

BIOTECNOLOGIA: UM PANORAMA AO LONGO DOS SÉCULOS

Estela Fernandes e Silva, Karine Laste Macagnan e
Tainá Figueiredo Cardoso
(Organizadoras)



BIOTECNOLOGIA: UM PANORAMA AO LONGO DOS SÉCULOS



Estela Fernandes e Silva
Karine Laste Macagnan
Tainã Figueiredo Cardoso

(Organizadores)

BIOTECNOLOGIA:
UM PANORAMA AO LONGO DOS SÉCULOS

1^a Edição

Quipá Editora
2021

Copyright © dos autores e autoras. Todos os direitos reservados.

Esta obra é publicada em acesso aberto. O conteúdo dos capítulos, os dados apresentados, bem como a revisão ortográfica e gramatical são de responsabilidade de seus autores, detentores de todos os Direitos Autorais, que permitem o download e o compartilhamento, com a devida atribuição de crédito, mas sem que seja possível alterar a obra, de nenhuma forma, ou utilizá-la para fins comerciais.

Revisão e normalização: os autores e autoras

Preparação e diagramação: Quipá Editora

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

B616 Biotecnologia : um panorama ao longo dos séculos / Organizado por
Estela Fernandes e Silva, Karine Laste Macagnan e Tainã Figueiredo Cardoso.
— Iguatu, CE : Quipá Editora, 2021.

106 p. : il.

ISBN 978-65-89973-92-8
DOI 10.36599/qped-ed1.120

1. Biotecnologia. I. Silva, Estela Fernandes e. II. Macagnan, Karine Laste.
III. Cardos, Tainã Figueiredo. IV. Título.

CDD 660.6

Elaborada por Rosana de Vasconcelos Sousa — CRB-3/1409

Obra publicada pela Quipá Editora em dezembro de 2021.

www.quipaeditora.com.br / @quipaeditora

CONSELHO EDITORIAL

Me. Adriano Monteiro de Oliveira, Quipá Editora

Dra. Aida Figueiredo, Universidade de Aveiro (UA)

Dra. Alana Maria Cerqueira de Oliveira, Instituto Federal do Acre

Me. Ana Paula Brandão Souto, HUWC / Universidade Federal do Ceará (UFC).

Me. Ana Nery de Castro Feitosa, DHUWC) / Universidade Federal do Ceará (UFC).

Dra. Anna Ariane Araújo de Lavor, Instituto Federal do Ceará (IFCE), Campus Iguatu.

Dra. Anny Kariny Feitosa, Instituto Federal do Ceará (IFCE)

Me. Antoniele Silvana de Melo Souza, Secretaria Estadual de Pernambuco

Dr. Carlos Wagner Oliveira, Universidade Federal do Cariri (UFCA)

Me. Cristiane Ferreira Lima Secretaria de Administração Penitenciária do Ceará , SAP/CE

Dra. Elaine Carvalho de Lima, Instituto Federal do Triângulo Mineiro (IFTM)

Dra. Érica P. C. de Lima Machado, Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN)

Dra. Fernanda Pereira Martins, Instituto Federal de Goiás (IFG), Campus Valparaíso

Dra. Francione Charapa Alves, Universidade Federal do Cariri (UFCA)

Me. Francisco Odécio Sales, Instituto Federal do Ceará (IFCE), Campus Crateús

Dra. Harine Matos Maciel, Instituto Federal do Ceará (IFCE), Campus Baturité

Dra. Hidelano Delanusse Theodoro, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)

Dr. Iarê Lucas Andrade, Universidade Regional do Cariri (URCA)

Dra. Jane Márcia Mazzarino, Universidade do Vale do Taquari (UNIVATES)

Dr. Jarles Lopes de Medeiros, Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Dr. José Luiz Esteves, BSSP Escola de Negocios / MULTIVIX – Pós-Graduação

Me. Josete Malheiro Tavares, Secretaria Municipal de Saúde, Eusébio - CE

Dra. Júlia Elisabete Barden, Universidade do Vale do Taquari (UNIVATES)

Dra. Keyle Sâmara Ferreira de Souza, Secretaria de Educação (SEDUC/CE)

Dr. Marcelino Gevilbergue Viana, Universidade Regional do Cariri (URCA)

Dr. Marcos Pereira dos Santos, Faculdade Rachel de Queiroz (FAQ) - Ponta Grossa/PR

Me. Maria Antunízia Gomes, Instituto Federal do Ceará (IFCE)

Dra. Maria Eneida Feitosa, Universidade Regional do Cariri (URCA)

Dra. Maria Iracema Pinho de Souza, Universidade Federal do Cariri (UFCA)

Me. Marília Maia Moreira, Universidade Estadual Vale do Acaraú (UVA)

Me. Mira Raya Paula de Lima, Instituto Federal do Ceará (IFCE)

Dra. Mônica Maria Siqueira Damasceno, Instituto Federal do Ceará (IFCE)

Dra. Patricia Verônica Nunes Carvalho Sobral de Souza, TCE-SE/ Universidade Tiradentes

Esp. Ricardo Damasceno de Oliveira, Universidade Regional do Cariri

Me. Sergio Ricardo Quiroga, Periodista, ICAES - Catedra Francesco Fattorello, Argentina

Dra. Sislândia Maria Ferreira Brito, Universidade Regional do Cariri (URCA)

Dr. Thiago Barbosa Soares, Universidade Federal do Tocantins (UFT)

APRESENTAÇÃO

Esta obra tem como objetivo demonstrar um panorama geral sobre a Biotecnologia, para contemplar a importância dessa área de estudo e sua aplicabilidade.

A Biotecnologia desenvolve tecnologias a partir de organismos vivos, ou matéria-prima a partir deles, baseado nos processos biomoleculares e celulares, para criar ou modificar produtos e resolver problemas na sociedade nas mais diferentes áreas, e.g. saúde, ambiental, agrária e industrial.

A Biotecnologia faz parte da história humana começando, por exemplo, pelo advento do vinho através da fermentação de bactérias pelos egípcios e chega aos dias atuais, através da produção de vacinas e de métodos diagnósticos.

Desta forma, é fundamental o desenvolvimento de obras científicas que reconheçam sua importância. Nesse sentido, esperamos que a presente coletânea possa contribuir como fonte acadêmico-científica para a concepção de trabalhos futuros.

Fazemos votos de uma boa leitura.

As organizadoras.

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO

CAPÍTULO 1 09

BIOTECNOLOGIA: BREVE HISTÓRICO E A PRESENÇA NOS DIVERSOS CAMPOS DA SOCIEDADE

Estela Fernandes e Silva

Karine Laste Macagnan

Tainã Figueiredo Cardoso

CAPÍTULO 2 23

BIOTECNOLOGIA NA PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO

Juliana Silva Lemões

Lucas Silva Lemões

Luize Silva Mascarenhas

CAPÍTULO 3 38

PROCESSO DE PRODUÇÃO DE BIOPLÁSTICOS: INFLUENCIA DAS FONTES DE CARBONO E DE NITROGÊNIO

Karine Laste Macagnan

Mariane Igansi Alves

Izadora Almeida Perez

Angelita da Silveira Moreira

CAPÍTULO 4 53

VACINAS CONTRA A CÁRIE DENTÁRIA: UMA ALTERNATIVA POSSÍVEL?

Marina de Brito Teixeira

Natália Gonçalves Macedo

Paula Fernandes e Silva

Salma B Salybi

CAPÍTULO 5 64

MICROENCAPSULAÇÃO DE PROBIÓTICOS POR SPRAY DRYER

*Izadora Almeida Perez
Karine Laste Macagnan
Camila Waschburger Ames
Angelita da Silveira Moreira*

CAPÍTULO 6

79

LIPASES MICROBIANAS: FONTES E FATORES DE PRODUÇÃO

*Bruno Roswag Machado
Eduardo Silveira Ribeiro
Patrícia Silva Diaz
Susan Hartwig Duarte*

CAPÍTULO 7

92

IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES

*Eduardo Silveira Ribeiro
Bruno Roswag Machado
Susan Hartwig Duarte
Patrícia Silva Diaz*

SOBRE AS ORGANIZADORAS

105

ÍNDICE REMISSIVO

106

CAPÍTULO 1

BIOTECNOLOGIA: BREVE HISTÓRICO E A PRESENÇA NOS DIVERSOS CAMPOS DA SOCIEDADE

*Estela Fernandes e Silva
Karine Laste Macagnan
Tainã Figueiredo Cardoso*

RESUMO

A biotecnologia é uma ciência tecnológica, que explora processos celulares e biomoleculares para o desenvolvimento de produtos e processos para resolver problemas e criar produtos de utilidade. Atualmente, os avanços da Biotecnologia estão inseridos no nossos dia-a-dia gerando benefícios em diversas áreas, como na saúde, meio ambiente, agricultura e infraestrutura. Dentro da indústria farmacêutica, a biotecnologia é aplicada para produção e melhoramento de drogas farmacêuticas, produção de proteínas recombinantes para fins terapêuticos e vacinas. Nas indústrias alimentícia e agropecuária, diversas aplicações tecnológicas são feitas melhorando a conservação dos alimentos, produzindo colheitas mais resistentes e produtivas, animais e plantas modificados para produzirem substâncias utilizáveis em remédios ou substâncias de interesse. O meio ambiente também se beneficia com a biotecnologia, pois grande parte das indústrias fazem uso de biotécnicas para o tratamento especial de dejetos, além do uso de bactérias no combate à poluição causada por petróleo e metais e da produção de bioplásticos biodegradáveis. Nossa objetivo nesse capítulo é realizar uma revisão histórica da biotecnologia e mostrar os avanços realizadas e perspectivas para sua aplicação.

