

ESTUDO DA OBTENÇÃO DE BIOCATALISADORES COM MATRIZES  
DE ALGINATO DE CÁLCIO VISANDO A PRODUÇÃO DE BIODIESEL

**VÂNEA FERREIRA TÔRRES TEIXEIRA**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE  
DARCY RIBEIRO

**CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ  
FEVEREIRO - 2011**

ESTUDO DA OBTENÇÃO DE BIOCATALISADORES COM MATRIZES  
DE ALGINATO DE CÁLCIO VISANDO A PRODUÇÃO DE BIODIESEL

**VÂNEA FERREIRA TORRES TEIXEIRA**

“Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal”.

Orientador: Prof. Nádya Rosa Pereira  
Co-orientador: Prof. Victor Haber Perez

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ  
FEVEREIRO – 2011

ESTUDO DA OBTENÇÃO DE BIOCATALISADORES COM MATRIZES  
DE ALGINATO DE CÁLCIO VISANDO A PRODUÇÃO DE BIODIESEL

**VÂNEA FERREIRA TORRES TEIXEIRA**

“Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal”.

Orientadora: Prof. Dr. Nádia Rosa Pereira

Aprovada em 23 de fevereiro de 2011

**Comissão Examinadora:**

---

Prof. Walter Ruggeri Waldman (D.S., Ciência dos Materiais) UFSCAR - SP

---

Prof. Rubén Jesus Sánchez Rodríguez (D.S., Ciência dos Materiais) UENF - RJ

---

Prof. Victor Haber Pérez (Co-orientador) (D.S., Engenharia de Processos) UENF - RJ

---

Prof. Nádia Rosa Pereira (Orientador) (D.S., Engenharia Química) UENF - RJ

*Dedico...*

*Às minhas filhas Laura e Julia*

*Muitas são Senhor meu Deus, as maravilhas que tens operado para comigo, eu quisera anunciá-las e manifestá-las, mas são mais do que se podem contar (Salmos 40.5)*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço ao meu Senhor e salvador Jesus Cristo, por seu grande amor e proteção a cada minuto. Obrigada Senhor, por me amar tanto e por me presentear constantemente como tens feito. Eu também o amo muito, não pelo que tens feito na minha vida, mas por tudo que tu és. Essa conquista envolveu muitas lutas e muito aprendizado que me fizeram crescer e te conhecer ainda mais de perto.

Agradeço a minha família, minha amada família. sem vocês eu não teria conseguido. Meu esposo, companheiro inseparável, que sempre me apoiou e que soube, com muito amor, compreender a minha ausência e encher de atenção e carinho as nossas princesas quando eu não podia estar por perto. Minhas “Tchutchucas”, Laurinha e Juju, como eu amo vocês! Sei como foi difícil também para vocês, o que por muitas vezes me fez pensar em desistir, mas sabia que essa conquista seria importante para nós. Obrigado minhas lindas! “Amores de mamãe!”

Meus amados papito e mami. Vocês são os grandes responsáveis por eu ter chegado até aqui. Vocês, com muita sabedoria, souberam me dar raízes e asas. Obrigada por estarem sempre presentes e serem tão dedicados a nossa família. Obrigada pelas orações, pelos conselhos e por manterem os meus tanques de amor sempre repletos. Amo muito vocês!

À minha irmã e melhor amiga Késia, que mesmo estando distante fisicamente, soube me apoiar, me encorajar e ouvir os meus desabafos nos momentos difíceis.

Obrigado ao meu grande amigo Paulo Henrique, para mim, Paulo Henrico (super cunhado), pelo incansável apoio na vida acadêmica. Você é um grande profissional. Seus conselhos e suas orientações sempre fizeram diferença na minha vida. Obrigado de coração por tudo.

Ao meu amado irmão Jansen e a Glaucy, minha irmã do coração, pelo apoio e carinho que sempre recebo de vocês, Amo vocês!

A minha Tia Rute, tio Darci e Rosane que tenho certeza que nunca se esquecem de orar por mim e me abençoam constantemente com palavras de carinho e muito incentivo. Amo vocês!

Aos meus companheiros de trabalho, Ana Luiza, Geraldo e Waldinéia, que ao longo da caminhada se tornaram amigos. Vocês fazem parte desse trabalho. Obrigada de coração.

À minha parceira e grande amiga Juliana, que viveu junto comigo essa experiência. Obrigada amiga, por tudo.

Ao meu co-orientador e amigo Victor, por seu constante apoio e incentivo e por sua grande participação no desenvolvimento deste trabalho. Admiro o tamanho do seu coração, que sem medir esforços, está sempre pronto a ajudar. Que Deus te ilumine, sempre. Obrigada.

À minha orientadora Nadia, pela confiança, compreensão e conhecimentos compartilhados. Reconheço e admiro o seu profissionalismo e sua inteligência. Sinto-me privilegiada por ter sido sua primeira orientada e tenho certeza que faço parte do início da caminhada brilhante de uma excelente pesquisadora. Obrigada por tudo.

Aos amigos de laboratório, Évelin, Lara, Clara, Natalia, Shaline, Lorena, João e Simone pelo companheirismo e apoio.

Ao amigo Acácio, pela grande ajuda nas análises de Absorção Atômica.

Aos professores Rubén e Walter, pela parceria no desenvolvimento do trabalho e por terem aceitado fazerem parte da banca avaliadora desta dissertação.

À UENF pelo suporte financeiro e oportunidade de desenvolver este trabalho.

Enfim, a todos que de alguma forma contribuíram, de maneira direta ou indireta, para que este projeto fosse realizado. Que Deus a todos abençoe rica e abundantemente.

## ÍNDICE

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>3</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>4</b>
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	5
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>5</b>
3.1 CATÁLISE ENZIMÁTICA .....	5
3.2 LIPASES .....	7
3.3 SUPORTES PARA IMOBILIZAÇÃO .....	8
3.4 ALGINATOS .....	9
3.4.1 <i>Fonte de Obtenção</i> .....	9
3.4.2 <i>Constituição Química e Física do alginato</i> .....	10
3.4.3 <i>Características dos Géis de Alginato</i> .....	11
3.4.4 <i>Produção das Partículas de Alginato de Cálcio</i> .....	14
3.4.5 <i>Produção dos suportes híbridos de alginato com quitosana</i> .....	16
3.5 IMOBILIZAÇÃO .....	17
3.5.1 <i>Tipos de imobilização</i> .....	18
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>22</b>
4.1 MATERIAIS .....	22
4.2 MÉTODOS .....	23
4.2.1 <i>Preparação dos suportes de alginato</i> .....	23
4.2.2 <i>Cinética de gelificação</i> .....	24
4.2.3 <i>Preparação dos suportes de alginato com ferro</i> .....	25
4.2.4 <i>Produção dos suportes híbridos de alginato com quitosana</i> .....	26
4.2.5 <i>Secagem das partículas de Alginato</i> .....	26
4.2.6 <i>Imobilização enzimática</i> .....	27
4.2.7 <i>Caracterização dos suportes</i> .....	29
4.2.8 <i>Caracterização dos derivados imobilizados</i> .....	31
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>33</b>
5.1 ESTUDO DAS CONDIÇÕES DE PRODUÇÃO DAS PARTÍCULAS DE ALGINATO .....	33
5.1.1 <i>Cinética de gelificação</i> .....	35
5.1.2 <i>Preparação dos suportes</i> .....	41
5.1.3 <i>Produção dos suportes híbridos de alginato</i> .....	43
5.1.4 <i>Secagem</i> .....	45
5.2 CARACTERIZAÇÃO DOS SUPORTES PARA IMOBILIZAÇÃO .....	48
5.2.1 <i>Resistência a agitação</i> .....	48
5.2.2 <i>Solubilidade dos suportes em diferentes meios</i> .....	48

5.2.3	<i>Análise granulométrica</i> .....	49
5.2.4	<i>Análise Termogravimétrica</i> .....	51
5.2.5	<i>Morfologia</i> .....	55
5.2.6	<i>Imobilização</i> .....	57
5.3	<b>CARACTERIZAÇÃO FÍSICA DOS BIOCATALISADORES IMOBILIZADOS</b> .....	57
6.	<b>CONCLUSÃO</b> .....	68
7.	<b>RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS</b> .....	69
8.	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	70



## RESUMO

TEIXEIRA, V.F.T. MSc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; Fevereiro de 2011; Estudo da obtenção de biocatalisadores com matrizes de alginato de cálcio visando a produção de biodiesel; Professora Orientadora: Nádia Rosa Pereira, D.Sc.; Professor Co-orientador: Victor Haber Perez, D.Sc.; Banca Avaliadora: Rubén Jesus Sánchez Rodriguez, D.Sc.; Walter Ruggeri Waldman, D.Sc.; Víctor Haber Pérez, D.Sc.

Este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de biocatalisadores com propriedades magnéticas visando aplicações futuras na produção de biodiesel em biorreatores assistidos por campos eletromagnéticos. O trabalho experimental envolveu a preparação de suportes de alginato de cálcio e híbridos de alginato de cálcio/quitosana com inclusão de partículas magnéticas seguida da imobilização de lípases nestes suportes. Os suportes foram produzidos pelo método de gotejamento em solução de cloreto de cálcio. No desenvolvimento do trabalho foram estudadas as condições operacionais que permitissem a obtenção de suportes com boa rigidez, esfericidade e tamanho uniforme; o processo de gelificação das partículas de alginato de cálcio por meio da cinética de troca iônica dos íons envolvidos na formação do gel; a cinética de secagem dos suportes sob diferentes condições de temperatura e o efeito do teor de ferro nos suportes através de testes operacionais em biorreator assistido por campo eletromagnético. Os suportes produzidos foram caracterizados quanto a: umidade, resistência a agitação, solubilidade, degradação térmica, distribuição granulométrica e morfologia. Os biocatalisadores imobilizados foram preparados utilizando uma lípase comercial de *Pseudomonas fluorescences* (lípase AK) por três diferentes procedimentos de imobilização: aprisionamento em gel, adsorção física e ligação covalente. No primeiro caso, os rendimentos de imobilização foram menores que 10%, provavelmente devido a limitações difusionais, enquanto que os derivados imobilizados por interação direta da enzima com os suportes (adsorção física e ligação covalente) apresentaram rendimentos da ordem de 30% e as melhores atividades hidrolíticas foram alcançadas pelos derivados imobilizados por ligação covalente nos suportes de alginato com quitosana ativados com glutaraldeído, os quais alcançaram rendimentos da ordem de 50%.

## ABSTRACT

TEIXEIRA, V.F.T. MSc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; February, 2011; Study about the obtainment of biocatalysts with calcium alginate matrices in order to produce biodiesel; Teacher Advisor: Nádia Rosa Pereira, D.Sc.; Teacher Co-advisor: Victor Haber Perez, D.Sc.; Banking Appraiser: Rubén Jesus Sánchez Rodriguez, D.Sc.; Walter Ruggeri Waldman, D.Sc.; Victor Haber Pérez, D.Sc.

This work presents a study about magnetic biocatalysts development seeking its applications on the biodiesel production in bioreactors assisted by electromagnetic fields. The experimental efforts were towards the preparation of supports of calcium alginate and calcium alginate/chitosan beads with addition of magnetic particles and the immobilization of lipases on these supports. The beads were produced by the dripping method in solution of calcium chloride. About this issue it was investigated the following: a) operational conditions to attain supports with good rigidity, spherical shape and uniform size; b) the process of gelification of calcium alginate beads through ionic exchange kinetics of the involved ions in the gel formation; c) drying kinetics of the supports under natural convection at different temperature and alginate concentration and d) effect of magnetic particles into the supports through operational tests in the bioreactor assisted by electromagnetic field. The supports were characterized in terms of their moisture content, resistance to agitation, solubility, thermogravimetric degradation, morphology and size distribution. The immobilized biocatalysts were prepared using a commercial lipase from *P. fluorescences* (lipase AK) for three different immobilization procedures: entrapping, physical adsorption and covalent binding. In the first case, the immobilization yields were lower than 10%, probably due to diffusion limitations, while the immobilized biocatalysts by direct interaction between enzyme and supports, i.e., physical adsorption and/ or covalent binding, reached coupling yield around 30%. In addition, immobilization method by covalent binding in alginate-chitosan supports activated with glutaraldehyde presented coupling yield more than 50% and consequently the highest hydrolytic activities.

## 1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, pode-se observar uma intensa atividade a nível mundial pelo uso de energias renováveis em virtude dos graves problemas associados à emissão de gases poluentes que resultam no aquecimento global. Neste contexto, a obtenção de biocombustíveis (etanol, biodiesel, etc.) se apresenta como uma alternativa muito atrativa em substituição aos combustíveis fósseis. Esse interesse se justifica pelo fato dos biocombustíveis serem uma alternativa menos agressiva ao meio ambiente, economicamente competitivos além de serem biodegradáveis e derivados de matérias-primas renováveis de ocorrência natural (Felizardo, 2003; Ferrari et al., 2005).

A tecnologia mundialmente estabelecida para a produção industrial de biodiesel baseia-se na transformação química (alcoólise) de óleos vegetais com um álcool (geralmente o metanol) usando catalisadores ácidos ou básicos, que atuam na quebra de moléculas de triglicerídeos gerando uma mistura de ésteres de ácidos graxos, denominada biodiesel (Marchetti et al., 2007). Apesar do bom rendimento proporcionado por essa via, o uso de catalisadores químicos gera problemas ao meio ambiente e dificuldades de recuperação e purificação do produto final (Ferrari et al., 2005). Estas dificuldades justificam o grande número de pesquisas em busca de vias alternativas como a substituição do metanol (obtido do petróleo) por etanol e o uso de catalisadores enzimáticos (biocatalisadores) que possuem alta seletividade e formam um produto final com maior grau de pureza.

Na busca por novas tecnologias, tem-se pesquisado a utilização de catalisadores biológicos imobilizados em suportes diversos. Estes apresentam como vantagens facilidade de separação e reutilização tornando sua utilização bastante promissora. Muitas pesquisas têm sido realizadas com relação aos tipos de materiais utilizados como suporte e aos diferentes métodos de imobilização de enzimas e células que podem ser utilizados (Moraes et al., 2002; Lagoa e Rodrigues, 2009; Wang et al., 2005).

Vários grupos de pesquisa no Brasil e no mundo têm trabalhado intensamente em atividades de pesquisa para o desenvolvimento de biocatalisadores a partir de enzimas ou células imobilizadas em matrizes de

diferentes origens para utilização em diversos processos fermentativos e em reações de esterificação para produção de biodiesel.

Dentre os diversos materiais utilizados como suportes, destaca-se a utilização do alginato que é um polímero biodegradável facilmente encontrado na natureza e sua utilização como suporte para imobilização de enzimas e células dentre outras aplicações tem sido alvo de muitos estudos. O alginato, quando em contato com cátions divalentes, forma um gel com características interessantes como, uniformidade, biocompatibilidade e porosidade da matriz formada.

Este trabalho propõe o desenvolvimento de suportes de alginato de cálcio com características magnéticas para imobilização de enzimas lípases visando a utilização dos biocatalisadores obtidos em processo de produção de biodiesel por método não convencional utilizando reatores assistidos por campo eletromagnéticos. Estes reatores podem alcançar maiores taxas de reação sob menores resistências à transferência de calor e massa. Quando um campo magnético externo é aplicado a um reator que contenha catalisadores magnéticos, é possível modificar a distribuição das partículas e com isso alcançar condições mais eficientes de contato entre estas e o meio reacional, resultando em maiores taxas de reação. Para que isso aconteça é imprescindível que o biocatalisador apresente permeabilidade magnética, as quais podem ser conferidas pela incorporação de partículas magnéticas (por exemplo, magnetita ou ferro metálico) na matriz porosa. Portanto, a proposta deste trabalho tem como objetivo o estudo da obtenção de biocatalisadores heterogêneos formados por partículas de alginato de cálcio e híbridos de alginato com incorporação de ferro metálico para imobilização de enzimas visando sua utilização em processo de produção de biodiesel nestes reatores assistidos por campo magnético.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Estudo da produção de suportes de alginato de cálcio com propriedades magnéticas, para imobilização de lipase, visando produção de biodiesel em bioreatores assistidos por campo eletromagnético.

## 2.2 Objetivos específicos

1. Determinar as condições de produção das partículas de alginato de cálcio pelo método de gotejamento, visando à obtenção de suportes rígidos, com boa esfericidade e tamanho uniforme;
2. Produzir suportes de alginato e híbridos de alginato/quitosana e alginato/quitosana com incorporação de ferro;
3. Determinar a cinética de gelificação dos suportes de alginato de cálcio;
4. Caracterizar os suportes produzidos com relação a: umidade, resistência a agitação, solubilidade, granulometria, morfologia e estabilidade térmica.
5. Testar a imobilização da lipase de *Pseudomonas fluorescens* nas partículas produzidas por aprisionamento, por adsorção física e por ligação covalente com e sem ativador.
6. Caracterizar os biocatalisadores com relação à morfologia, atividade enzimática e eficiência de imobilização.

## 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 3.1 Catálise enzimática

Tecnicamente, o biodiesel é definido como ésteres alquílicos de ácidos graxos, obtidos na reação de transesterificação de qualquer triglicerídeo (óleos e gorduras vegetais ou animais) com álcool de cadeia curta (Pinto et al., 2005).

A produção de biodiesel é economicamente competitiva devido a utilização de fontes renováveis de matéria-prima e catalisadores de baixo custo, além deste combustível ser tecnicamente e ambientalmente aceitável. Os métodos para a obtenção de biodiesel podem diferenciar na escolha da matéria-prima e na via de obtenção. A transesterificação é o processo mais utilizado atualmente e pode ser definida como sendo a etapa de conversão de triglicerídeos, na presença de

catalisador, em uma mistura de ésteres alquílicos de ácidos graxos (biodiesel) e glicerina (

Figura 1). Na reação de transesterificação podem ser usados catalisadores químicos (ácidos ou básicos) ou catalisadores enzimáticos (Ferrari et al., 2005).

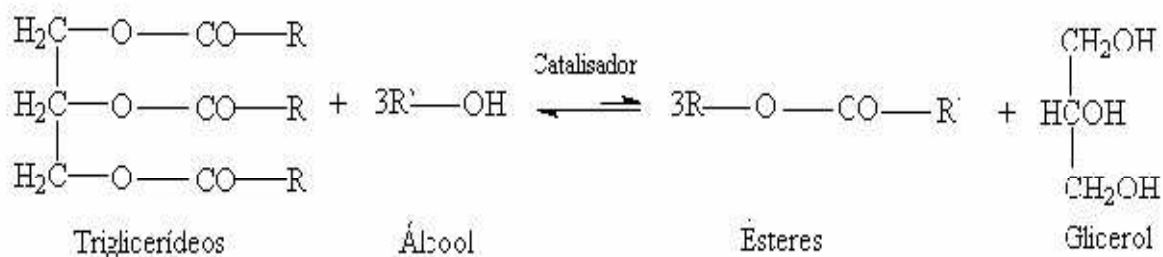


Figura 1. Reação de transesterificação (Moreira, 2007).

Atualmente os processos industriais de produção de biodiesel utilizam catalisadores químicos como o hidróxido de sódio e potássio, devido ao maior rendimento em ésteres em menor tempo de reação. Todavia, este processo apresenta alguns problemas, dentre eles a reação de saponificação ocasionada pela presença de água na matéria-prima e ácidos graxos livres e a necessidade de passos adicionais de neutralização e lavagem para redução dos teores de substâncias indesejáveis no biodiesel pronto, além de não permitir a recuperação do catalisador utilizado. Neste sentido a catálise enzimática, utilizando lipases, aparece como uma opção promissora na produção do biodiesel (Moreau et al., 2008). O processo de transesterificação enzimática, se otimizado, oferece inúmeras vantagens ao processo químico, pois permite maior controle sobre a distribuição posicional dos ácidos graxos no produto final, devido à seletividade e regioespecificidade das lipases (Bornscheuer, 1998; De Castro et al., 2004). A Tabela 1 apresenta as vantagens e desvantagens dos processos de obtenção de biodiesel por via química e enzimática.

Tabela 1: Catálise química X catálise enzimática (Nascimento et al., 2001).

Processo	Vantagens	Desvantagens
Químico	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Simplicidade</li> <li>• Alto rendimento</li> <li>• Curto tempo de reação</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Dificuldade de separação do catalisador</li> <li>• Impossibilidade de reutilização do catalisador</li> <li>• Dificuldade de utilização do etanol hidratado</li> <li>• Obtenção de produtos com menor grau de pureza</li> </ul>
Enzimático	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Facilidade de separação do catalisador (suporte)</li> <li>• Obtenção de produtos com maior grau de pureza</li> <li>• Possibilidade de utilizar etanol hidratado na reação</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Longo tempo de reação</li> <li>• Baixo rendimento</li> <li>• Custo das enzimas</li> </ul>

### 3.2 Lipases

As lipases (triglicerol acil-hidrolases. E.C 3.1.1.3) são classificadas como enzimas hidrolíticas que atuam na interface orgânico-aquosa, catalisando a hidrólise de ligações éster-carboxílicas de acilglicerois liberando ácidos orgânicos e glicerol. (De Castro et al., 2004). Elas não requerem co-fatores, são regioespecíficas e atuam em uma larga faixa de pH (Dalla-vecchia et al., 2004).

As lipases são encontradas largamente distribuídas na natureza em animais (lípases lácteas e lipase pancreática), vegetais (extraídas da soja, do centeio e do algodão) e as microbianas (leveduras, fungos e bactérias) (Paques; Macedo, 2005). As lipases provenientes de micro-organismos são as mais utilizadas industrialmente porque além de apresentarem procedimentos mais simples de isolamento são, geralmente, mais estáveis e com propriedades mais diversificadas que as lipases de outras fontes. Estas enzimas são em sua maioria extracelulares, o que favorece sua extração, isolamento e purificação (Brockman, 1984). Nos últimos anos, muitos trabalhos foram apresentados na literatura com o intuito de viabilizar a utilização de lipases em processos industriais. Dentre eles, destacam-se os estudos dos procedimentos de imobilização enzimática os quais envolvem diferentes graus de complexidade e eficiência. Moreira (2007) estudou o desempenho de diferentes lipases na reação de transesterificação enzimática

do óleo de palma com etanol visando à produção de biodiesel. Entre as lipases testadas, a lipase de *Pseudomonas fluorescens* teve um desempenho destacado com relação a atividade de transesterificação, convertendo 90,98% do óleo de palma nos ésteres etílicos correspondentes em 72h.

