

# Série Tecnologia Ambiental

## Potencial Biotecnológico do Uso de Micro-organismos Imobilizados em Gel de Alginato de Cálcio

Ellen Cristine Giese

# **SÉRIE TECNOLOGIA AMBIENTAL**

**Potencial Biotecnológico do Uso de Micro-organismos Imobilizados em Gel de Alginato de Cálcio**

**Ellen Cristine Giese**

## **PRESIDÊNCIA DA REPÚBLICA**

**Dilma Vana Rousseff**

Presidente

**Michel Miguel Elias Temer Lulia**

Vice-Presidente

## **MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO**

**Celso Pansera**

Ministro de Estado da Ciência, Tecnologia e Inovação

**Emília Maria Silva Ribeiro Curi**

Secretária-Executiva

**Adalberto Fazzio**

Subsecretário de Coordenação das Unidades de Pesquisa

## **CETEM – CENTRO DE TECNOLOGIA MINERAL**

**Fernando Antonio Freitas Lins**

Diretor

**Arnaldo Alcover Neto**

Coordenador de Análises Minerais

**Claudio Luiz Schneider**

Coordenador de Processos Minerais

**Durval Costa Reis**

Coordenador de Administração

**Cosme Antonio de Moraes Regly**

Coordenador de Planejamento, Gestão e Inovação

**Francisco Wilson Hollanda Vidal**

Coordenador de Apoio Tecnológico às Micro e Pequenas Empresas

**Ronaldo Luiz Corrêa dos Santos**

Coordenador de Processos Metalúrgicos e Ambientais

# **SÉRIE TECNOLOGIA AMBIENTAL**

ISSN 0103-7374

ISBN 978-85-8261-029-9

**STA - 81**

## **Potencial Biotecnológico do Uso de Micro-organismos Imobilizados em Gel de Alginato de Cálcio**

**Ellen Cristine Giese**

DSc. em Química pela Universidade Estadual de  
Londrina. Tecnologista Pleno do CETEM/MCTI.

**CETEM/MCTI**

**2015**

## **SÉRIE TECNOLOGIA AMBIENTAL**

**Luis Gonzaga Santos Sobral**

Editor

**Andréa Camardella de Lima Rizzo**

Subeditora

### **CONSELHO EDITORIAL**

Mariza Bezerra de M. Monte (CETEM), Paulo Sergio M. Soares (CETEM), Saulo Rodrigues P. Filho (CETEM), Sílvia Gonçalves Egler (CETEM), Vicente Paulo de Souza (CETEM), Antonio Carlos A. da Costa (UERJ), Fátima Maria Z. Zotin (UERJ), Jorge Rubio (UFRGS), José Ribeiro Aires (PETROBRÁS), Luis Enrique Sánches (EPUSP) e Virginia S. Ciminelli (UFMG).

A Série Tecnologia Ambiental divulga trabalhos relacionados ao setor minerometalúrgico, nas áreas de tratamento e recuperação ambiental, que tenham sido desenvolvidos, ao menos em parte, no CETEM.

O conteúdo desse trabalho é de responsabilidade exclusiva do(s) autor(es).

**Valéria Cristina de Souza**

Coordenação Editorial

**João Henrique de Castro Rocha**

Programação Visual

**Valéria Cristina de Souza**

Editoração Eletrônica

**Andrezza Milheiro**

Revisão

---

Giese, Ellen Cristine

Potencial biotecnológico do uso de micro-organismos imobilizados em gel de alginato de cálcio / Ellen Cristine Giese \_\_Rio de Janeiro: CETEM/MCTI, 2015.

47p. (Série Tecnologia Ambiental, 81)

1. Imobilização celular. 2. Alginato de cálcio. 3. Biohidrometalurgia. I. Centro de Tecnologia Mineral. II. Título. III. Série.

CDD – 660.2

---

# SUMÁRIO

RESUMO _____	7
ABSTRACT _____	8
1   BIOPROCESSOS _____	9
1.1   Introdução _____	9
1.2   Uso de Células Imobilizadas em Bioprocessos __	11
1.3   Vantagens do Uso de Biocatalisadores Imobilizados _____	13
2   MÉTODOS DE IMOBILIZAÇÃO CELULAR _____	15
2.1   Ligação ao Suporte _____	15
2.2   Floculação _____	16
2.3   Contenção em Membranas _____	17
2.4   Aprisionamento em Matriz Polimérica _____	17
3   IMOBILIZAÇÃO CELULAR EM GEL DE ALGINATO DE CÁLCIO _____	19
3.1   Mecanismo de Imobilização Celular _____	19
3.2   Aplicações dos Biocatalisadores Imobilizados em Processos Biotecnológicos _____	22
4   CONSIDERAÇÕES FINAIS _____	34
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS _____	35



## **RESUMO**

A imobilização celular consiste em um processo pelo qual micro-organismos, células ou enzimas são confinados através de interações físicas ou químicas em uma matriz, ou fixados na superfície do agente imobilizador. A imobilização celular visa preservar a atividade metabólica e/ou catalítica das células vivas ou enzimas com a intenção de aumentar a produtividade dos bioprocessos envolvidos e de diminuir os custos das operações laboratoriais e, principalmente, industriais. As técnicas de imobilização celular mais comumente utilizadas, são descritas como naturais, por ocorrerem de forma espontânea como na formação de biofilmes ou adesão; ou artificiais, por inclusão em matrizes poliméricas como o alginato de cálcio. Avanços recentes nas técnicas de imobilização celular têm sido descritos na literatura, resultando em biocatalisadores com potencial aplicação em diferentes áreas como a farmacêutica, alimentícia, agroindústria, assim como no setor mineral, especialmente nos processos de recuperação ambiental envolvidos. Esta revisão bibliográfica realiza uma abordagem sobre as diferentes técnicas de imobilização celular, com ênfase no uso de células microbianas imobilizadas em gel de alginato de cálcio em processos biotecnológicos dos setores industriais emergentes. O uso de biocatalisadores imobilizados em processos biohidrometalúrgicos também está descrito.

### **Palavras-chave**

imobilização celular, gel de alginato de cálcio, bioprocessos, indústria mineral, biohidrometalurgia.

## **ABSTRACT**

The cell immobilization is a process whereby microorganisms, cells or enzymes are confined in a matrix by physical or chemical interactions, or attached to the surface of the immobilizing agent. Cell immobilization aims at maintaining the metabolic and/or catalytic activity of living cells or enzymes as an attempt of increasing the productivity of bioprocesses involved and decrease costs of laboratory and mainly industrial operations. Cell immobilization techniques most commonly used are described as natural, to occur spontaneously as the formation of biofilms or surface adhesion; or artificial, for inclusion in polymer matrices such as calcium alginate. Recent advances in cell immobilization techniques have been described in the literature, resulting in biocatalysts with potential application in different areas such as pharmaceutical, food, agro-industry and also in the mining sector, especially in the processes where environmental recovery is involved. This bibliographic review accomplishes a discussion of different cell immobilization techniques, with emphasis on the use of microbial cells immobilized in calcium alginate gel in biotechnological processes in emergent industrial sectors. The use of immobilized biocatalysts in biohydrometallurgical processes is also described.

### **Keywords**

cell immobilization, calcium alginate gel, bioprocess, mining industry, biohydrometallurgy.

## 1 | BIOPROCESSOS

### 1.1 | Introdução

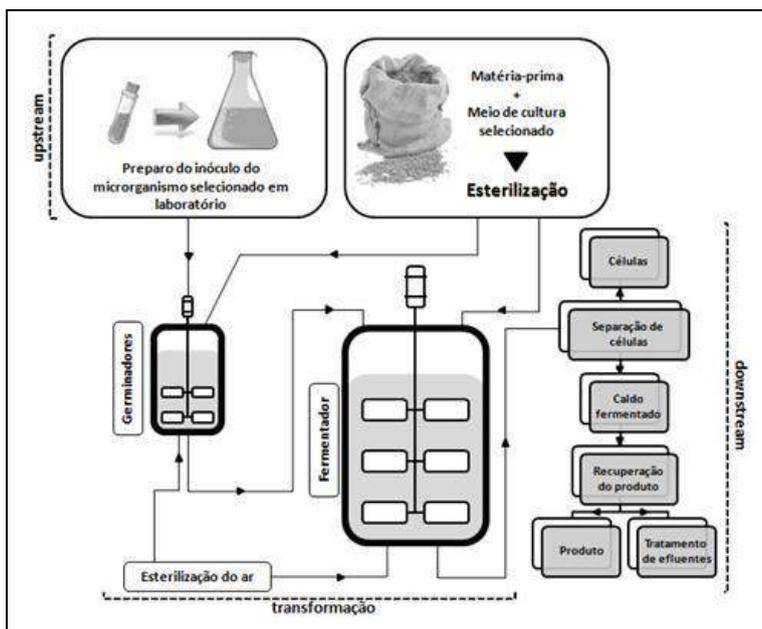
Os processos biotecnológicos compreendem um conjunto de operações que viabilizam a aplicação industrial de reações ou vias biológicas mediadas por células vivas de animais, plantas, micro-organismos ou enzimas sob condições controladas (SHULER; KARGI, 2002).

Diferentes micro-organismos têm sido amplamente utilizados na produção de substâncias de interesse comercial, como enzimas, antibióticos, gomas, ácidos orgânicos, solventes, e biocombustíveis por processos fermentativos. Dentre os processos biotecnológicos também se destacam os bioprocessos nos quais o produto é o próprio micro-organismo, como a levedura de panificação e os inoculantes agrícolas, assim como as células microbianas utilizadas em processos de biotransformação na produção de esteroides, aromas e fragrâncias, entre outros (BORZANI *et al.* 2001; PEREIRA JR. *et al.* 2008).

