

IMOBILIZAÇÃO CELULAR E SUAS PRINCIPAIS APLICAÇÕES EM BIOPROCESSOS: UMA REVISÃO

Maria de Fátima Farias Rocha ¹

RESUMO

O presente capítulo apresenta um levantamento bibliográfico a respeito dos suportes e técnicas que podem ser utilizados para a imobilização celular. Dentre os suportes, constatou-se que o alginato de cálcio é amplamente empregado. As técnicas de imobilização ligação a superfície, auto agregação, contenção por barreiras e aprisionamento em matrizes porosas foram descritas. Além disso, foram mostrados exemplos e principais aspectos relacionados às aplicações de células imobilizadas em bioprocessos, como na produção de enzimas, álcoois e biossurfactantes, e em processos de biodegradação. Diante dessa variedade, foi destacada a relevância do aprimoramento da imobilização celular como alternativa em processos biotecnológicos, sobretudo pela possibilidade de potencializar a produção do metabólito de interesse e de reutilizar as células imobilizadas por vários ciclos.

Palavras-chave: Imobilização celular, Suportes, Técnicas de imobilização celular.

INTRODUÇÃO

Um bioprocessos está relacionado a biotransformação de matérias primas em produtos, mediante a utilização de células (animais, vegetais e microbianas) ou enzimas. Para a obtenção desse produto, deve-se adotar uma estratégia de fermentação, que pode incluir o cultivo de células imobilizadas (KOURKOUTAS *et al.*, 2004).

A imobilização celular consiste basicamente no confinamento físico das células em uma região do espaço, onde são mantidas suas atividades catalíticas em processos contínuos ou descontínuos, apresentando a possibilidade de reutilização das mesmas (FREEMAN e LILLY, 1998). Além disso, constitui um mecanismo útil para elevar a produção do metabólito de interesse se comparado aos processos utilizando células livres, tornando-o mais atrativo industrialmente, bem como pode ser aplicada na biorremediação ambiental (HO e NGUYEN; 2016; BARLOW *et al.*, 2017).

¹ Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos da Universidade Tiradentes - UNIT, fatimafarias25@gmail.com

Diante da relevância dessa temática, o objetivo do presente capítulo é a realização de um levantamento bibliográfico com o intuito de abordar os principais aspectos relacionados à imobilização celular, com ênfase nas suas principais aplicações em processos biotecnológicos.

METODOLOGIA

Foram realizadas pesquisas bibliográficas referentes à temática proposta em artigos científicos, de forma a esboçar concisamente conceitos, fundamentos e exemplos de suportes, tratamentos e técnicas que podem ser empregadas para a imobilização celular, bem como as suas possíveis aplicações. Para tal, foi utilizada como principal biblioteca digital o *Google Scholar* (Google Acadêmico), no qual foram pesquisados os seguintes termos (palavras-chave): *cell immobilization; supports used for cell immobilization; techniques of cell immobilization*. Além disso, as listas de referências dos artigos encontrados foram analisadas em busca de outros estudos. A seleção dos trabalhos foi realizada com a leitura dos títulos e resumos (em alguns casos, introdução e conclusão), com o intuito de eliminar os que eram irrelevantes para a elaboração da presente revisão. Em seguida, os textos completos dos artigos foram considerados, por meio da identificação e extração de informações importantes. Por fim, esses dados foram sintetizados, resultando no presente capítulo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

➤ Suportes

A região do espaço onde ocorre o confinamento físico das células é denominada suporte, e precisa apresentar determinadas características, tais como: não oferecer toxidez às células; resistência ao ataque químico e microbiano; pouca sensibilidade às possíveis solicitações mecânicas; elevada difusividade de substratos e produtos (SCHIMIDELL *et al.*, 2001).

Diversos tipos de materiais podem ser utilizados como suporte, a exemplo de polímeros naturais, polímeros sintéticos e materiais inorgânicos. É importante destacar que a depender da finalidade, os suportes podem ser utilizados individualmente ou de forma combinada, introduzindo grupos funcionais que serão responsáveis pela imobilização celular

(KOURKOUTAS *et al.*, 2004; SCHIMIDELL *et al.*, 2001). Além disso, a sua utilização deve considerar o microrganismo que será empregado no processo.