Lipase AK “AMANO” 20 é uma preparação enzimática produzida por um único processo de fermentação de uma linhagem selecionada de *Pseudomonas fluorescences*. Como a maioria das lipases microbianas, as preparações comerciais disponíveis destas lípases possuem preferência estereoquímica para hidrólise de ésteres de alcoóis secundários (Faber, 1997). A lipase AK “AMANO” 20 tem uma elevada atividade lipolítica e estabilidade térmica (Amano Enzyme, 2006) e possui sete resíduos de lisina em sua estrutura (Palomo et al., 2005).

O mecanismo de ação das lípases é baseado nas reações de ativação interfacial e umas das principais dificuldades na compreensão dos mecanismos de hidrólise estão relacionadas ao fato de que a atividade das lípases depende das propriedades físicas da emulsão, ou seja, da disposição de substratos disponíveis à lipase (Brockman, 1984). O método mais utilizado para determinar a atividade das lípases é a titulação dos ácidos graxos formados pela hidrólise do triglicerídeo produzidos em uma emulsão (óleo/água) estabilizada com um agente tensoativo (Soares et al., 1999). A goma arábica é o agente mais utilizado, conduzindo elevada atividade lipolítica (Verger, 1997). A lipase na ausência de tensoativos se encontra em uma conformação fechada, com seu sítio catalítico indisponível. Com a adição de tensoativos, ela adquire uma conformação aberta, atingindo máxima atividade catalítica (Fernandez-Lorente et al., 2007).

### **3.3 Suportes para imobilização**

A escolha e o uso adequado dos suportes de imobilização são fundamentais para que se consiga alcançar todas as vantagens oferecidas pela utilização de biocatalisadores imobilizados, que são facilidade de recuperação, reutilização da enzima e a melhoria das propriedades desejáveis como estabilidade frente às condições reacionais e seletividade (Villeneuve et al., 2000; Dalla-Vecchia et al., 2004)



As principais características a serem observadas na seleção de um suporte para imobilização de enzimas são: área superficial, permeabilidade, capacidade de regeneração, solubilidade, morfologia, composição, resistência mecânica, custo dentre outras, destacando-se a importância da avaliação das possibilidades de regeneração e reutilização do material analisado (Dalla-Vecchia et al, 2004).

Para a reutilização de derivados imobilizados, geralmente, há a necessidade do uso de operações como filtração, centrifugação e agitação que requerem do suporte boa resistência mecânica. A estabilidade térmica é também uma característica importante, visto que suportes sensíveis termicamente, quando submetidos a variações de temperatura, podem sofrer distorções ou modificações em sua estrutura, destruindo o sítio ativo da enzima (Kennedy, 1987).

Segundo Messing (1975), os suportes para imobilização de enzimas podem ser classificados conforme sua composição podendo ser orgânicos e inorgânicos e quanto a sua morfologia como porosos, não porosos e de estrutura de gel (Dalla-Vecchia et al, 2004). Apesar dos suportes inorgânicos apresentarem uma série de vantagens em relação aos suportes orgânicos como: elevada resistência mecânica, estabilidade térmica, fácil regeneração por processo de pirólise e resistência em uma larga faixa de temperatura, pressão e pH, a utilização de suportes orgânicos no campo da imobilização de biocatalisadores tem se destacado, provavelmente devido à grande variedade de grupos funcionais reativos que podem ser “introduzidos” nos suportes orgânicos (Kennedy, 1987) e por apresentarem baixo custo e serem facilmente degradados não causando danos ao meio ambiente. Dentre os suportes orgânicos naturais mais utilizados na imobilização de enzimas destacam-se a agarose, o alginato, a quitosana e os polieletrólitos de quitosana vistos pelo grande número de trabalhos encontrados na literatura (Torres et al., 2003; Mendes et al., 2006; Mateo et al., 2007; Rodrigues et al., 2008; Adriano et al., 2008).

### **3.4 Alginatos**

#### **3.4.1 Fonte de Obtenção**

O alginato é um biopolímero, derivado do ácido algínico, encontrado na natureza, extraído principalmente de algas marinhas marrons, pertencentes à

classe *Phaeophyceae*, que constituem a principal fonte de obtenção de alginatos. Existe uma grande variedade de espécies que variam em tamanho, forma, assim como em porcentagem e qualidade do alginato que produzem, sendo que as principais algas utilizadas para a produção comercial de alginatos são espécies de *Macrocystis*, *Laminaria* e *Ascophyllum* (Mchugh, 1987).

### 3.4.2 Constituição Química e Física do alginato

O ácido algínico é um polissacarídeo que contém, naturalmente, grupos carboxílicos em cada constituinte residual, e possui várias habilidades funcionais (Ikeda et al., 2000). Uma importante propriedade é a sua capacidade de reagir com cátions polivalentes, especialmente íons cálcio, para produzir géis fortes ou polímeros insolúveis (Grant et al., 1973; King, 1983).

Os alginatos são constituídos por duas unidades monoméricas, o ácido  $\beta$ -D-manurônico (M) e o ácido  $\alpha$ -L-ácido gulurônico (G) e possuem grande variação em sua composição e estrutura sequencial (Figura 2). Esses ácidos são unidos por ligações glicosídicas entre os carbonos 1,4 das unidades monoméricas (King, 1983; Moe et al., 1995). Estes monômeros são organizados em blocos ao longo da cadeia, que podem ser compostos por blocos de homopolímeros (GG e MM) junto com blocos alternados (MG) na mesma molécula, o que pode ser visto na

Figura 3. As configurações espaciais que os blocos M e G adotam, juntamente com a proporção, distribuição e comprimento destes blocos, determinam as propriedades físicas e químicas do alginato (Smidsrød, 1974).

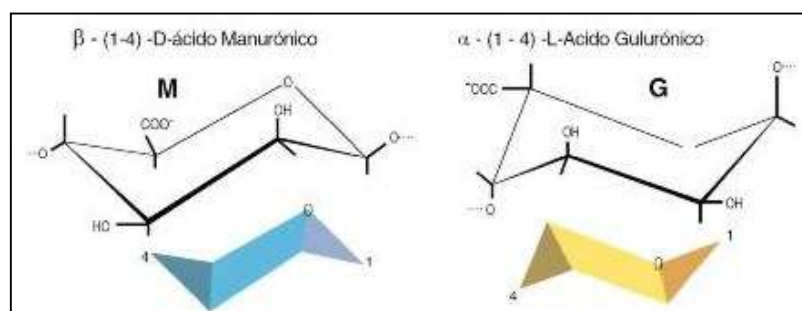
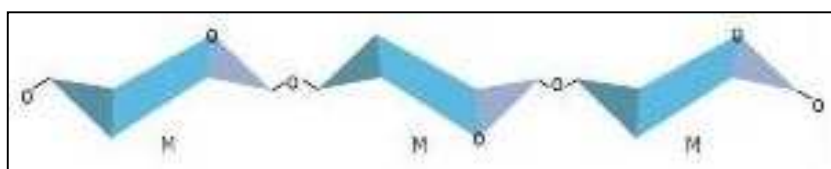
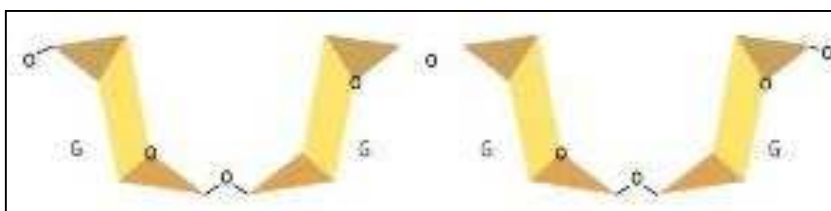


Figura 2: Estrutura Química do alginato (Kimica, 2007).

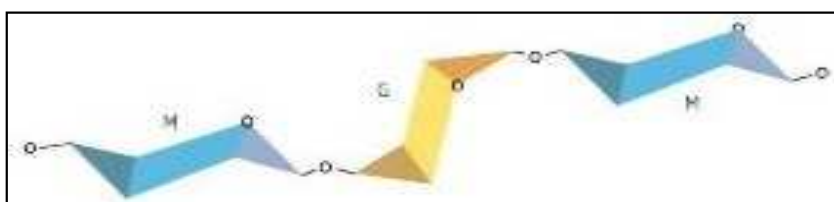
As diferentes sequências de blocos MG e GG é que irão determinar a flexibilidade da cadeia, influenciando na solubilidade e estabilidade do gel que será formado. Blocos MG, por exemplo, formam cadeias mais flexíveis e mais solúveis em pHs baixos e a estabilidade do gel está diretamente relacionada ao conteúdo de blocos G (Ertesvåg e Valla, 1998).



Segmento de bloco *M-M*



Segmento de bloco *G-G*



Segmento de bloco *M-G*

Figura 3: Estrutura dos blocos que constituem a molécula de alginato. M: ácido manurônico e G: ácido gulurônico (Kimica, 2007).

Quanto maior o peso molecular de um alginato solúvel, maior a viscosidade de sua solução. O alginato de sódio, que possui viscosidade de 200-400 mPa.s, é chamado de alginato de "média viscosidade" e possui uma maior aplicação comercial.

### 3.4.3 Características dos Géis de Alginato

Soluções de alginato possuem a capacidade de reagir com muitos cátions di e trivalente e formar géis que se formam em temperatura ambiente ou em

qualquer temperatura até 100 °C. Esses géis, possuem aplicações em diversos setores tecnológicos, particularmente quando o cálcio é usado como íon divalente. Allen et al., (1963) classificaram o cloreto de cálcio como o agente gelificante mais efetivo. O efeito desses íons é estabelecer ligação entre as cadeias de alginato através de interações iônicas. Essa estrutura reticulada formada tem uma grande capacidade de reter água, formando assim um gel muito estável.

Soluções de alginato também podem formar géis ao serem cuidadosamente acidificadas, os quais, ao contrário do gel de cálcio, são mais frágeis e possuem muitas aplicações na indústria de alimentos por darem a sensação de derretimento quando levados à boca (Morris, 1985).

Para que o alginato tenha a capacidade de formar um gel ele precisa ter um número suficiente de monômeros gulurônicos que se alinham lado a lado formando uma estrutura parecida com um “berço”, que tem a dimensão ideal para acomodar em seu interior um cátion (geralmente  $\text{Ca}^{2+}$ ), gerando uma estrutura dimérica. Os grupos carboxílicos de alginato têm afinidade por uma vasta variedade de cátions e quando em contato com soluções aquosas de metais divalentes, suas características mudam significativamente. Um modelo utilizado para descrever a formação do gel de alginato de cálcio é o modelo “egg-box” (“caixa de ovo”), que considera a associação de duas ou mais cadeias resultando em uma estrutura bidimensional similar a uma caixa de ovo, como descrita na

Figura 4, onde nos interstícios encontram-se os íons cálcio (Grant et al., 1973).

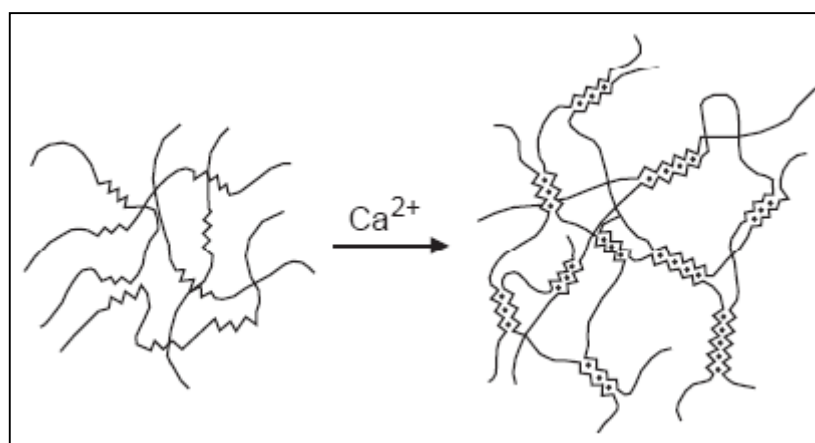
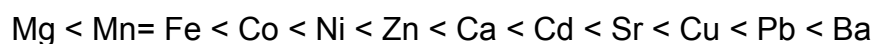


Figura 4: Rearranjo das cadeias de alginato com cálcio (Zambon et al., 2002).

O modelo “egg-box” permite verificar a importância das unidades G na gelificação do alginato. Alginatos contendo maiores concentrações de blocos GG formam géis mais rígidos e resistentes. Os blocos M também formam ligações intermoleculares, embora sejam menos efetivos que os blocos G, portanto a formação e a força do gel estão diretamente ligadas com a quantidade de resíduos G e o comprimento médio destes blocos. Quanto maior o conteúdo de blocos G, maior é o potencial de formação de gel e maior é sua força.

A estrutura do gel de alginato é governada não somente pela concentração e estrutura química do material do gel, mas também pela cinética de formação do mesmo, que depende da concentração do cátion, da força iônica e do pH. A afinidade entre íons metálicos e o alginato varia de acordo com as propriedades dos íons, como raio iônico, efeitos estéricos, força iônica e eletronegatividade. Segundo Davis et al (2003) a seletividade do alginato por íons metálicos divalentes é a seguinte:



A diferente afinidade por íons metálicos faz com que o alginato seja utilizado em processos de tratamento de efluentes contaminados através de troca iônica entre os íons divalentes, que estão ligados às moléculas do ácido, pelos íons que se encontram na solução aquosa que possuem maior afinidade pelo alginato. A troca iônica é um processo de adsorção de espécies iônicas acompanhado simultaneamente pelo processo de dessorção de outras espécies iônicas em quantidades equivalentes. No decorrer dos processos, ocorre a competição entre os íons, sendo que a espécie ligante é a de maior afinidade ao trocador iônico. Outros fatores também podem influenciar na gelificação do alginato como: a concentração do alginato, presença de impurezas, concentração e natureza dos íons gelificantes e método de preparação.

A literatura descreve dois métodos convencionais para o preparo de géis de alginato de cálcio que serão descritos a seguir.

### **3.4.3.1 Método da gelificação interna**

Smidsrod e Draget (1997) descrevem o método da gelificação interna baseados na liberação controlada de íon cálcio, proveniente da dissociação dos seus sais. Para que a ligação não ocorra muito rapidamente, os íons cálcio são adicionados na forma de  $\text{CaCO}_3$  insolúvel,  $\text{CaSO}_4$  levemente solúvel ou complexados com agente quelante como EDTA ou citrato. À medida que o cálcio ionizado na solução interage com polímeros de ácido algínico, mais sal será solubilizado, resultando na formação de um gel homogêneo. Alterações no pH ou temperatura também podem ser utilizadas para controlar a liberação de íons de cálcio por toda a solução de alginato.

### **3.4.3.2 Método de difusão**

O método de formação de géis por difusão é também chamado de método de gelificação rápida. A formação do gel se dá por atomização ou gotejamento da solução de alginato de sódio em uma solução contendo íons cálcio, formando partículas únicas e independentes. Nesta técnica é criada uma zona de gelificação da superfície em direção ao centro do gel. A homogeneidade do gel pode ser alcançada com alginato de alta massa molar e altas concentrações de íons gelificantes (Smidsrod e Draget, 1997).

### **3.4.4 Produção das Partículas de Alginato de Cálcio**

A produção das partículas de alginato de cálcio pode ser feita por diferentes técnicas, sendo que a mais utilizada é por difusão pelos métodos de atomização ou gotejamento da solução de alginato de sódio em solução gelificante contendo íons cálcio. Na atomização a solução de alginato de sódio é atomizada através de um bico atomizador, na solução de cloreto de cálcio. As partículas formadas por atomização possuem diâmetros menores que 0,2mm sendo que a viscosidade e temperatura da solução de alginato de sódio, a pressão do gás inerte; o diâmetro de abertura do bico atomizador e a altura entre

o bico atomizador e a solução de  $\text{CaCl}_2$  são fatores que precisam ser controlados por exercerem grande influência no tamanho e características das partículas produzidas (Tu et al., 2005 e Fundueanu et al., 1999). Para obtenção de partículas de diâmetros maiores utiliza-se o método de gotejamento. Nesta técnica, a solução de alginato de sódio é gotejada em solução de cálcio (ou outro cátion divalente de maior afinidade) sob constante agitação (agitador magnético). Após o período de agitação e contato, a difusão do cálcio nos interstícios das gotas de alginato forma partículas de alta viscosidade e insolúveis em água (Fundueanu et al., 1999; Díaz et al., 2007; Papageorgiou et al., 2006).

Fundueanu et al., (1999) após inúmeras tentativas obtiveram partículas de diâmetro entre 1000 e 1400  $\mu\text{m}$  e de boa esfericidade. Através de seu trabalho verifica-se que a altura do bico de gotejamento é um dos critérios mais importantes para a obtenção de partículas com boa esfericidade, pois, para baixas alturas, as partículas apresentaram uma “cauda” acentuada.

Welter (2009) testou diferentes concentrações para solução de alginato de sódio e diferentes alturas referente à distância percorrida pela gota. Para as condições analisadas, foi concluído que a concentração de alginato de sódio de 2% e altura do bico de gotejamento de 30 cm foram as condições mais adequadas para produção de partículas esféricas.

Vreeker et al. (2008) realizaram um estudo para avaliar a capacidade de reidratação de partículas de alginato de cálcio secas. As esferas foram produzidas pelo método de gotejamento, utilizando seringa de 500 mL para gotejar a solução de alginato de sódio 1% em solução de cloreto de cálcio 1%. As partículas foram produzidas utilizando alginato com alta concentração de blocos G (alto G) e com alginatos de baixa concentração de blocos G (baixo G). A reidratação das esferas de alginato de cálcio secas em ar à temperatura ambiente com umidade relativa de 11% foi testada em água destilada e em soluções salinas de diferentes concentrações. As partículas produzidas a partir do alginato com alto G apresentaram menores taxas de reidratação que as de baixo G, porém para ambas a massa das partículas hidratadas foi maior que a massa inicial. As taxas de reidratação aumentaram com o aumento da concentração do sal e não ocorreu reidratação em água pura para nenhuma das partículas, o que sugere que a reidratação das partículas de alginato de cálcio depende da força iônica do meio de reidratação e que as zonas de junção formadas durante a secagem são

estáveis em água pura impedindo a entrada de água. Durante a reidratação, íons cálcio foram liberados para a solução circundante e esta liberação ocorreu antes de iniciado o aumento de volume das partículas.

### 3.4.5 Produção dos suportes híbridos de alginato com quitosana

Os suportes de alginato com quitosana são produzidos com o objetivo de se obter hidrogéis mais versáteis, com diferentes estruturas químicas e físicas, o que pode melhorar a sua atuação em uma determinada aplicação (Berger et al., 2004). O complexo quitosana-alginato é formado por interações iônicas entre os grupos carboxílicos do alginato e os grupos amino da quitosana (Figura 5) (Tapia et al., 2004). O alginato por ser insolúvel em pH ácido atua minimizando a solubilidade da quitosana nestes meios, fazendo com que o complexo alginato/quitosana possa ser usado em uma ampla faixa de pH (George e Abraham, 2006). A estabilidade química e física dos hidrogéis de alginato pode ser aumentada por modificação química empregando agentes funcionais. Essa modificação pode ser realizada com diferentes espécies químicas tais como glutaraldeído, epícloridina, glioxal, formaldeído e outros (Mendes et al., 2006).

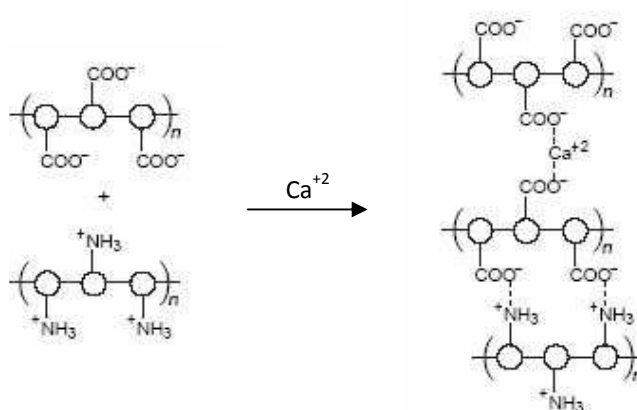


Figura 5: Sistema alginato/quitosana (Finotelli, 2006).



### 3.5 Imobilização

A imobilização de enzimas tem sido considerada como uma alternativa viável e de grande aplicação. Muitas sínteses químicas apresentam melhores taxas de conversão quando realizadas utilizando biocatalizadores, tais como enzimas ou células íntegras, no lugar dos catalisadores químicos convencionais. Um importante diferencial da catálise enzimática é a especificidade com que as enzimas atuam. Para realizar tais processos em média e grande escala é importante que esses biocatalizadores contenham altas concentrações de enzimas e que possam ser recuperados ao final do processo para reutilização (Van Der Padt, 1993).

O processo de imobilização se caracteriza por restringir a mobilidade da enzima em um definido espaço, provendo altas concentrações das mesmas, com preservação de sua atividade catalítica (Guisán, 2006). Biocatalisadores têm sido amplamente utilizados em diversos processos, seja em escala laboratorial ou industrial. Há muitos anos esforços intensivos têm sido empreendidos no desenvolvimento de biocatalizadores utilizando técnicas que permitam o seu uso repetido ou em processos contínuos. As principais vantagens obtidas pelo processo de imobilização são o aumento da estabilidade térmica do biocatalisador e possibilidade de recuperação e reutilização sem perda significativa da sua atividade catalítica (Guisán, 2006). As principais desvantagens são a alteração da conformação nativa na enzima; o custo do suporte e a atividade durante o processo de imobilização (Arroyo, 1998). A seleção do método de imobilização deve ser baseada em parâmetros como atividade recuperada do derivado imobilizado; características de regeneração e inativação; custo do procedimento de imobilização e a finalidade desejada para a enzima imobilizada (Malcata et al., 1990).

A eficiência do processo de imobilização pode ser avaliada pela capacidade do suporte e do método utilizado em aprisionar a maior quantidade de enzimas possível. Diferentes métodos de imobilização têm sido utilizados na obtenção de sistemas eficientes para utilização nos processos biotecnológicos em reatores industriais, tornando-os economicamente viáveis e apresentando melhor produtividade. Porém, a escolha de uma matriz adequada para a imobilização é de fundamental importância para a obtenção do produto desejado (Petre et al.,

1999). A porosidade, o tamanho dos poros e o grau de hidrofobicidade da matriz interferem na intensidade da adesão celular (Silva et al., 2006).

