torna o sítio ativo mais acessível pelo substrato e assim provoca o aumento da atividade catalítica do biocatalisador imobilizado (KALANTARI *et al.*, 2017). Para o uso de resíduos agrícolas ou agroindustriais nos processos de imobilização, tem-se utilizado a imobilização multipontual de lipases, lacases e leveduras conforme descrito na literatura (BRÍGIDA *et al.*, 2008; MENDES *et al.*, 2013; ALMEIDA *et al.*, 2017). E também outros métodos de imobilização como a adsorção física de lacase, β -fructofuranosidase para diversas aplicações (MUSSATO *et al.*, 2009). O uso de uma variedade de métodos de imobilização (adsorção física, ligação covalente, encapsulação e ligação cruzada) em todos os casos, permite o controle de interação entre a enzima e o suporte e aumenta as possibilidades de sucesso, resultando em maior aplicabilidade e economia nos processos industriais.

2.1 Adsorção Física

O método físico para a imobilização de enzimas, a adsorção, é uma das técnicas mais utilizadas na obtenção de biocatalisadores insolúveis por ser considerado um processo simples, menos dispendioso por conseguir manter a atividade catalítica elevada e apresentar um maior potencial comercial para alguns tipos de sistemas imobilizados (KHARRAT *et al.*, 2011). Na adsorção as enzimas são ligadas à matriz através de ligações de hidrogênio, forças de Van der Waals ou interações hidrofóbicas ou iônicas. A adsorção quando comparada a outros métodos de imobilização oferece algumas vantagens que devem ser consideradas, como: facilidade de no processo de imobilização, a ausência de modificação química e ainda assim o aumento da estabilidade do biocatalisador (CRISTÓVÃO *et al.*, 2011).

A imobilização nesse método ocorre quando há o contato da enzima com o suporte (Figura 2) nas condições de pH e forças iônicas adequadas (ZHAO *et al.*, 2017). A distância entre as moléculas de enzimas imobilizadas é muito importante e deve ser determinada principalmente pela diferença entre taxa de imobilização e taxa de difusão e pelo carregamento de suporte (FERNANDEZ-LOPEZ *et al.*, 2017). Quando relacionado com as outras técnicas, a adsorção pode possuir maior potencial, pois oferece a capacidade de reutilização de suportes, principalmente aqueles de maior valor, pois os tipos de ligações enzima/suporte são reversíveis e assim a enzima imobilizada pode ser removida quando por algum motivo se torna inativa (ARICA e BAYRAMOGLU, 2004).

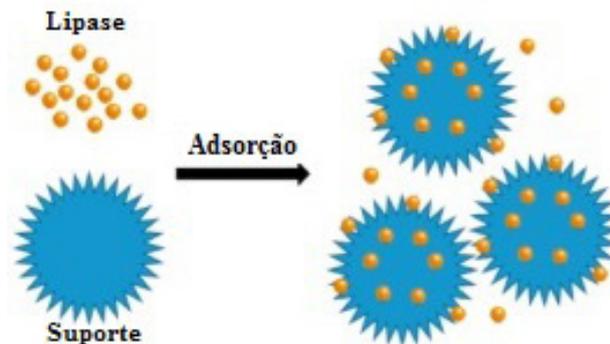


Figura 2 - Imobilização por adsorção física (Adaptado de ZHAO *et al.*, 2017).

Os suportes utilizados nessa técnica podem ser de origem orgânica (lignocelulósicos, DOWEX) ou de origem inorgânica (celite, bentonita, alumina e sílica) ou suportes híbridos (SIMÕES *et al.*, 2011). Imobilizar uma enzima por esse método requer uma interação eletrostática entre a enzima e o suporte, para que a enzima não seja lixiviada até mesmo durante as etapas do processo de imobilização (KHARRAT *et al.*, 2011).

O método baseado na adsorção física da enzima sobre a superfície de suportes insolúveis em água provoca pouca ou nenhuma alteração conformacional da enzima ou destruição de seu sítio ativo (ZIVKOVIC *et al.*, 2015). Porém, como o resultado da força fraca da ligação entre a enzima e o suporte, este método tem uma desvantagem, pois durante o uso repetido há a lixiviação das enzimas adsorvidas do suporte, diminuindo a estabilidade operacional (ZIVKOVIC *et al.*, 2015). Além disso, as enzimas são altamente dependentes das condições do pH, temperatura, substrato e solvente, podendo ser facilmente dessorvidas com qualquer alteração desses parâmetros.

Os suportes porosos utilizados para imobilização de lipase geralmente utilizam a técnica de adsorção física e é uma das maneiras mais empregadas em operações de larga escala através de leito fixo contínuo e reatores de tanque agitado (FORESTI e FERREIRA, 2007; KANG *et al.*, 2007). A imobilização de enzimas em suporte poroso acontece através da incorporação da enzima nos poros de suporte, seguida de sua fixação na parede porosa (FERNANDEZ-LOPEZ *et al.*, 2017). Quando uma lipase é adsorvida em um suporte hidrofóbico, sua estrutura é modificada e seu sítio ativo é totalmente exposto (conformação aberta) com o mecanismo de ação, chamado de ativação interfacial, possibilitando uma melhora significativa na catálise (MANOEL *et al.*, 2015). A hiperativação da lipase de *Pseudomonas fluorescens* (PF) imobilizada em micropartículas magnéticas de sílica funcionalizadas com grupos octis, que as tornam mais hidrofóbicas, foi previamente relatada em trabalhos desenvolvidos por KOPP *et al.* (2015).

Em outros trabalhos foram relatados o uso de vários tipos suportes para a imobilização por adsorção física, dentre eles suportes orgânicos: como sabugo de milho para a adsorção de lipase de *Burkholderia cepacia* (RUZENE *et al.*, 2014) e fibra

de coco verde para a imobilização de lacase (CRISTÓVÃO *et al.*, 2011) e os suportes inorgânicos como: resina macroporosa para imobilização de lipase de *Candida* sp. (99-125 lipase) (GAO *et al.*, 2009), polietileno agarose (TORRES *et al.*, 2006), esferas de polipropileno revestido por vidro (FORESTI E FERREIRA, 2007), entre outros.

2.2 Ligação Covalente

A imobilização por ligação covalente em suportes insolúveis é outro método de imobilização de enzimas muito importante para o melhoramento e estabilização de enzimas, além de permitir uma fácil recuperação e conseqüentemente uma melhor estabilidade operacional (HOU *et al.*, 2015). Dentre os métodos de imobilização a ligação covalente de uma enzima a um suporte é talvez o método mais significativo, porém técnicas e ferramentas de imobilização efetivas exigem uma maior exploração (ASMAT *et al.*, 2017). Nesta técnica a enzima é ligada ao suporte inerte mediante ligações químicas covalentes, que são estabelecidas entre os grupos primários amino e o anel fenólico de alguns aminoácidos constituintes da enzima com os grupos reativos do suporte, formando assim o braço espaçador (DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004). Os grupos químicos existentes na enzima interagem através de ligações cruzadas com os grupos químicos do suporte insolúvel, através da modificação da superfície do suporte utilizando agentes multifuncionais (HOMAEI *et al.*, 2013; ATACAN *et al.*, 2017) e muitas vezes envolvem três passos: a ativação do suporte, a modificação da superfície ativada e a imobilização da enzima (IDRIS & BUKHARI, 2012).