Dentre os suportes existentes, o alginato de cálcio é comumente utilizado. O alginato é um polissacarídeo constituído por ácido manurônico e ácido gulurônico, sendo um componente importante das algas marrons. Pode ser obtido, além das algas, de fontes bacterianas e, a depender da fonte originária, a proporção entre blocos de ácido manurônico e ácido gulurônico irá variar, fazendo com que suas características (adesão celular e estabilidade final do gel, por exemplo) também variem (PAWAR e EDGAR, 2012; WANG *et al.*, 2003).

A formação de géis de alginato ocorre na presença de cátions divalentes, como o cloreto de cálcio, onde as interações entre os blocos de ácido gulurônico formam junções bem seguras. Além desses, os blocos de ácido manurônico também participam, formando junções mais fracas, sendo essa a razão dos alginatos com elevado teor de ácido gulurônico originarem géis mais resistentes (PAWAR e EDGAR, 2012).

Além do cálcio, outros íons divalentes tem afinidade com o alginato, a exemplo do bário, estrôncio e chumbo. No entanto, o cálcio (Ca^{2+}) é frequentemente utilizado a fim de induzir a formação do gel de alginato (PAWAR e EDGAR, 2012). A reação de gelificação do alginato de sódio com cloreto de cálcio é ilustrada na Fig. 1:

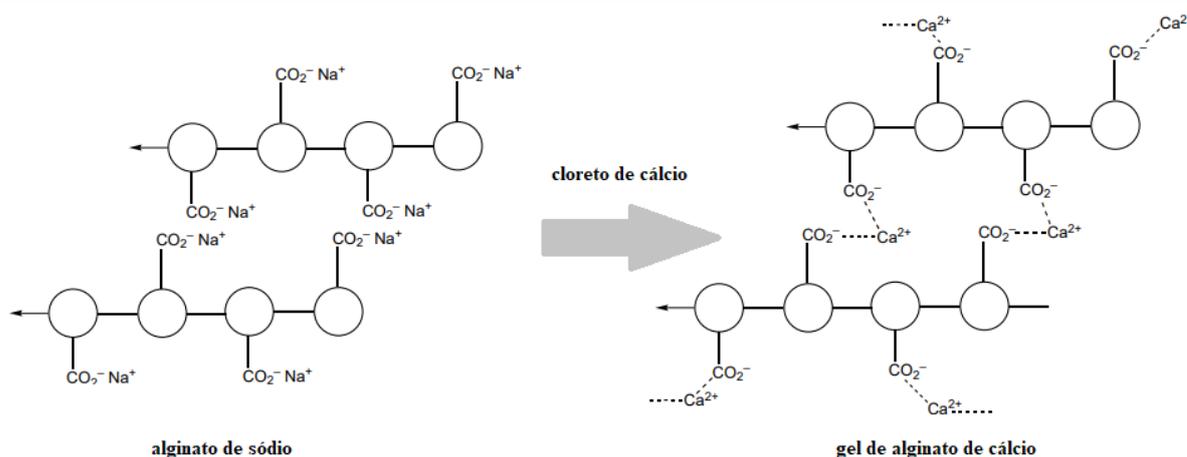


Figura 1 – Reação de gelificação do alginato de sódio na presença de íons de cálcio.
Fonte: Adaptado de ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY.

Como já mencionado, o alginato de sódio é um polímero natural que pode ser extraído de algas marrons. Quando colocado em uma solução com íons de cálcio, esses substituem os

íons de sódio do polímero, na reação de gelificação que também pode ser denominada *cross-linking*, conforme ilustrado anteriormente (PAWAR e EDGAR, 2012).

Inúmeros trabalhos reportam a utilização do alginato como suporte na imobilização de alguns tipos celulares. GEED *et al.* (2018) estudaram os efeitos da transferência de massa externa na biodegradação do inseticida malation em biorreator, utilizando células de *Bacillus sp.* imobilizadas em suporte de alginato.

KUREEL *et al.* (2017) fizeram o comparativo da remoção do benzeno em reator em batelada por células de *Bacillus sp.* imobilizadas em álcool polivinílico (PVA)-alginato, espumas de poliuretano (PUF) e células livres. Os parâmetros importantes do processo foram otimizados e as remoções de benzeno encontradas foram em 70% para as células livres, 84% para as células imobilizadas em PVA-alginato e 90% para as células imobilizadas em PUF.

ADINARAYANA *et al.* (2005) estudaram a imobilização das células de *Bacillus subtilis* em diferentes suportes para a produção de protease alcalina. Dentre esses suportes, utilizaram o alginato de cálcio, k-carragenana, ágar-ágar e poliacrilamida, além de realizarem o procedimento com células livres. Os resultados encontrados mostraram que a utilização do alginato de cálcio como suporte é vantajosa em comparação aos demais, uma vez que se obteve uma maior atividade volumétrica dentro do mesmo processo fermentativo.