Os processos fermentativos são definidos como um conjunto de operações que incluem desde o tratamento da matéria-prima e o preparo dos meios de propagação e produção, até a biotransformação do substrato em produto por rota bioquímica, sua separação e purificação. A Figura 1 ilustra as principais etapas de um bioprocessos conduzido por micro-organismos.

De maneira geral, os bioprocessos podem ser divididos em três estágios: 1) etapa denominada de à montante (upstream), a qual envolve o preparo do inóculo e da matéria-prima; 2) transformação, em que o micro-organismo é colocado em

contato direto com o substrato e ocorre a formação de produtos oriundos das reações bioquímicas favorecidas pelas condições do processo e, 3) etapa de jusante (downstream), onde o produto formado é separado, recuperado e purificado, quando necessário.



**Figura 1.** Ilustração das principais etapas de um processo fermentativo industrial genérico.

Os micro-organismos utilizados nos processos fermentativos devem apresentar elevada eficiência na conversão do substrato em produto de interesse e permitir o acúmulo do mesmo no meio de cultivo, mantendo o seu comportamento fisiológico intacto. Para tanto, a imobilização das células microbianas vem sendo utilizada como uma alternativa para elevar a atividade fermentativa, principalmente por promover a

melhor adaptação das células ao meio de cultivo e proporcionar o uso de maiores densidades celulares no processo (CANILHA *et al.* 2006).

## 1.2 | Uso de Células Imobilizadas em Bioprocessos

O estado morfológico de fungos, leveduras e bactérias durante o processo fermentativo exerce influência direta na obtenção dos produtos de interesse, principalmente pelo fato do uso dos micro-organismos na forma imobilizada contribuir para a diminuição do tempo de cultivo e para o aumento do rendimento do processo (FENG *et al.* 2003).

Uma vez que fungos e leveduras apresentam estados morfológicos bastante complexos em cada etapa do processo fermentativo, o confinamento físico ou químico das células microbianas em uma região definida permite adequar suas estruturas morfológicas aos processos bioquímicos de interesse de maneira que seja preservada a atividade catalítica celular. As células retidas em estruturas insolúveis permanecem em uma região específica dos biorreatores e facilitam as etapas de *upstream*, transformação e *downstream* (KOURKOUTAS *et al.* 2004; PRASAD *et al.* 2005; REIS *et al.* 2013).

Assim, diferentes espécies microbianas têm sido utilizadas como biocatalizadores imobilizados em processos fermentativos na produção de pigmentos (GARBAYO *et al.* 2003), solventes (WU *et al.* 2015), proteínas (PARASCANDOLA *et al.* 2006), gomas (BERGMAIER *et al.* 2005), enzimas (BICKERSTAFF JR. 1997) e bebidas como vinhos e leite fermentado (KOURKOUTAS *et al.* 2004; GARCÍA-MARTINEZ *et al.* 2015), entre outros.

Dentre os bioprocessos destacam-se, também, os processos bioquímicos nos quais não ocorre a formação de um produto direto, como a biorremediação, o tratamento de resíduos ou efluentes urbanos e industriais, e recuperação de metais, entre outros (MALAJOVICH, 2012; RIZZO *et al.* 2014).

No caso do tratamento de efluentes, o uso de reatores anaeróbios em batelada sequencial com biomassa imobilizada vem sendo amplamente estudado para aplicação na remoção de DQO (demanda química de oxigênio). Nestes reatores, a imobilização da biomassa microbiana utilizada no processo tende a melhorar a retenção de sólidos e a eliminar a etapa de sedimentação, com conseqüente redução do tempo de operação (RATUSZNEI *et al.* 2000; 2001).

Outro exemplo bastante atual é o uso de biossorventes nas operações de tratamento de resíduos líquidos. Os métodos convencionais de tratamento (precipitação química, floculação, coagulação, flotação, troca iônica) não são suficientemente eficientes quando utilizados no tratamento de efluentes muito diluídos. O uso de células microbianas mortas como biossorvente vem alcançando bons resultados, pois além da capacidade de adaptação de alguns micro-organismos a uma diversidade de poluentes, os mesmos podem influenciar na mobilidade dos metais em meio aquoso. O uso de biocatalisadores imobilizados vem sendo utilizado na remoção de fosfato de águas residuais por microalgas como, por exemplo, do gênero *Chlorella*, imobilizadas em diferentes matrizes (ROBINSON; WILKINSON, 1994; INFANTE *et al.* 2013). A imobilização celular em materiais sólidos e de baixo custo também tem sido cada vez mais explorada nos processos de biossorção e adsorção para a remoção de corantes de efluentes têxteis (LIN *et al.* 2012).

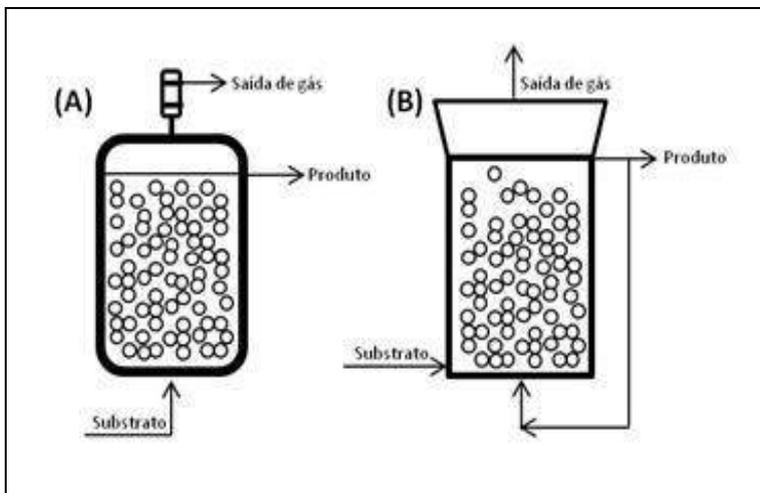
### 1.3 | Vantagens do Uso de Biocatalisadores Imobilizados

As principais vantagens do uso de células imobilizadas sobre o uso de células livres nos diferentes processos biotecnológicos consistem na capacidade de operação na presença de uma maior densidade celular, no aumento da estabilidade e do tempo de atividade do biocatalisador, assim como a maior afinidade pelo substrato e maior tolerância às altas concentrações de compostos tóxicos ao crescimento microbiano, uma vez que a matriz de imobilização resulta, geralmente, na maior proteção das células (COVIZZI *et al.* 2007).

O uso dos biocatalisadores imobilizados favorece, ainda, os processos fermentativos contínuos principalmente por eliminar a necessidade de adaptação dos micro-organismos em bateladas sucessivas de fermentação, diminuição do risco de contaminação, e por apresentar fácil recuperação do produto final sem a formação de subprodutos, o que determina a diminuição de custos e tempo de produção (DURAN; BAILEY, 1986; CANILHA *et al.* 2006). A extração do produto se torna mais eficiente pelo uso de células imobilizadas por eliminar a necessidade da retirada de biomassa ou reciclo. O micro-organismo imobilizado pode ser regenerado e reutilizado em bioprocessos subsequentes sem a necessidade de remoção dos mesmos dos tanques fermentativos ou reatores (SOUZA, 2002; COVIZZI *et al.* 2007).

No caso dos processos fermentativos, o maior desempenho dos biorreatores é proveniente da alta densidade de células microbianas fixadas no suporte escolhido. Os principais tipos

de biorreatores com células imobilizadas podem ser reatores de leito fixo e leito fluidizado (Figura 2), os quais podem sofrer modificações para melhorar a transferência de massa e demais parâmetros das condições de cultivo.

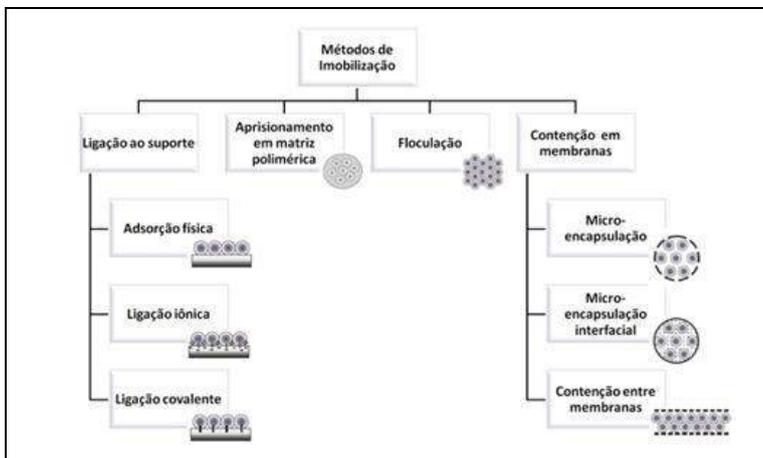


**Figura 2.** Tipos de biorreatores com células imobilizadas empregados (A) leito fixo, (B) leito fluidizado.

O leito fixo de biocatalizadores imobilizados, disposto verticalmente, tem sido o tipo de biorreator mais utilizado nos processos fermentativos, sendo normalmente operado com células imobilizadas em esferas de gel hidrofílico, uma vez que o uso de partículas imobilizadas pelo método de adsorção pode apresentar dificuldades em processos contínuos de longa duração, devido ao crescimento celular dentro do leito (PRADELLA, 2001).

## 2 | MÉTODOS DE IMOBILIZAÇÃO CELULAR

Os diferentes métodos de imobilização celular podem ser divididos em quatro categorias (Figura 3), de acordo com a localização das células na matriz e a natureza do suporte.



**Figura 3.** Diferentes métodos de imobilização celular de micro-organismos.

De maneira geral, o suporte deve apresentar uma grande superfície de contato, de preferência contendo a presença de grupos funcionais que ocasionem melhor adesão celular serem de fácil manuseio e reutilizáveis, e devem também garantir a viabilidade celular e a estabilidade dos processos nos quais são empregados.