A depender da natureza dos grupos ativos do suporte, da reatividade e estado de protonação dos mesmos, pode ocorrer a interação com os grupos da enzima, entre os quais, os que mais se ligam são os grupos químicos $-SH$, $-OH$, e $-NH_2$ (VAIDYA *et al.*, 2008). A enzima imobilizada por esse método, por possuir uma ligação mais forte quando comparada a ligação existente na adsorção, é mais estável, pois sua ligação é irreversível e não se desprende do suporte em presença do substrato ou de soluções de alta concentração iônica (CASTRO *et al.*, 2008).

Os grupos aminos na superfície das enzimas tratados com agentes que possibilitam a formação de ligação cruzada, tais como glutaraldeído, na presença de um agente precipitante permite uma imobilização devido à preparação de agregados de enzimas por ligação cruzada (CLEAs) que são indicados como biocatalisadores imobilizados eficientes, mesmo em escala industrial (BOROS *et al.*, 2013). O glutaraldeído possui grupos funcionais em uma extremidade da molécula que se ligam a enzima e na outra extremidade grupos que se ligam ao suporte. Por possuir esta estrutura, ele se torna uma das moléculas que podem ser utilizadas como braço espaçador em imobilizações por ligações covalentes (MATEO *et al.*, 2007). Este agente modifica grupos aminos primário das proteínas, embora possa eventualmente reagir com outros grupos como os tióis, fenóis, imidazólios (BARBOSA *et al.*, 2012).

O revestimento de um suporte com uma mistura dos reagentes sinalizantes como

o 4-aminopeniltrimetoxissilano (APTS) e feniltrimetoxissilano (FTMS) e em diferentes proporções demonstraram que a densidade dos grupos aminados presentes na superfície da sílica pode ser controlada (BANET *et al.*, 2008). Assim, um método simples pode garantir e até mesmo manter a dispersão da funcionalidade dos grupos aminos da superfície (BANET *et al.*, 2008). Outra maneira que pode ajudar na imobilização e estabilização da enzima é a funcionalização do suporte através da adição de grupos aminos para posterior imobilização (Figura 3) (FIROOZ *et al.*, 2017).

Vários aminoácidos da enzima estão relacionados com a elevada força desta ligação, e proporciona uma grande rigidez na estrutura da mesma (BARBOSA *et al.*, 2012). Em processos industriais, o biocatalisador imobilizado por esse método é mais eficiente, pois devido à rigidez da ligação, a estrutura da enzima pode-se manter inalterada diante de qualquer fator que possa desnaturá-la, com a temperatura e pH extremos, solventes orgânicos, e outros (MILETIC *et al.*, 2012). Entretanto, caso a enzima possua diferentes conformações quando ativada e inativada, essa forte ligação pode dificultar a ativação da mesma depois do processo de imobilização, como por exemplo quando imobilizada com o sítio ativo inacessível (MATEO, *et al.*, 2007).

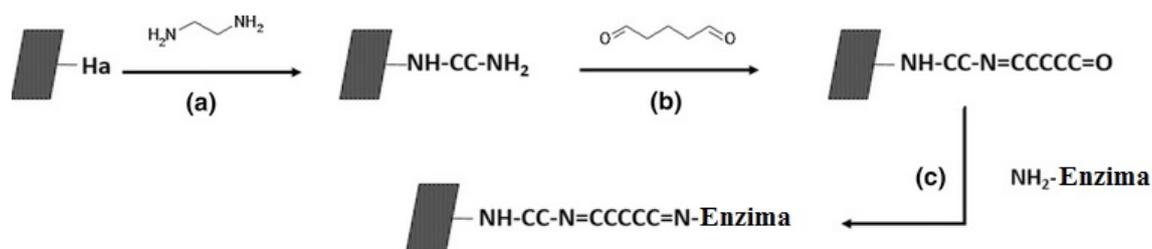


Figura 3 - Mecanismo de imobilização por ligação covalente: (a) funcionalização de celulose com grupos aminos; (b) reticulação com glutaraldeído e (c) imobilização da enzima (FIROOZ *et al.*, 2017).

De acordo com ZHU *et al.* (2011) algumas das vantagens observadas nesse método foi a maior eficiência e estabilidade, já que suas ligações entre o suporte e a enzima não são tão suscetíveis a pH, força iônica, solventes e temperatura. Porém, a ligação covalente pode resultar em perdas da atividade enzimática. As principais razões para que isso ocorra são: mudanças estruturais, que podem ocorrer muitas vezes durante o processo de imobilização; limitações na difusão, reduzindo a conversão e o impedimento estérico, que bloqueia parcialmente a ligação com os sítios ativos.

Durante a última década vários estudos foram realizados com o objetivo de melhorar a atividade da enzima imobilizada através de ligações covalentes. Vishwanath *et al.* (1995) demonstraram que uma imobilização específica e bem ordenada de acordo com os grupos reativos do agente e da enzima, acarretam em um melhor número de sítios ativos disponíveis para a ação catalítica. Em outro estudo a lipase foi imobilizada na presença de aditivos de ácidos graxos, que possibilitou a ocupação do centro ativo por um substrato molecular e impediu uma mudança conformacional da enzima durante o processo de ligação, preservando a alta atividade catalítica

(OZTURK & KILINC, 2010).

Segundo Barbosa et al. (2012) existem duas estratégias para a imobilização por ligação covalente utilizando o glutaraldeído como agente bifuncional, e a primeira é a utilização de um suporte pré-ativado. A ativação ótima (em termos de reatividade) para este suporte acontece quando o aldeído de uma extremidade da molécula se liga ao grupo amino no suporte e o aldeído da outra extremidade fica livre, resultando uma estrutura bastante reativa com os resíduos de aminoácidos da enzima. Esta ativação com glutaraldeído provoca a superfície do suporte um revestimento com um reagente quimicamente reativo, capaz de imobilizar covalentemente proteínas (Figura 4).