Palavras-chave: Agropecuária. Indústria alimentícia. Saúde.

INTRODUÇÃO

A Biotecnologia é uma ciência que utiliza seres vivos ou parte deles para gerar produtos ou processos (FALEIRO et al., 2011). É a Biotecnologia que está envolvida em temas altamente atuais e, por vezes, polêmicos como a manipulação de embriões humanos, a clonagem terapêutica e a transgenia (FALEIRO et al., 2011). Apesar dessa ciência parecer atual, ela existe desde as civilizações antigas e pode ser vista, principalmente, através da produção de alimentos: Os egípcios fabricavam bebidas como vinho e cerveja e alimentos como o pão utilizando microrganismos (SCHÜRRLE, 2020). No decorrer dos séculos, e principalmente em decorrer do desenvolvimento de técnicas moleculares e da engenharia genética, essa técnica foi aprimorada e ganhou espaço em

diversas áreas como na medicina, na agricultura e na indústria. Desta forma, o objetivo desse estudo foi o de traçar um panorama histórico associado a uma atualização sobre a importância da Biotecnologia para a sociedade.

REFERENCIAL TEÓRICO

História da Biotecnologia

A história da Biotecnologia confunde-se com a história da humanidade e apresenta-se em um primeiro momento através da produção de alimentos. A fabricação de queijos, presente desde a Pré-História, dependia da quimosina (enzima obtida do estômago de bezerros e ovelhas). Cerveja, vinho, vinagre, pão, iogurte, produtos da soja e queijos fazem parte da dieta humana desde a antiguidade, fato comprovado através de registros arqueológicos em diferentes locais: Mesopotâmia, Egito, China e Europa Central (EICHHOLTZ, 1960). Um outro importante exemplo histórico do papel da Biotecnologia está na preservação de alimento para animais através da fermentação de gramíneas que possibilitou a criação de bovinos em regiões frias por longos períodos de tempo (EICHHOLTZ, 1960).

No que se refere à importância histórica da Biotecnologia no campo da saúde, há registros de que no século XVIII marinheiros europeus carregaram barris de repolho fermentado a bordo de seus navios para prevenir o escorbuto durante suas longas viagens de exploração (EICHHOLTZ, 1960). Outro marco importante nessa área foi a produção de proteínas humanas através da tecnologia do DNA recombinante, quando em 1976, Herbert Boyer e Robert A. Swanson (1947-1999) co-fundou a Genentech, a primeira empresa de biotecnologia a comercializar tecnologia de DNA recombinante, expressando com sucesso em 1977 gene sintético de somatostatina humana (14 aminoácidos) em *Escherichia coli* (SCHÜRRLE, 2020).

A presença da Biotecnologia no ramo industrial teve uma de suas participações através da utilização de excrementos de aves e de cães para tratamento de peles e couros até o início do século XX (EICHHOLTZ, 1960).

A Microbiologia é um dos pilares da Biotecnologia, contudo até a invenção do microscópio no século XVII por Zacharias Jansen (1588–1631), Christiaan Huygens (1629–1695) e Antoni van Leeuwenhoek (1632–1723) ainda não se compreendia completamente

a importância dos microrganismos para os processos fermentativos que garantiram a produção de alimentos e bebidas desde a Antiguidade (SCHÜRRLE, 2020).

Resumos dos principais eventos relevantes na história da Biotecnologia são mostrados na Figura 1.

Figura 1 - Principais eventos relevantes na história da Biotecnologia



No decorrer dos séculos, passamos da biotecnologia clássica para a biotecnologia moderna, a qual proporciona diversos avanços na sociedade. Na tabela 1, podemos analisar alguns exemplos de bens e serviços que tiveram origem biotecnológica.

Tabela 1 - Exemplos de bens e serviços de origem biotecnológica

Setor	Bens e serviços biotecnológicos
Agropecuária	Adubo composto, plantas com propriedades novas e resistentes, animais e plantas geneticamente selecionados, biotécnicas de reprodução
Saúde	Antibióticos, hormônios, medicamentos, testes diagnósticos
Indústria Química	Butanol, acetona, glicerol, ácidos orgânicos, enzimas
Energia	Etanol, biogás
Meio Ambiente	Recuperação de petróleo, tratamento do lixo, purificação da água

Por ser uma ciência ampla, que engloba diversas outras ciências e áreas, como química, física, bioquímica, informática, biologia. Podemos ver sua aplicação nos mais diferentes segmentos da sociedade.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foi desenvolvida uma revisão de literatura através da busca de artigos científicos relacionados às diversas áreas da Biotecnologia (Agropecuária, Saúde, Ambiental, Alimentícia/Industrial) nas bases de dados científicos como: PubMed, Scielo, Google acadêmicos, Periódicos capes, entre outros.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Biotecnologia e agropecuária

Um dos primeiros aliados da agricultura foi o melhoramento genético. Através dele, podemos produzir organismos geneticamente superiores (ou seja que apresentam características de interesse), através de sucessivos cruzamentos e selecionando os melhores descendentes (HERDT, 2006). Contudo estas metodologias podem ser demoradas, uma vez que é realizada através da observação, necessitando completar o ciclo da cultura ou de vida do animal para saber se as características desejadas foram passadas para as outras gerações (HERDT, 2006). Contudo, os estudos de Gregor Mendel (1822-1884), atualmente conhecido como o pai da genética, e de outros cientistas contemporâneos, revelaram como as características eram transmitidas entre as gerações e permitiram as primeiras descobertas acerca dos mecanismos que envolvem a seleção das melhores espécies, em um momento no qual não se tinha conhecimento sobre o DNA e dos processos de divisão celular (SILVA, 2001).

A evolução veio com o descobrimento do DNA, e a biotecnologia agrícola foi intensificada na década de 1970. Dando início a Revolução Verde, a aplicação de um conjunto de biotécnicas modernas no campo permitiu aumentar a produtividade agropecuária (PINGALI, 2012). As técnicas de engenharia genética, que trouxeram a oportunidade de modificar e/ou adaptar os métodos do melhoramento clássico, abriu a possibilidade de buscar e encontrar genes relacionados as características buscadas até mesmo de espécies distantes (HEDDEN, 2003).

Um dos principais resultados da biotecnológica moderna foi o desenvolvimento dos organismos geneticamente modificados (OGMs). Através da engenharia genética, é possível modificar características de um organismo para excluir fenótipos indesejáveis ou potencializar as de interesse. Na prática, já foram desenvolvidas diversas plantas

tolerantes a herbicidas e resistentes a insetos (ANDERSON et al., 2019; SCHÜTTE et al., 2017), que auxilia na conservação ambiental (visto que diminui o número de aplicações de pesticidas) e aumenta a produção de alimentos.

A tecnologia Bt promove às plantas a capacidade de resistência a específicos insetos-praga, através da inserção de genes codificantes de proteínas inseticidas. Essa tecnologia facilitou o manejo pragas das lavouras de algodão, soja e milho, diminuindo o número de aplicações de inseticidas em até 67% (LU et al., 2010). Além disso, atualmente estão disponíveis no mercado diferentes tipos na soja melhoradas geneticamente para produzir um maior número de grãos por vagem ou com valor nutricional agregado, como por exemplo com maior concentração de ácidos graxos saturados, o que permite produzir óleos especializados para frituras livres de gorduras trans (COSTA et al., 2019; HITZ et al., 1995). Outro exemplo do melhoramento genético no enriquecimento nutricional dos grãos é o desenvolvimento do “arroz dourado”, o qual foi modificado para produzir betacaroteno e assim auxiliar no combate a deficiência de vitamina A (SIMKIN, 2021).