### 2.1 | Ligação ao Suporte

A adesão microbiana sobre superfícies sólidas é a maneira mais comum de os micro-organismos estarem presentes na natureza, especialmente sobre rochas e minerais, e está

diretamente relacionada à atividade microbiana e sua sobrevivência (EHRlich & NEWMAN, 2009). Neste modelo, a ligação das células microbianas consiste em um processo físico-químico resultante das propriedades hidrofílicas e/ou hidrofóbicas da superfície celular, o qual é dependente do pH e força iônica da solução em que se encontra e também da composição da superfície do suporte (BOS *et al.* 1999).

O método de imobilização por meio de ligação a superfícies é o que apresenta menor custo operacional, porém, tem como desvantagem a perda de biomassa microbiana e consequente estabelecimento do equilíbrio entre células livres e imobilizadas no sistema, uma vez que não há uma barreira física de contenção celular. Os suportes sólidos mais utilizados são materiais celulósicos (DEAE-celulose, pedaços de madeira, bagaço-de-cana) e inorgânicos (pérolas de vidro, porcelana, areia). A eficiência deste método de imobilização pode ser melhorada pelo aumento da porosidade do suporte, assim como pelo tratamento dos mesmos com agentes policatiônicos como a quitosana, os quais promoverão o estabelecimento de ligações químicas entre a parede celular e o suporte tratado (TSE; YU, 2003; SUN *et al.* 2006).

## 2.2 | Floculação

A tendência de formação de agregados celulares é observada naturalmente para diferentes espécies fúngicas; porém, pode ocorrer, também, em suspensões bacterianas. A formação de agregados celulares em suspensão é conhecida como floculação, a qual é associada a uma rápida sedimentação de maneira natural, ou na presença de agentes floculantes ou ligantes (KOURKOUTAS *et al.* 2004). A floculação é uma das

técnicas de imobilização mais utilizadas em larga escala, devido ao potencial de formação de agregados celulares nos reatores de leito fixo e fluidizado, assim como em tanques com agitação (FREEMAN; LILLY, 1998).

### **2.3 | Contenção em Membranas**

O método de contenção em membranas ou por barreiras é baseado no uso de membranas pré-formadas como filtros porosos ou no aprisionamento das células microbianas *in situ*, como no caso de microcápsulas ou interface entre dois líquidos imiscíveis. Dentre as membranas sintéticas, geralmente utilizadas destacam-se as poliméricas de microfiltração ou de ultrafiltração, assim como membranas cerâmicas, borrachas de silicone e demais tipos de membranas de troca iônica (EL-MANSI *et al.* 2007).

A contenção em membranas tem como desvantagem a limitação de transferência de massa devido a possibilidade das células se fixarem no suporte como resultado do crescimento microbiano. Porém, a transferência de massa não depende unicamente do tamanho dos poros da membrana, mas, também, de seu caráter hidrofóbico ou hidrofílico (KOURKOUTAS *et al.* 2004).

### **2.4 | Aprisionamento em Matriz Polimérica**

O método de aprisionamento celular em uma matriz polimérica está baseado na difusão artificial das células microbianas, em um complexo molecular rígido ou semi-rígido e, assim, como no método de contenção em membranas, a matriz utilizada pode ser pré-formada ou sintetizada *in situ*. A matriz celular formada

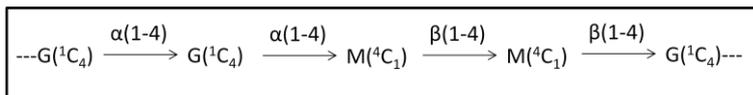
permite ao micro-organismo a transferência de gases e de massa (troca de nutrientes, metabólitos etc.), mesmo que limitada, durante o processo fermentativo, impedindo a difusão das células para o meio de cultivo (NEDOVÍČ; WILLAERT, 2005).

Neste caso, o crescimento microbiano depende da limitação imposta pela porosidade do material, embora o método propicie a formação dos biocatalizadores em formato esférico com maior superfície de contato; e do acúmulo de biomassa no interior da matriz. Os geis comumente usados na formação destas matrizes celulares são ágar, agarose, goma carragenana, alginato, quitosana, álcool polivinílico, entre outros (KOURKOUTAS *et al.* 2004; PARASCANDOLA *et al.* 2006).

A capacidade de transferência de massa dependerá da matriz utilizada no processo de imobilização celular. Por exemplo, a quantidade de oxigênio dissolvido em goma carragenana é estimada na faixa de 0,08 a 0,1 mm<sup>3</sup>, enquanto que em gel de alginato estes valores podem variar entre 0,1 e 0,16 mm<sup>3</sup>. Quando a difusão de oxigênio não é uniforme, as células da superfície do gel migram para o meio externo, ocasionando o rompimento da matriz (OGBONNA *et al.* 2000). Para minimizar estes efeitos, faz-se necessário otimizar o tamanho da partícula e a concentração celular a serem utilizadas no processo. O método de aprisionamento das células microbianas em gel é o mais utilizado pela sua facilidade, baixa toxicidade e alta capacidade de retenção celular.

### 3 | IMOBILIZAÇÃO CELULAR EM GEL DE ALGINATO DE CÁLCIO

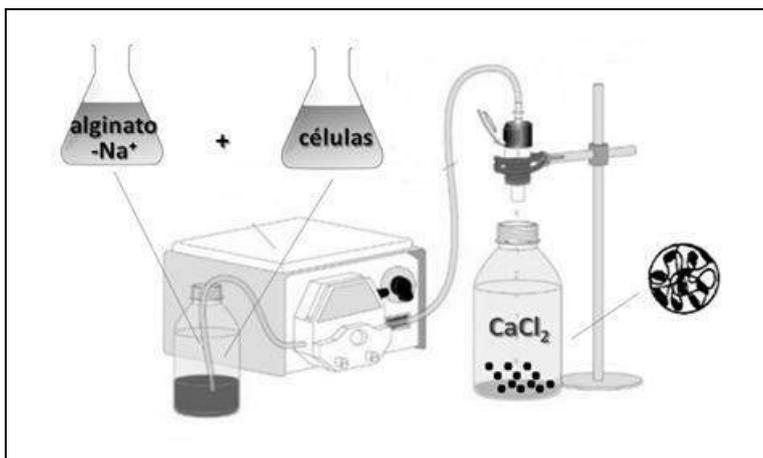
O alginato é um polissacarídeo linear constituído por unidades de ácido manurônico ligado por ligações glicosídicas do tipo  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) e, também, por unidades de ácido gulurônico, unidas por ligações do tipo  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4) (Figura 4). Estes polissacarídeos foram isolados, primeiramente, de algas marrons pertencentes aos gêneros *Laminaria* e *Macrocystis*, sendo, também produzidos por bactérias dos gêneros *Pseudomonas* e *Azotobacter*, sendo que a proporção de  $\beta$ -manurato e  $\alpha$ -guluronato depende da origem do alginato (GUO *et al.*, 2006).



**Figura 4.** Estrutura química do alginato de sódio, G = ácido gulurônico, M = ácido manurônico.

#### 3.1 | Mecanismo de Imobilização Celular

O principal mecanismo de imobilização por aprisionamento em matriz polimérica consiste na mistura de células microbianas com um composto polimérico com cargas negativas (alginato, pectato). A formação das esferas de alginato de cálcio ocorre através de uma reação denominada gelificação iônica. Para tanto, uma suspensão de células microbianas em solução de alginato de sódio é gotejada em uma solução iônica de concentração adequada, geralmente  $\text{CaCl}_2$  (Figura 5) para a formação do gel de diferente porosidade, de acordo com as condições pré-otimizadas (CULPI *et al.* 2010).



**Figura 5.** Esquema do procedimento de imobilização celular em alginato de cálcio

A obtenção da matriz de alginato de cálcio para imobilização celular inicia-se pela preparação de uma solução de alginato de sódio de 2 a 4% (m/v), em água destilada ou solução tampão. A suspensão deve ser agitada por cerca de 6 horas em agitador magnético ou deixada durante a noite em agitador orbital em temperatura ambiente. Caso a autoclavação seja a metodologia de esterilização escolhida, o pH da solução de alginato de sódio deve ser ajustado para valores próximos de 7,0 ou 8,0 para evitar degradação.

A solução estéril de alginato de sódio é, então, misturada com um volume igual de suspensão celular, a qual deve ser previamente preparada em solução tampão isotônica, evitando-se íons fosfato, citrato, EDTA e cátions divalentes. As pérolas de gel de alginato de cálcio serão, então, formadas através do gotejamento da mistura das soluções de alginato de sódio e células em suspensão em uma solução contendo de 20

a 100 mM de íons  $\text{Ca}^{2+}$  (Figura 5). As esferas de alginato formadas devem permanecer em solução de  $\text{CaCl}_2$  de 5 a 30 minutos para a completa finalização do processo (THU *et al.* 1996).

A ligação dos íons  $\text{Ca}^{2+}$  aos resíduos de guluronato resulta na formação de esferas de gel de alginato consistentes e insolúveis. As características dos biocatalizadores imobilizados formados dependerão da velocidade de fluxo, densidade da solução de polímero e concentração da solução iônica na qual o gel será formado (WANG *et al.* 2005).

As propriedades geleificantes do alginato provêm das ligações entre os cátions divalentes e os resíduos de guluronato, as quais favorecem a formação de um gel termoestável. O grau de substituição de íons  $\text{Ca}^{2+}$  depende do tempo de contato entre as esferas formadas e a solução iônica, assim como da acidez desta solução. De maneira geral, a substituição é máxima em pH próximo a neutralidade no tempo de contato de 1 hora na presença de íons  $\text{Ca}^{2+}$  (FUNDUEANU *et al.* 1999).