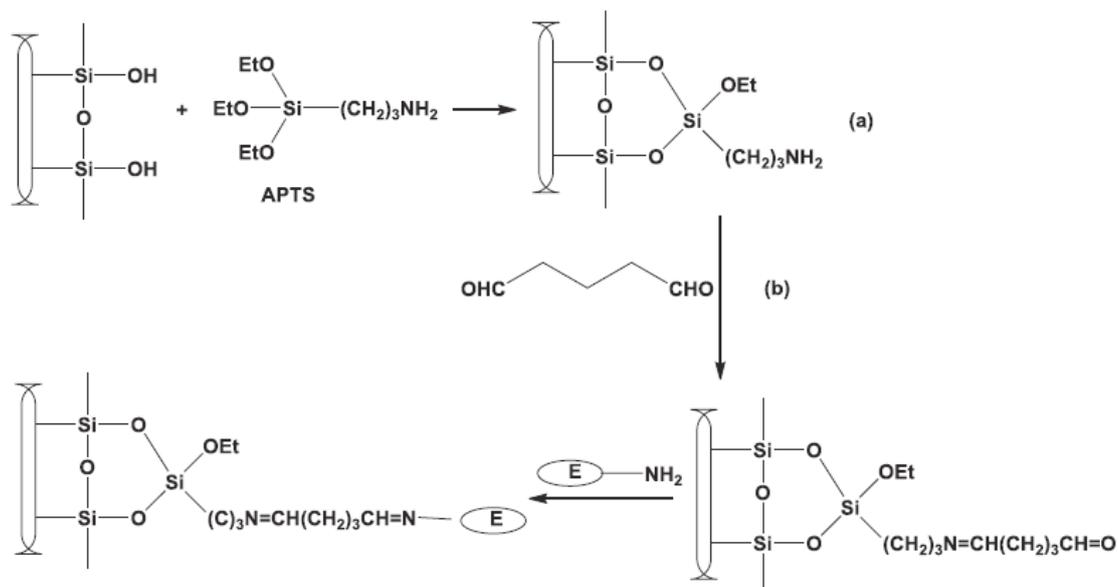


Figura 4 - Mecanismo de imobilização por ligação covalente: (a) silanização e (b) formação do braço espaçador com glutaraldeído (CARDOSO *et al.*, 2009).

A segunda estratégia é para adsorção da enzima por troca iônica sobre o suporte aminado e, posteriormente, tratar este composto com glutaraldeído sob condições suaves para obtenção da ligação entre a enzima e o suporte através da ativação de todos os grupos amino primários do suporte e da enzima com apenas uma molécula de glutaraldeído (Figura 5) (RODRIGUES *et al.*, 2011).

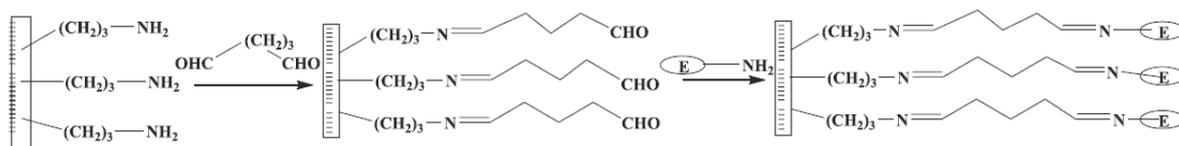


Figura 5 - Reação de suportes aminopropilados para ligação covalente utilizando o glutaraldeído como agente de ativação (CARDOSO *et al.*, 2009).

A imobilização covalente pode ocorrer também através de ligações multipontuais envolvendo muitos locais na superfície da enzima ligados ao suporte (Figura 6). Segundo POPPE *et al.* (2013), as enzimas só se tornam estávelmente imobilizados no suporte, quando, pelo menos, duas ligações são produzidas no complexo enzima-

suporte. Porém quando a imobilização é realizada a pH 7 (neutro), o único grupo amino reativo na superfície da enzima é o amino terminal, uma vez que outros grupos aminos são ionizados e não reagem com o suporte. Portanto, para que as enzimas fiquem imobilizados multipontualmente nestes suportes essa imobilização precisa ocorrer apenas em valores de pH próximos ou acima de 10, pois em pH altos o ϵ -amino dos resíduos de lisina presente na superfície da lipase estão suficientemente reativos, favorecendo a ligação multipontual (MATEO *et al.*, 2005).

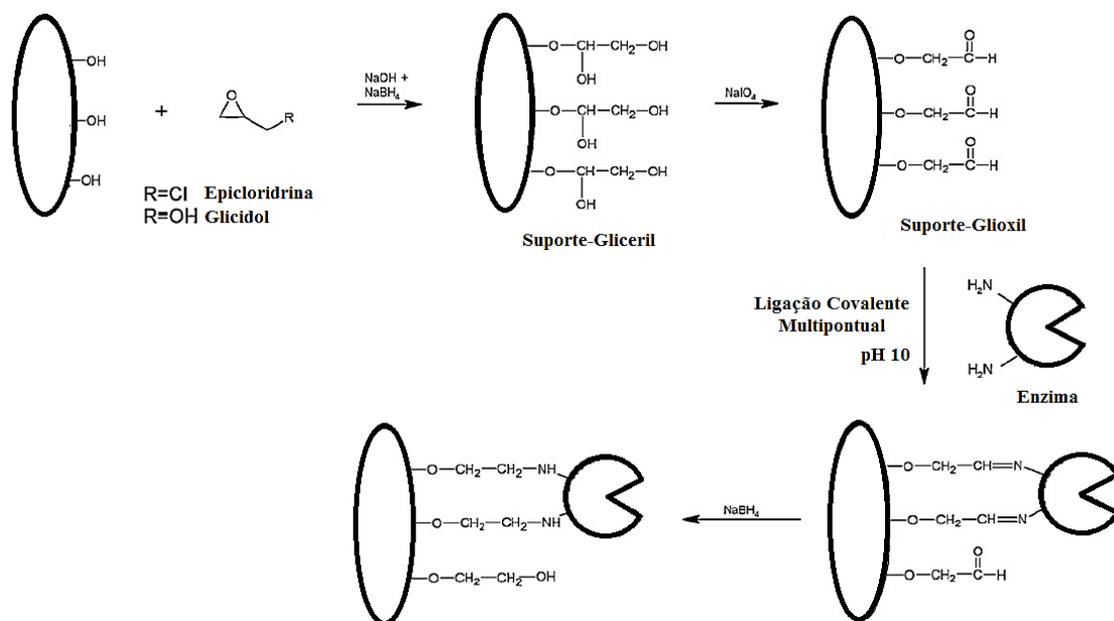


Figura 6 - Mecanismo de ligação covalente multipontual em suportes funcionalizados com glicidol (Adaptado de MENDES *et al.*, 2011a).

Os suportes utilizados para imobilização por ligação covalente multipontual devem apresentar algumas características importantes, como uma grande superfície para que dessa forma tenha uma boa congruência geométrica com a superfície da enzima (MATEO *et al.*, 2006). Em alguns casos, a ligação covalente multipontual permite uma elevada intensidade na ligação entre enzima e suporte, como enzima-amino-glutaraldeído ou suporte-amino-glutaraldeído e assim tornando-a susceptível em reações com amplos valores de pH (RODRIGUES *et al.*, 2011).

Segundo MATEO *et al.* (2007), a ligação multipontual de enzimas em suportes pré-existente ativada com grupos aldeído por meio de pequenos braços espaçadores promove uma estrutura mais rígida da enzima imobilizada, quando comparada a ligação unipontual. Porém, em alguns casos esta modificação da superfície da enzima pode também ter um impacto (negativo ou positivo) em sua estabilidade e atividade enzimática, pois todos os grupos amino de superfície enzima são modificados (BARBOSA *et al.*, 2012).