O gel de alginato de cálcio apresenta características interessantes como resistência mecânica, uniformidade, biocompatibilidade e porosidade da matriz formada, o que tem despertado grande interesse no uso deste material como suporte para imobilização de enzimas e células dentre outras aplicações. A imobilização de enzimas por aprisionamento em gel de alginato de cálcio oferece vantagens como simplicidade, baixo custo e a imobilização pode ser realizada sob condições moderadas (Gryta, 2002).

A utilização de biocatalizadores heterogêneos na produção de biodiesel surge como uma alternativa bastante viável porque além de evitar o problema de saponificação, gerado pela catálise química, é possível a utilização do etanol hidratado na reação e os produtos obtidos apresentam maior grau de pureza. Pode-se encontrar na literatura muitos trabalhos que utilizam lípases imobilizadas em diferentes matrizes porosas, para produção de biodiesel. Cruz Jr. (2000) imobilizou lípases em matriz de quitosana para obtenção de biodiesel por transesterificação de óleo de mamona e obteve valores de conversão de ésteres etílicos superiores a 90%.

### **3.5.1 Tipos de imobilização**

Na literatura, encontram-se muitos métodos descritos e utilizados para imobilização de enzimas. As técnicas de imobilização podem ser classificadas em naturais e artificiais. As naturais incluem a formação de biofilmes e a adesão/adsorção de enzimas em suportes sintéticos ou naturais e ocorrem espontaneamente por meio de interações eletrostáticas. As artificiais incluem a encapsulação ou aprisionamento em matrizes poliméricas como o alginato ou através de ligações covalentes utilizando-se agentes ligantes multifuncionais como o glutaraldeído ou carbodiimida (Figura 6).

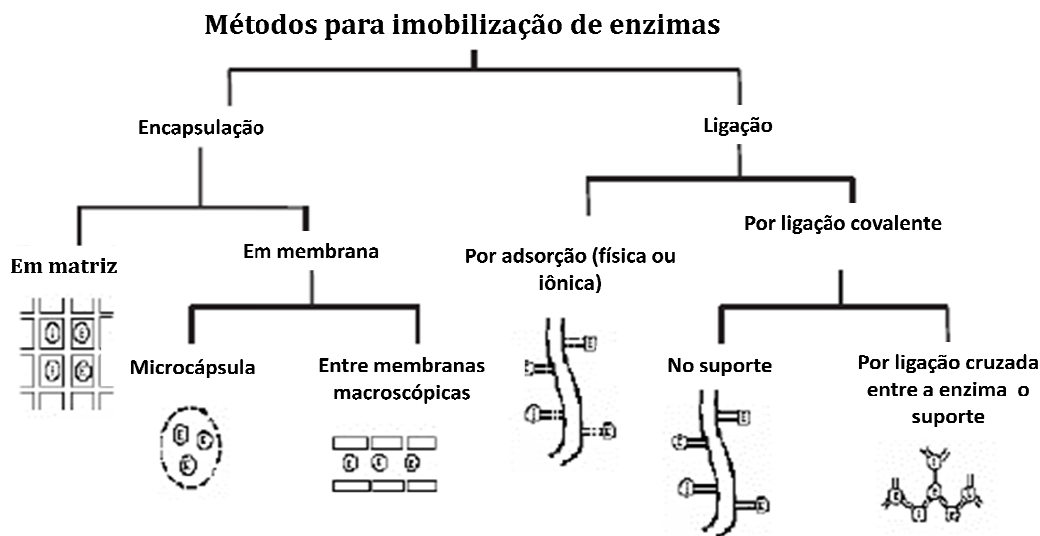


Figura 6. Esquema mostrando os diferentes métodos para imobilização de enzimas com destaque para os métodos de encapsulação (ou aprisionamento) em matriz e por ligação covalente no suporte (Dalla-Vecchia et al, 2004).

### **3.5.1.1 Imobilização por aprisionamento em matriz polimérica**

O mecanismo clássico de imobilização por aprisionamento é a mistura de enzimas ou células microbianas com um composto polimérico com cargas negativas como o alginato, pectato, ou outro polímero orgânico. Esta mistura é gotejada em uma solução gelificante para formação de ligações iônicas, que resultam na formação de um gel consistente e insolúvel, o qual imobiliza a enzima ou o microrganismo. O tamanho da barreira de contenção formada em torno das enzimas irá depender da velocidade de fluxo, da densidade da solução polimérica, da concentração da solução iônica e do tempo de imersão nesta solução na qual o gel será formado (Wang et al., 2005).

Essa técnica apresenta como vantagem o fato da enzima não interagir quimicamente com o polímero evitando, assim, a desnaturação; e em geral esta técnica apresenta total eficiência de imobilização. Contudo, a velocidade de difusão dos substratos e produtos através da membrana pode ser um problema. As enzimas encapsuladas apresentam atividade mais elevada em substratos de baixa massa molar, pois estes compostos se difundem pela membrana e se aproximam com mais facilidade do sítio ativo do biocatalisador (Dalla-Vecchia et

al, 2004). Moraes et al.(2002) estudaram a produção de isomaltulose a partir de sacarose, utilizando-se células de *Erwinia* sp. D12 imobilizadas em alginato de cálcio, em colunas de leito empacotado e obtiveram em torno de 50% de conversão, usando soluções de sacarose entre 20-30% a 35 °C.

Tanriseven e Dogan, (2001) imobilizaram a enzima de *Saccharomyces cereisiae* por aprisionamento em matriz de alginato. A imobilização resultou em 87% de atividade recuperada nos suportes úmidos, permanecendo inalterada por 36 dias.

Li et al., 2003, imobilizaram a bactéria *Klebsiella* sp. LX3 produtora de enzima denominada isomaltulose sintase, capaz de converter sacarose em isomaltulose e trealulose, por aprisionamento em gel de alginato de cálcio 2% (p/v). Utilizaram solução 10% de sacarose como substrato e obtiveram 87% de isomaltulose, 11,6% de trealulose e 1% de glicose.

Como visto, muitos relatos são encontrados na literatura de trabalhos que obtiveram excelentes resultados utilizando enzimas ou células integras imobilizadas em matrizes de alginato de cálcio, por aprisionamento, para utilização em processos fermentativos, nos quais o substrato é aquoso, não havendo a necessidade de retirada de umidade dos suportes. Segundo Lagoa e Rodrigues (2009), os suportes de alginato de cálcio hidratados (forma de gel) apresentam estrutura altamente porosa quando observados por microscopia eletrônica de varredura após preparação da amostra por meio de técnicas especiais que preservam a arquitetura do gel, o que facilita a difusão do substrato no interior do suporte até contato com a enzima imobilizada, garantindo os altos rendimentos alcançados. No entanto, após secagem, apresentam baixa porosidade, com poros localizados próximos à superfície e núcleo compacto o que pode dificultar os fenômenos de transferência de massa e interferir na atividade final do biocatalisador.

### **3.5.1.2 Imobilização por Adsorção física**

A adsorção física de enzima em suportes é uma técnica de imobilização antiga e muito utilizada. A enzima é imobilizada em um suporte sólido por interações de Van der Waals, ligações de hidrogênio ou iônicas.

Neste método, a quantidade de enzima imobilizada bem como sua atividade após imobilização depende da natureza do suporte utilizado e de suas características como: tamanho, área superficial, caracter hidrofóbico/ hidrofílico e composição química. A porosidade do suporte é importante e melhora a eficiência de imobilização por que a enzima fica adsorvida no interior dos poros, sendo que a quantidade de enzima adsorvida depende do tamanho dos poros e da concentração enzimática (Villeneuve et al., 2000).

Estudos reportados na literatura mostram que um pré-tratamento do suporte com aditivos ou solventes orgânicos, ou o uso destes durante o processo de imobilização melhora a eficiência do processo. Kogusi et al., (1995) imobilizaram lipase de *Pseudomonas fluorescens* em resina de troca iônica Dowex 66 sem um pré-tratamento do suporte e obtiveram baixos rendimentos de imobilização. Porém, ao adicionarem 50% de um solvente polar (etanol ou isopropanol) alcançaram rendimentos da ordem de 96 a 97%. Da mesma forma Montero et al., (1993) observaram que o pré-tratamento do suporte com solvente orgânico afetou a adsorção da lipase de *Candida rugosa* melhorando sua atividade na hidrólise de azeite de oliva. Os autores sugeriram que o solvente polar “absorve” as moléculas de água do suporte, favorecendo a adsorção da proteína.

### **3.5.1.3 Imobilização por ligação covalente**

A imobilização por ligação covalente envolve a formação de ligações covalentes entre os grupos funcionais presentes na superfície do suporte e os grupos funcionais dos resíduos de aminoácidos da enzima os quais, geralmente, não estão envolvidos no sítio ativo da enzima.

Em alguns casos, quando os grupos funcionais do suporte não possuem a capacidade de ligarem à enzima, eles precisam passar por um procedimento de ativação (reticulação), no qual seus grupos funcionais são ativados por reagentes específicos como, por exemplo, o glutaraldeído, que introduz um grupo carbonila, altamente susceptível a reações com os grupos nucleofílicos da enzima. A imobilização covalente evita o fenômeno de dessorção, diminui a velocidade de desativação espontânea e resiste a valores extremos de pH e temperatura. (Cardoso et al., 2009).

É importante que as condições de ativação sejam bem estabelecidas porque a eficiência deste procedimento é diretamente proporcional ao tipo e à concentração do agente de reticulação, tempo de contato e temperatura (Berger et al., 2004). Algumas estratégias têm sido utilizadas na tentativa de se proteger o sítio ativo das enzimas durante os processos de imobilização, dentre elas, destaca-se a utilização do polietilenoglicol (PEG-1500), que tem sido extensivamente utilizado como um modificador de proteínas (Sharma et al., (2001) e Soares et al., (2003).

A Figura 7 mostra as reações envolvidas no método de imobilização covalente em suportes aminopropilados. Naturalmente estes suportes não conseguem se ligar à enzima e por isso precisam passar pela etapa de ativação, que introduz grupamentos aldeídos em sua superfície para então se ligarem à enzima.

Os hidrogéis formados por reticulação devem ser isentos de agentes de reticulação que não reagiram e para isso precisam passar por diversas etapas de lavagem.

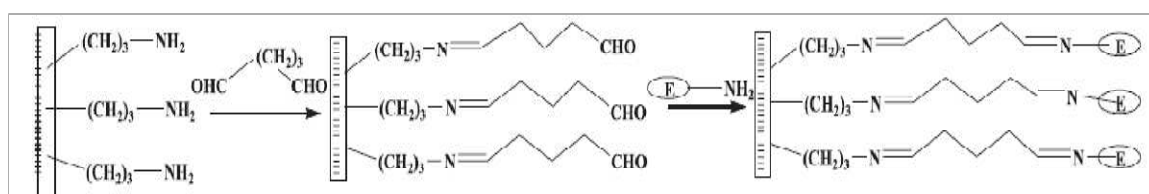


Figura 7: Reação de suportes aminopropilados para imobilização covalente, usando o glutaraldeído como agente de ativação (Cardoso et al., 2009).

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Materiais

A enzima utilizada neste trabalho foi lipase microbiana comercial de *Pseudomonas fluorescences* (Lipase AK) produzidas pela Amano Pharmaceuticals.

Foram utilizados na produção dos suportes para imobilização: alginato de sódio comercial Protanal LF 20/40 fornecido pela FMC BioPolymer, cujas especificações do fabricante são: massa molecular de 200.000 – 400.000g.mol<sup>-1</sup>, viscosidade 198mPa.s (1% (m/v) solução aquosa – 20°C) e pH 6,7 (1% solução aquosa – 20°C), quitosana de alto massa molecular e cloreto de cálcio dihidratado PA adquiridos da Sigma-Aldrich e glutaraldeído 25% da Vetec. Todos os outros reagentes utilizados foram de grau analítico.

Os reagentes utilizados no processo de imobilização foram: hexano, etanol PA e polietilenoglicol (PEG 1500) (Vetec); acetona, hidróxido de potássio, indicador ácido-base (fenolftaleína) e goma arábica em pó (Sigma-Aldrich), azeite de oliva comercial com baixo teor de acidez e água destilada para a realização da atividade hidrolítica da enzima.

## **4.2 Métodos**

### **4.2.1 Preparação dos suportes de alginato**

As soluções de alginato de sódio foram preparadas adicionando-se o alginato em pó diretamente em água destilada, ficando a mistura sob agitação magnética por 6 horas para total dissolução dos grânulos formados. A solução formada foi sonicada por 10 minutos para retirada de bolhas previamente à produção das partículas.

As partículas de alginato foram obtidas por gotejamento da solução aquosa de alginato de sódio em solução gelificante de cloreto de cálcio 0,1Molar. Para isto, foi utilizado um sistema de gotejamento da solução de alginato de sódio (Figura 8), composto por um tubo de aço inox com 0,7 mm de diâmetro de saída, denominado bico gotejador, uma bomba peristáltica Bomba Peristáltica MasterFlex – Cole-Parmer - modelo 7553-70 para bombeamento da solução de alginato de sódio até o bico gotejador e sistema de agitação magnética da solução gelificante. As gotas formadas caíram diretamente em um béquer contendo solução de cloreto de cálcio 0,1 Molar, sob agitação magnética, para gelificação por troca iônica dos íons sódio por cálcio. As partículas formadas foram retiradas da solução com auxílio de uma peneira, lavadas abundantemente

em banho de água corrente e secas superficialmente com papel toalha. Em seguida, foram secas em estufa a 100°C, sob pressão atmosférica, até umidade de equilíbrio.

Segundo Torres (2006), dentre os parâmetros que influenciam no tamanho da gota formada estão a temperatura e concentração da solução de alginato de sódio (viscosidade), vazão de bombeamento da bomba peristáltica e altura percorrida pela gota até contato com a solução gelificante. Baseados nestes parâmetros foram testados três concentrações (1%, 2% e 3%) de solução aquosa de alginato de sódio, três vazões de escoamento da solução de alginato de sódio (4,2; 3,0 e 1,7mL/min), sendo que para cada vazão foram testadas três alturas de gotejamento (18, 24 e 30cm).

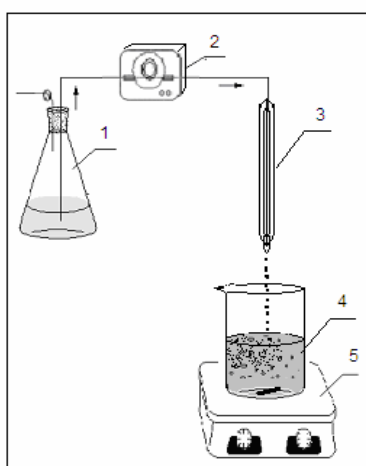


Figura 8: Esquema geral do sistema experimental empregado na preparação de partículas de alginato de cálcio. 1- Solução de alginato de sódio; 2- Bomba peristáltica; 3- Bico gotejador; 4- Solução de cloreto de cálcio; 5- Agitador magnético.

#### 4.2.2 Cinética de gelificação

Foram preparadas partículas de alginato de cálcio nas concentrações de 1%, 2% e 3%. O acompanhamento da cinética de liberação de sódio e adsorção de cálcio foi feito por meio da quantificação de íons sódio e cálcio nas partículas por fotometria de chama e por absorção atômica (amostras previamente digeridas) em diferentes tempos de imersão em solução de cálcio. Para cada



tempo, foram produzidas 20 partículas em 50 mL de solução de cloreto de cálcio 0,1 molar. A quantificação dos íons foi realizada nos tempos 10, 20, 30, 45, 60, 120, 180, 240, 300 e 1440 minutos de imersão em solução gelificante. Em cada tempo determinado as partículas foram escorridas e lavadas abundantemente com água destilada. Depois de pesadas foram digeridas em capela de exaustão com aquecimento, ácido nítrico e peróxido de hidrogênio (conforme método da AOAC, 2000). A solução resultante da digestão (aproximadamente 1 mL) foi diluída para 50 mL e realizada a leitura de sódio e cálcio em equipamento de absorção atômica. Todo este procedimento foi realizado para cada concentração de alginato de sódio em triplicata.

Os dados experimentais resultantes da cinética de troca iônica foram submetidos à análise estatística para avaliar a significância estatística da variável tempo nas concentrações de íons  $\text{Ca}^{2+}$  absorvido pelas partículas de alginato. Foi realizada uma Análise de Variância (ANOVA) para um nível de confiança de 95% ( $p < 0,05$ ), seguida de um Teste de Tukey, para comparação entre as médias.

#### **4.2.3 Preparação dos suportes de alginato com ferro**

Preparou-se uma solução aquosa de alginato de sódio 2% (p/v) e após completa solubilização do alginato adicionou-se ferro metálico em pó nas concentrações de 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1% (p/v).

A homogeneização do ferro na solução de alginato foi feita por agitação com bastão de polietileno e por tratamento ultrassônico usando banho de ultrassom a uma frequência de 40kHz, com potência de 100 W à temperatura ambiente. As partículas foram produzidas por gotejamento da solução de alginato com ferro em solução gelificante de cloreto de cálcio conforme descrito no item 4.2.1. As partículas com diferentes concentrações de ferro foram testadas em reator assistido por campo magnético, sob diferentes condições de vazão do ar e indução magnética, para verificar a resposta dos suportes ao campo magnético aplicado. Este teste foi utilizado para determinar a concentração de ferro a ser utilizada na produção dos biocatalisadores, visando à sua utilização em reação de biodiesel no referido reator.

#### **4.2.4 Produção dos suportes híbridos de alginato com quitosana**

Após determinadas as condições de produção de suportes de alginato, com e sem ferro, foram produzidos suportes híbridos de alginato e quitosana com e sem incorporação de ferro. Estas partículas foram sintetizadas segundo metodologia descrita por Methal et al (2000) com modificações. Inicialmente, preparou-se uma solução de quitosana 1% (p/v) em ácido acético 5% (v/v). A esta solução adicionou-se solução de cloreto de cálcio para concentração final de 0,1 molar de cálcio e 0,5% (p/v) de quitosana. Os suportes foram produzidos gotejando-se a solução de alginato de sódio 2% (com ferro e sem ferro) na solução de cloreto de cálcio com quitosana onde permaneceram por 1h, sob agitação magnética, para gelificação dos suportes.

#### **4.2.5 Secagem das partículas de Alginato**

Para a realização do estudo da cinética de secagem dos suportes de alginato utilizou-se secagem em estufa convencional sem circulação de ar por ser um processo que simula o tipo de secagem comumente utilizado nos trabalhos de laboratório que utilizam alginato.

Inicialmente, determinou-se a umidade do material úmido por termogravimetria em estufa à pressão atmosférica na temperatura de 105°C até a amostra atingir peso constante. Realizou-se o acompanhamento da perda de massa dos suportes preparados com alginato a 1, 2 e 3% a 100°C para verificação da interferência dessas concentrações na cinética de secagem do material. Os suportes preparados com alginato a 2% foram secos nas temperaturas de 70, 100 e 120°C para estudo da cinética de secagem nestas condições. Realizou-se também a secagem dos suportes de alginato 2% com incorporação de ferro e dos suportes híbridos de alginato 2% com quitosana.

As amostras foram colocadas em cadinhos posicionados em sentido diagonal no interior da estufa, ficando uma amostra posicionada na frente, uma no centro e outra no fundo da estufa, na tentativa de minimizar os problemas relacionados às possíveis diferenças de temperatura e circulação de ar, visto que a distribuição espacial dentro da estufa exerce influência na secagem das

amostras. Utilizou-se amostras de aproximadamente 4 gramas para acompanhamento da perda de massa durante 240 minutos.

#### **4.2.6 Imobilização enzimática**

Foram testados diferentes métodos de imobilização da lipase AK nos suportes produzidos, tais métodos foram escolhidos de acordo com as características de cada suporte e o principal objetivo foi comparar a eficiência de imobilização dos diferentes biocatalisadores. Nos suportes de alginato (puro e com ferro) foram testados os métodos de imobilização por aprisionamento e por adsorção física / ligação covalente e nos suportes híbridos de alginato (alginato e quitosana puro e com ferro) foi testada a imobilização por ligação covalente com presença de ativador.

##### **4.2.6.1 Por aprisionamento**

Foi adicionada lipase AK em pó nas concentrações 5mg/mL, 10mg/mL e 15mg/mL (massa de enzima/ volume solução alginato) diretamente em 200 mL de solução de alginato de sódio 2%. Após homogeneização manual com bastão de polietileno, as partículas foram produzidas por gotejamento da solução aquosa de alginato de sódio em solução gelificante de cloreto de cálcio 0,1 molar no sistema descrito no item 4.2.1, com vazão de 3,0 mL/min e altura de 24 cm e tempo de imersão das partículas de 1 hora. As partículas gelificadas foram lavadas exaustivamente com água destilada e secas a vácuo à temperatura ambiente. O mesmo procedimento foi realizado para a imobilização da enzima por aprisionamento nos suportes de alginato com magnetita. A magnetita foi adicionada na concentração de 0,6% (concentração determinada no estudo realizado com partículas com diferentes concentrações de ferro no reator assistido por campo magnético) na solução de alginato de sódio e enzima.

#### **4.2.6.2 Por ligação covalente sem presença de ativador**

Os suportes de alginato secos ficaram imersos em hexano (razão da massa de suporte : solução de hexano de 1:10) sob agitação por 2 horas. Adicionou-se a solução enzimática na concentração 5mg/mL na proporção 10 mL de solução para cada grama de suporte. O sistema ficou sob agitação por 4 horas à temperatura ambiente seguido de contato estático por um período de 18 horas a 4°C. Os derivados imobilizados foram recuperados por filtração a vácuo, com sucessivas lavagens com água destilada e armazenados em geladeira.

#### **4.2.6.3 Por ligação covalente com presença de ativador**

Quando os grupos funcionais do suporte não possuem a capacidade de se ligarem à enzima, os suportes precisam passar por um procedimento de ativação, no qual seus grupos funcionais são ativados por reagentes específicos como, por exemplo, o glutaraldeído, que introduz um grupo aldeído, altamente susceptível a reações com os grupos nucleofílicos da enzima. Devido às características químicas da quitosana presente nos suportes híbridos de alginato e quitosana, estes suportes precisaram passar por uma etapa inicial de ativação para posterior imobilização.