Na pecuária, a aplicação da biotecnologia acontece *i.e.* através da seleção de animais com características de interesse, uso de pré e probióticos para modificar o peso e aumentar a massa muscular dos animais e interferir em seus processos de reprodução (COUTINHO; ROSÁRIO; JORGE, 2010). O salmão selvagem do Atlântico, modificado para expressar genes de salmão do Pacífico e de enguia e assim crescer de forma mais acelerada, é o primeiro peixe geneticamente modificado aprovado pelas agências regulatórias para consumo humano do mundo (LEDFORD, 2015). Em suíños, animais contendo maior proporção de gordura intramuscular também já foram obtidos por transgenia. Nesses animais foram inseridos a sequência do gene *PID1* (FANG et al., 2017), promovendo o acúmulo de gordura intramuscular. Além disso, esses animais podem servir como modelos para estudos acerca da diabetes e metabolismo de lipídios, permitindo o desenvolvimento de tratamentos e fármacos para humanos (MU et al., 2019). Em bovinos, a deleção do gene da miostatina (*GDF8*) causa o fenótipo de musculatura dupla controlando uma característica de grande valor comercial (*i.e.* desenvolvimento da massa muscular). A alteração neste gene, cuja função biológica começa a ser exercida ainda nos períodos embrionário, gera animais adultos com maior número de fibras musculares e maior deposição de músculo na carcaça (GROBET et al., 1997; JEANPLONG et al., 2001).

Biotecnologia e alimentos

A biotecnologia é fundamental na produção de vários alimentos do dia a dia. Substâncias essenciais para a produção de pães, queijos, iogurtes e bolos, por exemplo, são sintetizadas industrialmente com ajuda de bactérias, leveduras, fungos, algas ou até alguns tipos de vírus (ITO, 2018). Cerca de 4500 anos antes de Cristo, através de registros da civilização babilônica, já indicavam a utilização de leveduras na produção de pães e cerveja. Mas a evolução da biotecnologia trouxe outras aplicações, além da produção em si. Com a utilização de microrganismos é possível produzir substâncias para realçar sabor, agregar textura, cor e consistência, e até elevar a quantidade de vitaminas em alimentos (ITO, 2018).

As “fábricas” microbianas estão atraindo cada vez mais o interesse das indústrias de aromas, pois podem fornecer um recurso sustentável alternativo para compostos de sabor e fragrância desejados (SCHRADER et al., 2019).

Em relação aos bioaromas, a riboflavina é produzida industrialmente por processos de fermentação com o fungo *Ashbya gossypii*, e o caldo de cultura emite (após a remoção do micélio contendo riboflavina) um atraente cheiro de nozes, flores e frutas (BIRK et al., 2019).

A vanilina é um dos mais importantes compostos aromáticos aromáticos utilizados em alimentos, bebidas, perfumes e fármacos e é produzida em uma escala de mais de 10 mil toneladas por ano pela indústria por meio de síntese química. Abordagens alternativas baseadas em biotecnologia para a produção são baseadas na bioconversão de lignina, estilbenos fenólicos, isoeugenol, eugenol, ácido ferúlico ou aminoácidos aromáticos, aplicando fungos, bactérias, células vegetais ou microrganismos geneticamente modificados (PRIEFERT et al., 2001). Muitas espécies de bactérias têm a capacidade de descarboxilar ácidos cinâmicos substituídos, como ácido ferúlico, eugenol, isoeugenol e ácido p-cumárico, que são convertidos em produtos químicos aromáticos úteis, como *Bacillus* sp. (SHIMONI et al. 2000), *Pseudomonas* sp. (RABENHORST et al., 1996), *Sphingomonas paucimobilis* (MASAI et al. 2002), entre outras. Também já foi relatado a produção de vanilina por um mecanismo de biotransformação de compostos fenólicos em fungos, *Aspergillus luchuensis* (TAIRA et al., 2018).

Os polímeros sintetizados por bactérias, fungos e leveduras são chamados de biopolímeros microbianos dentre eles, os polissacarídeos hidrocolóides apresentam alto valor comercial devido à sua capacidade de formar soluções viscosas e géis em meio

aquoso, semelhante a outras gomas vegetais tradicionais (KUMAR et al., 2018). Diversos estudos investigaram o efeito de hidrocolóides ou gomas nas propriedades reológicas e na qualidade de biscoitos ou bolos feitos de diferentes farinhas sem glúten, os chamado gluten-free. Turabi et al. (2010) usaram goma xantana, goma guar, goma de alfarroba e k-carragena na formulação de bolos de arroz. Preichardt et al. (2011) avaliaram o papel da goma xantana na qualidade de bolos sem glúten com farinha de arroz e milho para pacientes celíacos. Gularte et al. (2012) estudaram o efeito da incorporação da goma guar com outras fibras nas propriedades da torta de arroz. Benkadri et al. (2018) desenvolveram um biscoito sem glúten para crianças celíacas à base de farinha composta de arroz e grão de bico adicionado de goma xantana. Gautério et al. (2021) desenvolveram mousse de maracujá sem ingredientes de origem animal adicionado de goma xantana.

Além dessas aplicações, destacam-se os “alimentos funcionais” os quais possuem compostos ativos fisiologicamente benéficos para a saúde humana e reduzindo o risco de doenças crônicas. Dentre os compostos funcionais mais conhecidos, probióticos, prebióticos e antioxidantes naturais devem ser dados como exemplos. Essas substâncias podem ser obtidas por métodos biotecnológicos e por extração de tecidos vegetais ou animais (GRAJEK et al., 2005). Há um grande número de probióticos usados em alimentos lácteos fermentados, principalmente em iogurtes (SANDERS, 1998). A maioria das bactérias probióticas pertence aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, que são identificados como seguros (HOLZAPFEL; SCHILLINGER, 2002). Iogurte e produtos lácteos fermentados foram recebidos pela comunidade e pela indústria de alimentos como os melhores transportadores de ingredientes alimentares funcionais, incluindo probióticos, prebióticos e antioxidantes, como polifenóis e carotenóides (O'SULLIVAN et al., 2016). Recentemente, Rahmani et al. (2021) desenvolveram um iogurte probiótico contendo *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium bifidum* enriquecido extrato de chá verde, como antioxidante.

Biotecnologia e meio ambiente

Existe uma preocupação mundial em relação à poluição do solo causada pela contaminação de hidrocarbonetos de petróleo. Uma vez que ocorre um derramamento, ele perturba o ecossistema marinho e de água doce e ameaça seriamente a saúde humana. Geralmente requer tecnologias complexas para removê-lo do solo. Os hidrocarbonetos de petróleo contêm uma variedade de produtos químicos que são extremamente tóxicos e

cancerígenos por natureza. A biorremediação é uma solução sustentável para a degradação de hidrocarbonetos de petróleo, é assistida por bactérias, fungos ou/e algas. Os métodos de aplicação mais recentes de biorremediação de hidrocarbonetos de petróleo (*in situ* e *ex situ*) também são relatados (NAEEM et al., 2020).

A presença dos metais pesados, arsênio (As), cádmio (Cd), cromo (Cr) (VI), mercúrio (Hg) e chumbo (Pb), no meio ambiente também têm causado grande preocupação à saúde pública, pois relata-se um aumento significativo de acumulação devido ao aumento do seu uso industrial. O acúmulo de metais pesados gera estresse oxidativo no organismo causando efeitos fatais em importantes processos biológicos que levam à morte celular (RAHMAN; SINGH, 2019). Rahman e Singh (2020) forneceram informações atualizadas sobre diferentes processos microbianos (biorremediação) para a remoção de metais pesados, dentre eles, a oxidação-redução, biomíneralização, bioprecipitação, biolixiviação, tecnologia de biossurfactante, biovolatilização, biossorção, bioacumulação e fitorremediação micrório-assistida.

Inseridos no atual contexto de preservação do meio ambiente, plásticos biodegradáveis têm sido amplamente estudados a fim de substituir parcialmente os plásticos sintéticos não biodegradáveis (ALVES et al., 2017). Os polihidroxialcanoatos (PHAs) são biopolímeros biodegradáveis que podem ser produzidos por inúmeros microrganismos para armazenamento de energia e carbono e podem ser sintetizados a partir de matérias-primas renováveis (ANDERSON; DAWES, 1990). Dentre os PHAs, o poli(3-hidroxibutirato) [P(3HB)] e seu poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) [P(3HBco-3HV)] copolímero são os mais estudados; sua biodegradabilidade, biocompatibilidade e algumas propriedades termoplásticas e mecânicas permitem a aplicação desses compostos como substitutos de plásticos petroquímicos (KHANNA; SRIVASTAVA, 2005). Mais de 300 microrganismos capazes de sintetizar PHAs foram listados na literatura; no entanto, apenas um pequeno número é usado atualmente no desenvolvimento de PHAs, incluindo *Ralstonia* sp., *Azotobacter vinelandii*, *Alcaligenes latus*, *Cupriavidus necator*, *Escherichia coli* recombinante, *Alcaligenes eutrophus* e *Pseudomonas* sp. (ALVES et al., 2017).