É importante ressaltar que o alginato é um suporte amplamente utilizado nesse tipo de processo, sobretudo quando envolve bactérias e leveduras. Além do mencionado anteriormente, ADINARAYANA *et al.* (2005) também observaram que a adaptação das características do suporte de alginato potencializam a operacionalidade do sistema imobilizado, demonstrando que um mesmo suporte preparado na presença de porcentagens distintas de cloreto de cálcio apresenta diferentes estabilidades.

HO e NGUYEN (2016) estudaram a imobilização de *Bacillus subtilis* em alginato-quitosana para a fermentação da enzima natoquinase. Nesse trabalho, seis fatores que afetavam a estabilidade da imobilização foram estudados. Dentre eles, observou-se que a concentração de alginato e a densidade das células influenciavam significativamente. Assim, otimizando esses fatores e mantendo os demais a um nível normal, a eficiência da imobilização chegou a 90,73%, e se teve a possibilidade de reutilizar as células imobilizadas 6 vezes.

Independentemente do tipo de suporte empregado, pode-se propor mecanismos de tratamento com o objetivo de torná-lo mais efetivo para o processo em estudo. GEED *et al.* (2018) e KUREEL *et al.* (2017), por exemplo, propuseram o tratamento do suporte de alginato por meio da adição de ácido bórico e cloreto de cálcio, visando aumentar a estabilidade e força do gel. YAN *et al.* (2012) propuseram a modificação biológica da espiga de milho, utilizada como suporte, por meio da hidrólise da celulose. Esse tratamento modificou a superfície do suporte, tornando-o áspero e poroso, contribuindo assim para a absorção das células.

➤ Técnicas de imobilização celular

Os processos biotecnológicos são favorecidos por técnicas de imobilização celular (Fig. 2), que podem ser agrupadas em quatro grupos a depender do mecanismo físico empregado e que serão explicadas nos tópicos seguintes (KOURKOUTAS *et al.*, 2004).

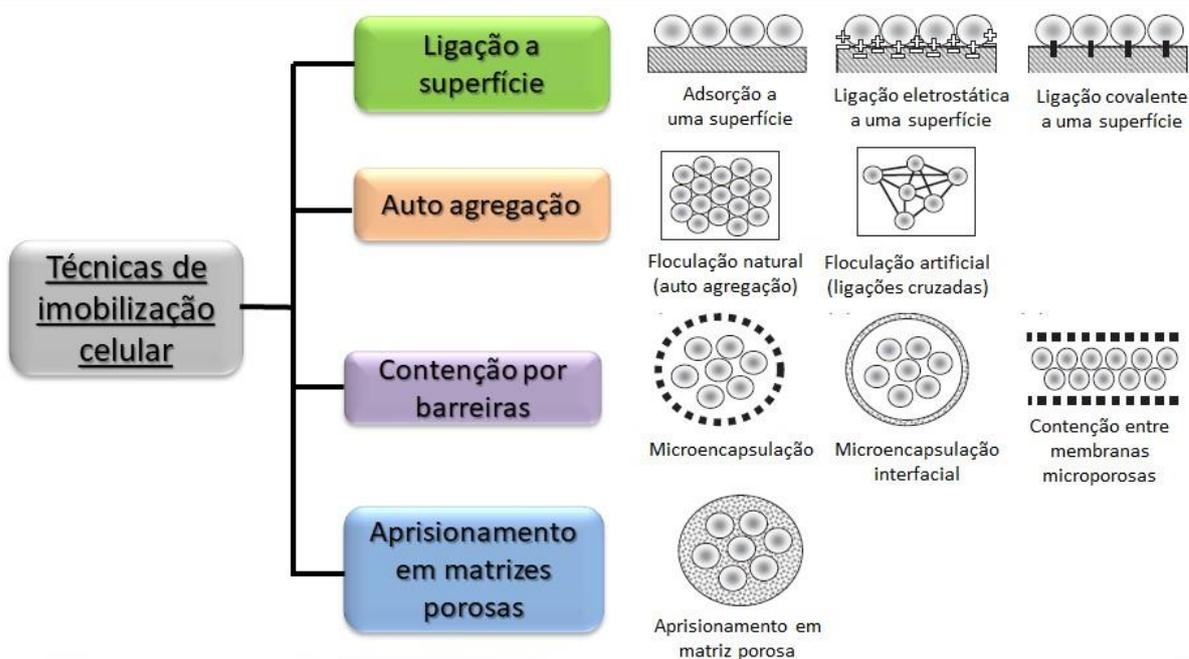


Figura 2 – Técnicas de imobilização celular.
Fonte: Adaptado de KOURKOUTAS *et al.* (2004).