A redução das alterações conformacionais envolvidos na inativação da enzima e conseqüentemente no aumento da estabilidade da enzima imobilizada está também relacionado com a distância relativa entre todos os aminoácidos da enzima envolvidos na imobilização e o suporte, que deve ser muito pequena. Desse modo, um maior

número possível de resíduos de aminoácidos da enzima reage com o suporte causando uma ligação mais forte entre ambos (MATEO *et al.*, 2007).

Trabalhos veem sendo desenvolvidos com a imobilização por ligação covalente multipontual em diversos tipos de suporte e com diferentes agentes funcionalizantes. Em sua maioria, o biocatalisador imobilizado obteve uma maior estabilidade térmica, como lipases de *Rhizomucor miehei* (LRM) e *Candida antarctica* (CALB) imobilizadas em resina ativada com aldeído (POPPE *et al.*, 2013) e a lipase de *Rhizopus oryzae* (LRO) imobilizada em sílica funcionalizada com grupo epóxi (ASHJARI *et al.*, 2015). Outro estudo, a lipase de *Hypocrea pseudokoningii* foi imobilizada em suportes de glioxil-agarose e também apresentou uma melhor estabilidade térmica e à solventes orgânicos (PEREIRA *et al.*, 2015).

2.3 Encapsulação

As novas técnicas de imobilização são utilizadas para conservar a natureza catalítica do biocatalisador, dentre elas, o método de encapsulação pela técnica sol-gel mostrou ser uma técnica versátil para a imobilização de uma grande variedade de biomoléculas (SOARES *et al.*, 2006; CARVALHO *et al.*, 2015; BARBOSA *et al.*, 2014). O encapsulamento atraiu uma considerável atenção em áreas como biotecnologia, medicina, farmacêutica, catálise, nutrição e ecologia (KATO *et al.*, 2011).

O método consiste na proteção às biomoléculas através da sua imobilização no interior de uma rede polimérica ou microcápsulas de polímeros que representa um microambiente separado do ambiente externo e permite o substrato e os produtos passarem através dos mesmos, mas com retenção da enzima (ZHANG *et al.*, 2012). Depois do aprisionamento, as enzimas não estão ligadas à matriz polimérica ou cápsula, e sua difusão é limitada, porém quando comparado com lipases imobilizadas por adsorção física, os imobilizados por encapsulação apresentaram uma maior estabilidade (ZHAO *et al.*, 2015). Pode limitar os movimentos de desdobramentos e rotações da enzima, por outro lado, permite o reconhecimento do substrato, favorecendo uma boa catálise (GUISAN, 2006). Um estudo realizado por Barbosa *et al.* (2014) mostrou que a lipase de *Burkholderia cepacia* encapsulada em aerogel de sílica apresentou eficiência catalítica significativa na reação de hidrólise de azeite de oliva e manteve estável, acima de 50% da atividade inicial relativa, durante 23 reusos do mesmo biocatalisador em reações consecutivas.

Dentre os métodos de imobilização de enzimas, devido a simples preparação, a vasta diversidade de biomoléculas e sua reprodutibilidade, por não necessitar de equipamentos sofisticados, a encapsulação é considerada uma boa alternativa. Segundo Guisan (2006) este processo é baseado no confinamento da enzima em uma matriz física, e pode envolver a polimerização de materiais orgânicos ao redor da mesma, cujo envoltório é constituído por um polímero geliforme e permeável, não havendo, portanto, a associação covalente entre a rede e as biomoléculas.

O método de encapsulação chama atenção para a formação de diversas estruturas como estudos realizados recentemente envolvendo materiais inorgânicos e orgânicos (MAJEWSKI *et al.*, 2017). Majewski *et al.* (2017) envolve duas estratégias gerais de confinamento (Figura 7): na primeira ocorre a síntese do suporte a partir da combinação dos materiais orgânicos e inorgânicos da estrutura juntamente com a enzima, em condições que favorecem a formação da estrutura do suporte e preservam a estrutura terciária da enzima ativa. Na segunda a enzima é introduzida em um suporte pré-existente que apresenta canais e/ou aberturas (celas) maiores do que o tamanho da enzima e assim, e posteriormente esse material juntamente com a enzima já introduzida é revestida com outro material.

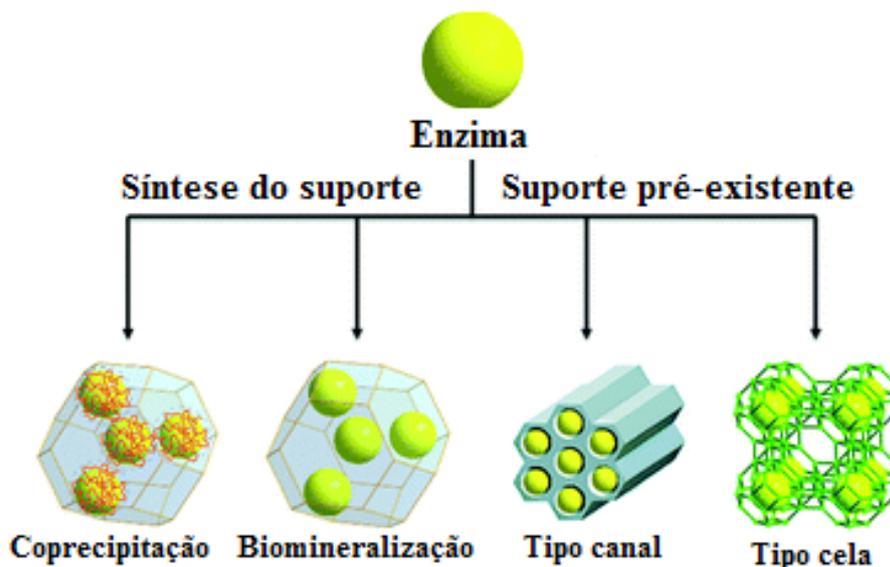


Figura 7 - Métodos de encapsulação enzimática (MAJEWSKI *et al.*, 2017).

A encapsulação oferece várias vantagens, dentre elas a possibilidade de modificação da matriz quimicamente; permeabilidade das matrizes, que permite adaptação de biomoléculas de tamanhos variáveis, transporte de composto com baixo peso molecular sem desprendimento das biomoléculas imobilizadas; propriedades ópticas, que possibilitam a medição de sinais de fluorescência e absorvância; além de resistências a agentes térmicos, químicos e degradação biológica (GUISAN, 2006). As condições a serem usadas para preparar a estrutura de suporte implica a preservação da atividade, eficiência e estabilidade da enzima (MAJEWSKI *et al.*, 2017).