Dentre as limitações descritas para o uso da matriz de gel de alginato, destaca-se a baixa estabilidade destes geis na presença de componentes do meio de cultivo, como íons fosfato e citrato, os quais podem promover rupturas e a dissolução das esferas formadas. Este problema, algumas vezes, pode ser contornado com o uso de sais de bário, no lugar do  $\text{CaCl}_2$  ou pelo tratamento com quitosana, para aumentar a resistência dos biocatalizadores formados (YOO *et al.* 1996).

## 3.2 | Aplicações dos biocatalisadores imobilizados em processos biotecnológicos

O alginato apresenta propriedades únicas que o torna um produto de grande importância comercial pela sua capacidade de geleificar e espessar soluções, assim como no seu potencial biotecnológico como suporte para a imobilização de enzimas e células. O uso de gel de alginato na imobilização celular é muito versátil e apresenta diferentes aplicações, possibilitando o uso de células vivas ou inativadas em biorreatores possibilitando aplicações inovadoras em diferentes áreas de conhecimento (MÜLLER *et al.* 2011).

O uso de biorreatores operados na presença de células microbianas imobilizadas em gel de alginato de cálcio tem sido descrito na literatura em processos fermentativos de produção de antibióticos, ácidos, edulcorantes, bebidas fermentadas, enzimas, polissacarídeos, entre outros. Os biocatalisadores imobilizados nesta matriz polimérica têm se destacado atualmente por apresentarem aplicações em outras áreas com potencial emergente, como a fermentação alcoólica para a produção de etanol combustível, na recuperação de áreas ambientais degradadas e no setor de mineração, descritos a seguir.

### 3.2.1. Biocombustíveis

A principal aplicação dos biocatalisadores imobilizados na agroindústria está relacionada à produção de biocombustíveis de primeira geração, produzidos a partir da fermentação dos açúcares solúveis da cana-de-açúcar, milho e beterraba. Estudos referentes à eficiência dos processos fermentativos na produção de etanol a partir de células de *Saccharomyces*

*cerevisiae* imobilizadas em alginato de cálcio e outros suportes têm sido extensivamente descritos na literatura (BANGRAK *et al.* 2011; DUARTE *et al.* 2013).

O etanol tem ocupado um lugar de destaque e de grande importância tecnológica, com crescimento anual de 20 % no país, colocando o Brasil como um dos principais produtores de energia alternativa. Outro aspecto relevante é o seu uso como intermediário na síntese do biodiesel, o qual é capaz de substituir o diesel derivado do petróleo (Agência Internacional de Energia). O etanol também é utilizado na produção de hidrogênio para pilhas a combustível (MAIA *et al.* 2007).

Diversos modelos de biorreatores para a produção biotecnológica de etanol vêm sendo descritos na literatura, sendo que a grande maioria envolve o uso de células microbianas livres com o inconveniente de se inocular um número grande de células. O uso da imobilização celular promove o aumento da produção de etanol, uma vez que se mostra como alternativa eficiente para contornar este problema e também diminui a inibição causada pela alta concentração de substrato e de produto formado (retro-inibição) presentes no mosto. A produção de etanol por células imobilizadas em alginato tem sido descrita como promissora por diferentes pesquisadores (JAMAI *et al.* 2001; NAJAFPOUR *et al.* 2004; BANGRAK *et al.* 2011).

Em estudos conduzidos por DUARTE (2011), por exemplo, células de *Saccharomyces cerevisiae* imobilizadas em gel de alginato de cálcio mostrou ser um excelente biocatalizador na produção de etanol, permitindo a reutilização das esferas por oito ciclos de fermentação de aproximadamente 10 horas cada, com rendimento de cerca de 65% quando utilizada sacarose como fonte de carbono.

Processos em escala piloto, utilizando leveduras imobilizadas em alginato de cálcio em reatores de leite fluidizado, foram desenvolvidos no Japão pela empresa Kyowa Hakko Kogyo Co. A planta operou por seis meses contínuos de maneira estável com produção de  $12\text{m}^3/\text{dia}$  com rendimento de cerca de 95% em comparação com o valor teórico (BORZANI *et al.* 2001).

A mesma tecnologia de imobilização tem sido aplicada nos estudos para obtenção de etanol de segunda geração, a partir da fermentação de materiais lignocelulósicos, baseada na obtenção de etanol a partir da fermentação da xilose e arabinose pela levedura *Scheffersomyces stipitis* (MILESSI *et al.* 2013). Atualmente, o micro-organismo mais utilizado na produção de etanol é a *Saccharomyces cerevisiae*, capaz de fermentar as hexoses provenientes dos açúcares solúveis da cana-de-açúcar. Porém, a produção de etanol de segunda geração é baseada no uso dos resíduos lignocelulósicos, sendo essencial o uso de leveduras capazes de fermentar pentoses como a xilose.

### 3.2.2. Biorremediação

Os processos microbianos para remoção de compostos recalcitrantes e metais pesados empregam células vivas, não-vivas, ou ainda biopolímeros como biossorventes. Muitos dos biossorventes são utilizados na forma imobilizada, principalmente quando se trata de grandes volumes de efluentes. Desta forma, a biossorção (uso de células não vivas) e a bioacumulação (uso de células vivas) podem ser considerados métodos viáveis de baixo custo, fácil aplicação e eficientes no tratamento de efluentes (CHOJNACKA, 2010).

O constante crescimento populacional e concomitante aumento da atividade antrópica tornam constante a preocupação com a manutenção dos recursos hídricos, principalmente no que tange à recuperação de águas residuais. O uso de microalgas no tratamento destes efluentes parece ser uma solução eficaz, devido à sua capacidade de assimilar íons fosfatos e, também, à sua capacidade de remoção de metais pesados.

Estudos demonstraram que o emprego de biocatalizadores imobilizados da alga *Chlorella vulgaris* em alginato de sódio apresentam melhor eficiência na remoção de amônio e fosfato em comparação com o uso das células livres (~99% de N e P removidos em três dias de águas residuais provenientes do esgoto doméstico contra 50% de remoção pelas células livres) (LAU *et al.*, 1997). Esta técnica de imobilização celular permite ainda o uso da co-imobilização de duas espécies distintas com o intuito de aumentar a eficiência deste tipo de processo, como no caso da imobilização conjunta de *C. vulgaris* e da bactéria *Azospirillum brasilense* (DE-BASHAN *et al.* 2002).

Bactérias imobilizadas em alginato de cálcio vêm sendo empregadas em processos de biodegradação de pesticidas organofosforados como o coumafós e seus produtos, clorferon e dietiltiofosfato. Os consórcios de bactérias degradadoras imobilizadas apresentaram taxas de detoxificação, na presença destes componentes, cinco vezes maiores quando comparadas com as células livres (HA *et al.* 2009).

Uma maior velocidade de degradação por células imobilizadas em gel de alginato de cálcio foi, também observada na degradação de compostos clorofenólicos. A imobilização celular promoveu a diminuição da fase *lag* de decomposição,

permitindo maior densidade celular no biorreator com menor exposição aos efeitos tóxicos das altas concentrações do composto reaclitrante presente (LEE *et al.* 1996).

### 3.2.3. Indústria mineral

Na indústria mineral, as células imobilizadas de *Acidithiobacillus ferrooxidans* vêm sendo amplamente empregadas nos processos de remoção de sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S) de gases residuais, na dessulfurização de carvão, na lixiviação de sulfetos minerais de metais não-ferrosos e também no tratamento de drenagem ácida de mina (KAHRIZI *et al.* 2008).

#### 3.2.3.1. Biolixiviação

A bactéria gram-negativa *A. ferrooxidans* é acidófila, aeróbia, mesófila, autotrófica e quimiotrófica, sendo capaz de obter energia a partir da oxidação de íons Fe<sup>2+</sup> à Fe<sup>3+</sup>, assim como de compostos reduzidos de enxofre. Este micro-organismo foi a primeira espécie microbiana a ser empregada nos processos de biolixiviação de sulfetos minerais de cobre, sendo atualmente utilizada na solubilização de diferentes metais (DRESHER, 2004).

A biolixiviação é um processo hidrometalúrgico de dissolução de sulfetos minerais pela ação de um grupo de micro-organismos capazes de produzir agentes oxidantes a partir dos constituintes do próprio minério em processo de lixiviação, os quais são, em sua maioria, isolados bacterianos que ocorrem naturalmente em jazimentos contendo sulfetos minerais em lugares propícios à lixiviação natural. (SCHIPPERS, 2007; OLIVEIRA *et al.* 2010).

Os micro-organismos envolvidos nos processos de biolixiviação encontram-se, geralmente, aderidos à superfície dos sulfetos minerais (células sésseis), enquanto uma parte da população microbiana pode ser encontrada dispersa em solução (células planctônicas). O biofilme bacteriano formado, em consequência da adesão celular, é capaz de complexar os íons  $\text{Fe}^{3+}$  e potencializar as reações oxidativas na superfície do sulfeto mineral, promovendo sua dissolução (GIESE, 2014).

Assim, a presença de uma maior concentração de células microbianas na pilha de biolixiviação é um fator importante a ser considerado para eficiência deste processo biohidrometalúrgico. De maneira geral, os micro-organismos são inoculados através de um processo de aglomeração das células microbianas com a amostra mineral a ser lixiviada (OLIVEIRA *et al.* 2010).

O uso do inóculo imobilizado é uma alternativa para reduzir o consumo de soluções ácidas utilizadas na lixiviação, garantindo que uma adesão mais uniforme das células microbianas ao minério, uma vez que o suporte utilizado na imobilização deve garantir que as células bacterianas sejam lixiviadas e colonizem a pilha por completo. A imobilização também contribui para o aumento da tolerância celular a maiores concentrações de metais pesados solubilizados durante o processo de lixiviação microbiana (MARTÍNEZ; PARADA, 2013).