Os suportes híbridos foram inicialmente ativados com glutaraldeído. Para a ativação, os suportes foram embebidos em solução de glutaraldeído 2,5% (v/v) em tampão fosfato de sódio 0,1 Molar e pH 7 por 1 hora a 25°C sob agitação branda (razão massa de suportes : volume total de 1:10). Após este período, o suporte foi lavado exaustivamente com água destilada sendo em seguida levado à estufa (60°C) por 2 horas (Paula et al., 2008).

Os suportes previamente ativados foram embebidos em hexano em uma razão de 1:10 e mantidos sob agitação branda por 2 horas. Após este período, para cada grama de suporte ativado (matéria seca), foram adicionados 50mg de lipase AK em pó e 0,1mL de solução aquosa contendo 5mg/mL de polietilenoglicol (PEG-1500). As suspensões contendo enzima e suportes foram mantidas sob suave agitação à temperatura ambiente por 2 horas, seguido de armazenamento sem agitação por um período adicional de 18 horas a 4°C. Os

derivados imobilizados foram recuperados por filtração a vácuo, com sucessivas lavagens com água destilada e armazenados em geladeira.

#### **4.2.7 Caracterização dos suportes**

Os suportes de alginato puros, alginato com ferro e alginato com quitosana foram caracterizados quanto à umidade, resistência mecânica e térmica, solubilidade, granulometria e morfologia.

##### **4.2.7.1 Determinação de Umidade**

A umidade dos suportes foi determinada pelo método gravimétrico em estufa de convecção natural a 105°C até peso constante.

##### **4.2.7.2 Resistência a agitação**

A resistência mecânica dos suportes a agitação foi determinada por imersão de exatamente 1g de suporte seco em 200 mL de água destilada por um período de 72 horas sob agitação vigorosa à temperatura ambiente. Os suportes foram retirados da água com o auxílio de peneira metálica, secos até peso constante em estufa convencional a 105°C e em seguida pesados para verificação de perda de massa por comparação com a massa inicial.

Segundo a metodologia proposta por Alzate (2008), a resistência pode ser dividida em três categorias de acordo com a perda de massa do suporte seco (considerando a massa antes e depois do teste de agitação), as quais estão apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2: Resistência a agitação dos suportes segundo Alzate (2008)

<i>Resistência a agitação</i>	<i>Satisfatória</i>	<i>Moderada</i>	<i>Insatisfatória</i>
Perda de massa (%)	< 2	2 a 5	> 5

#### **4.2.7.3 Solubilidade dos suportes em diferentes meios**

A solubilidade dos suportes foi avaliada por imersão de 1g de suporte seco em 100 mL de diferentes solventes, durante 72 horas, a 25°C sob agitação branda. Em seguida os suportes foram filtrados a vácuo e lavados com água destilada. Foi realizada uma avaliação visual e microscópica do estado de conservação da estrutura dos suportes. Os diferentes meios foram água, hexano, etanol, ácido acético e mistura de etanol anidro com óleo vegetal na proporção 1:1.

#### **4.2.7.4 Distribuição granulométrica**

A distribuição de tamanhos das partículas de alginato de cálcio com e sem incorporação de ferro foi determinada pelo método de difração a laser usando um Analisador de partículas modelo SALD-3101 (SHIMADZU) que permite analisar uma ampla faixa de tamanhos de partículas entre 0.05 e 3000  $\mu\text{m}$  de diâmetro.

A metodologia de análise consiste em dispersar uma massa de partículas em um sistema de amostragem em fase aquosa constituído por uma espécie de banho termostático, equipado com uma bomba para ajuste do fluxo de ar que movimenta as partículas através de um único sistema ótico e única fonte de luz, sendo o princípio da medição o espalhamento desta luz ao incidir sobre as partículas em suspensão.

#### **4.2.7.5 Análise morfológica**

A análise da morfologia dos suportes e biocatalisadores foi realizada com auxílio da microscopia óptica (MO) e da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Para análise por microscopia óptica, as partículas secas foram colocadas em placa de petri e analisadas usando estereoscópio com câmera digital acoplada. A microscopia eletrônica de varredura foi realizada em equipamento da marca SHIMADZU, sendo as amostras metalizadas com ouro e as imagens geradas a partir de elétrons secundários sob vácuo. Esta técnica essencialmente

permite investigar aspectos morfológicos dos materiais, utilizando principalmente detalhes da imagem topográfica da superfície examinada.

#### **4.2.7.6 *Análise termogravimétrica (TGA)***

Termogravimetria é a técnica na qual a mudança da massa de uma substância (em atmosfera controlada) é medida em função da temperatura, esta submetida a uma programação controlada (Edith, 1997). É uma técnica muito utilizada na caracterização do perfil de degradação de polímeros. A exposição à temperatura elevada pode, algumas vezes, alterar a estrutura química e, por consequência, as propriedades dos materiais.

A análise termogravimétrica (TGA) foi empregada para caracterizar os suportes de alginato de cálcio com e sem a incorporação de ferro. As análises foram conduzidas usando o Sistema Termogravimétrico SDT 2960 (TA Instruments) com uma balança de termo sensibilidade de 0,1  $\mu\text{g}$ . As amostras secas (aprox. 16,0 mg) foram analisadas sob atmosfera dinâmica de nitrogênio (P.A.) com fluxo de 100  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , entre 20 e 1150°C, operando com uma taxa de aquecimento de 20°C  $\text{min}^{-1}$ . Os dados foram processados usando o software Universal V3 System Analysis (TA Instruments).

#### **4.2.8 *Caracterização dos derivados imobilizados***

Os biocatalisadores imobilizados foram caracterizados quanto à atividade enzimática recuperada e eficiência de imobilização.

##### **4.2.8.1 *Determinação da atividade hidrolítica***

A atividade enzimática da enzima livre e imobilizada foi determinada pelo método de hidrólise de azeite de oliva de acordo com a metodologia adaptada de Soares et al (1999). Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 $\mu\text{mol}$  de ácido graxo por minuto de reação.

Foram misturados 5 mL de uma emulsão de azeite de oliva (50% azeite: água e 2,5% de gama arábica) e 4 mL de tampão fosfato 0,1M pH 7,0. A fim de garantir homogeneização do meio, o sistema reacional foi mantido sob agitação (150 rpm) a 37°C por 10 minutos. Em seguida adicionou-se a amostra que ficou sob agitação de 200rpm durante o tempo determinado para a reação. Após o período de incubação, adicionou-se 10 mL de uma mistura de etanol e acetona (1:1) com o objetivo de cessar a reação. A amostra foi titulada com solução de KOH (0,02 N) com o auxílio de um agitador magnético e indicador fenolftaleína. O volume gasto na titulação foi anotado para realização dos cálculos. A atividade foi calculada considerando o volume gasto na titulação segundo a equação (1).

$$A = \frac{(V_a - V_b) \times C_{KOH} \times 10^3}{t \times m} \quad (1)$$

*Em que: A é atividade hidrolítica em U/g sendo U definida como unidades de atividade em  $\mu\text{mols}/\text{min}$ ;  $V_a$ ,  $V_b$  são volumes de KOH gastos na titulação da amostra e do branco em mL, respectivamente;  $C_{KOH}$  é a concentração da solução de KOH usada na titulação em mol/L; t é tempo de incubação em min; m é a massa de biocatalizador adicionado usada em g.*

#### **4.2.8.2 Cálculo do rendimento de imobilização**

O rendimento de imobilização ( $\square$ ) foi calculado com base na atividade enzimática oferecida e a atividade enzimática residual presente no meio reacional após o processo de imobilização, como mostra a equação (2).

$$\eta(\%) = \frac{U_0 - U_f}{U_0} \times 100 \quad (2)$$

*Em que:  $U_0$  é a atividade oferecida no início da imobilização (U/g) e  $U_f$  é a atividade residual presente no sobrenadante após a imobilização (U/g).*



#### 4.2.8.3 Cálculo da atividade recuperada

O cálculo da atividade recuperada foi determinado pela relação entre a atividade contida nos biocatalisadores e as atividades inicial e final presentes no sobrenadante, conforme mostrado na equação (3).

$$AR(\%) = \frac{U_s}{U_o - U_f} \times 100 \quad (33)$$

*Em que: AR é a atividade recuperada (%);  $U_s$  é a atividade hidrolítica contida no derivado imobilizado (U/g);  $U_o$  é a atividade oferecida no início da imobilização (U/g) e  $U_f$  é a atividade residual presente no sobrenadante após a imobilização (U/g).*

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Estudo das condições de produção das partículas de alginato

Foram realizados experimentos para verificar os parâmetros que influenciam nas características físicas das partículas produzidas por gotejamento, visando à determinação das condições experimentais que proporcionem a produção de partículas com boa esfericidade e com distribuição granulométrica uniforme ou estreita. Posteriormente, foi realizado um estudo para determinação da capacidade de troca iônica e do tempo necessário para total gelificação das partículas.

Para a produção das partículas de alginato de cálcio à temperatura ambiente, foram testadas três concentrações (1%, 2% e 3% p/v) de solução aquosa de alginato de sódio. Para cada concentração de alginato de sódio utilizada foram testadas três alturas de gotejamento (18, 24 e 30 cm), sendo necessária a realização de ajustes na vazão de escoamento da bomba peristáltica. As vazões utilizadas para o gotejamento das soluções de alginato de sódio 1, 2 e 3% foram de 4,2; 3,0 e 1,7mL/min, respectivamente. O aumento da concentração do alginato leva a um aumento da viscosidade da solução que exerce grande interferência no processo de formação das gotas em uma mesma temperatura. Segundo Torres (2006), o diâmetro de abertura do bico gotejador e

a temperatura da solução de alginato de sódio (consequentemente na viscosidade da solução) interferem no tamanho da gota formada. Para um mesmo diâmetro de abertura do bico, soluções de maior viscosidade formam gotas maiores. Foi possível observar que a altura do bico de gotejamento até o contato com a solução gelificante de cloreto de cálcio foi uma das principais variáveis na obtenção de partículas de boa esfericidade. A altura percorrida pela gota determina a velocidade no momento de impacto da partícula com a superfície da solução gelificante de modo que para menores alturas, as partículas apresentaram uma “cauda” acentuada e para maiores alturas, houve a formação de partículas achatadas, conforme mostrado na Tabela 3. Para as diferentes concentrações da solução de alginato de sódio (diferentes viscosidades), foi necessário se fazer ajustes de vazão da bomba peristáltica de forma que, quanto maior a vazão da bomba, menos uniformes foram as partículas produzidas. Portanto, para a produção de partículas uniformes utilizou-se baixas vazões. As partículas de alginato de cálcio úmidas formadas apresentaram formato esférico, com diâmetro da ordem de 4 a 5 mm .

Tabela 3: Ensaios para obtenção de partículas com boa esfericidade por gotejamento.

<b>Ensaio</b>	<b>CAlginato de Sódio (% mássica)</b>	<b>Altura do bico gotejador* (cm)</b>	<b>Forma</b>
1	1%	18	Esférica
		24	Esférica
		30	Achatada
2	2%	18	Formação de cauda
		24	Esférica
		30	Achatada
3	3%	18	Formação de cauda
		24	Esférica
		30	Achatada

\*Altura do trajeto percorrido pela gota

Para todas as condições analisadas, o ensaio 2, no qual foi utilizado concentração mássica de 2%, vazão da bomba peristáltica de 3,0mL/min e altura do bico de gotejamento de 24 cm, foi o mais adequado. Os suportes preparados nestas condições apresentaram boa esfericidade, diâmetro médio de 4 a 5 mm (partículas úmidas) e diâmetro médio entre 1 e 2 mm depois de secos.

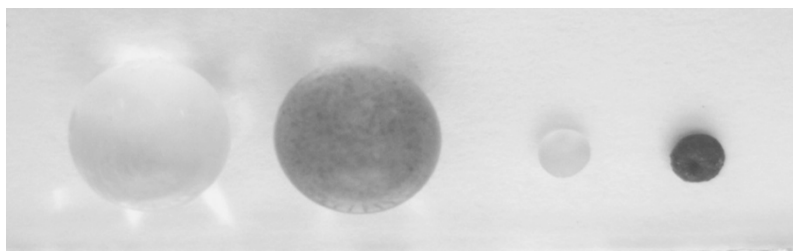


Figura 9: Fotografias digitais dos suportes de alginato sem ferro e com ferro, hidratados e secos em estufa convencional a 100°C.

### 5.1.1 Cinética de gelificação

O estudo da cinética de gelificação das partículas de alginato de cálcio foi realizado com o objetivo de determinar exatamente o tempo necessário para que ocorra a total gelificação destas partículas. Durante o processo de gelificação íons sódio são liberados para a solução gelificante enquanto os íons cálcio se ligam a estrutura do polímero para a formação do gel. Neste contexto, realizou-se um estudo do processo de gelificação do alginato para determinação da cinética de entrada dos íons cálcio e consequente determinação do tempo de gelificação. Avaliou-se também neste estudo a interferência de duas variáveis no processo de gelificação como: a concentração da solução de alginato de sódio e a incorporação de íons ferro na estrutura do alginato.

O presente estudo foi realizado através da quantificação dos íons sódio e cálcio presentes nas partículas de alginato ao longo do tempo de gelificação, realizada em equipamento de absorção atômica. Inicialmente, fez-se a quantificação dos íons sódio nas partículas de alginato 1, 2 e 3% ao longo do tempo de gelificação. Os resultados mostraram que, independente da

concentração de alginato utilizada, praticamente todo o sódio presente nas partículas foi liberado durante o processo de gelificação (Figura 10).

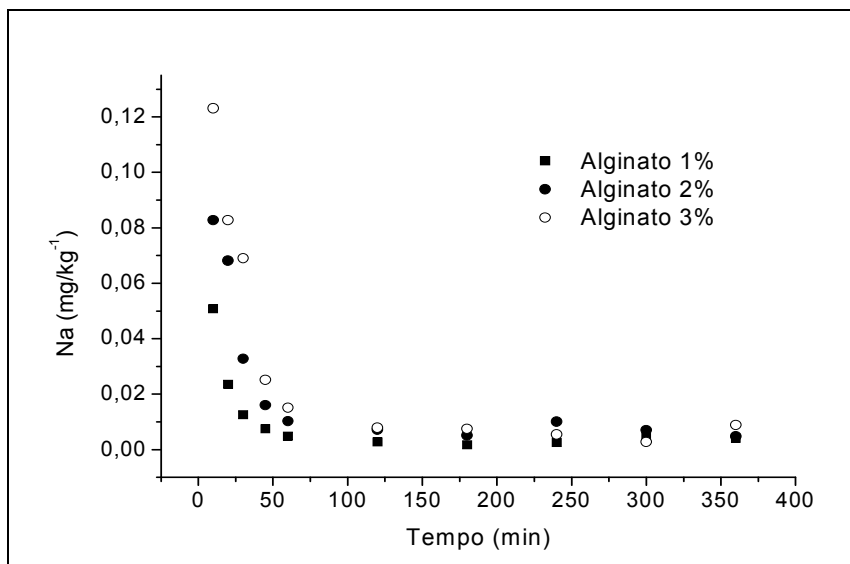


Figura 10: Cinética de redução de íons sódio nas partículas de alginato 1, 2 e 3% ao longo do tempo de gelificação.

De acordo com Blandino et al (1999), na formação de partículas de alginato pelo método de gotejamento, o processo de formação do gel começa imediatamente após o contato da solução de alginato de sódio (em formato de gota) com a solução catiônica. Neste momento, forma-se instantaneamente uma membrana capsular que vai aumentando sua espessura à medida que os íons cálcio difundem em direção ao centro da gota. Estes autores, estudaram a influência da concentração de alginato de sódio e cloreto de cálcio na cinética de gelificação de membranas de alginato de cálcio formadas pelo método de extrusão e observaram que o processo de formação do gel é controlado pela difusão dos íons cálcio. Em razão de o cálcio ser um cátion metálico menor que a molécula do polímero é ele que se difunde através da cadeia do alginato se ligando aos sítios de ligação do polímero que estão livres.

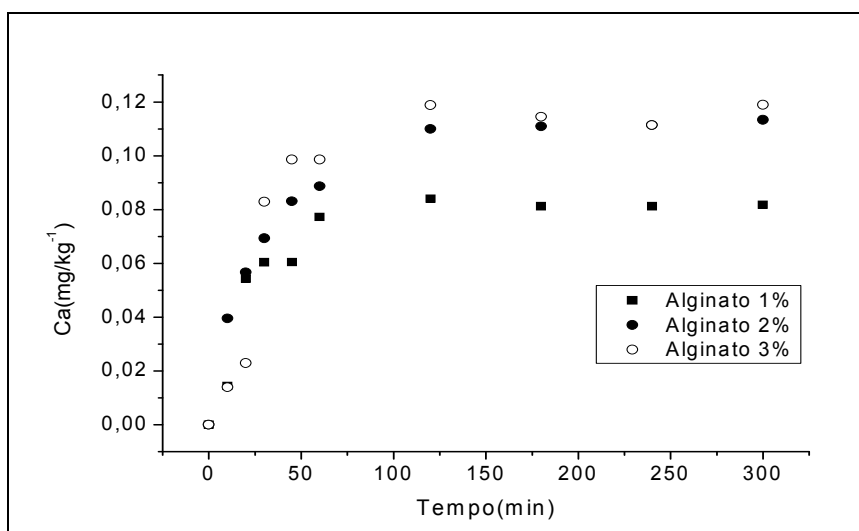


Figura 10. Cinética de absorção de íons cálcio nas partículas de alginato 1, 2 e 3% ao longo do tempo de gelificação.

A figura 11 mostra a cinética de absorção de íons cálcio pelas partículas de alginato ao longo do tempo de gelificação. Inicialmente, é possível observar um rápido aumento na concentração dos íons cálcio, indicando um intenso processo de difusão na fase inicial de formação do gel. Isso ocorre porque o gradiente de concentração existente entre as soluções favorece a difusão dos íons cálcio que se ligam rapidamente aos sítios de ligação da cadeia polimérica que estão desocupados. À medida que estes sítios vão sendo ocupados, nas regiões mais externas, os íons cálcio precisam se difundir através do gel que já está formado para então se ligar aos sítios que ainda estão livres na zona de gelificação mais interna, o que provoca uma diminuição na velocidade de formação do gel.

Na figura 10, uma comparação entre as curvas permite dizer que as concentrações de íons cálcio absorvidos pelas partículas de alginato 2% são consideravelmente maiores que para alginato 1%. No entanto, o mesmo não acontece quando a concentração do alginato é elevada de 2% para 3%, no qual é possível observar um discreto aumento da concentração do cálcio. Possivelmente este fenômeno se justifique pelo fato de que, com o aumento da concentração do alginato, aumenta-se também o número de sítios de ligação por unidade de volume na região superficial das partículas, o que pode dificultar a difusão dos íons cálcio por esta membrana superficial já reticulada.

A cinética de gelificação das partículas de alginato com ferro permitiu verificar a influência da incorporação do ferro no processo de formação do gel. Os

resultados ilustrados na figura 12, mostram uma discreta diferença entre as concentrações de sódio liberado das partículas de alginato com ferro e sem ferro que também podem ser resultado de dificuldades difusionais provocadas pela presença do ferro na estrutura do alginato. No entanto, as diferenças existentes entre as concentrações de cálcio absorvido por estas partículas são claras e bem expressivas (Figura 13).

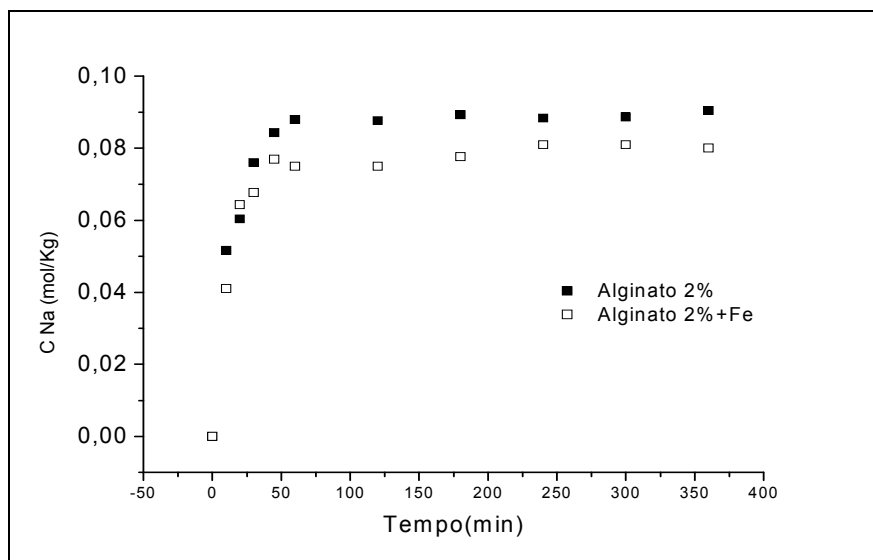


Figura 12. Cinética de liberação de íons sódio das partículas de alginato 2% e alginato 2% com ferro.

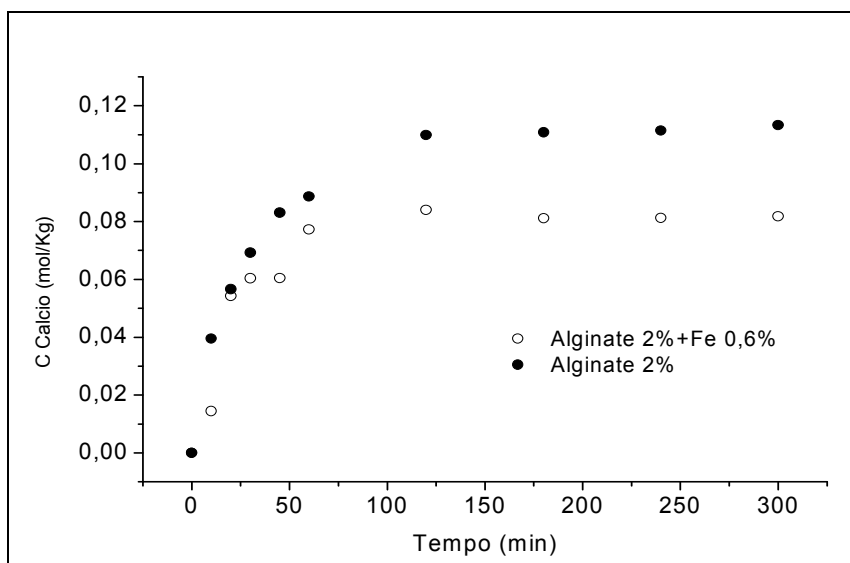


Figura 13. Cinética de absorção de íons cálcio pelas partículas de alginato 2% e alginato 2% com ferro.