Para melhorar a atuação de enzimas em meio orgânico tem-se utilizado o procedimento de encapsulação em meio poroso durante a síntese pela técnica sol-gel, onde a enzima é encapsulada quando é adicionada ao meio reacional ainda no processo de formação do gel. O processo sol-gel é baseado na capacidade de formação de sílica, óxido metálico e matrizes organosiloxano, onde sua porosidade é definida pela reação de precursores orgânicos em temperatura ambiente (GUISAN, 2006). Além disso, para melhorar ainda mais é relatado na literatura o uso de aditivos no processo de imobilização pela técnica sol-gel como agentes que influenciam positivamente o aumento da atividade e da estabilidade de enzimas imobilizadas (HARA *et al.*, 2010;

BARBOSA *et al.*, 2014;2016). Essa influência está diretamente associada à proteção da enzima contra a inativação durante a etapa de encapsulamento, à retenção da camada de água ao redor do biocatalisador e aos efeitos dispersantes das moléculas da enzima (LEVANDOSKI *et al.*, 2015).

As técnicas de encapsulação são instrumentos confiáveis e chamam atenção por oferecer diversas aplicações, tais como biossensores, bioelétrica, bioprocessos, biocatalisadores, cromatografia de bioafinidade e biotransdutores. No entanto, o método de encapsulação em sistemas preparados para aplicações catalíticas, também tem como considerações importantes o efeito que a estrutura escolhida pode ter em fatores como a difusão e/ou a seletividade do substrato (MAJEWSKI *et al.*, 2017), já que uma das desvantagens encontradas é a dificuldade de difusão dos substratos por entre os poros da matriz do suporte. Ainda que todas essas vantagens e resultados promissores sejam alcançados se faz necessária à busca de protocolos e precursores mais biocompatíveis, com a finalidade de minimizar efeitos de retração e colapso dos poros e assim melhorar ainda mais a eficiência catalítica, e a estabilidade mecânica do sol-gel (GUISAN, 2006).

A técnica tem aplicações industriais com base em métodos químicos e físicos, tais como a evaporação do solvente, polimerização interfacial, e da armadilha (orgânico/inorgânico) da matriz (KATO *et al.*, 2011). Atualmente, dispõe-se de um grande número de matrizes, englobando materiais orgânicos e inorgânicos, naturais ou sintéticos (RUZENE *et al.*, 2014, BARBOSA *et al.*, 2014; WANG *et al.*, 2015; BARBOSA *et al.*, 2016; MAJEWSKI *et al.*, 2017).

2.4 Ligação Cruzada

A ligação cruzada é um método de imobilização responsável pela síntese de CLEA's (Cross-Linked Enzyme Aggregates) que são agregados de enzimas reticuladas. CLEA's é uma técnica de imobilização relativamente recente desenvolvida originalmente há pouco mais de 40 anos atrás pelo grupo de estudos do Prof. Jorge Sheldon (SHELDON, 2007; SHELDON, 2011). A preparação do CLEA apresenta algumas vantagens e por isso vem chamando atenção de vários pesquisadores, pois é considerada um procedimento simples, pois a proteína não precisa ser purificada e requer somente a precipitação da mesma para a formação de agregados (MAHMOD *at el.* 2016). Segundo Sheldon (2011) o melhor agente reticulante para a formação dos agregados é o glutaraldeído.

O processo de imobilização ocorre quando o glutaraldeído penetra na estrutura interna da enzima e seu grupo aldeído reage com os grupos amino da proteína que provoca uma agregação química entre as enzimas formando um "biocatalisador sólido", podendo eventualmente acontecer reações com outros grupos como os tióis, fenóis e imidazólios (YUSOF *et al.*, 2016). Alguns fatores são importantes para controlar o tamanho final das partículas de CLEA, são eles: o tipo e quantidade do precipitado,

a velocidade de agitação, concentração de proteínas, além da concentração de glutaraldeído (GARCIA-GALAN *et al.*, 2011).

Algumas enzimas possuem uma pequena quantidade de grupos aminas, que pode prejudicar a reticulação tornando a imobilização pouco eficaz, já que a mesma acontece entre o grupo aldeído e amino do agente e enzima, respectivamente. Para amenizar ou sanar esse problema surge a necessidade de adicionar mais uma etapa no processo de imobilização por CLEA, o uso de aditivos (Figura 7). A utilização de aditivos como outras proteínas, por exemplo, a albumina bovina, é comumente observada em alguns trabalhos por possuir um grande número de grupos amino que facilitam o intercruzamento (DONG *et al.*, 2010).

A adição de diferentes aditivos, além de facilitar a formação do CLEA, aumenta a atividade enzimática, estabilidade, e pode ser separado facilmente por filtração e centrifugação (YUSOF *et al.*, 2016). Em contrapartida, para algumas aplicações industriais a utilização de CLEA's não são viáveis, pois não são mecanicamente resistentes por serem frágeis e a depender da viscosidade do precipitante utilizado sua recuperação torna-se difícil e complexa para utilização em larga escala (GARCIA-GALAN *et al.*, 2011).

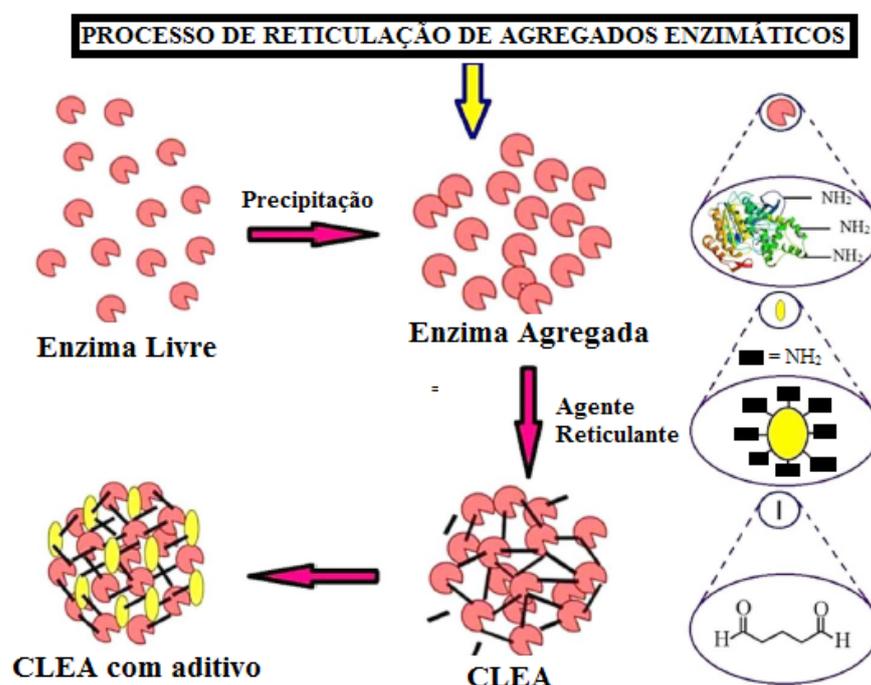


Figura 7 - Esquema da preparação de CLEA's utilizando aditivo (Adaptado de YUSOF *et al.*, 2016).