a) Ligação a superfície

A técnica de ligação a superfície consiste na adesão celular ao suporte de imobilização, que ocorre graças as ligações iônicas ou covalentes entre as células e o suporte empregado (KOURKOUTAS *et al.*, 2004; ROBLETO-ORTÍZ *et al.*, 2011). Esse tipo de imobilização celular pode ser alcançado naturalmente ou induzido artificialmente com o uso de agentes de ligação, a exemplo dos óxidos metálicos, glutaraldeído ou o aminosilano (GUNGORMUSLER-YILMAZ *et al.*, 2015).

É uma técnica amplamente utilizada devido a relativa facilidade de realização, onde pode-se empregar como suporte, por exemplo, materiais celulósicos (madeira e serragem) e materiais inorgânicos (porcelana e vidro poroso) (KOURKOUTAS *et al.*, 2004; YAN *et al.*, 2012). Dentre as propriedades desejáveis aos materiais do suporte, destacam-se a alta resistência, elasticidade e porosidade, que levam a uma grande superfície de adsorção e baixo custo comercial (GUNGORMUSLER-YILMAZ *et al.*, 2015).

b) Auto agregação

A técnica de auto agregação, como o próprio nome sugere, consiste na capacidade das células se agregarem a fim de formar uma unidade maior ou a propriedade de células em suspensões para aderir em aglomerados e sedimentos rapidamente, sem que seja necessária a presença de um suporte. Graças aos grandes tamanhos dos aglomerados, essa técnica pode ser empregada em biorreatores projetados para trabalhar com células previamente imobilizadas, no entanto, a ausência do suporte de imobilização traz consigo instabilidade e baixa resistência a tensão de cisalhamento (LUO *et al.*, 2016; KOURKOUTAS *et al.*, 2004).

A utilização dessa técnica foi reportada no trabalho de YASUDA *et al.* (2003), no qual foi aplicada na biorremediação para tratamento de solo. As células da bactéria *Bacillus subtilis* foram imobilizadas em formação espontânea por auto agregação e posteriormente retidas no solo. De forma geral, outros autores relatam que alguns microrganismos tem a capacidade de formarem agregados com partículas sólidas encontradas naturalmente (nesse caso o solo) e até mesmo favorecerem processos de co-imobilização com outros microrganismos (RUIZ-GÜERECA e SÁNCHEZ-SAAVEDRA, 2015; KOURKOUTAS *et al.*, 2004).

c) Contenção por barreiras

A técnica de contenção por barreiras, também conhecida como contenção em membranas, pode ser obtida pelo uso de filtros de membranas microporosas, aprisionamento de células em microcápsulas ou por imobilização entre a superfície de interação de dois líquidos imiscíveis (KOURKOUTAS *et al.*, 2004; BARLOW *et al.*, 2017). Embora seja uma técnica que vem sendo amplamente estudada, sobretudo pela aplicabilidade para produtos que precisam ser livres de células e quando uma mínima transferência de compostos é requerida, apresenta como desvantagens limitações de transferência de massa e possibilidade de bioincrustação de membrana proveniente do crescimento celular (GUNGORMUSLER-YILMAZ *et al.*, 2015; KOURKOUTAS *et al.*, 2004).

No que diz respeito a transferência de massa, o tamanho e a estrutura dos poros da membrana não são os únicos fatores que interferem, a hidrofobicidade/hidrofilicidade e o tipo do material da membrana também são fatores que influenciam positivamente (GUNGORMUSLER-YILMAZ *et al.*, 2015).

d) Aprisionamento em matrizes porosas

A técnica de aprisionamento em matrizes porosas consiste na penetração das células em uma matriz porosa até que a sua mobilidade seja obstruída pela presença de outras células ou na formação *in situ* do material poroso em uma cultura de células (KOURKOUTAS *et al.*, 2004; GUNGORMUSLER-YILMAZ *et al.*, 2015).