Na tentativa de tentar entender estas diferenças, algumas hipóteses são levantadas e discutidas. Segundo Davis et al (2003), o alginato possui afinidade química pelos íons ferro divalentes, que de forma semelhante ao cálcio, se ligam aos sítios de ligação do alginato formando gel. Durante o processo de produção, percebeu-se a ocorrência de oxidação de ferro ao longo do processo de gelificação o que leva a possibilidade da ocorrência de possíveis trocas entre os íons cálcio já ligados aos sítios de ligação com os íons ferro ou até mesmo a ligação direta dos íons ferro, oxidados nos sítios de ligação ainda desocupados. Porém, a princípio, o ferro presente nas partículas não está na forma de íons e por isso a possibilidade de ligação química com o suporte seria mínima. Essa hipótese foi reforçada com a observação de que os suportes produzidos com ferro apresentaram menor resistência mecânica (observada por esmagamento manual das partículas úmidas) quando comparado com partículas de alginato de cálcio sem o ferro. Assim, o ferro presente nos suportes estaria preso fisicamente às redes tridimensionais formadas no processo de reticulação, formando barreiras físicas que podem impedir a ligação do cálcio nos sítios de ligação. A reticulação das cadeias de alginato se dá por interação dos monômeros de ácido gulurônico com íons divalentes (neste caso, íons cálcio). Conseqüentemente, o impedimento dos sítios de ligação e a dificuldade de movimentação dos íons cálcio no interior da partícula, promovidos pela presença de ferro metálico, causam uma deficiência no processo de reticulação, o que justifica essa menor resistência mecânica do gel de alginato formado com incorporação de ferro.

Os resultados apresentados até aqui mostram que a determinação do tempo de gelificação das partículas deve ser definido pelo tempo necessário para se chegar a concentração de equilíbrio de íons cálcio no interior das partículas. Realizou-se análise de variância para verificação da influência da variável tempo no processo de gelificação cujos resultados mostraram efeito altamente significativo para a variável tempo. Aplicou-se então o teste Tukey para comparação das médias das concentrações de cálcio absorvido pelas partículas de alginato 1, 2 e 3% e alginato 2% com ferro ao longo do tempo de gelificação. Os resultados estão expressos nas Tabela 4 a 7.

Tabela 4: Média das concentrações de íons cálcio nas partículas de alginato 1% ao longo do tempo de gelificação.

Tempo (min)	Concentração de $\text{Ca}^{+2}$ (Mol/Kg)
0	0,000 <sup>f</sup>
10	0,014 <sup>e</sup>
20	0,054 <sup>d</sup>
30	0,060 <sup>c</sup>
45	0,060 <sup>c</sup>
60	0,077 <sup>b</sup>
120	0,084 <sup>a</sup>
180	0,081 <sup>a,b</sup>
240	0,081 <sup>a,b</sup>
300	0,082 <sup>a,b</sup>

Tabela 5: Média das concentrações de íons cálcio nas partículas de alginato 2% ao longo do tempo de gelificação.

Tempo (min)	Concentração de $\text{Ca}^{+2}$ (Mol/Kg)
0	0,000 <sup>g</sup>
10	0,039 <sup>f</sup>
20	0,057 <sup>e</sup>
30	0,069 <sup>d</sup>
45	0,083 <sup>c</sup>
60	0,089 <sup>b</sup>
120	0,110 <sup>a</sup>
180	0,111 <sup>a</sup>
240	0,111 <sup>a</sup>
300	0,113 <sup>a</sup>

Tabela 6: Média das concentrações de íons cálcio nas partículas de alginato 3% ao longo do tempo de gelificação.

Tempo (min)	Concentração de $\text{Ca}^{+2}$ (Mol/Kg)
0	0,000 <sup>f</sup>
10	0,014 <sup>e</sup>
20	0,023 <sup>d</sup>
30	0,083 <sup>c</sup>
45	0,099 <sup>b</sup>
60	0,099 <sup>b</sup>
120	0,119 <sup>a</sup>
180	0,114 <sup>a</sup>
240	0,111 <sup>a</sup>
300	0,119 <sup>a</sup>

Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.



**Tabela 7.** Média das concentrações de íons cálcio absorvidos pelas partículas de alginato 2% com 0,6% de ferro ao longo do tempo de gelificação.

Tempo (min)	Concentração de Ca <sup>+</sup> (Mol.Kg <sup>-1</sup> )
0	0,000 <sup>f</sup>
10	0,038 <sup>e</sup>
20	0,056 <sup>d</sup>
30	0,077 <sup>a</sup>
45	0,068 <sup>a b</sup>
60	0,073 <sup>a b</sup>
120	0,068 <sup>b c</sup>
180	0,062 <sup>c</sup>
240	0,076 <sup>a</sup>
300	0,078 <sup>a</sup>

Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Os resultados encontrados mostraram que a concentração de íons cálcio absorvidos pelas partículas de alginato 1, 2 e 3% foi crescente durante os primeiros 120 minutos de imersão, para as diferentes concentrações de alginato, não havendo aumento significativo das trocas após este período até 1440 minutos (24 horas), indicando que o equilíbrio foi atingido. No entanto, com 60 minutos de imersão as partículas já possuem em torno de 85 a 90% do cálcio total que será absorvido ao final de mais 60 minutos de imersão. Ou seja, a quantidade de cálcio que será absorvida nos próximos 60 minutos de imersão é muito pequena se comparada à concentração final atingida. Desta forma, convencionou-se o tempo de 60 minutos como sendo o tempo necessário para gelificação dos suportes de alginato já que a concentração de cálcio absorvido nos primeiros 60 minutos do processo já é suficiente para produção de suportes rígidos e resistentes. No caso das partículas de alginato com ferro, o equilíbrio ocorre mais rapidamente e os 60 minutos já são suficientes para se atingir a concentração máxima de íons cálcio.

### 5.1.2 Preparação dos suportes

Baseados nos resultados obtidos nos testes preliminares, foram determinadas as condições de produção dos suportes de alginato para imobilização da enzima lípase AK. A inclusão de ferro na solução de alginato de sódio não provocou grandes alterações na viscosidade da solução de modo que

os suportes de alginato com ferro foram produzidos nas mesmas condições que os suportes de alginato puro (altura de gotejamento e vazão da bomba). O ferro metálico ficou disperso na solução de forma bastante homogênea. Entretanto, após o gotejamento, foi possível observar uma interferência da força magnética do agitador no ferro presente nas partículas, gerando um alinhamento do ferro no interior das partículas no pólo de maior proximidade à base do agitador (Figura 4). Convencionou-se então o uso de agitação manual para a produção dos suportes de alginato com ferro.

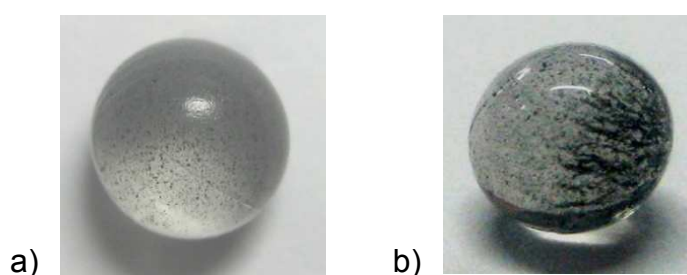


Figura 14. Partículas úmidas de alginato com ferro produzidas com agitação manual (a) e produzidas com agitador magnético (b).

#### **5.1.2.1 Determinação do teor mínimo de ferro nos suportes**

O desenvolvimento de biocatalisadores com propriedades magnéticas é essencial para a tecnologia que utiliza biorreatores assistidos por campo eletromagnético. O teor de ferro presente nestes suportes é de extrema importância para que estes reatores atuem em condições de leito estabilizado magneticamente. Neste contexto, foi realizado um estudo visando avaliar qual o teor de ferro requerido para garantir aos biocatalisadores propriedades magnéticas suficientes para operar o reator dentro das limitações tecnológicas de induções magnéticas possíveis de serem geradas pelo sistema.

Para este experimento foram preparadas partículas de alginato de cálcio com teores de ferro de 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0% e como fluidos foram usados primeiramente ar sintético e posteriormente uma mistura de óleo de soja: etanol na razão molar 1:8 da mesma forma que é feito para a síntese de biodiesel.

Inicialmente o leito do reator foi abastecido com 1 g de partículas, correspondendo a uma altura de aproximadamente 2 cm no leito. Após atingirem velocidade de mínima fluidização o leito foi expandido até o dobro da altura inicial do leito de partículas. Nesta condição, foi então determinada a indução magnética requerida para estabilizar magneticamente o leito. A Tabela 8 apresenta os resultados usando ar sintético como fluido, sendo possível verificar uma relação inversamente proporcional entre a vazão de ar necessária para expandir / fluidizar o leito e a indução magnética requerida para estabilizá-lo, à medida que se aumenta o teor de ferro nas partículas.

Tabela 8. Resultados da avaliação do teor de ferro nas partículas de alginato no desempenho fluidodinâmico do biorreator assistido por campo eletromagnético usando ar sintético para a expansão / fluidização do leito de partículas.

Teor de Fe nas partículas (%)	Pressão do Ar (KgF/cm <sup>2</sup> )	Valor de Corrente (A)	Indução magnética (mT)	Altura final do leito (cm)
<b>0,1</b>	0,40	13,40	32,10	2
<b>0,2</b>	0,90	7,00	16,39	2,5
<b>0,4</b>	1,30	3,99	9,89	2,5
<b>0,6</b>	1,30	2,75	6,14	2,3
<b>0,8</b>	1,40	2,85	6,42	2,4
<b>1,0</b>	1,40	3,30	7,87	2,4

Estes resultados mostram que as partículas com teor de ferro a partir de 0,6% já garantem condições de operação com induções magnéticas relativamente baixas, em torno de 6 mT. Com base nestes resultados, adotou-se o teor de ferro de 0,6% para a preparação dos biocatalisadores com propriedades magnéticas que serão desenvolvidos neste trabalho.

### 5.1.3 Produção dos suportes híbridos de alginato

A inclusão de quitosana nos suportes de alginato foi realizada com o intuito de fornecer aos suportes de alginato os grupamentos amino presentes na estrutura da quitosana e assim possibilitar a utilização do método de imobilização covalente utilizando o glutaraldeído como ativador. Estes suportes híbridos apresentaram características físicas semelhantes aos suportes produzidos com

alginate puro. As partículas úmidas formadas apresentaram boa esfericidade e diâmetro médio na ordem de 4 a 5 mm. Na produção dos suportes de alginato/quitosana com incorporação de ferro, foi possível observar, durante o tempo de imersão em solução gelificante, a formação de bolhas de ar no interior das partículas. O surgimento dessas bolhas ocorreu alguns minutos após o contato das partículas de alginato com a solução gelificante de cálcio e quitosana sugerindo a ocorrência de reações químicas entre quitosana e ferro ou entre o ácido acético (utilizado no preparo da solução de quitosana) e o ferro, com liberação de gás. Conforme descrito no item 5.1.2, observou-se a necessidade de utilização de agitação manual durante a gelificação das partículas com ferro para evitar acúmulo de ferro em um dos pólos da partícula. Porém, na intenção de verificar a interação da quitosana com o ferro, foi utilizado o agitador magnético para produção dos suportes de alginato/quitosana/ferro e foi possível observar que as bolhas se formavam no interior das partículas, na região de maior concentração de ferro, conforme mostra a figura 15.

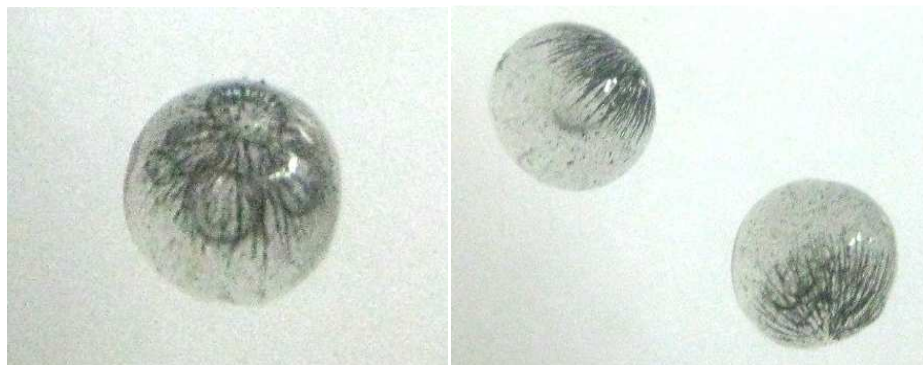


Figura 11. Fotografias obtidas durante o monitoramento do processo de gelificação das partículas de alginato com quitosana e ferro mostrando a formação de bolhas no interior das partículas no pólo de maior concentração de ferro.

A formação dessas bolhas no interior das partículas foi tão intensa que além de provocar um deslocamento das mesmas para a superfície da solução gelificante, ficando parte das partículas em contato com o ar atmosférico, muitas bolhas eclodiram gerando partículas completamente irregulares e quebradiças. Após secagem, elas apresentaram aparência bastante irregular, diâmetro médio na ordem de 3 a 4 mm e baixa resistência mecânica, sendo possível destruí-las

com leve esmagamento manual, conforme mostra a Figura 126. Sendo assim, o híbrido alginato/quitosana/ferro não se mostrou um sistema apropriado para o desenvolvimento de biocatalisadores com propriedades magnéticas nas condições estudadas.

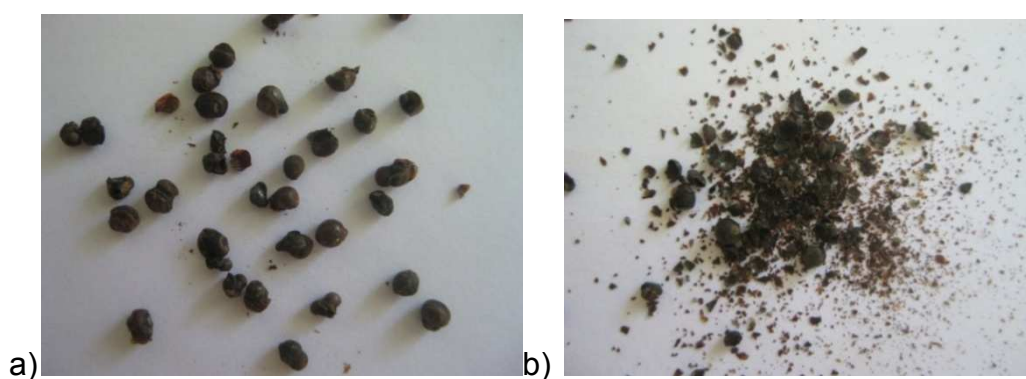


Figura 12. Suportes híbridos de alginato/quitosana/ferro secos antes (a) e após esmagamento manual (b).

#### 5.1.4 Secagem

Os suportes de alginato 1, 2 e 3% foram secos a 100°C em estufa com convecção natural (convencional) com acompanhamento de suas variações de massa ao longo do tempo para construção das curvas de umidade em função do tempo de secagem dos mesmos (Figura 17). Uma comparação entre as curvas de secagem permitiu observar um comportamento bastante semelhante para as três concentrações de solução de alginato testadas. De acordo com as curvas de secagem, observa-se que o processo tem taxa de secagem decrescente até atingir o equilíbrio.

Para os suportes de alginato 2% (p/v) submetido à secagem em diferentes temperaturas, foi possível observar um comportamento diferente na secagem com ar a 70°C em relação às temperaturas de 100 e 120°C. Nessa temperatura, observa-se uma diminuição da taxa de secagem, provocado provavelmente pela maior resistência à transferência de massa devido à saturação da umidade no ar ambiente (Figura 18)

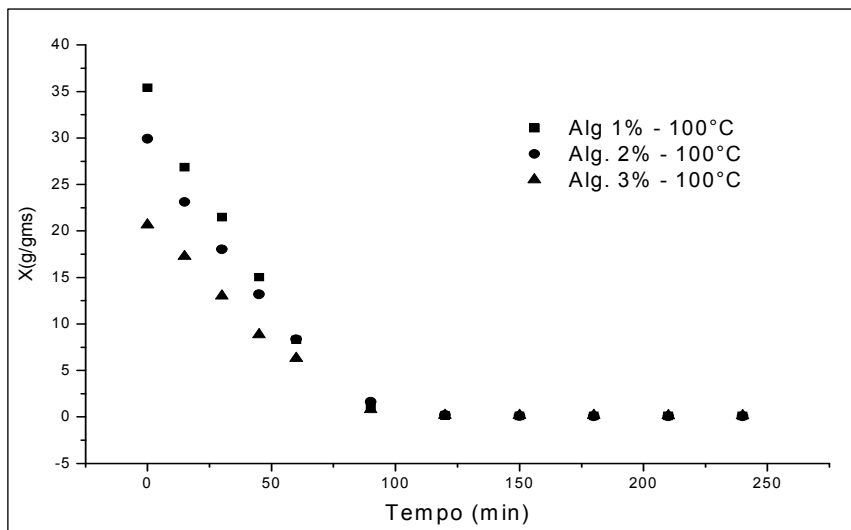


Figura 137. Curvas de secagem dos suportes de alginato em diferentes concentrações em estufa convencional a 100°C.

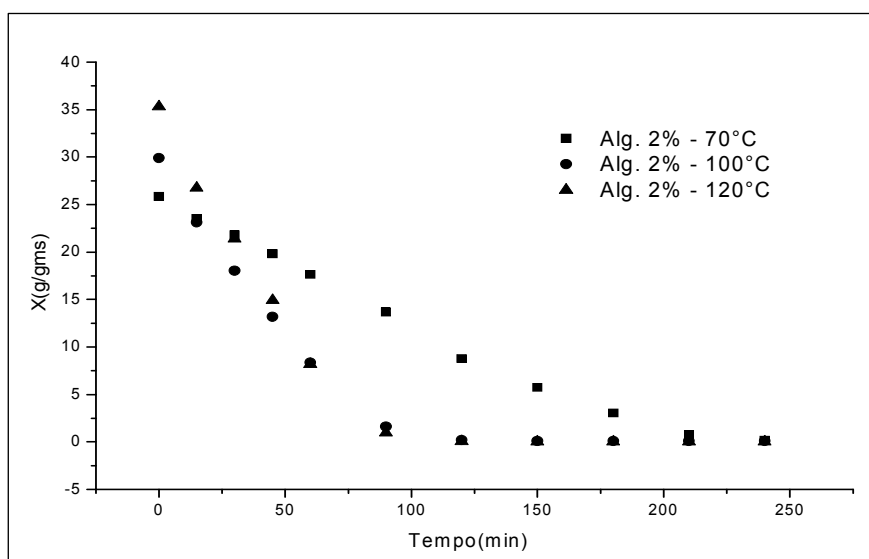


Figura 148. Curvas de secagem em estufa convencional a 70°, 100° e 120°C para partículas de alginato de cálcio preparadas com alginato de sódio 2% (p/v).

As curvas de cinética de secagem dos suportes híbridos de alginato/ferro e alginato/quitosana com ar a 100°C (Figura 19) apresentaram comportamento bastante semelhante, no entanto, foi observado que a presença do ferro diminui a umidade inicial das partículas.

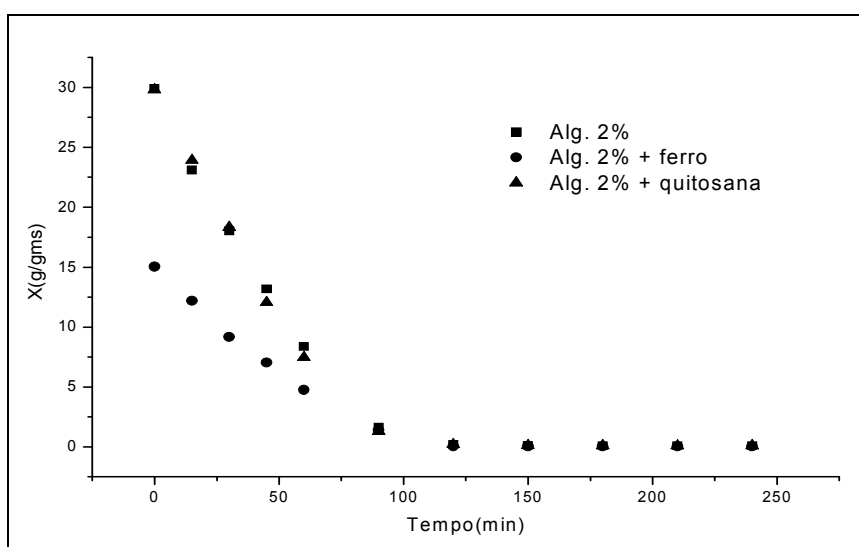


Figura 19. Curvas de secagem dos suportes de alginato a 2% e dos híbridos alginato com ferro e alginato com quitosana a 100°C em estufa convencional.

A tabela 9 mostra as umidades iniciais e finais dos diferentes suportes produzidos. Uma comparação dos resultados permite observar que os suportes produzidos com alginato 3% secos a 100°C alcançam peso constante com umidade final relativamente alta. Essa menor perda de água possivelmente está relacionada ao aumento da concentração do alginato.

**Tabela 9.** Umidades iniciais e finais dos suportes

Suportes	Temperatura de secagem (°C)	X <sub>inicial</sub>	X <sub>final</sub>
Alginato 1%	100	98%	9%
Alginato 2%	70	97%	18%
	100	97%	8%
	120	97%	3%
Alginato 3%	100	96%	18%
Alginato 2% + ferro	100	94%	3%
Alginato 2% + Quitosana	100	97%	10%

É possível observar também que a presença do ferro nos suportes facilita a retirada de água uma vez que os suportes com ferro conseguem alcançar baixas umidades finais se comparado aos demais suportes secos nas mesmas condições de secagem.

## 5.2 Caracterização dos suportes para imobilização

### 5.2.1 Resistência a agitação

Todos os suportes produzidos apresentaram resultados satisfatórios para análise de resistência a agitação e permaneceram totalmente preservados após 72 horas de agitação vigorosa em água à temperatura ambiente. Os suportes de alginato com quitosana apresentaram aumento de massa devido à absorção de água, no entanto não se observou nenhum desprendimento de fragmento de partícula.