Portanto, com o objetivo de aprimoramento de biocatalisadores mais eficientes, imobilizados em diferentes suportes, o uso de matrizes de natureza orgânica, inorgânica ou híbrido têm apresentado particular interesse comercial nos últimos anos, devido às suas diferentes características e aplicações.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, L. C.; BARBOSA, A. S.; FRICKS, A. T.; FREITAS, L. S.; LIMA, A. S.; SOARES, C. M. F. **Use of conventional or non-conventional treatments of biochar for lipase immobilization.** *Process Biochemistry* 61: 124-129, 2017.
- ARICA M.Y.; BAYRAMOGLU, G. **Polyethyleneimine-grafted poly(hydroxyethyl methacrylate-co-glycidyl methacrylate) membranes for reversible glucose oxidase immobilization.** *Biochemistry Engineering Journal* 20: 73–7, 2004.
- ASGHER, M.; SHAHID, M.; KAMAL, S.; IQBAL, H. M. N. **Recent trends and valorization of immobilization strategies and ligninolytic enzymes by industrial biotechnology.** *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 101: 56– 66, 2014.
- ASHJARI, K.; MOHAMMADIC, M.; BADRI, R. **Chemical amination of *Rhizopus oryzae* lipase for multipoint covalent immobilization on epoxy-functionalized supports: Modulation of stability and selectivity.** *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 115: 128–134, 2015.
- ASMAT, S.; HUSAIN, O.; AZAM, A. **Lipase immobilization on facile synthesized polyaniline-coated silver-functionalized graphene oxide nanocomposites as novel biocatalysts: stability and activity insights.** *RSC Advances* 7: 5019–5029, 2017.
- ATACAN, K.; ÇAKIROGLU, B.; ÖZACAR, M. **Covalent immobilization of trypsin onto modified magnetitenanoparticles and its application for casein digestion.** *International Journal of Biological Macromolecules* 97: 148–155, 2017.
- BANET, P.; MARCOTTE, N.; LERNER, D. A.; BRUNEL, D. **Single-step dispersion of functionalities on a silica surface.** *Langmuir* 24(16): 9030–9037, 2008.
- BARBOSA, A. S.; LISBOA, J. A.; SILVA, M. A. O.; CARVALHO, N. B.; PEREIRA, M. M.; FRICKS, A. T.; MATTEDI, S.; LIMA, A. S.; FRANCESCHI, E.; SOARES, C. M. F. **The novel mesoporous silica aerogel modified with protic ionic liquid for lipase immobilization.** *Química Nova* 39 (4): 415-422, 2016.
- BARBOSA, A. S.; SILVA, M. A. O.; CARVALHO, N. B.; MATTEDI, S.; IGLESIAS, M. A.; FRICKS, A. T.; LIMA, A. S.; FRANCESCHI, E.; SOARES, C. M. F. **Immobilization of lipase by encapsulation in silica aerogel.** *Química Nova* 37 (6): 969-976, 2014.
- BARBOSA, O.; TORRES, R.; ORTIZ, C.; FERNANDES-LAFUENTE, R. **Versatility of glutaraldehyde to immobilize lipases: Effect of the immobilization protocol on the properties of lipase B from *Candida antarctica*.** *Process Biochemistry* 47: 1220–1227, 2012.
- BOROS, Z.; WIESER, D.; MARKUS, M.; ABAHAZIOVA, E.; MAGYAR, A.; TOMIN, A.; KOCZKA, B.; KOCZKA, P.; POPPE, L. **Hydrophobic adsorption and covalent immobilization of *Candida antarctica* lipase B on mixed-function-grafted silica gel supports for continuous-flow biotransformations.** *Process Biochemistry* 48: 1039–1047, 2013.
- BRÍGIDA, A. I. S.; PINHEIRO, A. D. T.; FERREIRA, A. L. O.; GONÇALVES, L. R. B. **Immobilization of *Candida antarctica* Lipase B by Adsorption to Green Coconut Fiber.** *Appl Biochem Biotechnology* 146: 173–187, 2008.
- BRITO, M. J. P.; VELOSO, C. M.; BONOMO, R. C. F.; FONTAN, F. C. I.; SANTOS, L. S.; MONTEIRO, K. A. **Activated carbons preparation from yellow mombin fruit stones for lipase immobilization.** *Fuel Processing Technology* 156: 421–428, 2017.
- CARVALHO, N. B.; LIMA, A. S.; SOARES, C. M. F. **Uso de sílicas modificadas para imobilização de lipases.** *Química Nova* 38: 399-409, 2015.

CASTRO, H. F.; ZANIN, G. M.; MORAES, F. F.; SÁ-PEREIRA, P. **ENZIMAS EM BIOTECNOLOGIA: Produção, Aplicações e Mercado**. Capítulo 6 – Imobilização de enzimas e sua estabilização. In: Editores: Elba P.S. Bon (IQ/UFRJ), Maria Antonieta Ferrara (FIOCRUZ) e Maria Luisa Corvo (INETI - Lisboa, Portugal) Alane B. Vermelho (UFRJ), Carmem Lucia A. Paiva (UNIRIO), Ricardo Bicca de Alencastro (IUFRRJ) e Rosalie R. R. Coelho (UFRJ). (Org.). Rio de Janeiro: EDITORA INTERCIÊNCIA, 2008.

CRISTÓVÃO, A. R. O.; TAVARES, A. P. M.; BRÍGIDAB, A. I. S.; LOUREIROA, J. M.; BOAVENTURA, A. R.; MACEDO, E. A.; COELHO, M. A. A. **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: 6 – 12, 2011.

DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. G.; SOLDI, V. **Synthetic applications of lipases immobilized on polymers**. *Química Nova* 27 (4): 623-630, 2004.

DONG, T.; ZHAO, L.; HUANG, Y.; TAN, X. **Preparation of cross-linked aggregates of aminoacylase from *Aspergillus melleus* by using bovine serum albumin as an inert additive**. *Bioresour Technol* 101: 6569–6571, 2010.

FERNANDEZ-LOPEZ, L.; PEDRERO, S. G.; LOPEZ-CARROBLES, N.; GORINES, B. C.; VIRGEN-ORTÍZ, J. J.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. **Effect of protein load on stability of immobilized enzymes**. *Enzyme and Microbial Technology* 98: 18–25, 2017.

FIROOZ, N. S.; PANAHI, R.; MOKHTARANI, B.; YAZDANI, F. **Direct introduction of amine groups into cellulosic paper for covalent immobilization of tyrosinase: support characterization and enzyme properties**. *Cellulose* 24: 1407–1416, 2017.

FORESTI, M.L.; FERREIRA, M.L. **Analysis of the interaction of lipases with polypropylene of different structure and polypropylene-modified glass surface**. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 294: 147 – 155, 2007.

GAO, S.; WANG, Y.; WANG, T.; LUO, G.; DAI, Y. **Immobilization of lipase on methyl-modified silica aerogels by physical adsorption**. *Bioresource Technology* 100: 996 - 999, 2009.

GARCIA-GALAN, C.; BERENQUER-MURCIA, Á.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; RODRIGUES, R. C. **Potential of different enzyme immobilization strategies to improve enzyme performance**. *Adv Synth Catal* 353: 2885–2904, 2011.