Nesse método, as células podem ser imobilizadas em uma variedade de materiais macro ou micro porosos, a exemplo de cerâmica, vidro sinterizado e carvão ativado; polímeros naturais, a exemplo de colágeno, ágar e alginato e polímeros sintéticos, a exemplo de acrilamida, poliuretano e polivinil. Assim, a eficácia da imobilização varia de acordo com o tipo de célula e do material utilizado como suporte (GUNGORMUSLER-YILMAZ *et al.*, 2015; ADINARAYANA *et al.*, 2005).

Para fins de fermentação, por exemplo, é comum que se realize esse tipo de imobilização em géis de polissacarídeos como k-carragenina, ágar e alginato. No entanto, é necessário ressaltar a limitação de transferência de massa imposta aos processos de imobilização em géis (HO e NGUYEN; 2016; MISHRA *et al.*, 2016).

A imobilização de células constitui, independente da técnica empregada, um mecanismo útil para elevar a produção de metabólitos microbianos de interesse, assim como pode ser aplicada em processos de biorremediação ambiental (HO e NGUYEN; 2016; BARLOW *et al.*, 2017; YASUDA *et al.*, 2003). Para isso, tal técnica não deve apresentar efeitos adversos nas propriedades biocatalíticas desejadas, além de ser segura, simples, requerer o menor número de etapas e ingredientes possíveis para o seu preparo, tornando-a aplicável em escala industrial e viável economicamente (KOURKOUTAS *et al.*, 2004; GUNGORMUSLER-YILMAZ *et al.*, 2015).

➤ **Caracterizações**

Bioquímica: A determinação das condições bioquímicas as quais as células e o suporte serão submetidas é uma etapa imprescindível quando se trata de imobilização celular, uma vez que a otimização dessas condições aumenta a estabilidade da técnica de imobilização, a possibilidade de reutilização das células e a produtividade do processo (HO e NGUYEN, 2016; MISHRA *et al.*, 2016)

Físico-química: Com o objetivo de confirmar a imobilização celular, verificar os grupos funcionais e acompanhar as reações envolvidas, a espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) é uma técnica aplicável, uma vez que pode fornecer informações cruciais a respeito da estrutura molecular dos componentes (KUREEL *et al.*, 2017).

Morfológica: A microscopia eletrônica de varredura (MEV) é uma técnica que pode fornecer informações sobre a morfologia das bactérias, comprovar a adesão das células ao suporte empregado na imobilização e verificar os efeitos dos tratamentos aos quais esses suportes podem ser submetidos (ROBLETO-ORTÍZ *et al.*, 2011; YAN *et al.*, 2012).

➤ **Estabilidade do sistema**

Ao se realizar a imobilização celular, é desejável que o sistema apresente maior estabilidade quando submetido a diversas condições de temperatura, pH, solventes (que podem ser empregados para a recuperação do metabólito de interesse, por exemplo), bem como a possibilidade de reutilizar as células imobilizadas por vários ciclos, tornando-o viável

economicamente e possivelmente aplicável em escala industrial (KOURKOUTAS *et al.*, 2004; GUNGORMUSLER-YILMAZ *et al.*, 2016; CHEN *et al.*, 2007).

➤ Aplicações de células imobilizadas em bioprocessos

A realização de processos utilizando células imobilizadas tem sido alvo de diversos estudos no ramo da biotecnologia, sobretudo pela possibilidade de elevar a produção dos metabólitos microbianos de interesse e de reutilizar as células por vários ciclos. Dentre os processos, pode-se citar como exemplo a produção de enzimas, álcoois e biossurfactantes, além da aplicação em processos de biodegradação (Tabela 1).

Tabela 1 – Aplicações de microrganismos imobilizados, técnicas e suportes empregados.

Processo	Microrganismo	Técnica de imobilização	Suporte	Referências
Produção de enzimas	<i>Bacillus subtilis</i>	Aprisionamento	Alginato-quitosana	HO e NGUYEN (2016)
	<i>Bacillus subtilis</i>	Aprisionamento	Alginato de cálcio	ADINARAYANA <i>et al.</i> (2005)
Produção de álcoois	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Ligação a superfície	Espiga de milho	YAN <i>et al.</i> (2012)
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Aprisionamento	Alginato de cálcio	MISHRA <i>et al.</i> (2016)
Produção de biossurfactantes	<i>Bacillus subtilis</i>	Ligação a superfície	Toalha de algodão	YI <i>et al.</i> (2017)
Biodegradação	<i>Bacillus subtilis</i>	Contenção por barreiras	Polietilenoglicol-poliácido láctico	BARLOW <i>et al.</i> (2017)
	<i>Bacillus sp</i>	Contenção por barreiras	PVA-alginato	GEED <i>et al.</i> (2018)
	<i>Bacillus sp</i>	Contenção por barreiras	PVA-alginato e PUF	KUREEL <i>et al.</i> (2017)
	<i>Pseudomonas putida</i>	Ligação a superfície	Fibra de agave-	ROBLETO-ORTÍZ <i>et al.</i>