Biotecnologia e saúde

O mercado farmacêutico conta hoje com cerca de 160 antibióticos que são derivados semissintéticos de produtos naturais bacterianos ou fúngicos. Uma parcela

importante (cerca de dois terços dos ~ 6.000) dos antibióticos conhecidos hoje foram isolados de espécies de actinomicetos, como *Streptomyces hygroscopicus* (SCHÜRRLE, 2020). A penicilina, descoberta de por Alexander Fleming em 1927, que é uma droga, produzida por fungos do gênero *Penicillium* representou um avanço marcante na terapêutica, dando início a era de antibióticos altamente eficazes produzidos por biotecnologia industrial (SCHÜRRLE, 2020).

A produção biotecnológica de Ácido 6-aminopenicilânico (6-APA), a unidade molecular principal das penicilinas, na década de 1960 marcou o início da produção de novos análogos semissintéticos de penicilina com propriedades aprimoradas. Nesse contexto, em 1945, Giuseppe Brotzu (1895-1976) descobriu cefalosporina C, um antibiótico beta-lactâmico de *Acremonium chrysogenum*, dando início à produção biotecnológica de uma nova classe de antibióticos tendo o ácido 7-aminocefalosporânico (7-ACA) como unidade central. O 7-ACA apresentou maior estabilidade do que as penicilinas a condições ácidas e na presença de beta-lactamases (enzimas bacterianas que degradam a penicilina) (SCHÜRRLE, 2020).

Nos dias atuais, além dos antibióticos, é possível citar outros fármacos de origem biotecnológica como as estatinas microbianas (como compactina, lovastatina, pravastatina), certos imunossupressores (por exemplo, ciclosporina A, rapamicina), micotoxinas, inseticidas, herbicidas, antiparasitários e alguns antineoplásicos (SCHÜRRLE, 2020).

Apesar da somatostatina ter sido a primeira molécula de genes humanos produzida pela tecnologia do DNA recombinante em *E. coli*, foi a produção da insulina que marcou esse ramo de proteínas recombinantes. Em setembro 1978, aconteceu a clonagem e expressão dos genes sintéticos para a cadeia A (77 pb) e cadeia B (104 pb) da insulina humana e em 1982, a insulina se tornou o primeiro fármaco recombinante aprovado para uso clínico (RASMUSSEN, 2014).

As vacinas têm papel fundamental para prevenir doenças e desde sua aplicação, por Jenner, até a atualidade representaram um marco biotecnológico na saúde mundial. Pasteur aprimorou o desenvolvimento das vacinas através de processos como a atenuação e inativação de microrganismos para compor vacinas. As tecnologias mais atuais contam com a purificação de microrganismos, engenharia genética e aprofundamento do conhecimento acerca do sistema imunológico (PLOTKIN, 2005).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A Biotecnologia é uma área da ciência que se desenvolve juntamente com a humanidade e está presente nos variados âmbitos da sociedade. A Biotecnologia participa direta e indiretamente no desenvolvimento da sociedade, pois tem reflexos para: a saúde das populações, produção de alimentos e qualidade do meio ambiente.

REFERÊNCIAS

- ALVES, M. I.; MACAGNAN, K. L.; RODRIGUES, A. A.; DE ASSIS, D. A.; TORRES, M. M.; de OLIVEIRA, P. D.; MOREIRA, A. da S. Poly(3-hydroxybutyrate)-P(3HB): Review of Production Process Technology. *Industrial Biotechnology*, v. 13, n. 4, p. 192–208, 2017.
- ANDERSON, A.J.; DAWES E.A. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiology Review*, v. 54, p. 450–472, 1990.
- ANDERSON; J. A.; ELLSWORTH, P. C.; FARIA, J. C.; HEAD, G. P.; OWEN, M. D. K.; PILCHER, C. D.; SHELTON, A. M.; MEISSLE, M. Genetically Engineered Crops: Importance of Diversified Integrated Pest Management for Agricultural Sustainability. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, v. 7, p. 24, 2019.
- BENKADRI, S., SALVADOR, A., ZIDOUNE, M. N., SANZ, T. Gluten-free biscuits based on composite rice-chickpea flour and xanthan gum. *Food Science and Technology International*, v. 24, n. 7, p. 607-616, 2018.
- BIRK, F.; FRAATZ, M. A.; ESCH, P.; HEILES, S.; PELZER, R.; ZORN, H. Industrial riboflavin fermentation broths represent a diverse source of natural saturated and unsaturated lactones. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 67, n. 49, p. 13460–13469, 2019.
- COSTA, R. F.; da SILVA, A. G.; SIMON, G. A.; BESSA, O. R.; DIAS, M. O. Agronomic performance of transgenic soybean cultivars in Brazilian Cerrado. *Acta Scientiarum. Agronomy*, v. 41, e42713, 2019.
- COUTINHO, L. L.; ROSÁRIO, M. F. DO; JORGE, E. C. Biotecnologia animal. Estudos Avançados, v. 24, p. 123–147, 2010.
- EICHHOLTZ, F (1960) Silage und ähnliche Gärerzeugnisse. Die Wissenschaft, vol 96. 2nd edn. Springer Fachmedien, Wiesbaden
- FALEIRO, F. G.; ANDRADE, S. R. M. *Biotecnologia: estado da arte e aplicações na agropecuária*. Planaltina, DF:Embrapa Cerrados, 2011.
- FANG, G. F.; CHEN, W.; WANG, S. D.; WANG, Y. D.; LI, C. H.; ZHU, H. L.; WANG, H.; ZENG, Y. Q. Generation of transgenic pigs overexpressing PID1 genemediated by magnetic nanoparticles and sperm. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*, v. 12, n. 3, p. 161–168, 2017.

GALLAGE, N. J.; MOLLER, B. L. Baunilha: o sabor mais popular. *Biotecnologia de produtos naturais*, p. 3-24, 2017.

GAUR, N.; FLORA, G.; YADAV, M.; TIWARI, A. A review with recent advancements on bioremediation-based abolition of heavy metals. *Environmental Science: Processes & Impacts*, v. 16, n. 2, p. 180-193, 2014.

GAUTÉRIO, F. G. A.; ALVES, M. I.; LAUFFER, M. L.; MACAGNAN, K. L.; VENDRUSCOLO, C. T.; MOREIRA, A. da S. *Desenvolvimento de mousse de maracujá sem ingredientes de origem animal*. Tecnologia de Frutas e Hortaliças: desenvolvimento de produtos, análise e conservação. 1ed. Canoas/RS: Mérida Publishers, v. 1, p. 19-33, 2021.

GRAJEK, W.; OLEJNIK, A.; SIP, A. Probiotics, prebiotics and antioxidants as functional foods. *Acta Biochimica Polonica*, v. 52, n. 3, p. 665-671, 2005.

GROBET, L.; MARTIN, L. J.; PONCELET, D.; PIROTTIN, D.; BROUWERS, B.; RIQUET, J.; SCHOEBERLEIN, A.; DUNNER, S.; MÉNISSIER, F.; MASSABANDA, J.; FRIES, R.; HANSET, R.; GEORGES, M. A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-muscled phenotype in cattle. *Nature Genetics*, v. 17, n. 1, p. 71–74, 1997.

GULARTE, M. A.; DE LA HERA, E.; GÓMEZ, M.; ROSELL, C. M. Effect of different fibers on batter and gluten-free layer cake properties. *Food Science and Technology*, v. 48, p. 209–214, 2012.

HEDDEN, P. The genes of the Green Revolution. *Trends in genetics: TIG*, v. 19, n. 1, p. 5–9, 2003.

HERDT, R. W. Biotechnology in Agriculture. *Annual Review of Environment and Resources*, v. 31, n. 1, p. 265–295, 2006.

HITZ, W. D. et al. Reducing polyunsaturation in oils of transgenic canola and soybean. In: KADER, J.-C.; MAZLIAK, P. (Eds.). *Plant lipid metabolism*. Dordrecht: Springer Netherlands, p. 506–508, 1995.

HOLZAPFEL, W. H.; SCHILLINGER, U. Introduction to pre- and probiotics. *Food Research International*, v. 35, p. 109–116, 2002.