GIRELLI, A. M.; MATTEI, E. **Application of immobilized enzyme reactor in on-line high performance liquid chromatography: A review**. *Journal of Chromatography B* 819: 3-16, 2005.

GUISAN, J. M. **Immobilization of enzymes and cells**. 2nd ed., Institute of Catalysis, CSIC Campus UAM–Cantoblanco- Madrid, Spain, 2006.

HARA, P.; MIKKOLA, J. P.; MURZIN, D. Y.; KANERVA, L. T. **Supported ionic liquids in *Burkholderia cepacia* lipase-catalyzed asymmetric acylation**. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 67: 129-134, 2010.

HOMAEI, A.A.; SARIRI, R.; VIANELLO, F.; STEVANATO, R. **Enzyme immobilization: an update**. *J. Chem. Biol.* 6: 185–205, 2013.

HOU, C.; QI, Z.; ZHU, H. **Preparation of Core-shell Magnetic Polydopamine/Alginate Biocomposite for *Candida rugosa* lipase Immobilization**. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 128: 544-551, 2015.

IDRIS, A.; BUKHARI, A. **Immobilized *Candida antarctica* lipase B: Hydration, stripping off and**

application in ring opening polyester synthesis. *Biotechnol. Adv.* 30 (3): 550–563, 2012.

KALANTARI, M.; YU, M.; YANG, Y.; STROUNINA, E.; GU, Z.; HUANG, X.; ZHANG, J.; SONG, H.; YU, C. **Tailoring mesoporous-silica nanoparticles for robust immobilization of lipase and biocatalysis.** *Nano Research* 10 (2): 605–617, 2017.

KANG, Y.; HE, J.; GUO, X.; GUO, X.; SONG, Z. **Influence of pore diameters on the immobilization of lipase in SBA-15.** *Industry and Engineering Chemistry Research* 46: 4474–4479, 2007.

KATO, K.; NAKAGAKI, S.; NISHIDA, M.; HIRAO, K. **Enzyme encapsulation in silica particles prepared using enzyme-assisted sol-gel reactions in ionic liquids.** *Journal of the Ceramic Society of Japan.* 119 (2): 140-143, 2011.

KENNEDY, J.F.; CABRAL, J.M.S. **Enzyme Technology.** In: *Biotechnology – A Comprehensive Treatise in 8 vol.* Edited by H.J.REHM and G.REED: v.7 Editor John F. Kennedy, Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft., pp. 347- 404, 1987.

KHARRAT, N.; ALI, Y. B.; MARZOUK, S.; GARGOURI, Y.-TALEL; CHAABOUNI, M. **Immobilization of *Rhizopus oryzae* Lipase on silica aerogels by adsorption: Comparison with free enzyme.** *Process Biochemistry* 46: 1083 - 1089, 2011.

KOPP, W.; SILVA, F. A.; LIMA, L. N.; MASUNAGA, S. H.; TARDIOLI, P. W.; GIORDANO, R. C.; ARAÚJO-MOREIRA, F. M.; GIORDANO, R. L. C. **Synthesis and characterization of robust magnetic carriers for bioprocess applications.** *Mater. Sci. Eng. B* 193: 217–228, 2015.

LEVANDOSKI; K. L. D.; FICANHA; A. M M.; ANTUNES, A.; DALLAGO, R. M.; MIGNONI M. L. **Imobilização da lipase cal b em xerogel obtido pela técnica sol-gel Utilizando líquido iônico como aditivo.** *Perspectiva, Erechim.* 39 (147): 51-60, 2015.

MAHMOD, S. S.; YUSOF, F.; JAMI, M. S.; KHANAHMADI, S. **Optimizing the preparation conditions and characterization of a stable and recyclable cross-linked enzyme aggregate (CLEA)-protease.** *Bioresour. Bioprocess.* 3: 3, 2016.

MAJEWSKI, M. B.; HOWARTH, A. J.; Li, P.; WASIELEWSKI, M. R.; HUPPAB, J T.; FARHA, O. K. **Enzyme encapsulation in metal-organic frameworks for applications in catalysis.** *The Royal Society of Chemistry: CrystEngComm*, 2017.

MANOEL, E. A.; JOSÉ, C. S.; FREIRE, D. M. G.; RUEDA, N.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. **Immobilization of lipases on hydrophobic supports involves the open form of the enzyme.** *Enzyme and Microbial Technology* 71: 53–57, 2015.

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 Techonology* 40: 1451-1463, 2007.

MENDES, A.A.; DE CASTRO, H.F.; GIORDANO. R.L.C.. **Triagem de suportes orgânicos e protocolos de ativação na imobilização e estabilização de lipase de *Thermomyces lanuginosus*.** *Química Nova* 36: 245-251, 2013.

MILETIC, N.; NASTASOVIC, A.; LOOS, K. **Immobilization of biocatalysts for enzymatic polymerizations: Possibilities, advantages, applications.** *Bioresource Technology* 115: 126–135, 2012.

MONDAL, K.; MEHTA, P.; MEHTA, B. R.; VARANDANI, D.; GUPTA, M. N. **A bioconjugate of *Pseudomonas cepacia* lipase with alginate with enhanced catalytic efficiency.** *Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics* 1764: 1080-1086, 2006.