*PVA: álcool polivinílico; PUF: fibra de poliuretano

A seguir, os trabalhos mencionados na Tabela 1 são apresentados de forma resumida, dando ênfase aos principais aspectos observados.

a) Produção de enzimas

A nattokinase é uma potente enzima fibrinolítica com potencial para combater doenças cardiovasculares. Devido a sua importância em aplicações médicas, HO e NGUYEN (2016) estudaram a fermentação de tal enzima, utilizando células imobilizadas da bactéria *Bacillus subtilis* em suporte combinado de alginato-quitosana. Nesse trabalho, foram avaliados seis fatores que afetavam a estabilidade da imobilização: concentração de alginato, concentração de quitosana, pH, concentração de cloreto de cálcio (utilizado para tratamento), densidade celular adicionada e tempo de agitação. Dentre eles, foi observado que a concentração de alginato e a densidade das células influenciavam significativamente. Assim, otimizando esses fatores e mantendo os demais a um nível normal, obteve-se uma eficiência de imobilização de 90,73%, além da reutilização das células imobilizadas por 6 ciclos, sem a ocorrência de mudança na atividade enzimática da nattokinase.

ADINARAYANA *et al.* (2005) também estudaram a imobilização das células de *Bacillus subtilis*, dessa vez para a produção da protease alcalina, enzima que pode ser utilizada em diversas indústrias, a exemplo da alimentícia e farmacêutica. Dentre os suportes existentes, utilizaram o alginato de cálcio, k-carragenana, ágar-ágar e poliacrilamida, além de realizarem o procedimento com células livres. Os resultados encontrados mostraram que a utilização do alginato de cálcio como suporte foi vantajosa em comparação aos demais, uma vez que se obteve uma maior atividade volumétrica dentro do mesmo processo fermentativo. É importante ressaltar que o alginato é um suporte amplamente utilizado nesse tipo de processo, sobretudo quando envolve bactérias e leveduras. Além do mencionado anteriormente, ADINARAYANA *et al.* (2005) também observaram que a adaptação das características do suporte de alginato potencializam a operacionalidade do sistema imobilizado, demonstrando que um mesmo suporte preparado na presença de porcentagens distintas de cloreto de cálcio apresenta diferentes estabilidades.

b) Produção de álcoois

No estudo realizado por YAN *et al.* (2012), verificou-se a imobilização da levedura *Saccharomyces cerevisiae* em espiga de milho para a produção de etanol. Na etapa de estabilidade da técnica de imobilização, foi realizada a modificação biológica do suporte por hidrólise da celulose, o que aumentou a concentração de células imobilizadas e rompeu a superfície lisa do suporte, tornando-o mais áspero e poroso, obtendo-se por fim um aumento de eficiência catalítica para a produção do álcool. Além disso, as células imobilizadas da levedura foram utilizadas por 14 ciclos fermentativos sem perder a eficiência catalítica.

MISHRA *et al.* (2016) estudaram a imobilização de *Saccharomyces cerevisiae* em alginato de cálcio. Além disso, foi verificado o efeito da temperatura na estabilidade da imobilização em três temperaturas (30, 35 e 40°C), testadas em termos de concentração de glicose e produção de etanol. Os resultados mostraram que o aumento da temperatura causava um aumento na desintegração após cada ciclo fermentativo, ou seja, em temperaturas mais altas o desempenho da levedura imobilizada diminuiu significativamente.

c) Produção de biosurfactantes

No trabalho realizado por YI *et al.* (2017) destacou-se a utilização das células imobilizadas de *Bacillus subtilis* em ambos os lados de uma toalha de algodão, fixada no eixo vertical dos defletores do biorreator. Foi observado que a utilização de células imobilizadas na fermentação triplicou a produção do biosurfactante (surfactina) se comparada ao valor obtido utilizando células livres. Pôde-se notar que as células imobilizadas apresentaram estabilidade operacional, sendo eficientemente reutilizadas por 7 ciclos. Além disso, o processo desse estudo foi realizado em dois estágios de pH, isto é, nas primeiras 6 horas foi mantido um pH de $5,0 \pm 0,1$, enquanto que nas 18 horas seguintes foi mantido um pH de $7,5 \pm 0,1$, totalizando 24 horas de fermentação. Isso porque nas primeiras horas desejava-se obter um acúmulo da biomassa no biorreator, sendo necessário inibir a produção da surfactina. Posteriormente, o aumento do pH possibilitou um melhor desempenho de produção. Em ambos os valores de pH, as células imobilizadas de *Bacillus subtilis* apresentaram estabilidade.