ITO, A.G.T.P. *Biotecnologia e produção de alimentos*. Londrina: Editora e Distribuidora Educacional S.A., 192 p., 2018.

JEANPLONG, F.; SHARMA, M.; SOMERS, W. G.; BASS, J. J., KAMBADUR, R. Genomic organization and neonatal expression of the bovine myostatin gene. *Molecular and Cellular Biochemistry*, v. 220, n. 1-2, p. 31–37, 2001.

KHANNA S., SRIVASTAVA, A. K. Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. *Process Biochemistry*, v. 40, n. 2, p. 607–619, 2005.

KUMAR, A.; RAO, K. M.; HAN, S. S. Application of xanthan gum as polysaccharide in tissue engineering: a review. *Carbohydrate Polymers*, v. 180, p. 128–144, 2018.

LEDFORD, H. Salmon is first transgenic animal to win US approval for food. *Nature*, 2015.

LU, Y.; WU, K.; JIANG, Y.; XIA, B.; LI, P.; FENG, H.; WYCKHUYSEN, K. A.; GUO, Y. Mirid bug outbreaks in multiple crops correlated with wide-scale adoption of Bt cotton in China. *Science*, v. 328, n. 5982, p. 1151–1154, 2010.

MASAI, E.; HARADA, K.; PENG, X.; KITAYAMA, H.; KATAYAMA, Y.; FUKUDA, M. Cloning and characterization of the ferulic acid catabolic genes of *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 68, p. 4416–4424, 2002.

MU, Q.; ZHU, J.; SI, Y.; CHEN, X.; DUAN, G.; SUN, S.; FANG, G.; ZENG, Y.; YANG N. Overexpression of PID1 reduces high density lipoprotein level and functionality in swine. *IUBMB Life*, v. 71, n. 12, p. 1946–1951, 2019.

NAEEM, U.; QAZI, M. A. Leading edges in bioremediation technologies for removal of petroleum hydrocarbons. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 27, n. 22, p. 27370-27382, 2020.

O'SULLIVAN, A. M.; O'GRADY, M. N.; O'CALLAGHAN, Y. C.; SMYTH, T. J.; O'BRIENA, N. M.; KERRY, J. P. Seaweed extracts as potential functional ingredients in yogurt. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, v. 37, p. 293–299, 2016.

PINGALI, P. L. Green Revolution: Impacts, limits, and the path ahead. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 109, n. 31, p. 12302–12308, 2012.

PLOTKIN SA. Vaccines: past, present and future. *Nat Med*. 2005 Apr;11(4 Suppl):S5-11. doi: 10.1038/nm1209. PMID: 15812490; PMCID: PMC7095920.

PREICHARDT, L. D.; VENDRUSCOLO, C. T.; GULARTE, M. A.; MOREIRA, A. S. The role of xanthan gum in the quality of gluten free cakes: improved bakery products for coeliac patients. *International Journal of Food Science & Technology*, v. 46, p. 2591-2597, 2011.

PRIEFERT, H.; RABENHORST, J.; STEINBÜCHEL, A. Biotechnological production of vanillin. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 56, p. 296–314, 2001.

RABENHORST, J. Production of methoxyphenol-type natural aroma chemicals by biotransformation of eugenol with a new *Pseudomonas* sp. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 46, p. 470–474, 1996.

RAHMAN, Z.; SINGH, V. P. The relative impact of toxic heavy metals (THMs) (arsenic (As), cadmium (Cd), chromium (Cr)(VI), mercury (Hg), and lead (Pb)) on the total environment: an overview. *Environmental Monitoring and Assessment*, v. 191, n. 7, p. 419, 2019.

RAHMAN, Z.; SINGH, V. P. Bioremediation of toxic heavy metals (THMs) contaminated sites: concepts, applications and challenges. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 27, n. 22, p. 27563-27581, 2020.

RAHMANI, F.; GANDOMI, H.; NOORI, N.; FARAKI, A.; FARZANEH, M. Microbial, physiochemical and functional properties of probiotic yogurt containing *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* enriched by green tea aqueous extract. *Food Science & Nutrition*, v. 9, n. 10, p. 5536-5545, 2021.

RASMUSSEN N (2014) Gene jockeys: life science and the rise of biotech enterprise. Johns

Hopkins University Press, Baltimore.

SANDERS, M. E. Overview of functional foods: Emphasis on probiotic bacteria. *International Dairy Journal*, v. 8, p. 341–347, 1998.

SCHÜRRLE, K. History, current state, and emerging applications of industrial biotechnology. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, v. 173, p. 13-51, 2020.

SCHÜTTE, G.; ECKERSTORFER, M.; RASTELLI, V.; REICHENBECHER, W.; RESTREPO-VASSALLI, S.; RUOHONEN-LEHTO, M.; SAUCY, A. N. W.; MERTENS, M. Herbicide resistance and biodiversity: agronomic and environmental aspects of genetically modified herbicide-resistant plants. *Environmental Sciences Europe*, v. 29, n. 1, p. 5, 2017.

SHIMONI, E.; RAVID, U.; SHOHAM, Y. Isolation of a *Bacillus* sp. capable of transforming isoeugenol to vanillin. *Journal of Biotechnology*, v. 78, p. 1–9, 2000.

SILVA, E. P. da. A short history of evolutionary theory. *História, Ciências, Saúde-Manguinhos*, v. 8, p. 671–987, 2001.

SIMKIN, A. J. Carotenoids and apocarotenoids in planta: their role in plant development, contribution to the flavour and aroma of fruits and flowers, and their nutraceutical benefits. *Plants*, v. 10, n. 11, p. 2321, 2021.

TAIRA, J.; TOYOSHIMA, R.; AMEKU, N.; IGUCHI, A.; TAMAKI, Y. Vanillin production by biotransformation of phenolic compounds in fungus, *Aspergillus luchuensis*. *AMB Express*, v. 8, n. 1, p. 40, 2018.

TURABI, E.; SUMNU, G.; SAHIN, S. Quantitative analysis of macro and micro-structure of gluten-free rice cakes containing different types of gums baked in different ovens. *Food Hydrocolloids*, v. 24, p. 755–762, 2010.

SOBRE OS AUTORES

Estela Fernandes e Silva - Mestrado, doutorado e pós-doutorado em Ciências Fisiológicas pela Universidade Federal do Rio Grande (FURG). Bacharelado em Biotecnologia (UFPel), licenciatura em Biologia (UNIFRAN). Atualmente, atua como professora de Ciências dos anos finais nas cidades de Pelotas e Rio Grande e realiza curso de especialização em ensino de Ciências.

Karine Laste Macagnan - Doutora e Mestre em Ciências pela Universidade Federal de Pelotas (UFPel). Graduada em Biotecnologia pela UFPel e Formação Pedagógica em Biologia pela Universidade de Franca (UNIFRAN). Professora de Ciências dos anos finais na Prefeitura Municipal de Rio Grande.

Tainã Figueiredo Cardoso - Doutora em Produção Animal pela Universitat Autonoma de Barcelona. Mestre em Ciências Fisiológicas: Fisiologia Animal Comparada pela Universidade Federal do Rio Grande (FURG). Bacharel em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas (UFPel).

CAPÍTULO 2

BIOTECNOLOGIA NA PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO

Juliana Silva Lemões

Lucas Silva Lemões

Luize Silva Mascarenhas

RESUMO

A busca por fontes de energia alternativas é de extrema importância, tendo em vista as incertezas em relação à crescente demanda energética mundial. Dessa forma, os biocombustíveis ganham espaço mundialmente no setor de combustíveis, uma vez que são uma fonte renovável e segura. O etanol de segunda geração (E2G) é um biocombustível sustentável, produzido a partir de resíduos de biomassa, apresenta grandes vantagens do ponto de vista ambiental como a diminuição de gases do efeito estufa e a dependência de derivados de petróleo. No entanto, o processo de produção de E2G apresenta gargalos como elevado custo de enzimas para hidrólise de polissacarídeos e baixa eficiência na fermentação de pentoses. Nesse contexto, a utilização de ferramentas biotecnológicas visa solucionar os desafios encontrados nesse processo, através do desenvolvimento de genótipos e variedades vegetais com características desejáveis a produção de E2G, identificação e obtenção de novas enzimas e microrganismos. Este trabalho apresenta uma revisão de literatura que abrange as etapas do processo de produção, enzimas, microrganismos e avanços biotecnológicos acerca do tema.

Palavras-chave: Biocombustíveis. Biomassa lignocelulósica. Fermentação.