- MUSSATO, S.I.; AGUILAR, C.N.; RODRIGUES, L.R. TEXEIRA, J.A. **Fructooligosaccharides and β -fructofuranosidase production by *Aspergillus japonicus* immobilized on lignocellulosic materials.** *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 59: 76–81, 2009.
- OLIVEIRA, M. V. S.; DA RÓS, P. C. M.; MATTEDI, S.; CASTRO, H. F.; SOARES, C. M. F.; LIMA, A. S. **Transesterification of babassu oil catalyzed by *Burkholderia cepacia* encapsulated in sol-gel matrix employing protic ionic liquid as an additive.** *Acta Scientiarum. Technology* 36 (3): 445-451, 2014.
- OZTURK, T. K.; KILINC, A. **Immobilization of lipase in organic solvent in the presence of fatty acid additives.** *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 67: 214–218, 2010.
- PAIVA, A. L.; BALCÃO, V. M.; MALCATA, F. X.; **Kinetics and mechanics of reactions catalyzed by immobilized lipases.** *Enzyme and Microbial Technology* 27:187-204, 2000.
- PEREIRA, M. G.; FACCHINI, F. D. A.; POLIZELI, A. M.; VIVI, A. C.; JORGE, J. A.; PESSELA, B. C.; FÉRNANDEZ-LORENTE, G.; GUISAN, J. M.; POLIZELI, M. L. T. M. **Stabilization of the lipase of *Hypocrea pseudokoningii* by multipoint covalent immobilization after chemical modification and application of the biocatalyst in oil hydrolysis.** *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 121: 82–89, 2015.
- 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* 94: 57– 62, 2013.
- RODRIGUES, J.; PERRIER, V.; LECOMTE, J.; DUBREUCQ, E.; FERREIRA-DIAS, S. **Biodiesel production from crude jatropha oil catalyzed by immobilized lipase/acyltransferase from *Candida parapsilosis* in aqueous médium.** *Bioresource Technology* 218: 1224–1229, 2016.
- RODRIGUES, R. C.; BERENQUER-MURCIA, Á.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. **Coupling chemical modification and immobilization to improve the catalytic performance of enzymes.** *Adv Synth Catal*: 353: 2216–2238, 2011.
- RUZENE, D.S.; SILVA, D.P.; SOARES, C. M. F.; LIMA, A. S.; COSTA, D. M.; CABRERA-PADILLA, R.Y.; CASTRO, R. S. S.; SOUZA, E. R.; TEIXEIRA, J. A. C.; QUEISSADA, D. D. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR1020140013156, data de depósito: 20/01/2014, título: “**UTILIZAÇÃO DE SABUGO DE MILHO COMO SUPORTE PARA O PROCESSO DE IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES**”, Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial, Brasil, 2014.
- SHELDON, R. A. **Characteristic features and biotechnological applications of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs).** *Appl Microbiol Biotechnol* 92: 467–477, 2011.
- SHELDON, R. A. **Enzyme immobilization: the quest for optimum performance.** *Adv Synth Catal* 349: 1289–1307, 2007.
- SIMÕES, A. S.; MORI, R. Y.; FARIA, R.; CASTRO, H. F. **Desempenho da Matriz Híbrida SiO₂-Quitosana na Imobilização da Lipase Microbiana de *Candida rugosa*.** *Química Nova* 34: 33-38, 2011.
- SOARES, C.M.F.; SANTOS, O.A.; CASTRO, H.F.; MORAES, F.F.; ZANIN, G.M. **Characterization of sol-gel encapsulated lipase using tetraethoxysilane as precursor.** *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 39: 69–76, 2006.
- TORRES R.; ORTIZ C.; PESSELA B.C.C.; PALOMO J.M.; MATEO C.; GUISAN JM.; FERNANDEZ-LAFUENTE R. **Improvement of the enantioselectivity of lipase (fraction B) from *Candida antarctica* via adsorption on polyethylenimine-agarose under different experimental conditions.** *Enzyme and Microbial Technology* 39: 167–71, 2006.

- VAIDYA, B. K.; INGAVLE, G. C.; PONRATHNAM, S.; KULKARNI, B.D.; NENE, S. N. **Immobilization of *Candida rugosa* lipase on poly(allyl glycidyl ether-co-ethylene glycol dimethacrylate) macroporous polymer particles.** *Bioresource Technology* 99: 3623-3629, 2008.
- VISHWANATH, S.; BHATTACHARYYA, D.; HUANG, W.; BACHAS, L. G. **Site-Directed and Random Enzyme Immobilization on Functionalized Membranes: Kinetic Studies and Models.** *Journal of Membrane Science*. 108: 1-13, 1995.
- WANG, Y.; HSIEH, Y.L. **Immobilization of lipase enzyme in polyvinyl alcohol (PVA) nanofibrous membranes.** *Journal Membrane Science* 309: 73 - 81, 2008.
- YUSOF, F.; KHANAHMADI, S.; AMID, A.; MAHMOD, S. S. **Cocoa pod husk, a new source of hydrolase enzymes for preparation of cross-linked enzyme aggregate.** *SpringerPlus* 5: 57, 2016.
- ZARCULA, C.; CROITORU, R.; CORÎCI, L.; CSUNDERLIK, C.; PETER, F. **Improvement of Lipase Catalytic Properties by Immobilization in Hybrid Matrices.** *World Academy of Science, Engineering and Technology* 52: 179 - 184, 2009.
- ZHANG, B.; WENG, Y.; XU, H.; MAO, Z. **Enzyme immobilization for biodiesel production.** *Appl Microbiol Biotechnol* 93:61–70, 2012.
- ZHAO, K.; CAO, X.; DI, Q.; WANG, M.; CAO, H.; DENG, L.; LIU, J.; WANG, F.; TAN, T. **Synthesis, characterization and optimization of a two-step immobilized lipase.** *Renewable Energy* 103: 383-387, 2017.
- ZHAO, X.; OI, F.; YUAN, C.; DU, W.; LIU, D. **Lipase-catalyzed process for biodiesel production: Enzyme immobilization, process simulation and optimization.** *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 44:182–197, 2015.
- ZHU, X.; ZHOU, T.; WU, X.; CAI, Y.; YAO, D.; XIE, C.; LIU, D. **Covalent immobilization of enzymes within micro-aqueous organic media.** *Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic* 72: 145 – 149, 2011.
- ZIVKOVIC, L. T. I.; ZIVKOVIC, L. S.; BABIC, B. M.; KOKUNESOSKI, M. J.; JOKIC, B. M.; KARADZIC, I. M. **Immobilization of *Candida rugosa* lipase by adsorption onto biosafe meso/macroporous silica and zirconia.** *Biochemical Engineering Journal* 93: 73–83, 2015.

SOBRE O ORGANIZADOR

ALBERDAN SILVA SANTOS é Professor associado das faculdades de Química e Biotecnologia da UFPA; É Engenheiro Químico graduado pela UFPA; É Mestre em Química e Biotecnologia pelo Instituto de Química e Biotecnologia da UFPA; É Doutor em Bioquímica (Biotransformações com ênfase em oxidações microbiológicas) pelo Instituto de Química da UFRJ. Realizou Estágio pós-doutoral no Departamento de Biotecnologia do Instituto de Agroquímica e Tecnologia de Alimentos - IATA de Valencia, na Espanha. Atua no ensino de graduação e Pós-graduação no qual orienta Mestrandos e Doutorandos. Coordena projetos de cunho acadêmico-científico nos Laboratórios de Investigação Sistemática em Biotecnologia e Biodiversidade Molecular da UFPA, em áreas estratégicas como: Biotransformações; produção de enzimas; desenvolvimento de processos biotecnológicos no aproveitamento de resíduos agroindustriais para a produção de biomoléculas de interesse médico, cosméticas e farmacêutica; produção de biomoléculas a partir de cultivo de micro-organismos e cultivo de células vegetais. Aplica técnicas avançadas de Metabolômica e Lipidômica (CG/EM, LC/MS) na investigação metabólica de plantas e micro-organismos. Contribuiu na criação do curso de graduação e do programa de pós-graduação em Biotecnologia da UFPA. Foi o 1º Diretor da Faculdade de Biotecnologia da UFPA no período de 2009-2011. Atuou como vice-coordenador protempore do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da UFPA. Possui diversas publicações nas áreas da Química e Biotecnologia, assim como patentes. Recebeu a primeira Carta Patente na UFPA em dezembro de 2013. É pioneiro na otimização de processo de produção de metabólitos secundários e enzimas em cultura de células vegetais e de micro-organismos na Região Norte do Brasil.

Agência Brasileira do ISBN
ISBN 978-85-85107-47-5