d) Processos de biodegradação

A aplicação da imobilização celular foi reportada no trabalho de BARLOW *et al.* (2017), que trata da microencapsulação de *Bacillus subtilis* em uma membrana semipermeável composta de polietilenoglicol e poliácido láctico para a remediação do selênio, onde obteve-se um elevado potencial em reduzir a contaminação ambiental proveniente do mesmo. GEED *et al.* (2018) estudaram os efeitos da transferência de massa externa na biodegradação do inseticida malathion em biorreator, utilizando células de *Bacillus sp.* imobilizadas em suporte de alginato.

KUREEL *et al.* (2017) fizeram o comparativo da remoção do benzeno em reator em batelada por células de *Bacillus sp.* imobilizadas em álcool polivinílico (PVA)-alginato, espumas de poliuretano (PUF) e células livres. Os parâmetros importantes do processo foram otimizados e as remoções de benzeno encontradas foram em 70% para as células livres, 84% para as células imobilizadas em PVA-alginato e 90% para as células imobilizadas em PUF.

O estudo realizado por ROBLETO-ORTÍZ *et al.* (2011) tinha como objetivo a degradação do benzeno, tolueno e xileno (BTX), utilizando células imobilizadas da bactéria *Pseudomonas putida* em fibra de agave-espuma de polímero. Com o intuito de confirmar a imobilização celular, verificar os grupos funcionais e acompanhar as reações envolvidas, a espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) foi empregada em conjunto com a reflexão total atenuada (ATR), obtendo-se principalmente informações referentes aos grupos funcionais relacionados a imobilização do microrganismo no suporte composto. Além disso, para verificar a adesão de células a superfície composta e a formação do biofilme, foi empregada a microscopia eletrônica de varredura (MEV), onde pôde-se perceber que a adesão bacteriana foi favorecida pelo espumado, que ofereceu uma superfície rugosa.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O levantamento bibliográfico proporcionou o conhecimento do mecanismo de imobilização celular, ou seja, os suportes que podem ser empregados para esse fim, tratamentos aos quais esses suportes podem ser submetidos e técnicas existentes. Além disso, pôde-se também enfatizar a relevância da imobilização celular, uma vez que alguns trabalhos reportaram que a utilização de células imobilizadas, se comparadas as células livres,

possibilitaram um incremento de produção do metabólito de interesse, bem como potencializaram os processos de biodegradação.

No que diz respeito aos processos fermentativos, células imobilizadas podem ser empregadas para diversos fins, como a produção de enzimas, álcoois e biossurfactantes, e diferentes materiais podem ser empregados como suportes, a exemplo do alginato, espiga de milho e toalha de algodão. Logo, diante da variedade de aplicações, é fundamental o aprimoramento de técnicas e tratamentos que possibilitem a utilização de células imobilizadas em escala industrial.

REFERÊNCIAS

ADINARAYANA, K.; JYOTHI, B.; ELLAIAH, P. **Production of alkaline protease with immobilized cells of *Bacillus subtilis* PE-11 in various matrices by entrapment technique.** AAPS PharmSciTech, v. 6, n. 3, p. 391-397, 2005.

BARLOW, J.; GOZZI, K.; KELLEY, C. P.; GEILICH, B. M.; WEBSTER, T. J.; CHAI, Y.; SRIDHAR, S.; VEN, A. L. V. **High throughput microencapsulation of *Bacillus subtilis* in semi-permeable biodegradable polymersomes for selenium remediation.** Applied Microbiology and Biotechnology, v. 101, n. 1, p. 455-464, 2017.

FREEMAN, A.; LILLY, M. D. **Effect of processing parameters on the feasibility and operational stability of immobilized viable microbial cells.** Enzyme and Microbial Technology, v. 23, n. 5, p. 335-345, 1998.