INTRODUÇÃO

Os principais desafios encontrados na atualidade são problemas associados ao aquecimento global, dependência de combustíveis fósseis, segurança alimentar e energética. A crescente demanda de energia da sociedade moderna tem sido atendida principalmente pela utilização de combustíveis fósseis, como gás natural, carvão, petróleo e seus derivados, como gasolina e diesel. No entanto, o uso dessas fontes de energia tem causado preocupações com os impactos ambientais gerados, como poluição do ar, da água e do solo, além da mobilização de toneladas de carbono do subsolo para a atmosfera, sendo este um dos principais fatores que levam ao aquecimento global (FIVGA et al. 2019; HEMANSI et al. 2019).

Em decorrência destes aspectos, vários países têm aumentado o interesse no desenvolvimento de novas tecnologias e na valorização de fontes de energia mais sustentáveis, visando a substituição dos combustíveis fósseis. Nesse contexto, os biocombustíveis surgem como uma alternativa, utilizando como matéria-prima a biomassa vegetal para a produção de combustíveis como etanol e biodiesel (FIVGA et al. 2019).

O Brasil destaca-se neste cenário por apresentar grande participação de fontes renováveis na matriz energética, com usinas de bioenergia bem consolidadas e em constante expansão, utilizando principalmente resíduos de culturas como cana-de-açúcar e milho. A matriz energética brasileira apresenta posição singular e grande destaque em relação à proporção de fontes renováveis quando comparada aos países da OCDE - Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico-, bem como a nível mundial. No ano de 2018, 45,3% da matriz energética foi formada por fontes renováveis, sendo que etanol e bagaço de cana-de-açúcar representam 38,4% das fontes renováveis que compõe a matriz energética brasileira (MME, 2019; VIDAL, 2019; LOSEKANN; TAVARES; 2021).

O etanol é um dos principais biocombustíveis líquidos produzidos no Brasil, sendo a principal matéria-prima para a produção o caldo de cana-de-açúcar, rico em sacarose (ZABED et al., 2017; CONAB, 2021). Porém, para elevar rendimentos e a produtividade global do processo de produção de etanol é necessário o desenvolvimento e adequação de processos utilizando matérias primas alternativas à cana-de-açúcar. Neste contexto, o etanol de segunda geração (E2G) utiliza biomassa lignocelulósica como fonte de açúcares para a fermentação o que possibilita o aumento do volume de etanol produzido sem necessidade de aumento de área plantada, apenas com o aproveitamento de resíduos agrícolas e agroindustriais (ZABED et al., 2017).

Este trabalho apresenta uma revisão de literatura que abrange as etapas do processo de produção, enzimas, microrganismos e avanços biotecnológicos acerca do tema.

REFERENCIAL TEÓRICO

Biocombustíveis no Brasil

O Brasil é um dos principais produtores mundiais de biocombustível, sendo o segundo maior produtor de etanol do mundo (BRINKMAN et al., 2018). Os principais biocombustíveis líquidos produzidos no país são o etanol e o biodiesel (ANP, 2021).

O biodiesel é um biocombustível produzido pela conversão química de óleos e gorduras em ésteres alquílicos de ácidos graxos, e misturado ao diesel para a comercialização e uso em veículos ciclo diesel (ANP, 2021). Enquanto, o etanol é produzido através do processo de fermentação de diferentes matérias-primas, como as sacarídeas (caldo de cana-de-açúcar e beterraba), as amiláceas (amido de milho, arroz, batata, entre outros) e lignocelulósicas (plantas e resíduos lignocelulósicos) (ANP, 2021; PATEL; SHAH, 2021).

Na safra 2020/21 a produção brasileira de etanol foi de 32,8 bilhões de litros (CONAB, 2021). No país, a principal matéria-prima para a produção do etanol é o caldo de cana-de-açúcar, sendo a cultura responsável por 90% da produção nacional (ZABED et al., 2017; CONAB, 2021).

Outras biomassas como o milho, principal matéria-prima para a produção de etanol nos Estados Unidos, também estão sendo utilizadas no Brasil, tendo esta matéria-prima, um crescimento de 80% na safra 2020/2021 em relação à safra anterior (CONAB, 2021).

Biomassa lignocelulósica

A principal fonte de carbono na Terra são as biomassas lignocelulósicas, que compreendem os resíduos agrícolas e agroindustriais, culturas energéticas, resíduos de celulose e biomassa lenhosa. Os principais componentes da biomassa lignocelulósica são os polímeros celulose, hemicelulose e a lignina (HEMANSI et al., 2019).

A celulose é um polímero linear formado por moléculas de glicose unidas por ligações β -1,4 glicosídicas, sendo que a unidade repetitiva do polímero é a celobiose. A hemicelulose é um polímero ramificado formada por diferentes açúcares de cinco carbonos (xilose e arabinose), e seis carbonos (glicose, galactose e manose) e por diferentes ácidos hexaurânicos (ácido glucurônico, 4-O-metil glucurônico e ácido galactourônico) e deoxiexoses (ramanose e fucose) (ZABED et al., 2017).

A lignina é uma macromolécula de estrutura tridimensional complexa e altamente ramificada baseada em precursores monoméricos p-hidroxibenzoil (H), guaiacila (G) e siringila (S). As frações de hemicelulose e lignina têm composição química variável em função da espécie vegetal e estágio de desenvolvimento da planta (ZABED et al., 2017).

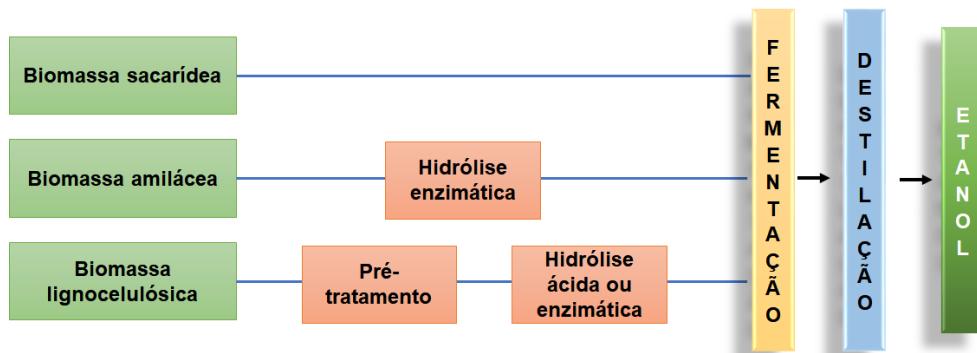
As biomassas lignocelulósicas são compostas também, em menores proporções, por alcalóides, terpenos, pectinas, carboidratos, saponinas, polifenóis, gomas, resinas, entre outros.

Processos de produção de etanol

Os biocombustíveis podem ser classificados em gerações de acordo com o tipo de matéria-prima e tecnologia utilizada para a produção. No processo de produção de etanol de primeira geração utilizam-se matérias-primas, como açúcares e amido, também utilizadas para a alimentação e processos produtivos tradicionais. Já o etanol de segunda geração é produzido através de novas tecnologias utilizando matérias-primas alternativas como resíduos lignocelulósicos (TEIXEIRA et al., 2016).

A principal diferença no processo de produção de etanol de segunda geração é a etapa de pré-tratamento que tem por objetivo desconstruir a estrutura da biomassa lignocelulósica para o aproveitamento das frações de celulose e hemicelulose. Após o pré-tratamento, a biomassa é submetida à hidrólise para liberação dos açúcares. A hidrólise da biomassa pode ser catalisada por ácidos ou enzimas, sendo que a hidrólise enzimática apresenta maiores rendimentos de açúcares liberados e menor formação de produtos de degradação (PATEL; SHAH, 2021). A Figura 1 apresenta as principais etapas dos processos de produção de etanol de primeira (biomassa sacarídea e amilácea) e segunda geração (biomassa lignocelulósica).

Figura 1 - Principais etapas do processo de produção de etanol de primeira geração (biomassa sacarídea ou amilácea) e segunda geração (biomassa lignocelulósica)



Fonte: Delgado et al. 2017, modificado.

Pré-tratamento

O pré-tratamento da biomassa lignocelulósica visa à quebra de ligações das moléculas que compõem a biomassa, redução da cristalinidade da celulose e adequação

às condições de reação para transformação bioquímica dos açúcares em etanol (EDEH, 2020).

Os pré-tratamentos são classificados em físicos, químicos, físico-químicos e biológicos. O tipo de pré-tratamento utilizado deve ser avaliado com o objetivo de obter maiores rendimento de açúcares e menores concentrações de produtos de degradação (EDEH, 2020).