O uso de micro-organismos lixiviantes imobilizados como inóculo de colunas de biolixiviação foi primeiramente descrito como “sementes” (BioSigma Bioleaching Seeds, BBS), as quais contém células imobilizadas de *Acidiphilium* spp., *Leptospirillum* spp., *Sulfobacillus* spp., *Acidithiobacillus* spp., *A. ferrooxidans*,

*A. thiooxidans*, *Acidianus* spp., *Ferroplasma* spp., *Metallosphaera* spp., *Sulfolobus* spp. e *Thermoplasma* spp. A matriz utilizada na patente em questão é composta de alginato de cálcio e íons  $\text{Fe}^{2+}$  (10-40%) e  $\text{Fe}^{3+}$  (60-90%), a qual é capaz de reter  $10^3$  g micro-organismos/g de material imobilizado (MARTÍNEZ; PARADA, 2013).

VAZ *et al.* (2014) observaram que o uso de células imobilizadas de *A. ferrooxidans*-LR em pérolas de vidro, como inóculo de colunas de biolixiviação de minério primário de níquel, apresentou a mesma eficiência que o método convencional de aglomeração, resultando na extração de 17% de níquel após 28 dias de processo contínuo.

### 3.2.3.2. Remoção de sulfeto de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{S}$ ) de gases residuais

O sulfeto de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{S}$ ) está entre os principais agentes contaminantes encontrados na atmosfera, sendo proveniente da atividade microbiana natural ou antrópica, esta última incluindo processamento de alimentos, tratamento de águas residuais, refino do petróleo e gás natural, indústrias petroquímicas, curtumes, fabricação de celulose e papel e processos de compostagem. Uma vez na forma gasosa, o  $\text{H}_2\text{S}$  é facilmente oxidado a dióxido de enxofre ( $\text{SO}_2$ ) que é posteriormente convertido em ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ), o qual pode retornar ao solo na forma de chuva ácida (MAAT *et al.* 2005).

Os reatores de fluxo ascendente do tipo UASB (*Upflow Anaerobic Sludge Blanket*) são muito utilizados no tratamento anaeróbio de efluentes por promoverem uma degradação eficiente da matéria orgânica (DQO ou DBO) na ausência de

oxigênio molecular. Neste caso, os micro-organismos convertem a matéria orgânica presente no efluente em gases como metano ( $\text{CH}_4$ ) e dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ), além de converterem sulfatos em gás sulfídrico ( $\text{H}_2\text{S}$ ) (CHERNICHARO *et al.* 2010).

A remoção de  $\text{H}_2\text{S}$  é baseada em duas etapas: 1) etapa de absorção, na qual os íons  $\text{Fe}^{3+}$  são convertidos em sulfato ferroso e o  $\text{H}_2\text{S}$  é oxidado para sua forma de enxofre elementar e 2) etapa de oxidação biológica, na qual os íons  $\text{Fe}^{2+}$  produzidos na etapa anterior conduzem à formação de  $\text{Fe}^{3+}$  novamente, repetindo-se os ciclos. O uso de um biocatalisador biológico requer condições amenas de temperatura e pressão sem a necessidade de adição de reagentes químicos, diminuindo os custos operacionais (MALHOTRA *et al.* 2002).

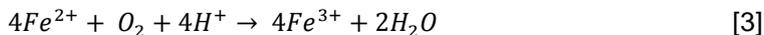
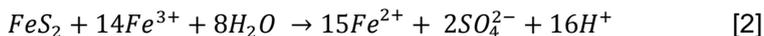
O tratamento biológico de efluentes gasosos pode ser realizado através do uso de biolavadores, biopercoladores e biofiltros, os quais são compostos por micro-organismos capazes de degradar e incorporar poluentes orgânicos ou inorgânicos derivados presentes nos gases. Nestes processos, espécies bacterianas são utilizadas na forma imobilizada, principalmente pela capacidade de formarem biofilmes e preencherem as colunas utilizadas para filtração dos gases (CABRAL, 2003).

Por exemplo, CHUNG *et al.* (1996b) avaliaram o uso de um sistema de biofiltração na presença de células de *Pseudomonas putida* CH11 imobilizadas em alginato de cálcio, sendo que o mesmo apresentou eficiência de 95% de remoção de  $\text{H}_2\text{S}$ . Em outro estudo, um consórcio de *P. putida* CH11 e *Arthrobacter oxydans* CH8, imobilizadas no mesmo suporte, foi utilizado na degradação de  $\text{H}_2\text{S}$  conjuntamente com  $\text{NH}_3$  (CHUNG *et al.* 2001). Taxas de 98% de eficiência na remoção

de  $H_2S$  foram observadas em biofiltros formados por colunas de células de *Thiobacillus thioparus*, imobilizadas em alginato de cálcio (CHUNG *et al.* 1996a) e alginato/quitosana (MAIA, 2003).

### 3.2.3.3. Tratamento de drenagem ácida de mina (DAM)

A drenagem ácida de mina (DAM) é um efluente da mineração proveniente da oxidação natural de sulfetos minerais, em especial a pirita ( $FeS_2$ ), após exposição à umidade e ao oxigênio, na presença ou não de bactérias oxidantes. Este fenômeno pode ser descrito pelas reações citadas abaixo (BORMA; SOARES, 2002), embora as mesmas ocorram de forma similar com outros sulfetos encontrados em rejeitos da mineração.



Em um primeiro momento, os minerais se oxidam espontaneamente pela ação do oxigênio molecular (Equação 1) ou por oxidação indireta pelo íon  $Fe^{3+}$  (Equação 2). A oxidação dos íons  $Fe^{2+}$  (Equação 3) acontece em valores de pH próximos ou acima de 4,5. Em valores maiores de pH, o íon  $Fe^{2+}$  é oxidado a  $Fe^{3+}$  que é, em seguida, precipitado na forma de  $Fe(OH)_3$  (Equação 4). As condições de baixo pH estimulam a reprodução de bactérias acidófilas que catalisam a

transformação do  $\text{Fe}^{2+}$  a  $\text{Fe}^{3+}$  (Equação 3), o que estabelece um ciclo de reações que favorecerão a degradação total desses sulfetos.

O ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) formado dissolve os metais e hidróxidos metálicos presentes no solo, gerando um efluente tóxico composto por arsênio, cádmio, zinco e urânio, entre outros. Esta solução ácida gerada durante a formação da DAM pode alcançar e contaminar corpos hídricos próximos, causando grandes problemas ambientais (RODRIGUEZ, 2010). Devido à capacidade oxidativa e lixiviante das bactérias presentes na DAM, a indústria metalúrgica passou a utilizá-las na extração de metais, como no processo de biolixiviação descrito anteriormente.

Diferentes processos biológicos vêm sendo descritos para o tratamento de DAM, dentre eles a utilização de micro-organismos anaeróbios (como as BRS – bactérias redutoras de sulfato) (BARROS *et al.* 2012), assim como o uso de biorreatores capazes de oxidar os íons  $\text{Fe}^{2+}$  em modo contínuo. A bactéria *A. ferrooxidans* tem sido utilizada como biocatalisador na produção de íons  $\text{Fe}^{3+}$  a partir de  $\text{Fe}^{2+}$  em reatores de leito fixo. Os suportes comumente utilizados nos processos de imobilização nestes processos são carvão ativado e pérolas de vidro, principalmente pela capacidade inerente às bactérias de formarem biofilmes e, conseqüentemente, aumentar a concentração de células microbianas no reator (GIESE, 2014). ZHOU *et al.* (2006) observaram um aumento da produtividade de íons  $\text{Fe}^{3+}$  de cerca de 4 vezes (~2 g/L.h) quando operaram um biorreator em modo contínuo com células imobilizadas de *A. ferrooxidans* em carvão ativado.

O uso de técnicas de aprisionamento em matriz polimérica também tem sido descrito na oxidação de íons  $\text{Fe}^{2+}$ . A biooxidação de íons  $\text{Fe}^{2+}$  em biorreatores de leito fixo, tanto em batelada contínua quanto em batelada repetida, tem sido realizada com o uso de biocatalisadores imobilizados em álcool polivinílico pelo método de PVA-ácido bórico (LONG *et al.* 2004) e em gel de alginato de cálcio (LANCY; TUOVINEN, 1984) ou PVA-alginato de cálcio (YUJIAN *et al.* 2006; YUJIAN *et al.* 2007).

#### 3.2.3.4. Remoção de mercúrio de áreas contaminadas

O processo de recuperação do ouro com o uso de mercúrio elementar ( $\text{Hg}^0$ ), denominado amalgamação, vem sendo utilizado extensivamente na atividade garimpeira desde meados da década de 80. O  $\text{Hg}^0$  é introduzido na fase de beneficiamento do minério, e retirado em balsas de drenagens nas margens dos rios, quando na etapa de recuperação do ouro (MELAMED; VILLAS BÔAS, 2002).

Uma vez disperso no ambiente, o  $\text{Hg}^0$  sofre uma série de transformações químicas que incidem na formação de metilmercúrio ( $\text{CH}_3\text{Hg}$ ), composto este de alta toxicidade e recalcitrância. Quando em contato com ambientes aquáticos, o mesmo pode ser incorporado por peixes e crustáceos e atingir o homem pela cadeia alimentar, causando danos irreversíveis ao sistema nervoso (VERA *et al.* 2007; CASTILHOS; RODRIGUES, 2008).

Uma das formas de diminuir a disponibilidade do  $\text{Hg}^0$  em efluentes líquidos é o uso de biomassa microbiana em processos de biossorção e bioacumulação, como descrito anteriormente, onde o  $\text{Hg}^0$  passa a ser encontrado como nano-partículas no citoplasma e na parede celular microbiana

(SINHA; KHARE, 2012). Dentre estes bioprocessos, destaca-se o uso de microalgas como o *Sargassum* sp. (SOBRAL *et al.* 2006), e bactérias como *Rhodococcus opacus* (ABBUD, 2010) e *Bacillus cereus* (SINHA *et al.*, 2012).