### 5.2.2 Solubilidade dos suportes em diferentes meios

Os resultados para o teste de solubilidade dos suportes em diferentes meios são mostrados na Tabela 9.

Tabela 9: Solubilidade dos suportes em diferentes solventes

<i>Suportes</i>	<i>Solventes</i>	<i>Solubilidade</i>	<i>Inchamento</i>
<b>Alginato com e sem ferro</b>	Água	Insolúvel	Não
	Hexano	Insolúvel	Não
	Ácido Acético	Insolúvel	Não
	Acetona	Insolúvel	Não
	Etanol + Óleo	Insolúvel	Não
<b>Alginato e quitosana</b>	Água	Insolúvel	Sim
	Hexano	Insolúvel	Não
	Ácido Acético	Parcialmente solúvel	Não
	Acetona	Insolúvel	Não
	Etanol + Óleo	Insolúvel	Não



Os suportes de alginato foram insolúveis e não apresentaram ganho de massa em nenhum dos meios testados. Já os suportes de alginato e quitosana apresentaram solubilidade parcial quando imersos em ácido acético glacial; pode-se observar turvação do meio já nos primeiros minutos e perda de massa dos suportes ao final do teste (aproximadamente 20% da massa inicial).

### 5.2.3 Análise granulométrica

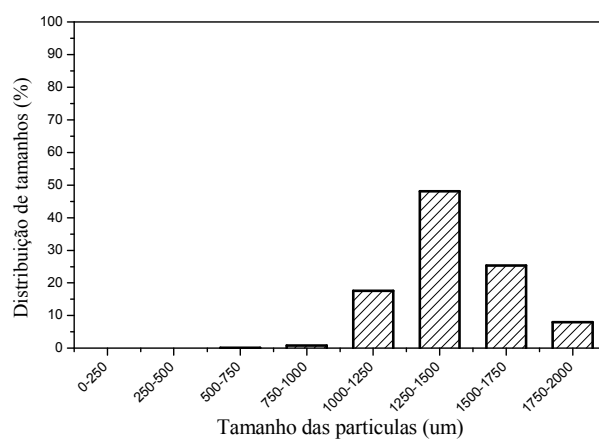
Os suportes secos apresentaram geometrias relativamente esféricas com pequenas variações de tamanho. Os resultados da distribuição de tamanho dos suportes estão apresentados na Tabela 10 e Figura 15, onde se pôde verificar que as partículas preparadas apresentaram uma distribuição de tamanho unimodal em torno de 97 a 99% correspondentes a diâmetros entre 1 e 2 mm.

Tabela 10: Distribuição de tamanhos dos diferentes suportes de alginato.

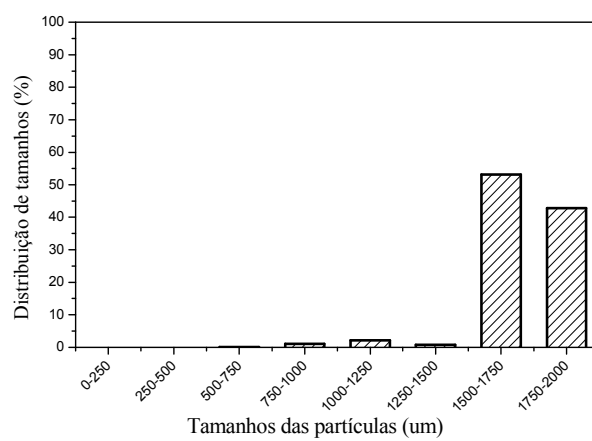
Suportes	Distribuição de tamanhos (%)	
	0,50–1,00 mm	1,00–2,00 mm
Alginato puro	1,00	99,00
Alginato + Ferro	1,13	98,87
Alginato/quitosana	2,07	97,93

Foi possível concluir que a estratégia adotada em relação à metodologia de preparação das partículas resultou em uma estreita distribuição de tamanhos. Estes resultados são importantes, pois a uniformidade de forma e tamanho das partículas facilita a distribuição das mesmas no leito do reator evitando a formação de caminhos preferenciais.

a)



b)



c)

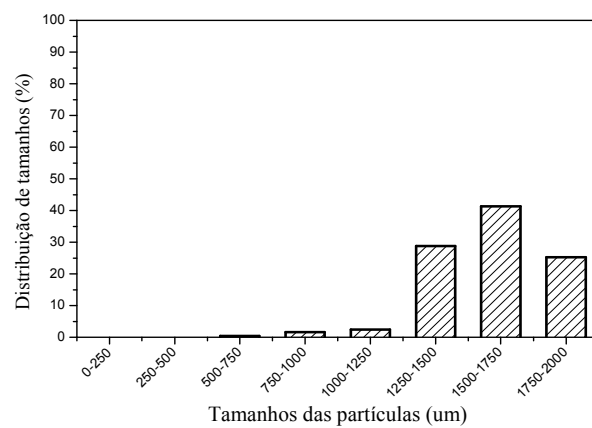


Figura 15. Perfis de distribuição de tamanhos de partículas para os seguintes sistemas:  
a) Alginate puro; b) Alginate + Ferro; c) Alginate + quitosana.

#### 5.2.4 Análise Termogravimétrica

É importante lembrar que as partículas de alginato em estudo foram desenvolvidas para utilização como suportes para imobilização de enzimas visando produção futura de biodiesel em biorreator assistido por campo eletromagnético. Assim sendo, a principal importância desta análise é avaliar a estabilidade térmica dos suportes, levando em consideração as condições de operação deste processo, que não devem ultrapassar temperaturas de 60-70°C para se evitar a inativação enzimática. Realizou-se análise termogravimétrica dos suportes de alginato puro nas concentrações de 1, 2 e 3% e dos suportes de alginato preparados com diferentes concentrações de ferro incorporado, cujos resultados estão ilustrados nas Figuras 21 e 22, respectivamente.

Verificou-se que as temperaturas de degradação térmica dos suportes estiveram acima de 200°C, de modo que na faixa de temperatura de trabalho prevista, os suportes se mostraram termicamente estáveis apresentando apenas eventos referentes à diminuição de massa que podem ser interpretados como perda de água por evaporação.

A Figura 21 corresponde ao termograma de alginato de cálcio puro obtido a partir de soluções de alginato de sódio com concentrações variando em 1, 2 e 3%. Em todos os casos, as curvas de TGA mostraram perfis parecidos e com eventos térmicos semelhantes, os quais foram verificados pelas curvas de DTG. Os resultados revelaram três estágios principais de perda de massa, um referente à perda de água em torno de 100°C seguido de dois estágios que sugerem a degradação do polímero. Destes dois, o primeiro, com temperatura máxima de degradação de 210°C, provavelmente referente à degradação das cadeias laterais e substituintes do biopolímero.

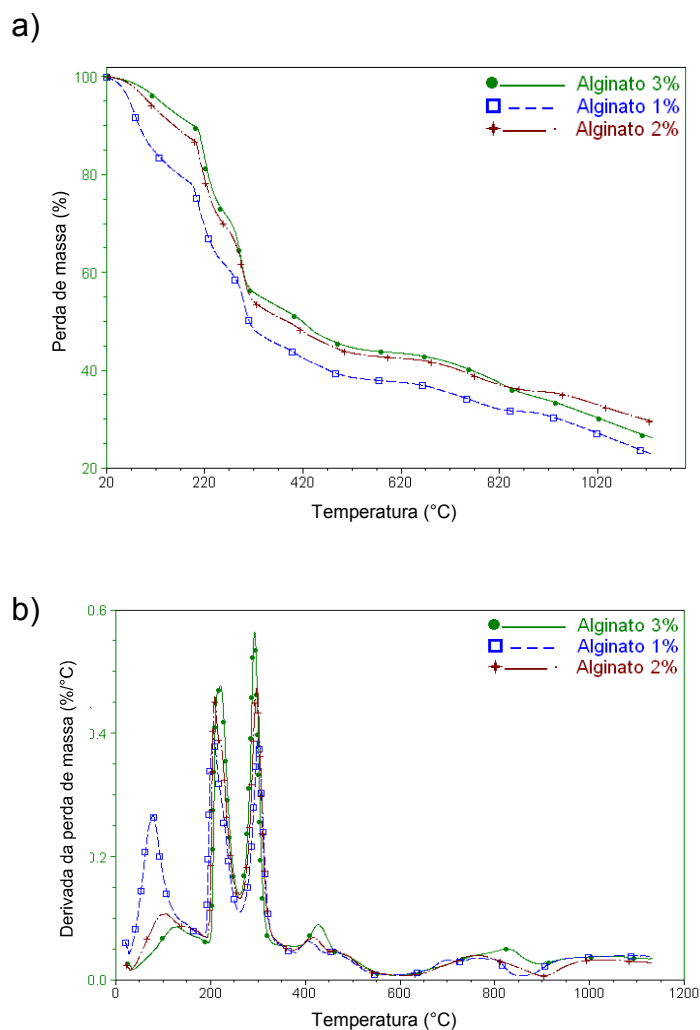


Figura 21. Termogramas obtidos para os suportes de alginato de cálcio puro partindo de solução de alginato de sódio com concentrações de 1; 2 e 3%, respectivamente: a) TGA; b) DTG.

O terceiro estágio ocorre por volta de 290°C e corresponde à degradação das cadeias principais. Após estes eventos, observam-se eventos que podem ser resultado de fragmentos residuais. De forma geral, este perfil de degradação é semelhante aos reportados na literatura (De Souza, 2009), os quais sugerem três faixas principais de perda de massa para o alginato e derivados de íons divalentes: a primeira relativa à desidratação; a segunda a perda de massa pela degradação de oxalatos formados e a terceira a decomposição de estruturas mais complexas. Este autor também sugere que a temperaturas mais elevadas há sinais que podem ser fragmentos de compostos intermediários formados incluindo

óxidos metálicos. Pode-se verificar ainda que os suportes de alginato de cálcio 1% se degradam em temperaturas menores que os suportes preparados com 2% de alginato (Figura 21a), provavelmente devido ao aumento na concentração do polímero e, conseqüentemente, maior concentração de cálcio. No entanto, uma comparação das curvas de perda de massa dos suportes com alginato a 2 e 3%, mostra que elas pouco diferem entre si. Observa-se apenas uma pequena diferença, que provavelmente se deve à diferença de concentração do polímero, considerando a concentração de cálcio semelhante.

Estes resultados fortalecem os resultados obtidos no estudo de cinética de gelificação dos suportes que mostrou que o aumento da concentração do alginato não é acompanhado proporcionalmente por aumento da concentração de cálcio, que por dificuldades difusionais não consegue se ligar a todos os sítios de ligação disponíveis.

Na figura 22, que ilustra os termogramas para os suportes de alginato de cálcio 2% com diferentes concentrações de ferro (0,2; 0,4 e 0,6%). verifica-se também três estágios de perda de massa como discutido para o caso do alginato puro. Na figura 22a, pode-se perceber, até 100°C, que à medida que se aumenta o teor de ferro no suporte, tem-se maior porcentagem de perda de água para uma dada variação de temperatura, possivelmente provocada pela maior facilidade de aquecimento e evaporação de água proporcionadas pela alta condutividade térmica do ferro.

Entre as temperaturas de 200 e 300°C, acontece a degradação do polímero. Um aumento nesta porção da curva (figura 22c) mostra também o efeito provocado pelo aumento da concentração do ferro que diminui a temperatura de velocidade máxima de degradação deste processo de perda de massa dos suportes. A partir de 350°C as curvas se separam novamente e a porcentagem de perda de massa residual parece ser maior para os suportes que têm menor teor de ferro.

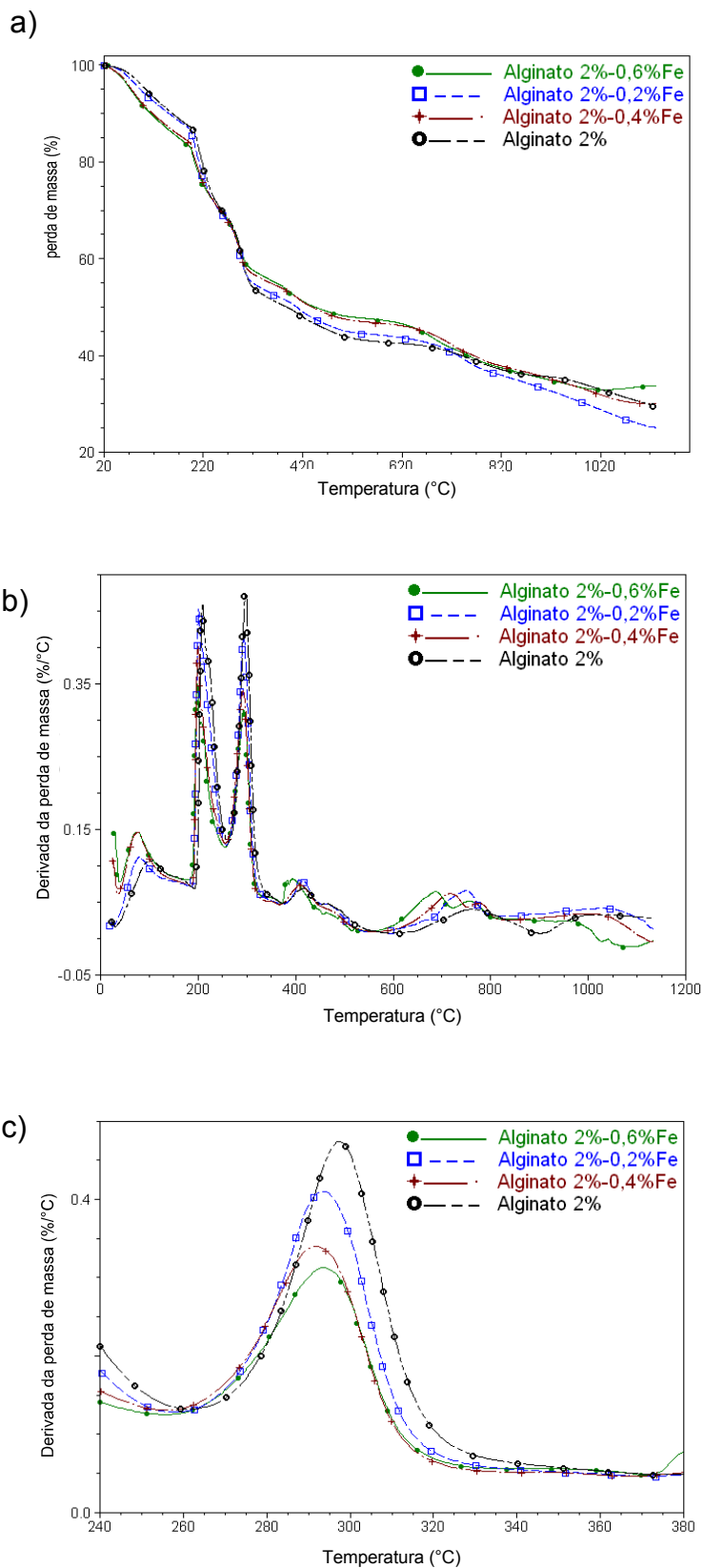


Figura 162: Termogramas obtidos para os suportes de alginato de cálcio 2% e alginato de cálcio 2% com diferentes concentrações de ferro incorporado. a) TGA; b) DTA e c) porção da curva DTA aumentada para o intervalo de temperatura entre 240 a 380°C.

### 5.2.5 Morfologia

A caracterização morfológica dos suportes de alginato, alginato com ferro e alginato com quitosana, foi caracterizada morfológicamente por meio de análise macroscópica (com auxílio de fotografias digitais) e análise microscópica por microscopia óptica (MO) e microscopia eletrônica de varredura (MEV).

As partículas foram fotografadas imediatamente após a preparação e após processo de secagem para visualização do efeito da secagem nas características morfológicas dos suportes.

As partículas úmidas de alginato 2% apresentaram diâmetro médio na ordem de 4 a 5 mm (medição manual com auxílio de régua milimetrada), formato esférico, coloração esbranquiçada semi-transparente e superfície lisa. O processo de secagem exerce grande interferência nas características morfológicas das partículas que passaram a apresentar diâmetro médio da ordem de 1 a 2 mm (medidos por difração a laser), coloração amarela transparente com alterações no formato, mantendo ainda boa esfericidade.

A Figura 23 mostra micrografias dos suportes de alginato 2% puro secos, em uma sequência de diferentes aumentos (56, 300 e 1000x), que confirmam o efeito do processo de secagem na morfologia das partículas. Percebe-se claramente uma estrutura superficial bem organizada que segue linhas paralelas ao longo da superfície do suporte com fendas que sugerem a presença de rachaduras. Essas características também foram observadas por Fundueanu et al. (1999) que caracterizaram físico-quimicamente as partículas de alginato produzidas por gotejamento.

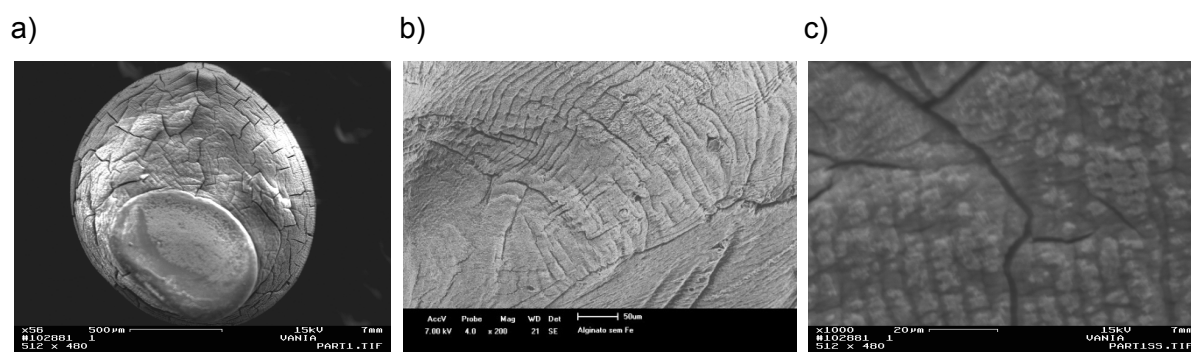


Figura 23: Micrografias obtidas por MEV referentes às partículas de alginato puro: a) aumento de 56x; b) aumento de 300x; c) aumento de 1000x.

Os suportes de alginato de cálcio 2% com quitosana apresentaram características muito semelhantes aos suportes de alginato puro diferindo apenas na coloração das partículas secas que apresentaram maior opacidade. Os suportes de alginato com ferro após secagem apresentaram maior rugosidade superficial e presença de pontos avermelhados distribuídos na superfície, sugerindo a presença de ferro oxidado (Figura 174).

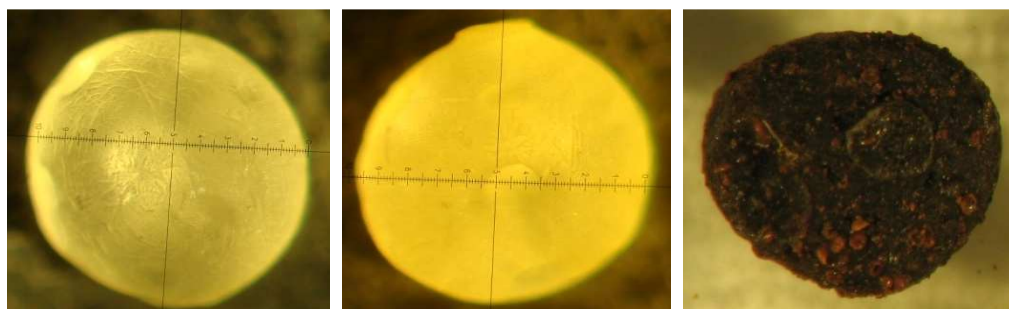


Figura 174: Fotografias obtidas em estereoscópio dos suportes de alginato secos. A) alginato puro. B) alginato com quitosana. C) alginato com ferro.

No entanto, quando submetidos a maiores tempos de gelificação ou na preparação de suportes com concentrações de ferro superiores a 0,8%, percebe-se claramente a intensificação e o aumento destes pontos na superfície dos suportes (figura 25). Nestas preparações ocorre uma modificação na coloração da solução gelificante de cloreto de cálcio de incolor para laranja, além de impregnação de ferrugem nas paredes do recipiente, indicando ter ocorrido oxidação do ferro presente nas partículas.



Figura 25: Fotografia digital de uma partícula de alginato com ferro 1% (p/v) gelificada por 2 horas em solução de cloreto de cálcio 0,1 molar.



### 5.2.6 Imobilização

Uma vez preparados os suportes com e sem a incorporação de ferro passou-se para uma etapa final de imobilização enzimática, onde foram seguidos três procedimentos de imobilização: aprisionamento em gel, adsorção física na superfície (e/ou ligação covalente direta da enzima com grupos carboxílicos presentes na superfície do alginato) e por ligação covalente usando agente de ativação, com o propósito de discriminar aquele que resultar em maiores valores de atividade enzimática.

Para o desenvolvimento dos biocatalisadores imobilizados foi selecionada, entre as lipases disponíveis comercialmente, a lipase de *Pseudomonas fluorescens* também denominada lipase AK. A seleção tomou por base trabalhos desenvolvidos anteriormente (De Castro, 2008; Moreira et al., 2007) e algumas características dessa lipase como elevada atividade lipolítica e estabilidade térmica (Amano Enzyme, 2008). Segundo informações fornecidas pelo fabricante, a lipase AK é uma preparação enzimática produzida por um único processo de fermentação de uma linhagem selecionada de *Pseudomonas fluorescens*. Como a maioria das lipases microbianas, as preparações comerciais disponíveis da lipase AK possuem preferência estereoquímica para hidrólise de ésteres de álcoois secundários (Faber, 1997).

### 5.3 Caracterização física dos biocatalisadores imobilizados

Os biocatalisadores imobilizados foram caracterizados morfológicamente através de fotografias obtidas em estereoscópio, microscopia óptica e micrografias eletrônicas de varredura.

A Figura 6 mostra uma sequência de fotos dos suportes de alginato 2% sem e com imobilização, por ligação covalente, em diferentes aumentos onde é possível perceber a presença de pontos escuros na superfície do suporte sugerindo a presença de lipase retida embora a distribuição seja bastante irregular.