Os pré-tratamentos físicos são os que utilizam temperatura, pressão, radiação, congelamento e/ou moagem da biomassa. Já os pré-tratamentos químicos utilizam ácidos, bases, solventes orgânicos e líquidos iônicos com o objetivo de separar as frações da biomassa. O pré-tratamento químico mais utilizado consiste no uso de ácido sulfúrico com o objetivo de solubilizar a fração de hemicelulose da biomassa. A principal desvantagem da utilização de ácidos para o pré-tratamento da biomassa é a formação de produtos de degradação como 5-hidroximetilfurfural e furfural que são prejudiciais à ação de microrganismos utilizados no processo fermentativo (ZABED et al. 2017; PATEL e SHAH, 2021).

Outro pré-tratamento químico utilizado é o alcalino, que é capaz de remover grande parte da lignina presente na biomassa pela dissolução da lignina e quebra das ligações éster intermoleculares alterando o grau de polimerização e as propriedades físicas da biomassa. O pré-tratamento para a remoção de lignina possibilita o aumento da eficiência da hidrólise enzimática dos carboidratos presentes na biomassa (EDEH, 2020; ZABED et al., 2017).

Solventes orgânicos como etanol, acetona, metanol, etilenoglicol, glicerol e água, com ou sem o uso de catalisadores, e os líquidos iônicos podem ser empregados no pré-tratamento da biomassa, porém os custos é fator limitante para aplicações em maiores escalas (JEDRZEJCZYK et al. 2019).

Os principais pré-tratamentos físico-químicos, também para a desconstrução da biomassa lignocelulósica, são a explosão a vapor, a explosão com dióxido de carbono e a explosão da fibra com amônia (AFEX - Ammonia fiber explosion) (ZABED et al., 2017).

Pré-tratamentos biológicos utilizam microrganismos (fungos e bactérias) para a degradação da lignina e são eficientes e ecologicamente corretos, porém apresentam a desvantagem de consumo de carboidratos pelos microrganismos e longos tempos de processo (ZABED et al. 2017).

A principal diferença no processo de etanol de segunda geração em relação ao processo de primeira geração é a etapa de pré-tratamento da biomassa lignocelulósica,

fundamental para a viabilidade técnica e econômica do processo de produção de etanol 2G (ZABED et al. 2017; EDEH, 2020).

Hidrólise Enzimática

A hidrólise enzimática tem o objetivo de tornar os açúcares presentes nas estruturas de celulose e hemicelulose disponíveis para a fermentação. A hidrólise enzimática da celulose ocorre pela ação das celulases que são compostas por diferentes enzimas pertencente às classes: Endoglucanases (EG, endo-1,4- β -D-glucanases, EC 3.2.1.4) - atacam regiões amorfas da cadeia polimérica gerando novos terminais facilitando a desconstrução da biomassa pela diminuição do grau de polimerização; Exoglucanases (CBH, celobiohidralase, 1,4- β -D-glucan, EC 3.2.1.91) - atuam nas extremidades redutoras e não redutoras da cadeia de celulose liberando celobiose e as β -glucosidases (EC 3.2.1.21) que catalisam a hidrólise de celobiose produzindo glicose (PATEL; SHAH, 2021).

A desconstrução da biomassa pelas diferentes classes de celulases ocorre de forma sinérgica o que aumenta a eficiência do processo. As expansinas e soleninas são proteínas que também auxiliam na desconstrução da estrutura lignocelulósica pelo afrouxamento da parede celular e rompimento das ligações de hidrogênio entre as microfibrilas de celulose e ligações entre a celulose e outros polissacarídeos (TEIXEIRA et al. 2016).

No processo de produção de etanol de segunda geração as etapas de hidrólise enzimática e fermentação podem ser realizadas de forma sequencial ou simultânea.

Fermentação

A transformação de açúcares em etanol é realizada por microrganismos através do processo de fermentação tanto nos processos de primeira quanto de segunda geração (FIVGA et al., 2019).

A principal diferença entre os processos é que nos processos de primeira geração os açúcares obtidos das matérias-primas sacarídeas ou amiláceas são a glicose e, em menores quantidades, a frutose, moléculas de açúcares com 6 carbonos. No processo de segunda geração, além da glicose proveniente da hidrólise da celulose, também estão disponíveis para a fermentação outros açúcares, incluindo moléculas de açúcares com 5 carbonos, como a xilose (FIVGA et al., 2019).

O principal microrganismo utilizado industrialmente em processos de fermentação da glicose é a *Saccharomyces cerevesiae*, porém a xilose obtida da fração de hemicelulose, não pode ser fermentada por esta levedura. Isto torna o emprego de outros microrganismos capazes de fermentar pentoses indispensáveis para a viabilidade do processo de produção de E2G (ZABED et al., 2017).

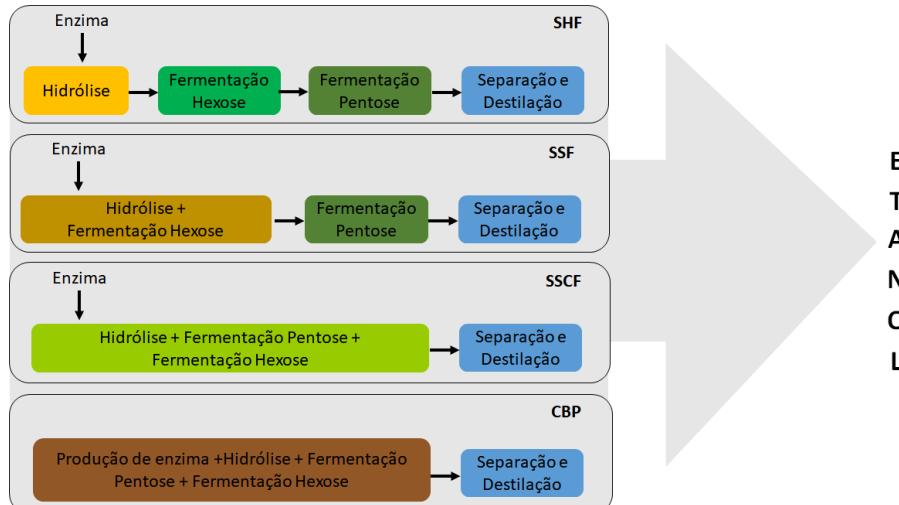
Diferentes estratégias de fermentação podem ser empregadas para a produção de etanol a partir da biomassa lignocelulósica como a hidrólise separada da fermentação (SHF), a sacarificação e fermentação simultâneas (SSF), a sacarificação e co-fermentação simultânea (SSCF) e o bioprocesso consolidado (CBP) (PATEL e SHAH, 2021).

Na sacarificação e co-fermentação simultânea (SSCF) a hidrólise enzimática e a fermentação são conduzidas em um mesmo reator com a adição de enzimas e microrganismos para a fermentação de pentoses e hexoses (EDEH, 2020).

No bioprocesso consolidado (CBP) a produção de celulases e de etanol ocorre em uma etapa única através de microrganismos, o que possibilita a redução de custos do processo (EDEH, 2020). A Figura 2 apresenta as etapas das principais estratégias de fermentação empregadas para a produção de etanol de segunda geração.

Cada estratégia de fermentação apresenta vantagens e desvantagens em relação ao processo como no SHF as temperaturas de hidrólise e fermentação podem ser otimizadas em cada etapa, no processo SSF maiores produtividades de etanol são alcançadas já que o rendimento de hidrólise não é limitado pela formação de glicose no meio reacional (PATEL; SHAH, 2021).

Figura 2 - Principais estratégias de fermentação para produção de etanol de segunda geração



Fonte: Cheng et al. 2019, modificado.

Biotecnologia na produção de etanol

A biotecnologia moderna é uma ferramenta estratégica que pode ser utilizada em diversos processos, bem como na obtenção de diferentes produtos. No que refere-se à biotecnologia direcionada a biomassa vegetal, destacam-se o melhoramento genético vegetal e a utilização de microrganismos nos processos de obtenção de biocombustíveis (CAMELO et al., 2019).

Na produção de E2G, a biotecnologia tem papel fundamental no desenvolvimento de culturas para fins energéticos com elevada produção de biomassa, bem como o desenvolvimento de genótipos com maiores teores de fibras e menor teor de lignina.

Em relação ao processo de produção de E2G, as ferramentas biotecnológicas são empregadas com o objetivo de obter maiores rendimentos na hidrólise enzimática pelo desenvolvimento de enzimas para desconstrução da biomassa lignocelulósica e maiores rendimentos de fermentação de pentoses e hexoses através do desenvolvimento de microrganismos mais eficientes (EMBRAPA, 2020; GUIDUCCI et al., 2020; MUSSATTO et al., 2021).