O uso de biocatalizadores imobilizados em gel de alginato de cálcio na bioacumulação de  $\text{Hg}^0$  a partir de efluentes sintéticos vem sendo descrito na literatura tanto com o uso de bactérias como também de espécies fúngicas (KAÇAR *et al.* 2002; SINHA *et al.* 2012). SINHA & KHARE (2012) demonstraram que células imobilizadas de *Enterobacter* sp. em alginato de cálcio promoveram a remoção de 7,3 mg de  $\text{Hg}^0$  por litro de efluente industrial em até 72 h e 5,0 mg de  $\text{HgCl}$  por litro de efluente sintético no mesmo período.

A volatilização de mercúrio por células bacterianas imobilizadas também tem sido descrita. Algumas bactérias são capazes de reduzir enzimaticamente o  $\text{Hg}$  (II) para a forma volátil e menos tóxica do  $\text{Hg}^0$ , sendo, também, uma alternativa para a remediação de áreas contaminadas. ZEROUAL *et al.* (2001) avaliaram diferentes suportes para a imobilização da bactéria *Klebsiella pneumoniae* e aplicação na volatilização de mercúrio. Dentre os suportes testados (alginato, poliacrilamida, vermiculita e pedaços de madeira), a imobilização em alginato de cálcio foi a que apresentou melhor eficiência, resultando em taxas de 89% de volatilização de forma estável em operação contínua durante 10 dias.

## 4 | CONSIDERAÇÕES FINAIS

O uso de biocatalizadores imobilizados, particularmente compostos por células microbianas, é uma alternativa viável em termos econômicos e operacionais a ser empregada nos processos biotecnológicos. Uma vez que busca preservar a atividade metabólica microbiana em um ambiente com alta densidade celular, é eficaz no aumento do rendimento dos bioprocessos envolvidos, seja em processos fermentativos ou na aplicação da biomassa em processos de biorremediação e tratamento de efluentes, entre outros. A imobilização celular utilizando gel de alginato de cálcio como matriz polimérica tem sido uma importante ferramenta em diferentes áreas, incluindo os setores agroindustrial e mineral, por se apresentar como um suporte de baixo custo e boa estabilidade. Apesar de apresentar inúmeras vantagens, os métodos de imobilização celular induzem alterações no crescimento, na fisiologia e no metabolismo de bactérias, leveduras e fungos, sendo necessários estudos criteriosos para o aprimoramento do uso destes tipos de biocatalizadores nos diferentes setores da biotecnologia.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBUD, J. S. Biocaptação de Hg (II) pela bactéria *Rhodococcus opacus*. Tese de Doutorado. Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro. 103f. 2010.
- BANGRAK, P., LIMTONG, S., PHISALAPHONG, M. Continuous ethanol production using immobilized yeast cells entrapped in loof are enforced alginate carriers. *Brazilian Journal of Microbiology*, vol. 42, p. 676-684, 2011.
- BARROS, C. A., RODRIGUES, J. C., BRITTO, G. M., CUNHA, C. D., RIZZO, A. C. L., SOARES, P. S. M. Métodos para tratamento biológico de drenagem ácida de mina - DAM. Série de Tecnologia Ambiental. Rio de Janeiro, CETEM/MCTI. 2012.
- BERGMAIER, D.; CHAMPAGNE, C. P.; LACROIX, C. Growth and exopolysaccharide production during free and immobilized cell chemostat culture of *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M. *Journal of Applied Microbiology*, vol. 98, n° 2, p. 272-284, 2005.
- BICKERSTAFF JR., G. F. Immobilization of Enzymes and Cells. *Methods in Biotechnology*, vol. 1, p 1-11, 1997.
- BORMA, L. S., SOARES, P. S. M. Drenagem ácida e gestão de resíduos sólidos de mineração. In: TRINDADE, R. B. M., FILHO, O. B. (Eds.). *Extração de Ouro: Princípios, Tecnologias e Meio Ambiente*. CETEM/MCT. 2002.
- BORZANI, W., SCHMIDELL, W., LIMA, U.A., AQUARONE, E. (Eds.). *Biotechnology Industrial*, vol. 1, 2 ,3, 4, Edgard Blücher, 1ª edição, São Paulo, 2001.
- BOS, R., VAN DERMEI, H.C., BUSSCHER, H.J., Physico-chemistry of initial microbial adhesive interactions - its mechanisms and methods for study. *FEMS Microbiology Reviews*, vol. 23, n° 2, p. 179-229, 1999.
- CABRAL, F. A. S. Biofiltração para desodorização de reatores anaeróbios. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina. 81 p. 2003.

- CANILHA, L., CARVALHO, W., SILVA, S. S. Biocatalisadores imobilizados. Revista Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento, nº 36, p. 48-57.
- CASTILHOS, Z. C., RODRIGUES, A. P. C. Avaliação da potencial acumulação de mercúrio em peixes dos reservatórios (previstos) de Jirau e de Santo Antônio, Rio Madeira, RO. Série Estudos e Documentos. Rio de Janeiro, CETEM/MCTI. 2008.
- CHOJNACKA, K. Biosorption and bioaccumulation – the prospects for practical applications. Environment International, vol. 36, nº 3, 299-307, 2010.
- CHUNG, Y. C., HUANG, C., TSENG, C. P. Operation optimization of *Thiobacillus thioparus* GCH11 biofilter for hydrogen sulfide removal. Journal of Biotechnology, vol. 52, p. 31-38, 1996a.
- CHUNG, Y. C., HUANG, C., TSENG, C. P. Biodegradation of hydrogen sulfide by a laboratory-scale immobilized *Pseudomonas putida* CH11 bio-filter. Biotechnology Progress, vol. 12, nº 6, p. 773-778, 1996b.
- CHUNG, Y. C., HUANG, C., TSENG, C. P. Biological elimination of H<sub>2</sub>S and NH<sub>3</sub> from waste gases by bio-filter packed with immobilized heterotrophic bacteria. Chemosphere, vol. 43, p. 1043-1050, 2001.
- CHERNICHARO, C. A. L., STUETZ, R. M., SOUZA, C. L., MELO, G. C. B. Alternativas para o controle de emissões odorantes em reatores anaeróbios tratando esgoto doméstico. Engenharia Sanitária e Ambiental, vol. 15, nº 3, p. 229-236, 2010.
- COVIZZI, L. G., GIESE, E. C., GOMES, E., DEKKER, R. F. H., SILVA, R. Imobilização de células microbianas e suas aplicações biotecnológicas. Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas, vol. 28, nº 2, p. 143-160, 2007.

- CULPI, T. A., PASQUALIM, P., FIN, M. T., SASSO, D. G. B., KAMINSKI, G. A. T., FUJIWARA, G. M., NUNES, P. M. P., RODRIGUES, B. H., DIAS, J. F. G., ZANIN, S. M. W. Importância de parâmetros de controle na elaboração de micropartículas de  $\text{Ca}^{2+}$ - alginato. *Visão Acadêmica*, vol. 11, nº 1, p. 38-44, 2010.
- DE-BASHAN, L. E., MORENO, M., HERNANDEZ, J.-P., BASHAN, A., Y. Removal of ammonium and phosphorus ions from synthetic wastewater by the microalgae *Chlorella vulgaris* co-immobilized in alginate beads with the microalgae growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *Water Research*, vol. 36, p. 2941–2948, 2002.
- DUARTE, J. C. Estudo da imobilização de células de *Saccharomyces cerevisiae* em suportes no processo de fermentação alcoólica. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas. 2011.
- DUARTE, J. C., RODRIGUES, A. R., MORAN, P. J. S., VALENÇA, G. P., NUNHEZ, J. R. Effect of immobilized cells in calcium alginate beads in alcoholic fermentation. *AMB Express*, vol. 3, p. 31-35, 2013.
- DURAN, P. M., BAILEY, J. E. Effects of immobilization on growth fermentation properties and macromolecular compositions of *Saccharomyces cerevisiae* attached to gelatin. *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 28, p. 73-87, 1986.
- DRESHER, W. H. Producing copper nature's way: bioleaching. Copper applications in mining & extraction. *Innovations*, 05/2004. Cooper Development Association Inc., 2004.
- EHRlich, H. L., NEWMAN, D. K. *Geomicrobiology*, 5ª edição, Editora CRC Press, Nova Iorque, 2009.
- EL-MANSI, E. M. T., BRYCE, C. F. A., DEMAİN, A. L., ALLMAN, A. R. *Fermentation Microbiology and Biotechnology*, 2ª edição, Editora Taylor & Francis, Boca Raton, 2007.

- FENG, K-C., ROU, T-M., LIU, B-L., TZENG, Y-M., CHANG, Y-N. Effect of fungal pellet size on the high yield production of destruxin B by *Metarhizium anisopliae*. *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 34, n° 1, p. 22-25, 2003.
- FREEMAN, A., LILLY, M. D. Effect of processing parameters on the feasibility and operational stability of immobilized viable microbial cells. *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 23, n° 5, p. 335-345, 1998.
- FUNDUEANU, G., NASTRUZZI, C., CARPOV, A., DESBRIERES, J., RINAUDO, M. Physico-chemical characterization of Ca-alginate micro-particles produced with different methods. *Biomaterials*, vol. 20, p. 1427-1435, 1999.
- GARBAYO, I., VILCHEZ, C., NAVA-SAUCEDO, J. E., BARBOTIN, J. N. Nitrogen, carbon and light-mediated regulation studies of carotenoid biosynthesis in immobilized mycelia of *Gibberella fujikuroi*. *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 33, n° 5, p. 629-634, 2003.
- GARCÍA-MARTÍNEZ, T., MORENO, J., MAURICIO, J. C., PEINADO, R. Natural sweet wine production by repeated use of yeast cells immobilized on *Penicillium chrysogenum*. *LWT - Food Science and Technology*, vol. 61, n° 2, 503-509, 2015.
- GIESE, E. C. Biofilmes: a interação micro-organismo/substrato mineral na biolixiviação. Série de Tecnologia Ambiental. Rio de Janeiro, CETEM/MCTI. 2014.
- GUO, X-L., DENG, G., XU, J., WANG, M-X. Immobilization of *Rhodococcus* sp. AJ270 in alginate capsules and its application in enantioselective biotransformation of trans-2-methyl-3-phenyl-oxiranecarbonitrile and amide. *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 39, n° 1, p. 1-5, 2006.
- HA, J., ENGLER, C. R., WILD, J. R. Biodegradation of coumaphos, chlorferon, and diethylthiophosphate using bacteria immobilized in Ca-alginate gel beads. *Bioresource Technology*, vol. 100, n° 3, p. 1138-1142, 2009.