GEED, S. R.; KUREEL, M. K.; PRASAD, S.; SINGH, R. S.; RAI, B. N. **Novel study on biodegradation of malathion and investigation of mass transfer correlation using alginate beads immobilized *Bacillus* sp. S4 in bioreactor.** Journal of Environmental Chemical Engineering, v. 6, n. 2, p. 3444-3450, 2018.

GUNGORMUSLER-YILMAZ, M.; CICEK, N.; LEVIN, D. B.; AZBAR, N. **Cell immobilization for microbial production of 1,3-propanediol.** Critical Reviews in Biotechnology, v. 36, n. 3, p. 482-494, 2015.

HO, H. T.; NGUYEN, H. T. **Optimization of *Bacillus Subtilis* Natto Immobilization Process on Alginate – Chitosan Complex and Its Application for Nattokinase**

Fermentation. International Journal of Pharmaceutical Science Invention, v. 5., n. 3, p. 25–30, 2016.

KOURKOUTAS, Y.; BEKATOROU, A.; BANAT, I. M.; MARCHANT, R.; KOUTINAS, A. A. **Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: A review.** Food Microbiology, v. 21, n. 4, p. 377–397, 2004.

KUREEL, M. K.; GEED, S. R.; GIRI, B. S.; RAI, B. N.; SINGH, R. S. **Biodegradation and kinetic study of benzene in bioreactor packed with PUF and alginate beads and immobilized with *Bacillus sp.-M3*.** Bioresource Technology, v. 242, p. 92–100, 2017.

LUO, S.; WU, X.; ZHU, Y.; LI, X.; JIANG, S.; ZHENG, Z. **Fermentative intensity of L-lactic acid production using self-immobilized pelletized *Rhizopus oryzae*.** African Journal of Biotechnology, v. 15, n. 21, p. 974–979, 2016.

MISHRA, A.; SHARMA, A. K.; SHARMA, S.; BAGAI, R.; MATHUR, A. S.; GUPTA, R. P.; TULI, D. K. **Lignocellulosic ethanol production employing immobilized *Saccharomyces cerevisiae* in packed bed reactor.** Renewable Energy, v. 98, p. 57–63, 2016.

PAWAR, S. N.; EDGAR, K. J. **Alginate derivatization: A review of chemistry, properties and applications.** Biomaterials, v. 33, n. 11, p. 3279–3305, 2012.

ROBLEDO-ORTÍZ, J. R.; RAMÍREZ-ARREOLA, D. E.; PÉREZ-FONSECA, A. A.; GÓMEZ, C.; GONZÁLEZ-REYNOSO, O.; RAMOS-QUIRARTE, J.; GÓNZALEZ-NÚÑEZ, R. **Benzene, toluene, and o-xylene degradation by free and immobilized *P. putida* F1 of postconsumer agave-fiber/polymer foamed composites.** International Biodeterioration and Biodegradation, v. 65, n. 3, p. 539–546, 2011.

ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY (RSC). **Cross-linking polymers - alginate worms,** disponível em <http://www.rsc.org/Education/Teachers/Resources/Inspirational/resources/3.1.9.pdf>, consultado em 18/08/2018.

RUIZ-GÜERRECA, D. A.; SÁNCHEZ-SAAVEDRA, M. P. **Growth and phosphorus removal by *Synechococcus elongatus*.** Journal of Applied Phycology, v. 28, n. 3, p. 1501–1507, 2015.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia industrial - Volume 2.** 1 Ed. São Paulo: Edgard Blucher, 2001.

WANG, L.; SHELTON, R. M.; COOPER, P. R.; LAWSON, M.; TRIFFITT, J. T.; BARRALET, J. E. **Evaluation of sodium alginate for bone marrow cell tissue engineering.** *Biomaterials*, v. 24, n. 20, p. 3475–3481, 2003.

YAN, S.; CHEN, X.; WU, J.; WANG, P. **Ethanol production from concentrated food waste hydrolysates with yeast cells immobilized on corn stalk.** *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 94, n. 3, p. 829–838, 2012.

YASUDA, T.; KATOH, S.; INOUE, Y.; SHIOMI, N. **A bioremediation method based on self immobilization of cells in shallow layer of soil.** *Journal Chemical Engineering of Japan*, v. 36, n. 2, p. 216-219, 2003.

YI, G.; LIU, Q.; LIN, J.; WANG, W.; HUANG, H.; LI, S. **Repeated batch fermentation for surfactin production with immobilized *Bacillus subtilis* BS-37: Two-stage pH control and foam fractionation,** *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 92, p. 530-535, 2017.