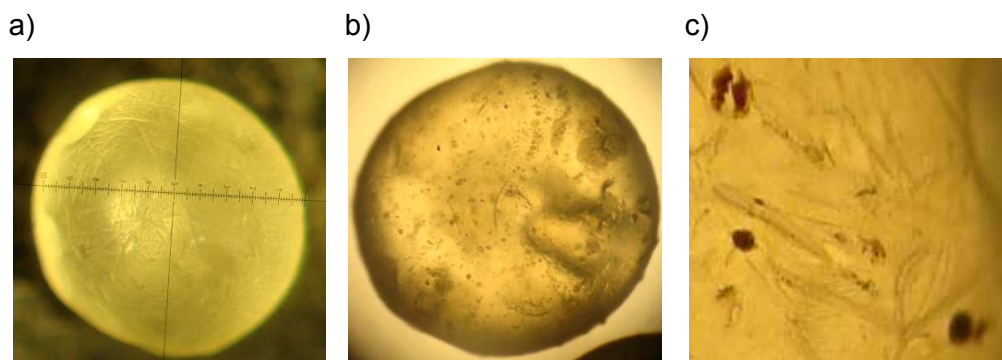


Figura 26: *Fotografias obtidas em estereoscópio referentes aos seguintes sistemas: a) Alginato puro; b) alginato + lipase AK imobilizada por ligação covalente c) alginato + lipase AK imobilizada por ligação covalente com aumento de 40x.*

A Figura 7, mostra a lipase AK imobilizada nos suportes híbridos e ativados de alginato com quitosana, por ligação covalente. É possível visualizar um bom recobrimento do suporte pela lipase AK que, diferentemente dos casos anteriores, a sua imobilização ocorre por enlace químico usando como agente ativador o glutaraldeído.

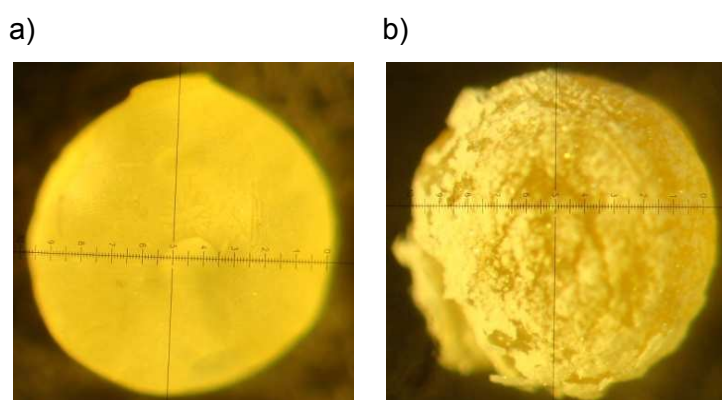


Figura 27. *Fotografias obtidas de estereoscópio referentes aos seguintes sistemas: a) Suporte de alginato com quitosana; b) Suporte de alginato com quitosana ativados com glutaraldeído e com lipase AK imobilizada por ligação covalente.*

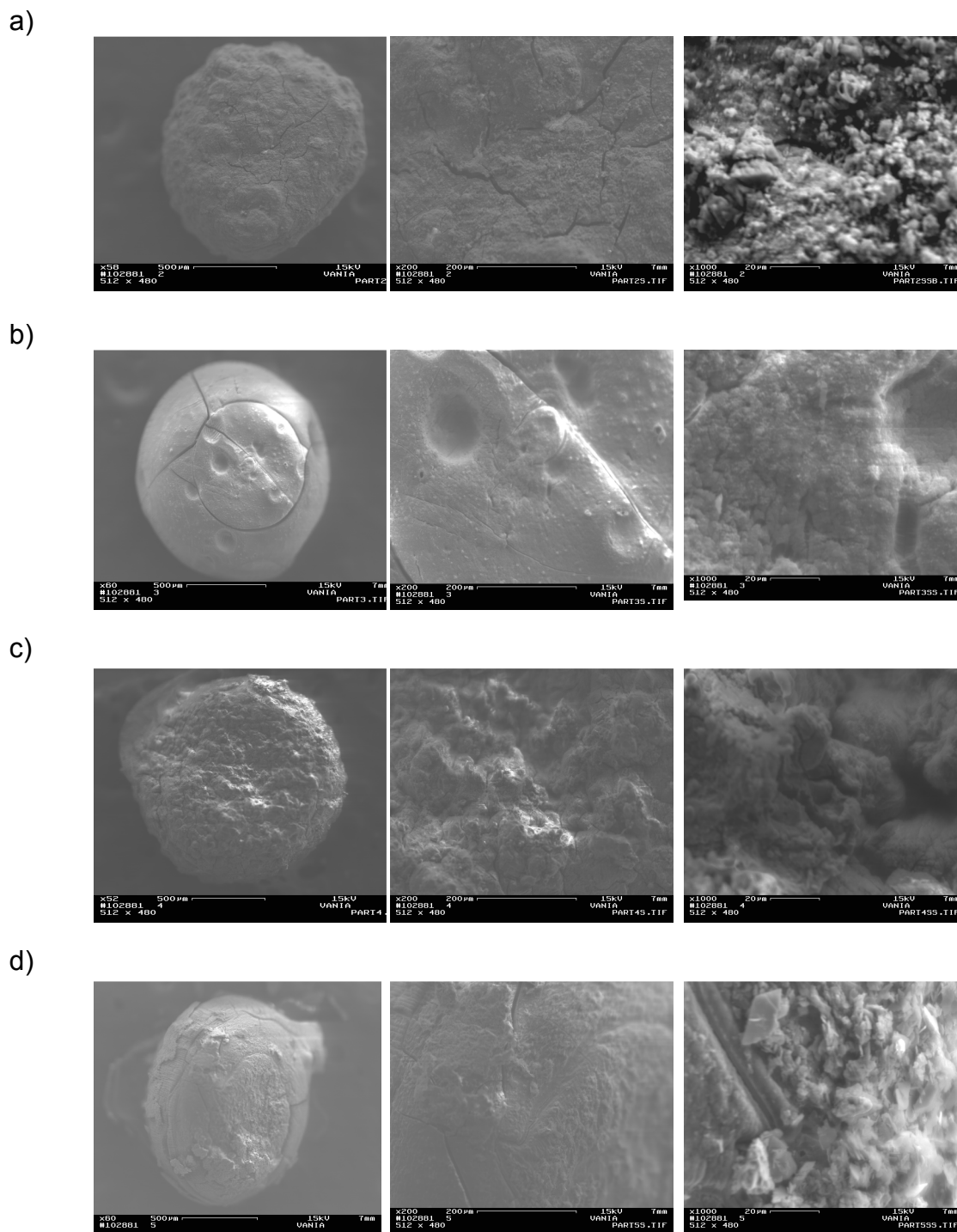


Figura 28. Micrografias obtidas por MEV com aumentos de 60 $\times$ , 200 $\times$  e 1000 $\times$ , respectivamente, referentes aos seguintes sistemas: a) Alginato/ferro/lipase AK (aprisionamento); b) Alginato/lipase AK (ligação covalente); c) Alginato/ferro /lipase AK (ligação covalente); d) Alginato/quitosana/lipase AK (ligação covalente com GLU).

As micrografias foram geradas proporcionalmente para todos os sistemas seguindo uma sequência de aumentos de 60x, 200x e 1000x, respectivamente, para facilitar a análise comparativa entre os sistemas biocatalisadores preparados. As imagens geradas por MEV (Figura 8) mostram aglomerados superficiais nos suportes imobilizados por ligação covalente que sugerem a presença da lipase AK sobre a superfície do suporte, não sendo possível verificar diferenças visuais em nível de interações de natureza química no recobrimento para cada sistema imobilizado.

Como mostrado no item 5.2.3, as partículas apresentaram granulometria bastante regular e aproximadamente 98% dos suportes produzidos apresentam tamanho entre 1 e 2 mm de diâmetro após secagem. A Figura 291829 apresenta uma micrografia obtida por MEV que comprova esta informação e mostra um suporte com diâmetro de 1,19 mm.

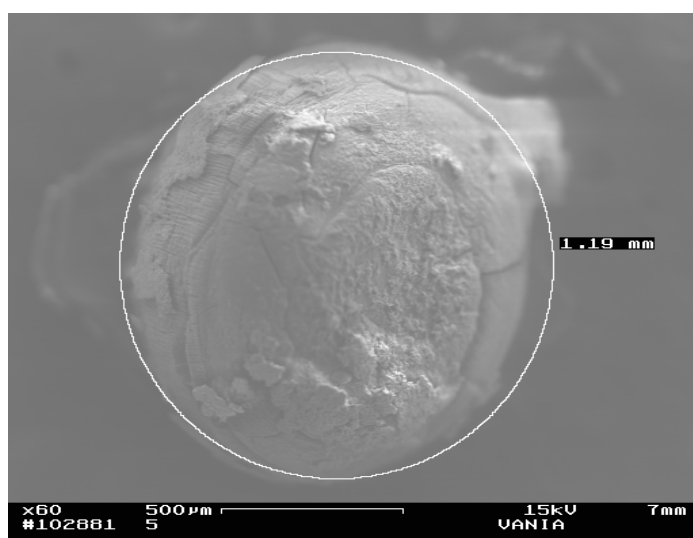


Figura 2918. Determinação do diâmetro médio das partículas de alginato de cálcio por Microscopia eletrônica de varredura (MEV) após etapa de secagem.

### **5.3.1.1 Imobilização da lipase AK por aprisionamento**

A imobilização de lipase AK por aprisionamento foi realizada, conforme metodologia descrita no tópico “Materiais e Métodos”, por dispersão da enzima em pó diretamente na solução de alginato de sódio 2%. As imobilizações foram realizadas utilizando diferentes concentrações de lipase AK para verificar o efeito

da concentração enzimática no rendimento de imobilização. Para cálculo dos valores de eficiência do processo de imobilização, foi determinada a atividade enzimática da solução de gelificação e da água de lavagem das partículas pós gelificação. A atividade enzimática encontrada em ambas as soluções foi nula, comprovando a total eficiência de imobilização do método utilizado, o que significa que toda a lipase oferecida foi realmente retida pelo polímero.

A avaliação do rendimento de imobilização considerou a atividade enzimática da lipase AK livre e dos preparados imobilizados através do método de hidrólise de azeite de oliva conforme metodologia modificada por Soares et al. (1999).

Tabela 11: Valores de atividade enzimática e rendimento de imobilização dos biocatalisadores secos preparados usando lipase AK imobilizada através do método de aprisionamento em matrizes de alginato de cálcio com e sem incorporação de ferro.

<b>Tipo de derivado Imobilizado</b>	<b>Concentração enzimática (mg/ml)</b>	<b>Atividade Enzimática (U/g seca)</b>	<b>Eficiência de Imobilização (%)</b>	<b>Atividade recuperada (%)</b>
Alginato de cálcio	5,0	116,6	100	4,09
	10,0	146,2	100	5,13
	15,0	115,2	100	4,04
Alginato de cálcio com ferro	5,0	69,2	100	2,43
	10,0	57,1	100	2,00
	15,0	51,7	100	1,81

Foi possível verificar que os valores encontrados para atividade enzimática dos biocatalisadores foram baixos quando comparados com aqueles observados para a enzima livre. Conseqüentemente, isto resultou em baixos rendimentos de imobilização independentemente das diferentes concentrações de lipase usadas no processo (Tabela 11), que em todos os casos foram inferiores a 10%. No entanto, os valores encontrados para atividade enzimática dessas lipases

imobilizadas foram pequenos, sugerindo que as enzimas presentes no interior dos suportes não se encontram disponíveis ou acessíveis ao substrato,

Na literatura, é possível encontrar inúmeros estudos envolvendo a utilização da técnica de imobilização de células íntegras de micro-organismos ou enzimas por aprisionamento em gel de alginato, principalmente em processos fermentativos com substratos aquosos, permitindo a utilização dos suportes úmidos. As muitas vantagens e facilidades oferecidas pelo método de imobilização por aprisionamento em matrizes porosas se esbarram em uma barreira que em muitos casos impedem sua utilização, as limitações difusionais, como discutido anteriormente. A dificuldade de difusão do substrato no interior nos suportes até contato com a lipase aprisionada na estrutura do gel é um grande problema encontrado neste método e que pode ser agravado em situações em que há a necessidade de retirada de umidade dos suportes. Com a proposta de desenvolvimento de biocatalisadores imobilizados visando sua utilização em sistemas aquo-restritos (como no caso da produção de biodiesel), tem-se a necessidade de retirada de umidade dos suportes, fazendo-se necessário a inclusão de uma etapa de secagem dos biocatalisadores imobilizados, que no caso do alginato pode aumentar as limitações difusionais e diminuir o rendimento de imobilização dos biocatalisadores. Segundo Lagoa e Rodrigues (2009), os suportes de alginato de cálcio após secagem apresentam baixa porosidade, com poros localizados próximos à superfície e núcleo compacto, em contraste com os suportes de gel (não secos) que apresentam estrutura altamente porosa quando observados por microscopia eletrônica de varredura após preparação da amostra por meio de técnicas especiais que preservam a arquitetura do gel. Estes dados justificam os baixos valores de atividade e baixos rendimentos de imobilização dos biocatalisadores imobilizados pelo método de aprisionamento. No entanto, um estudo realizado por Knezevic et al (2002) mostrou a possibilidade de utilização de partículas úmidas de alginato de cálcio com lipase imobilizada em sistema aquo-restrito, com resultados positivos. Estes autores obtiveram até 74% de rendimento de imobilização. As partículas foram produzidas em um sistema de extrusão eletrostática que possibilitou a produção de partículas com menor diâmetro e, conseqüentemente, maior área superficial e menor resistência a difusão.

### 5.3.1.2 Imobilização por interação com o suporte (adsorção física/ ligação covalente)

A adsorção física de enzimas em suportes sólidos está diretamente ligada às características do suporte como área superficial, caracter hidrofóbico/hidrofílico, caracter ácido/básico e composição química. De acordo com Secundo et al (2008), a imobilização de lípases por adsorção física é normalmente realizada em suportes hidrofóbicos devido ao caráter hidrofóbico das lípases, que sofrem ativação interfacial na presença de interface hidrofóbica e a região do sitio ativo interage por adsorção hidrofóbica com o suporte. Apesar do caráter hidrofílico do suporte de alginato, suas características morfológicas de superfície podem favorecer a interação por adsorção física da enzima nos poros superficiais do alginato (Figura 26c), embora a presença de grupos carboxílicos presentes em sua estrutura possibilite a ocorrência de ligações covalentes destes com os grupamentos amina presentes na estrutura da enzima. Desta forma, pode-se considerar, na interação da lípase AK com os suportes de alginato, a possibilidade de ocorrência simultânea dos fenômenos de adsorção e ligação covalente. Para o procedimento de imobilização da lípase AK nos suportes de alginato e alginato com ferro empregou-se um carregamento fixo de 50 mg de lipase por grama de suporte, correspondendo a 2846 unidades de atividade enzimática oferecidas por grama de suporte (U/g). A Tabela 6 apresenta os dados relativos à atividade hidrolítica, eficiência e rendimento de imobilização dos derivados imobilizados nos suportes de alginato e alginato com ferro.

Tabela 12: Valores de atividade enzimática e rendimento de imobilização dos biocatalisadores secos preparados usando lipase AK imobilizada através do método de adsorção física da enzima diretamente no suportes de alginato de cálcio com e sem ferro.

<b>Derivados Imobilizados</b>	<b>Atividade enzimática (U/g)</b>	<b>Eficiência de imobilização (%)</b>	<b>Atividade Recuperada (%)</b>
Alginato de cálcio	657,65	78	29,62
Alginato de cálcio mais ferro	739,43	75	34,64

Os valores de atividade hidrolítica foram semelhantes para ambos os derivados imobilizados, sendo que os suportes de alginato com ferro incorporado apresentaram um valor de atividade recuperada aproximadamente 5% maior que os suportes sem o ferro. Como visto no item 4.2.7.5, a inclusão de ferro nos suportes alterou suas características morfológicas de superfície, que pode ter favorecido o fenômeno de adsorção física da lipase no suporte.

Considerando a possibilidade de ocorrência de ligações covalentes das lípases nos suportes, o procedimento de imobilização foi conduzido por um período de 24 horas. Na imobilização covalente de enzimas o tempo de imobilização é uma variável importante, pois o processo de enlaces entre grupos reativos da enzima e grupos reativos do suporte é lento, já que a enzima tem que se realinhar para que seus grupos reativos se aproximem do suporte (Pedroche et al., 2007; Rodrigues et al., 2008). Assim, foi realizado um acompanhamento do desaparecimento da enzima na solução enzimática (aqui chamada de sobrenadante) ao longo do tempo de imobilização para determinação do tempo necessário para ocorrer a imobilização da máxima quantidade possível de enzimas por grama de suporte, determinando assim a eficiência do processo de imobilização (Tabela 12). Com base nestes resultados, é possível afirmar que aproximadamente 74% (2106U/g) da lípase oferecida (2846U/g) foi imobilizada nos suportes. No entanto, este valor não coincide com o valor de atividade enzimática dos derivados imobilizados (Tabela 12). Apesar da lípase AK possuir alta atividade catalítica para hidrólise de triacilglicerois (Moreira et al., 2007), os seus derivados apresentaram baixa atividade enzimática quando imobilizados em alginato. A lípase AK é comercializada na forma de pó seco e normalmente as preparações enzimáticas assim comercializadas contêm agentes protetores, tais como lactose e outros veículos que protegem a enzima durante o processo de liofilização, mantendo sua alta atividade (Klibanov, 2001). Possivelmente, após a imobilização, a concentração destes agentes protetores (ativadores) no microambiente da enzima é menor, o que pode ter reduzido a atividade catalítica do derivado. A atividade da enzima livre é medida na presença dessas substâncias, as quais não estarão presentes para proteger a enzima imobilizada, pois o derivado é submetido a sucessivas lavagens e por esse motivo a atividade hidrolítica dos derivados imobilizados é menor.



A atividade enzimática de uma enzima é uma propriedade relacionada com sua estrutura macromolecular. Desta forma, quando uma enzima é imobilizada em um suporte acontecem alterações que resultam em perda de atividade de parte das moléculas enzimáticas. Estas alterações podem ser atribuídas a um conjunto de fatores, embora na maioria das vezes de difícil quantificação, mas que poderiam ser os argumentos para tentar compreender os resultados observados.

Segundo Georgio e Hubbell (1993), é possível distinguir três formas de interação que podem interferir na atividade de enzimas imobilizadas: a ligação da enzima na matriz pode resultar em mudanças conformacionais que afetam a função catalítica; o acesso do substrato ao sítio ativo da enzima pode ser afetado por impedimento estérico do suporte e as propriedades do suporte (como sua natureza hidrofílica ou hidrofóbica, ou a presença de cargas fixas) afetam o modo de ação da enzima.

Os resultados obtidos indicam que nas condições adotadas, a interação de ambos os suportes com a enzima resultaram em rendimentos de imobilização similares da ordem de 29 e 34%, respectivamente para os suportes de alginato e alginato com ferro. Os grupamentos carboxílicos presentes na estrutura do alginato permitem sua ligação diretamente nos grupos amina da lipase AK, sem a necessidade de ativação do suporte.

### ***5.3.1.3 Imobilização por ligação covalente em suportes ativadas com glutaraldeído***

Este tipo de ligação acontece quando a enzima se liga covalentemente ao suporte por intermédio de ligações cruzadas usando um reagente entrecruzante como o glutaraldeído, tal como, deveria acontecer neste caso em particular em que os biocatalisadores foram preparados usando sistemas híbridos de alginato de cálcio e quitosana.

Considerando os resultados obtidos com os sistemas anteriores de suportes de alginato, considerou-se a alternativa de uso de uma mistura de alginato e quitosana, na busca por alternativas de biocatalisadores de maior eficiência. A inclusão de quitosana nos suportes de alginato foi realizada com o

objetivo de fornecer aos suportes de alginato os grupamentos amino presentes na estrutura da quitosana o que possibilitou a utilização do método de imobilização covalente utilizando o glutaraldeído como ativador. O ativador funciona como um braço que distancia a enzima do suporte, impedindo possíveis impedimentos estéricos causados pela proximidade da enzima no suporte de ligação.

Os suportes híbridos de alginato/quitosana foram sintetizados e ativados conforme metodologia descrita no 4.2.6.3. Para o procedimento de imobilização empregou-se um carregamento fixo de 50 mg de lipase por grama de suporte, correspondendo a 2846 unidades de atividade enzimática por grama de suporte. A atividade enzimática dos derivados imobilizados foi de 1123 unidades de atividade enzimática (Tabela 13). Em 4 horas de imobilização, aproximadamente 50% da atividade enzimática oferecida havia desaparecido do meio de imobilização, atingindo 75% em 12 horas de imobilização chegando a 82% no final do processo. Foi determinada a atividade enzimática da água de lavagem dos suportes imobilizados cuja atividade encontrada foi de aproximadamente 8% da atividade oferecida, sendo esse valor referente à atividade de enzimas que se desprenderam do suporte durante o processo de lavagem.

**Tabela 13.** Valores de atividade enzimática e rendimento de imobilização dos biocatalisadores secos preparados usando lipase AK imobilizada através do método de ligação covalente da enzima em suportes de alginato/quitosana ativados com glutaraldeído.

<b>Derivados Imobilizados</b>	<b>Atividade enzimática (U/g)</b>	<b>Eficiência de imobilização (%)</b>	<b>Rendimento de imobilização (%)</b>
Alginato / Quitosana	1123	74	53

O complexo alginato/Quitosana é formado por interações iônicas entre os grupos carboxílicos do alginato e os grupos amino da quitosana resultando em uma redução da solubilidade da quitosana pela presença do alginato que sendo insolúvel em meio ácido permite aplicações em amplas faixas de pH (Mendes, 2009). De forma geral, pode ser entendido que esta mistura dos copolímeros alginato de cálcio e quitosana é bastante favorável do ponto de vista físico e químico, uma vez que, o alginato garante a resistência física que os suportes

necessitam enquanto a quitosana fornece as características químicas favoráveis para a imobilização.

A quitosana, assim como as enzimas, possui grupamentos amino em sua superfície de forma que não existe afinidade química entre ambas. Então, para imobilização de enzimas em suportes com quitosana é necessário, inicialmente a utilização de um agente ativador que se liga a sua estrutura e possibilita sua ligação às enzimas.

O procedimento de imobilização envolve a formação de ligações covalentes entre os grupos funcionais presentes na superfície do suporte e os grupos funcionais dos resíduos de aminoácidos da enzima. Numa primeira etapa, os grupos funcionais do suporte (aminopropilados) são ativados pelo glutaraldeído que introduz, na superfície do suporte, grupamentos carbonilas os quais são susceptíveis a reações com os grupos nucleofílicos da lipase, favorecendo uma segunda etapa química de ligação da enzima ao suporte ativado. (Cardoso, 2009).