- HAY, I. D., REHMAN, Z. U., REHM, B. Microbial alginate production, modification and its applications. *Microbial Technology*, vol. 6, n° 6, p. 637-650, 2013.
- INFANTE, C., LEÓN, I., FLOREZ, J., ZÁRATE, A., BARRIOS, F., ZAPATA, C. Removal of ammonium and phosphate ions from wastewater samples by immobilized *Chlorella* sp. *International Journal of Environmental Studies*, vol. 70, n° 1, p. 1-7, 2013.
- JAMAI, L., SENDIDE, K., ETTAYEBI, K., ERRACHIDI, F., HAMDOUNI-ALAMI, O., TAHRI-JOOUTI, M. A., MCDERMOTT, T., ETTAYEBI, M. Physiological difference during fermentation between calcium alginate-immobilized *Candida tropicalis* and *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Letters*, vol. 204, n° 2, p. 375-379, 2001.
- KAÇAR, Y., ARPA, Ç., TAN, S., DENIZLI, A., GENÇ, O., ARICA, M. Y. Biosorption of Hg (II) and Cd (II) from aqueous solutions comparison of biosorptive capacity of alginate and immobilized live and heat inactivated *Phanerochaete chrysosporium*. *Process Biochemistry*, vol 37, n° 6, p. 601-610, 2002.
- KAHRIZI, E., ALEMZADEH, I., VOSSOUGH, M. Immobilization of *Acidithiobacillus ferrooxidans* on monolithic packing for biooxidation of ferrous iron. *Iranian Journal of Biotechnology*, vol. 6, n° 3, p. 137-143, 2008.
- KOURKOUTAS, Y., MCERLEAN, C., KANELAKI, M., HACK, C. J., MARCHANT, R., BANAT, I. M., KOUTINAS, A. A. High-temperature wine making using the thermotolerant yeast strain *Kluyveromyces marxianus* IMB3. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, vol. 112, n° 1, p. 25-35, 2004.
- LANCY, E. D., TUOVINEN, O. H. Ferrous ion oxidation by *Thiobacillus ferrooxidans* immobilized in calcium alginate. *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 20, n° 2, p. 94-99, 1984.
- LAU, P. S., TAM, N. F. Y., WONG, Y. S. Wastewater nutrients (N and P) removal by carrageenan and alginate immobilized *Chlorella vulgaris*. *Environmental Technology*, vol. 18, n° 9, p. 945-951, 1997.

- LEE, C. M., LU, C. J., HUANG, C. Z., WANG, C. C. 1996. Entrapped microbial cell process for treatment of chlorophenolic compounds. pp. 739-744 In: WIJFFELS, R. H., BUITELAAR, R. M., BUCKE, C., TRAMPER, J. (eds.) Immobilized cells: basics and applications. Proceedings of an International Symposium organized under auspices of The Working Party on Applied Biocatalysis of the European Federation of Biotechnology Noordwijkerhout, The Netherlands, November 26-29, 1995. Elsevier Science, Amsterdam, The Netherlands.
- LIN, S-H., WANG, Y-M., YEN, Y-C., CHEN, B-Y. Kinetic theory of biostimulation for azo dye decolorization using immobilized cell system. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers, vol. 43, n° 3, 399-408, 2012.
- LONG, Z-E., HUANG, Y., CAI, Z., CONG, W., OUYANG, F. Immobilization of *Acidithiobacillus ferrooxidans* by a PVA–boric acid method for ferrous sulphate oxidation. Process Biochemistry, vol. 39, p. 2129-2133, 2004.
- MAAT, H. T., HOGENDOORNB, J. A., VERSTEEG, G. F. The removal of hydrogen sulfide from gas streams using an aqueous metal sulfate absorbent Part II. The regeneration of copper sulfide to copper oxide - an experimental study. Separation and Purification Technology, vol. 43, p. 199-213, 2005.
- MAIA, T. A., BELLIDO, J. D. A., ASSAF, E. M., ASSAF, J. M. Produção de hidrogênio a partir da reforma a vapor de etanol utilizando catalisadores Cu/Ni-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Química Nova, vol. 30, n° 2, p. 339-345, 2011.
- MALHOTRA, S., TANKHIWALE, A. S., RAJVAIDYA, A., PANDEY, R. A. Optimal conditions for bio-oxidation of ferrous ions to ferric ions using *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Bioresource Technology, vol. 85, p. 225-234, 2002.
- MALAJOVICH, M. A. Biotecnologia. Rio de Janeiro, Edições da Biblioteca Max Feffer do Instituto de Tecnologia ORT, 2012.
- MAIA, G. D. Tratamento de gás sulfídrico (H<sub>2</sub>S) em biofiltro. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de São Carlos, 176p., 2003.

- MARTÍNEZ, P., PARADA, p. BioSigma Bioleaching Seeds (BBS): A new technology for managing bioleaching microorganisms, *Advanced Materials Research*, vol. 825, p. 305-308, 2013.
- MELAMED, R., VILLAS BÔAS, R. C. Mecanismos de interação físico-química e mobilidade do mercúrio em solos, sedimentos e rejeitos de garimpo de ouro. *Série de Tecnologia Ambiental*. Rio de Janeiro, CETEM/MCTI. 2002.
- MILESSI, T. S. S., CHANDEL, A. K., ANTUNES, F. A. F., SILVA, S. S. Immobilization of *Scheffersomyces stipitis* cells with calcium alginate beads: A sustainable method for hemicellulosic ethanol production from sugarcane bagasse hydrolysate. *Bioethanol*, vol. 1, n° 1, p. 1-8, 2013.
- MÜLLER, J. M., SANTOS, R. L., BRIGIDO, R. V. Produção de alginato por micro-organismos. *Polímeros*, vol. 21, n° 4, p. 305-310, 2011.
- NAJAFPOUR, G., YOUNESI, H., ISMAIL, K. S. K. Ethanol fermentation in an immobilized cell reactor using *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresource Technology*, vol. 92, p. 251-260, 2004.
- NEDOVÍČ, V., WILLAERT, R. Applications of cell immobilization technology. Springer, Holanda, 2005.
- OGBONNA, J. C.; MASHIMA, H.; TANAKA, H. Scale up of fuel ethanol production from sugar beet juice using loofa sponge immobilized bioreactor. *Bioresource Technology*, vol. 76, n° 1, p. 1-8, 2000.
- OLIVEIRA, D. M., SÉRVULO, E. F. C., SOBRAL, L. G. S., PEIXOTO, G. H. C. Biolixiviação: utilização de micro-organismos na extração de metais. *Série de Tecnologia Ambiental*. Rio de Janeiro, CETEM/MCT. 2010.
- PARASCANDOLA, P., BRANDUARDI, P., ALTERIS, E. D. PVA-gel (Lentikats®) as an effective matrix for yeast strain immobilization aimed at heterologous protein production. *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 38, n° 5, p. 184-189, 2006.

- PEREIRA JR., N., BON, E. P. S., FERRARA, M. A. Tecnologia de Biotecnologia. Séries em Biotecnologia. Volume 1. Escola de Química/UFRJ, Rio de Janeiro. 2008.
- PRADELA, J. G. C. Reatores com células imobilizadas. SCHIMIDELL, W., LIMA, U. A., AQUARONE, E. BORZANI, W. Biotecnologia Industrial. Volume 2. 1ª edição. Editora Edgard Blücher Ltda, São Paulo. 2001.
- PRASAD, K. K., MOHAN, S. V., BHASKAR, Y. V., RAMANAIAH, S. V., BABU, V. L., PATI, B. R., SARMA, P. N. Laccase production using *Pleurotus ostreatus* 1804 immobilized on PUF cubes in batch and packed bed reactors: influence of culture conditions. *Journal of Clinical Microbiology*, vol 43, n° 3, p. 301-307, 2005.
- RATUSZNEI, S. M., RODRIGUES, J. A. D., CAMARGO, E. F. M., ZAIAT, M., BORZANI, W. Feasibility of a stirred anaerobic sequencing batch reactor containing immobilized biomass for wastewater treatment. *Bioresource Technology*, vol. 75, n° 2, p. 127-132, 2000.
- RATUSZNEI, S. M., RODRIGUES, J. A. D., CAMARGO, E. F. M., ZAIAT, M. BORZANI, W. Influence of agitation rate on the performance of a stirred anaerobic sequencing batch reactor containing immobilized biomass. *Water Science and Technology*, vol. 44, n° 4, p. 305-312, 2001.
- REIS, V. R., BASSI, A. P. G., DA SILVA, J. C. G., CECCATO-ANTONINI, S. R. Characteristics of *Saccharomyces cerevisiae* yeasts exhibiting rough colonies and pseudohyphal morphology with respect to alcoholic fermentation. *Brazilian Journal of Microbiology*, vol. 44, n° 4, p. 1121-1131, 2013.
- RIZZO, A. C. L., SISINNO, C. L. S., CUNHA, C. D., SALGADO, A. M., BARROCAS, P. R. G., REICHWALD, D., GIESE, E. C. Aplicação de ensaios biológicos na avaliação da biodisponibilidade de hidrocarbonetos de petróleo em solos impactados. Série de Tecnologia Ambiental. Rio de Janeiro, CETEM/MCTI. 2014.

- ROBINSON, P. K., WILKINSON, S. C. Removal of aqueous mercury and phosphate by gel-entrapped *Chlorella* in packed-bed reactors. *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 16, nº 9, p. 802-807, 1994.
- ROSA, P. R., SÁ, E. M., COUTINHO FILHO, U., CARDOSO, V. L. Immobilized *Lactobacillus acidophilus* produced from whey and alginate. *Brazilian Journal of Chemistry Engineering*, vol. 30, nº 2, p. 267-276, 2013.
- ROWLEY, J. A., MADLAMBAYAN, G., MOONEY, D. J. Alginate hydrogels as synthetic extracellular matrix materials. *Biomaterials*, vol. 20, p.45-53, 1999.
- SCHIPPERS, A. Biogeochemistry of metal sulfide oxidation in mining environments, sediments, and soils. In: AMEND, J. P., EDWARDS, K. J., LYONS, T. W. *Sulfur biogeochemistry - Past and present*. Boulder, Colorado, Geological Society of America Special Paper 379, p 49-62, 2004.
- SHULER, M., KARGI, F. *Bioprocess Engineering: Basic Concepts*, Prentice Hall, 2ª edition, 2002.
- SINHA, A., KHARE, S. K. Mercury bioremediation by mercury accumulating *Enterobacter* sp. cells and its alginate immobilized application. *Biodegradation*, vol. 23, nº 1, p. 25-34, 2012.
- SINHA, A., PANT, K. K., KHARE, S. K. Studies on mercury bioremediation by alginate immobilized mercury tolerant *Bacillus cereus* cells. *International Biodeterioration and Biodegradation*, vol. 71, p. 1-8, 2012.
- SMIDSRD, O., SKJAK-BRAEK, G. Alginate as immobilization matrix for cells. *TIBTECH*, vol. 8, p. 71-78, 1990.
- SOBRAL, L. G. S., FERNANDES, A. L. V., LIMA, R. B., OLIVEIRA, D. M., XAVIER, P. G. Remoção de mercúrio de efluentes líquidos da indústria soda-cloro usando *Sargassum* sp. *Série de Tecnologia Ambiental*. Rio de Janeiro, CETEM/MCTI. 2006.

- SOUZA, S. F. D. Trends in immobilized enzyme and cell technology. *Indian Journal of Biotechnology*, vol. 1, p. 321-338.
- SUN, X-L, STABLER, C. L., CAZALIS, C. S., CHAIKOF, E. L. Carbohydrate and protein immobilization onto solid surfaces by sequential diels-alder and azide-alkyne cycloadditions. *Bioconjugate Chemistry*, vol. 17, p. 52-57, 2006.
- THU, B., SMIDSRØD, O., SKJAK-BRAEK, G. Alginate gels - Some structure-function correlations relevant to their use as immobilization matrix for cells. WIJFFELS, R. H., BUITELAAR, R. M., BUCKE, C., TRAMPER, J. (Eds) *Immobilized Cells: Basics and Applications*. Elsevier Science B.V. 19-30, 1996.
- TSE, S. W., YU, J. Adsorptive immobilization of a *Pseudomonas* strain on solid carriers for augmented decolourization in a chemostat bioreactor. *Biofouling*, vol. 19, n° 4, p. 223-233, 2003.
- VAZ, P. M., GIESE, E. C., OLIVEIRA, D. M. Biolixiviação de minério primário de níquel por *Acidithiobacillus ferrooxidans* –LR. In: RIBEIRO, R. C. C., EGLER, S., MATIOLLO, E., GIESE, E. C., CARNEIRO, M. C. Série Anais da XXII Jornada de Iniciação Científica. Rio de Janeiro, CETEM/MCTI. 2014.
- VERA, Y. M., CARVALHO, R. J., CASTILHOS, Z. C., KURTZ, M. J. R. Acumulação de mercúrio em tucunarés da Amazônia. Série Gestão e Planejamento Ambiental. Rio de Janeiro, CETEM/MCTI. 2007.
- VOS, P., BUCKO, M., GEMEINER, P., NAVRÁTIL, M., STIVEL, J., FAAS, M., STRAND, B. L., SKJAK-BRAEK, G., MORCH, Y. A., VIKARTOVSKÁ, A., LACIK, I., KOLLÁRIKOVÁ, G., ORIVE, G., PONCELET, D., PEDRAZ, J. L., ANSORGE-SCHUMACHER, M. B. Multiscale requirements for bio-encapsulation in medicine and biotechnology, *Biomaterials*, vol. 30, p. 2559-2570, 2009.
- YOO, I-K., SEONG, G. H., CHANG, H. N., PARK, J. K. Encapsulation of *Lactobacillus casei* cells in liquid-core alginate capsules for lactic acid production. *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 19, n° 5, p. 428-433, 1996.

- YUJIAN, W., XIAOJUAN, Y., HONGYU, L., WEI, T. Immobilization of *Acidithiobacillus ferrooxidans* with complex of PVA and sodium alginate. *Polymer Degradation and Stability*, vol. 91, p. 2408-2414, 2006.
- YUJIAN, W., XIAOJUAN, Y., WEI, T., .HONGYU, L. High-rate ferrous iron oxidation by immobilized *Acidithiobacillus ferrooxidans* with complex of PVA and sodium alginate. *Journal of Microbiological Methods*, vol. 67, p.212-217, 2007.
- ZEROUAL, Y., MOUTAOUAKKIL, A., BLAGHEN, M. Volatilization of mercury by immobilized bacteria (*Klebsiella pneumoniae*) in different support by using fluidized bed bioreactor. *Current Microbiology*, vol. 43, n° 5, p. 322-327, 2001.
- ZHOU, H-B., LIU, X., QIU, G-Z., LIU, J-S., CHEN, X-H. Immobilization of *Acidithiobacillus ferrooxidans* and ferric iron production. *Transactions of Non-ferrous Metals Society of China*. vol. 16, p. 931-936, 2006.
- WANG, L.; RIDGWAY, D.; GU, T.; MOO-YOUNG, M. Bioprocessing strategies to improve heterologous protein production in filamentous fungal fermentations. *Biotechnology Advances*, vol. 23, n° 2, p. 115-129, 2005.
- WU, H., HE, A-Y., KONG, X-P., JIANG, M., CHEN, X-P., ZHU, D-W., LIU, G-P., JIN, W-Q. Acetone–butanol–ethanol production using pH control strategy and immobilized cells in an integrated fermentation–pervaporation process. *Process Biochemistry*, vol. 50, n° 4, 614-622, 2015.

## SÉRIES CETEM

As Séries Monográficas do CETEM são o principal material de divulgação da produção científica realizada no Centro. Até o final do ano de 2014, já foram publicados, eletronicamente e/ou impressos em papel, mais de 280 títulos, distribuídos entre as seis séries atualmente em circulação: Rochas e Minerais Industriais (SRMI), Tecnologia Mineral (STM), Tecnologia Ambiental (STA), Estudos e Documentos (SED), Gestão e Planejamento Ambiental (SGPA) e Inovação e Qualidade (SIQ). A Série Iniciação Científica consiste numa publicação eletrônica anual.

A lista das publicações poderá ser consultada em nossa homepage. As obras estão disponíveis em texto completo para download. Visite-nos em <http://www.cetem.gov.br/series>.

### Últimos números da Série Tecnologia Ambiental

STA-80 – **Balanço Hídrico em Coberturas Secas Utilizando Modelagem Numérica.** Mario Valente Possa, Anderson Borghetti Soares, Vicente Paulo de Souza e Paulo Sérgio Moreira Soares, 2015.

STA-79 – **Desativação de Minas.** Adão Benvindo da Luz e João Alves Sampaio, 2015.

STA-78 – **Parâmetros Físico-Químicos e Geoquímicos na Mitigação de Drenagem Ácida de Mina Utilizando Método de Cobertura Seca: Estudos em escala piloto.** Vicente Paulo de Souza, Mario Valente Possa, Anderson Borghetti Soares e Paulo Sérgio Moreira Soares, 2014.

## **INFORMAÇÕES GERAIS**

CETEM – Centro de Tecnologia Mineral  
Avenida Pedro Calmon, 900 – Cidade Universitária  
21941-908 – Rio de Janeiro – RJ

Geral: (21) 3865-7222

Biblioteca: (21) 3865-7218 ou 3865-7233

Telefax: (21) 2260-2837

E-mail: [biblioteca@cetem.gov.br](mailto:biblioteca@cetem.gov.br)

Homepage: <http://www.cetem.gov.br>

## **NOVAS PUBLICAÇÕES**

Se você se interessar por um número maior de exemplares ou outro título de uma das nossas publicações, entre em contato com a nossa biblioteca no endereço acima.

Solicita-se permuta.

We ask for interchange.



## Missão Institucional

A missão do Centro de Tecnologia Mineral - CETEM é desenvolver tecnologia para o uso sustentável dos recursos minerais brasileiros.

## O CETEM

O Centro de Tecnologia Mineral - CETEM é um instituto de pesquisas, vinculado ao Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação - MCTI, dedicado ao desenvolvimento, à adaptação e à difusão de tecnologias nas áreas minerometalúrgica, de materiais e de meio ambiente.

Criado em 1978, o Centro está localizado no campus da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, na Cidade Universitária, no Rio de Janeiro e ocupa 20.000m<sup>2</sup> de área construída, que inclui 22 laboratórios, 3 usinas-piloto, biblioteca especializada e outras facilidades.

Durante seus 37 anos de atividade, o CETEM desenvolveu mais de 720 projetos tecnológicos e prestou centenas de serviços para empresas atuantes nos setores minerometalúrgico, químico e de materiais.