O método de imobilização de lipase utilizado nos suportes de alginato e quitosana foi bastante semelhante ao utilizado nos demais suportes preparados sendo acrescido apenas da etapa de ativação do suporte com glutaraldeído visando favorecer o processo de imobilização por distanciar a enzima da superfície do suporte e assim evitar a inativação da enzima por impedimento estérico. Os resultados confirmam esta hipótese e mostram que a utilização do ativador melhora a eficiência do processo de imobilização e proporciona maior atividade das lipases imobilizadas gerando derivados mais ativos. De acordo com as discussões acima, os resultados usando suportes de alginato-quitosana são muito animadores. Entretanto, deve-se salientar que não foi possível avaliar o desempenho catalítico do biocatalisador com propriedades magnéticas constituído por alginato-quitosana-ferro por apresentar resistência mecânica extremamente baixa conforme discutido anteriormente. Isto abre uma demanda de pesquisas futuras para se trabalhar em uma possível formulação de suportes desta natureza para aplicações em reatores assistidos por campo eletromagnético.

Os experimentos de imobilização realizados mostram que os suportes desenvolvidos possuem potencial de imobilização e podem ser utilizados como biocatalisadores em processos de transesterificação enzimática fornecendo

resultados relevantes. No entanto, ainda se faz necessário a realização de estudos mais aprofundados sobre o processo de imobilização para que as variáveis e os parâmetros que interferem neste processo sejam otimizados visando o aprimoramento das técnicas utilizadas e obtenção de derivados enzimáticos com propriedades magnéticas que apresentem maiores atividades recuperadas.

## 6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos ao longo deste trabalho permitiram as seguintes conclusões:

- 1) As condições operacionais estabelecidas para produção de partículas de alginato de cálcio por gotejamento permitiram a obtenção de suportes rígidos, com boa esfericidade e tamanho uniforme. Foi possível determinar a interferência de parâmetros como: altura do bico gotejador e vazão da bomba peristáltica no formato das partículas produzidas;
- 2) O estudo do processo de gelificação das partículas de alginato de cálcio determinou que a concentração máxima de íons  $\text{Ca}^{2+}$  absorvidos foi atingida com uma hora de imersão em solução de cloreto de cálcio, sendo este o tempo necessário para gelificação dos suportes;
- 3) O estudo da cinética de secagem dos suportes mostrou que todos os sistemas em estudo apresentaram comportamento bastante semelhante, isto é, um período de secagem constante inicial seguido de um período decrescente. A presença de ferro na estrutura dos suportes resultou em redução do tempo de secagem;
- 4) As análises termogravimétricas mostraram que os suportes preparados foram estáveis nas temperaturas de trabalho, as quais não devem ultrapassar  $70^{\circ}\text{C}$  para se evitar a inativação enzimática;

- 5) Os suportes preparados com teores de ferro a partir de 0,6 % se mostraram apropriados para utilização nos biorreatores assistidos por campo eletromagnéticos;
- 6) Os biocatalisadores imobilizados utilizando lípase comercial de *P. fluorescences* (lípase AK) por aprisionamento em gel, resultaram em rendimentos de imobilização menores que 10%, provavelmente devido a limitações difusionais. enquanto que os derivados imobilizados por interação direta da enzima com os suportes (adsorção física e ligação covalente) apresentaram rendimentos da ordem de 30% e as melhores atividades hidrolíticas foram alcançadas pelos derivados imobilizados por ligação covalente nos suportes de alginato com quitosana ativados com glutaraldeído, os quais alcançaram rendimentos da ordem de 50%;
- 7) Enquanto, que os derivados imobilizados por adsorção física e ligação covalente apresentaram resultados equivalentes aos reportados na literatura, sendo que os suportes de alginato com quitosana ativados com glutaraldeído apresentaram os melhores resultados de atividade hidrolítica.

## 7. RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Para complementação e aperfeiçoamento deste trabalho, considerando as dificuldades encontradas, algumas propostas para estudos futuros são sugeridas:

1. Testar os biocatalisadores magnéticos produzidos em reação de produção de biodiesel em reatores assistidos por campo eletromagnético;
2. Caracterizar os biocatalisadores imobilizados quanto aos parâmetros cinéticos, estabilidade térmica e capacidade de reutilização;
3. Sendo os suportes de alginato de cálcio/quitosana uma alternativa atrativa do ponto de vista de suas propriedades físico-químicas e atividade hidrolítica,

julga-se interessante estudar novas técnicas e procedimentos para incorporação de ferro nestes suportes visando a obtenção de biocatalisadores com propriedades magnéticas e características físicas estáveis;

4. Estudar a possibilidade de utilização de suportes de alginato de cálcio hidratados com lipase imobilizada por aprisionamento em processo de produção de biodiesel;
5. Verificar a possibilidade (ou o potencial) de substituição da imobilização de enzimas comerciais por células inteiras, produtoras de lipase intracelular, visando à obtenção de biocatalisadores com menor custo.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADRIANO, W.S. **Preparação e caracterização de derivados de enzimas industriais em quitosana**. (Doutorado). Engenharia Química, UFSCar, São Carlos, 2008.

AOAC – Association Of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis of the AOAC International. VII. 17th. ed. Gaithersburg, 2000.

ALLEN, L., NELSON, A.I., STEINBERG, M.P., MCGILL, J.N. Edible corn carbohydrate food coatings. I. Development and physical testing of a starch-alginate coating. **Food Technology**, v.17, p. 1437, 1963.

ALZATE C.E. O. Inmovilización de uma lipasa em quitosano para uso em esterificación en fase líquida. Tese de doutorado apresentada a Universidad Nacional de Colombia. Sede Bogotá. Programa de doutorado em Ciências Químicas, 2008.

AMANO ENZYME Inc. Disponível em: <[www.amano-enzyme.co.jp](http://www.amano-enzyme.co.jp)>. Acesso em: 12 jan. 2011.

ARROYO, M. Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones. **Ars Pharmaceutica**, v.39, n. 2, p. 23-29, 1998.

BERGER, J.; REIST, M.; MAYER, J. M.; FELT, O.; PEPPAS, N. A.; Gurny, R. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 57, p. 19-34, 2004.

BLANDINO, A.; MACIAS, M.; CANTERO, D. Formation of Calcium Alginate Gel Capsules: Influence of Sodium Alginate and CaCl<sub>2</sub> Concentration on Gelation Kinetics. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. v. 88, No. 6, 686-689, 1999.

BORNSCHEUER, U. E.; BESSLER, C.; SRINIVAS, R.; HARI KRISHNA, S. Optimizing lipases and related esterification efficiency at low loading. **Journal of the American Oil Chemist's Society**, v. 74, p. 107-111, 1997.

BROCKMAN, H. L. General features of lipolysis: reaction scheme, interfacial structure and experimental approaches. In: Borgstrom, B.; Brockman, H.L. (Eds.). **Lipases**. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, p. 1- 46, 1984.

CARDOSO, C.L.; MARCELA, C.; De MORAES, M.C.; CASS, Q.B. Imobilização de enzimas em suportes cromatográficos: uma ferramenta na busca por substâncias bioativas. Departamento de Química, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – SP. **Revista Química Nova**, v. 32, No. 1, 175-187, 2009.

CHAMPAGNE, C.P.; LACROIX, C.; SODINI-GALLOT, I. Immobilized cell technologies for the dairy industry. **Critical Reviews in Biotechnology**, Boca Raton, v. 14, n. 2, p. 109-134, 1994.

CRUZ JR, A.; PACHECO, S.; M.V.; FURIGO Jr. A. Imobilização de Lipase de *Candida Antarctica* B em Esferas de Quitosana para Obtenção de Biodiesel por Transesterificação de Óleo de Mamona. Universidade Federal de Santa Catarina – DEQEA, 2000.

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

DAVIS, T. A., VOLESKY, B. MUCCI, A. A review of the biochemistry of heavy metal biosorption by brown algae. **Water Research**, v. 37, p. 4311–4330, 2003.

DE CASTRO, H.F. Produção integrada de biodiesel e emulsificantes a partir do óleo de babaçu usando derivados estabilizados de lipases pancreática e microbiana. 2008. 88f. Relatório científico - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2008.

DE SOUZA, K.V. Desenvolvimento de espécies de ferro imobilizadas em matrizes poliméricas e sua utilização na remediação de resíduos industriais. Tese de doutorado. Universidade Federal do Paraná. Curitiba - Paraná, 2009.

DÍAZ, E. D. A., VELASCO, M. C. V., PÉREZ, F.R., LÓPEZ, C. A. R., IBARRETA, L. L., Utilización de adsorbentes baseados en Quitosano y Alginático Sódico para La eliminación de iones metálicos: Cu<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup>, Cr<sup>2+</sup> y Co<sup>2+</sup>. **Revista Iberoamericana de Polímeros**, v. 8(1), p. 20-37, 2007.

EDITH A. TURI. Thermal Characterization of Polymeric Materials - Academic Press, segunda edição, volume 1, Califórnia USA, 1997.

ERTESVÁG, H., VALLA, S. Biosynthesis and applications of alginates, *Polymer Degradation and Stability*, v. 59, p. 85-91, 1998.

FABER, K. Biotransformations in organic chemistry: A Textbook. 3. ed. Berlin: Springer Produktions-Gesellschaft, Cap. 1, 2, 3, 1997.



FELIZARDO, P.M.G. Produção de biodiesel à partir de óleos usados de frituras – Lisboa: Centro de Informação de Resíduos. Instituto Superior Técnico. Departamento de Engenharia Química, p. 127, 2003.

FERNANDEZ-LORENTE, PALOMO, J. M.; CABRERA, Z.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUIBAN, J. M. Improved catalytic properties of immobilized lipases by the presence of very low concentrations of detergents in the reaction médium. **Biotechnology and bioengineering**, v. 97, p. 242-250, 2007.

FERRARI, R.A.; OLIVEIRA, V. D.; SCABIO, A. Biodiesel de soja-Taxa de conversão em ésteres etílicos, caracterização físico-química e consumo em gerador de energia. **Química Nova**, v.28, n.1, p.19-23, 2005.

FINOTELLI, P. V. – Tese de Doutorado - Microcápsulas de Alginato contendo Nanopartículas Magnéticas para Liberação Controlada de Insulina. UFRJ, Instituto de Química, 2006.

FUNDUEANU, G., NASTRUZZI, C., CARPOV, A., DESBRIERES, J., RINAUTO, M., Physico-chemical characterization of Ca-alginate microparticles produced with different methods. **Biomaterials**, v. 20, p. 1427-1435, 1999.

GEORDE, M.; ABRAHAN, T. E. Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: Alginate and Chitosan – a review. **Journal of Controlled Release**, v. 114, p. 1-14, 2006.

GRANT, G. T., MORRIS, E. R., REES, D. A., SMITH, P. J. C., THOM, D. Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: The egg-box model, **Febs Letters**, v. 32, p. 195-198, 1973.

GRYTA, M. The assessment of microorganism growth in the membrane distillation system, 2002. Department of Water Technology and Environment Engineering, Institute of Chemical and Environment Engineering, Technical University of Szczecin, ul. Pu askiego 10, 70-322 Szczecin, Poland, 2002.

GUIBAN, J. M. Immobilization of enzymes for use in organic media. In: Guiban JM editor. Immobilization of Enzymes and Cells. Totowa: Humana Press: p. 1-13. 2006.

KENNEDY, J.F. Enzyme Technology. In: REHM, H.J.; REED, G. Biotechnology. v. 7a. Weinheim: VCH, 1987.

KIMICA CORPORATION. **Alginato**. Disponível em: <[http://www.kimica.jp/spanish/pag10\\_vease.htm](http://www.kimica.jp/spanish/pag10_vease.htm)>. Acesso em: 06 Setembro 2009.

KING, A. H. Brown seaweed extracts (Alginates). **Food Hydrocolloids**, v. 2, p. 115-188, 1983.

KLIBANOV, A. M. Improving enzymes by using them in organic solvents. *Nature*, v. 409, p. 241-246, 2001.

KOGUSI, Y.; TAKAHASHI, K.; LOPEZ, C. Large scale immobilization of lipase from *Pseudomonas fluorescens*. Biotype I and application for sardine oil hydrolysis. *J. Am. Oil Chem.* v. 72, p. 1281-1285, 1995.

LAGOA, R.; RODRIGUES, J.R. Kinetic analysis of metal uptake by dry and gel alginate particles. **Biochemical Engineering Journal** v. 46. P. 320-326, 2009.

MALCATA, F. X.; REYES, H. R.; GARCIA, H. S.; HILL Jr., C. G.; AMUNDSON, C. H. Immobilized lipase reactors for modification of fats and oils. A review. **Journal of the American Oil Chemist's Society**, v. 67, n. 12, p. 890-910, 1990.

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

MATEO, C.; GRAZU, V.; PALOMO, J. M.; LOPEZ-GALLEGO, F.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUIBAN, J. **Nature Protocols**, v. 2, p. 1022-1033, 2007.

McHUGH, D. J. Production, properties and uses of alginates in production and utilization of products from commercial seaweeds. Australia. FAO **Fisheries Technical Paper**. Cap. 2, p. 58-115, 1987.

MENDES, A. A.; RODRIGUES, D. S.; ADRIANO, W.S.; MAMMARELLA, E. J.; DE CASTRO, H. F.; GIORDANO R. L. C. Covalent Attachment of *Aspergillus oryzae* Lipase on Chemically Bound Hybrid Matrices. International Conference on Chitin and Chitosan, Montpellier-FR, Livro de Abstracts, v. 1. P. 95-96, 2006.

MENDES, A.A. **Seleção de suportes e protocolos de imobilização de lípases para a síntese enzimática de biodiesel**. Tese de Doutorado. Universidade Federal de São Carlos. São Carlos - São Paulo, Brasil, 2009.

MESSING, R. A. Immobilized enzymes for industrial reactors. Ed. Messing R. A. **Academic Press**, p.63, 1975.

METHAL A.; DIB A. F.; MOHAMAD S.; TALAL E.; KHALID M.; ADNAN B. Immobilization of antibodies on alginate-chitosan beads. **International Journal of Pharmaceutics** v. 206; p. 23–34. 2000.

MOE, S. T., DRAGET, K. I., SKJAK-BRAEK, G., SMIDSRØD, O. Alginates. In A. M. Stephen (Ed.), **Food polysaccharides and their applications**, New York: Marcel Dekker, p. 245-286. 1995.

MONTERO, S.; BLANCO, A.; VIRTO, M.D.; LANDETA, L.C.; AGUD, I.; SOLOZABAL, R.; LASCARAY, J.M.; RENOBALS, M.; LLAMA, M.J.; SERRA, J.L. Immobilization of *Candida rugosa* lipase and some properties of the immobilized enzyme. **Enzyme Microb. Technol.** v.15(3), p. 230-247, 1993.

MOREAU, V.H. Produção experimental de biodiesel por transesterificação enzimática. **Revista da Rede de Ensino Ftc**, Salvador, p.1-14, 7 dez. 2008.

MOREIRA, A. B. R.; PEREZ, V. H.; SANTOS, J. C.; DE CASTRO, H. F.; DA RÓS, P. C. M. Seleção de fonte de lipase para etanolise do óleo de palma. In: SINAIFERM 2007 – **Simpósio Nacional de Bioprocessos**, 16, 2007.

MOREIRA, A.B.R. **Seleção de fonte de lipase para síntese de biodiesel por transesterificação enzimática do óleo de palma com etanol**. 2007. 120 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, São Paulo, 2007.

NASCIMENTO, M. G.; COSTA NETO, P. R. e MAZZUCO, L. Biotransformação de Óleos e Gorduras; **BIO-TECNOLOGIA Ciência & Desenvolvimento**; ano III n.19; 28-31; 2001.

PALOMO, J. M.; ORTIZ, C.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; FUENTES, M.; GUIBAN, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Lipase-lipase interactions a a new tool to immobilized and modulate the lipase properties. **Enzyme and Microbial Tchnology**, v. 36, n. 4, p. 447-454, 2005.

PAPAGEORGIU, S. K., KATSAROS, F. K., KOUVELOU, E. P., NOLAN, J. W., DEIT, L. H., KANELLOPOULOS, N. K. Heavy metal sorption by calcium alginate beads from *Laminaria digitata*. **Journal of Hazardous Materials**, v. 137, p. 1765–1772, 2006.

PAULA, A. V.; MOREIRA, A B R.; BRAGA, L. P.; De CASTRO, H. F.; BRUNO, L. M. Comparação do desempenho da lipase de *Candida rugosa* imobilizada em suporte híbrido de polissiloxano-polivinilálcool empregando diferentes metodologias. **Quimica Nova**, v.31, n. 1, p. 35-40, 2008.

PEDROCHE, J.; YUST, M. M.; MATEO, C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GIRON-CALLE, J.; ALAIZ, M.; VIOQUE, J.; GUIBAN, J. M.; MELLAN, F. Effect of the support and experimental conditions in the intensity of the multipoint covalent

attachment of proteins on glyoxyl-agarose supports: Correlation between enzyme-support linkages and thermal stability. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 1160-1166, 2007.

PETRE, M.; ZARNEA, G.; ADRIAN, P.; GHEORGHIU, E. Biodegradation and bioconversion of cellulose wastes using bacterial and fungal cells immobilized in radiopolymerized hydrogels. **Resources, Conservation and Recycling**, Amsterdam, v. 27, n. 4, p. 309-332, 1999.

PINTO, A. C. et al. Biodiesel: An overview. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 6., p. 1313-1330, 2005.

RODRIGUES, D.S.; MENDES, A.A.; ADRIANO, W.S.; GONÇALVES, L.R.B.; GIORDANO, R.L.C. Multipoint covalent immobilization of microbial lipase on chitosan and agarose activated by different methods. **Jornal of Molecular Catalysis B: Enzymatc**, v. 51, p. 100-109, 2008.

SECUNDO, F.; MIEHÉ-BRENDELÉ, J.; CHERALU, C.; FERRANDI, E.E.; DUMITRIU, E. Adsorption and activities of lípases on synthetic beidellite clays with variable composition. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 109, p. 350-361, 2008.

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U.C. Production, purification, characterization and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, v. 19, p. 627-632, 2001.

SILVA, A. J.; HIRASAWA, J. S.; VARESCHE, M. B.; FORESTI, E.; ZAIAT, M. Evaluation of support materials for the immobilization of sulfate-reducing bacteria and methanogenic archaea. **Anaerobe**, London, v. 12, n. 2, p. 93-98, 2006.

SMIDSRØD, O. Molecular basis for some physical properties of alginates in the gel state. Faraday Discuss. **Chemical Society**, v. 57, p. 263-274, 1974.

SMIDSRD, O.; DRAGET, K. I. IN BERGHSTAHL, E. D. **Food colloids – proteins, lipids and polysaccharides**. Alginate Gelation Technologies, p.279 – 293, 1997.

SOARES, C. M. F.; CASTRO, H. F.; MORAES, F. F.; ZANIN, G. M. Characterization and utilization of *Candida rugosa* lipase immobilized on controlled pore silica. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.77/79, p. 745-757, 1999.

TANRISEVEN A.; DOGAN S. Immobilization of invertase within calcium alginate gel capsules. Department of Biochemistry, Gebze Institute of Technology, Gebze, Kocaeli, Turkey. 2001.

TAPIA, C.; ESCOBAR, Z.; OSTA, E.; SAPAG-HAGAR, J.; VALENZUELA, F.; BASUALTO, C.; GAI, M.N.; YAZDANI-PEDRAN, M. Comparative studies on polyelectrolyte complexes and mixtures of chitosan-alginate and chitosan-carregeenan as prolonged diltiazem chloride release systems. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 57, p. 65-75, 2004.

TORRES, M. A., **Produção e caracterização de microesferas de quitosana natural e modificada quimicamente e o seu uso na adsorção de proteínas**, 2006, Tese (Doutorado) Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2006.

TORRES, R.; MATEO, C.; FERNANDEZ-LORENTE, G. ORTIZ, C. FUENTES, M.; PALOMO, J.M.; GUIBAN, J.M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. A novel heterofunctional epoxy-amino sephabeads for a new enzyme immobilization protocol: Immobilization-stabilization of  $\beta$ -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. **Biotechnology Progress**, v. 19, p. 1056-1060, 2003.

TU, J., BOLLA S., BARR, J., MIEDEMA, J., LI, X., JASTI, B., Alginate microparticles prepared by spray-coagulation method: Preparation, drug loading and release characterization, **International Journal of Pharmaceutics**, v. 303, p. 171-181, 2005.

VERGER, R. Interfacial activation of lipases: facts and artifacts. **Trends in Biotechnology**, v. 15, p. 32-38, 1997.

VILLENEUVE, P.; MUDERHWA, J.M.; GRAILLE, J.; HAAS, M.J. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. **Journal of Molecular Catalysis: Enzymatic**, v. 9, p. 113-148, 2000.

VREEKER, R.; LI, L.; FANG, Y.; APPELQVIST, I.; MENDES, E. Drying and rehydration of Calcium Alginate Gels. **Food Biophysics**. p. 361-369, 2008.

WANG, L.; RIDGWAY, D.; GU, T.; MOO-YOUNG, M. Bioprocessing strategies to improve heterologous protein production in filamentous fungal fermentations. **Biotechnology Advances**, New York, v. 23, n. 2, p. 115-129, 2005.

WELTER, R. A. **Estudo de equilíbrio dos sistemas binários e ternário de troca iônica dos íons cobre, cádmio e cálcio pelo biopolímero alginato**. Dissertação de Mestrado apresentada a Faculdade de Engenharia Química – Unicamp. Departamento de Termo fluidodinâmica, 2009.

ZAMBON, A. A., RODRÍGUEZ, M. M., MIGUEL, V. U., ERRAZU, A. F., Produccion de alginatos comerciales a partir de algas pardas patagônicas, **Revista Industria y Química**, nº 344, 2002.

ZNEZEVIC, Z.; BOBIC, S.; MILUTINOVIC, A.; OBRADOVIC, B.; MOJOVIC, L.; BUGARSKI, B. Alginate-immobilized lipase by electrostatic extrusion for the purpose of palm oil hydrolysis in lecithin/isooctane system. **Process Biochemistry** v. 38, p. 313-318, 2002.