MATERIAIS E MÉTODOS

Foi realizada uma pesquisa bibliográfica de natureza qualitativa. Esta pesquisa bibliográfica baseou-se em materiais já publicados como: livros, publicações em periódicos e artigos científicos, entre outros disponíveis na internet. As buscas não foram limitadas por língua ou data de publicação. A última busca foi realizada em outubro de 2021.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Segundo Sarris e Papanikolaou (2016), pesquisas na produção de etanol estão sendo conduzidas com objetivo de alcançar maiores concentrações e produtividades volumétricas de etanol a partir da descoberta ou desenvolvimento de microrganismos, bem como a otimização e modelagem de novas estratégias de fermentação.

Em um cenário onde a produção industrial visa o aproveitamento máximo da estrutura das plantas, a desconstrução da parede celular vegetal de forma eficiente é um dos maiores desafios para as biorrefinarias (TEIXEIRA et al., 2016). No setor de

biocombustíveis, a utilização de enzimas é uma ferramenta estratégica importante empregada no processo de produção de E2G, onde faz-se necessário o uso de coquetéis enzimáticos para desestruturação da biomassa vegetal (ARAUJO et al., 2020). A engenharia metabólica e a biologia evolutiva têm sido aplicadas como estratégia para a intensificação de processos através do melhoramento de microrganismos visando cepas com maiores taxas de conversão de açúcares em diferentes produtos, incluindo etanol (MUSSATTO et al., 2021).

Arruda et al. (2021) produziram complexos enzimáticos usando fungos celulolíticos (*Aspergillus ochraceus*, *Fusarium sp.*, *Monilia sitophila*, *Mucor racemosus Fresenius*, *Penicillium oxalicum*, *Trichoderma asperellum*, *Trichoderma harzianum* e *Trichoderma reesei*) a partir de diferentes biomassas lignocelulósicas por fermentação em estado sólido. Cepas de *Trichoderma reesei* e *Penicillium oxalicum* foram as que apresentaram as melhores atividades enzimáticas.

Segundo Florencio et al. (2017), as linhagens *Trichoderma reesei* e *Aspergillus niger* de fungos filamentosos se destacam como microrganismos na produção de enzimas celulolíticas para a degradação de biomassa vegetal, sendo que industrialmente *T. reesei* tem sido utilizado na produção de coquetéis enzimáticos. *A. niger* pode produzir diversas enzimas para a degradação de outros polissacarídeos além da celulose.

No Brasil, a Embrapa Agroenergia e o Centro de Tecnologia Canavieira (CTC) desenvolveram coquetel enzimático CMX a partir de três microrganismos diferentes, com alto desempenho na desestruturação da biomassa. O coquetel é composto por mistura de enzimas dos tipos endoglicanases, exoglicanases, betaglicosidases, monooxigenaseslíticas de polissacarídeos (LPMOs) e xilanases (EMBRAPA, 2020).

A partir da hidrólise da biomassa lignocelulósica pré-tratada estão disponíveis diferentes tipos de açúcares para fermentação, incluindo pentoses como a xilose, obtida da fração de hemicelulose. O desenvolvimento de microrganismos capazes de consumir pentoses é fundamental para a viabilidade do processo E2G. Neste sentido, cepas de *S. cerevisiae* e *Zymomonas mobilis* estão sendo modificadas para esta finalidade (MUSSATTO et al., 2021).

Além dos já citados, diferentes microrganismos têm sido testados na produção de etanol para a fermentação de pentoses e hexoses. Hemansi et al. (2019) apresenta diferentes trabalhos que utilizaram as bactérias *Klebsiella oxytoca*, *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus pentoaceticus*, *Lactobacillus plantarum*,

Lactobacillus xylosus e os fungos e leveduras *Neurospora crassa*, *Pachysolen tannophilus*, *Paecilomyces sp NF1*, *Pichia stipitis* e *Rhizopus orizae* para a fermentação de pentoses. O mesmo autor lista os microorganismos *Fusarium sporium*, *Rhizomucor pusillus*, *Kloeckera apiculata*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyeromyces marxianus*, *S. bayanus*, *Mucor indicus*, *S. paradoxus*, *Pachysolen tannophilus*, *S. pastorianus*, *Pichia stipitis*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Pichia membranifaciens*, *Terulospora delbrueckii*, *Rhizopus oryzae* e *Zymomonas mobilis* para a fermentação de hexoses.

A Tabela 1 apresenta dados de condições operacionais e os respectivos rendimentos de etanol para diferentes microrganismos que foram compilados por Edeh (2020).

Tabela 1- Rendimentos de etanol obtidos a partir de diferentes microrganismos.

	Microrganismo	Temperatura (°C)	pH	Tempo de fermentação (h)	Rendimento etanol (g/L)
Levedura	<i>Saccharomyces Cerevisiae</i> 3013	30	5,5	65	130,12
	<i>Saccharomyces Cerevisiae</i> BY4742	35	5,0	96	39
Bactéria	<i>Zymomonas Mobilis</i> NRRL 806	30	6,5	18	30,4
	<i>Zymomonas Mobilis</i> ZMA7-2	30	4,0	44	99,78
Fungo	<i>Aspergillus oryzae</i> 694	30 (aeróbica)	5,0	24	
		30 (anaeróbica)	5,0	144	24,4
	<i>Rhizobium javanicus</i> 2871	30 (aeróbica)	5,0	24	
		30 (anaeróbica)	5,0	72	33

Fonte: Edeh, 2020.

A Tabela 2 apresenta microrganismos, substrato lignocelulósico e rendimento de etanol apresentados por Aditiya et al. (2016).

Em relação ao melhoramento vegetal para a produção de E2G, diversos estudos são realizados com o objetivo de desenvolver novas variedades com elevada produção de biomassa, bem como na utilização de ferramentas que permitam obter as características desejáveis à produção de E2G.

Tabela 2 - Rendimentos de etanol obtidos a partir de diferentes substratos e microrganismos.

Microrganismo	Substrato	Rendimento etanol
<i>Candida shehatae</i> NCL-3501	Palha de arroz	0,45 – 0,5 g/g
<i>Escherichia coli</i> KO11	Bagaço de cana-de-açúcar	31,5 g/L
<i>Thermoanaerobacter mathranii</i> BG1L1	Palha de trigo	0,39–0,42 g/g
<i>Pichia stipitis</i> BCC15191	Bagaço de cana-de-açúcar	8,4 g/L
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 590. E1	Palha de milho	63% rendimento teórico

Fonte: Aditiya et al (2016).

Nesse sentido, em parceria com outras instituições de pesquisa, a Embrapa Agroenergia desenvolveu a Cana Flex, uma variedade geneticamente transformada que apresenta diminuição dos níveis de transcrição do gene BAH1 ou da atividade da enzima codificada por este gene, o que resulta na produção em menor quantidade de ferulatos ligados a parede celular. Essa característica é vantajosa, uma vez que a diminuição das interligações de ácido ferúlico na parede celular permite um melhor acesso das enzimas hidrolíticas à lignocelulose para produção de E2G, dessa forma resulta na economia de custos na etapa de pré-tratamento da biomassa (GUIDUCCI et al., 2020).

Além disso, em cana-de-açúcar os efetores do tipo ativador transcripcional (TALENs) têm sido utilizados para edição gênica, afim de induzir mutações em uma região específica e altamente conservada (JUNG; ALTPETER, 2016; MOLINARI et al., 2020). Jung e Altpeter (2016) apontam que a utilização da técnica na edição de genomas complexos como o da cana-de-açúcar é eficiente, uma vez que as linhagens mutantes apresentaram reduções no conteúdo de lignina.

No setor energético, estudos transcriptômicos têm sido realizados com o objetivo de encontrar abordagens biotecnológicas que auxiliem a superar os desafios e melhorar a produção de biocombustíveis. Esse tipo de análise permite descobrir novos genes e vários tipos de RNAs funcionais; comparar a resposta de um ou mais organismos ou tipos de células em diferentes condições ambientais ou industriais, em termos de expressão transcrita diferencial e revelar muitos outros *insights* para explorar a complexidade biológica dos organismos (CARVALHO et al., 2019). Os resultados obtidos a partir da análise de transcriptoma podem contribuir em diversos aspectos nos processos de produção de etanol, na eficiência da degradação da biomassa, rendimento de etanol, características das plantas relacionadas à produtividade, tolerância a estresses, entre outros.

Da mesma forma, a metabolômica tem sido utilizada como alternativa para compreender como as mudanças no metabolismo podem ser utilizadas para melhorar a produção de biocombustíveis. Esses estudos são realizados principalmente com o objetivo de identificar genes-alvo para abordagens de engenharia genética com o objetivo de aumentar a produtividade e a produção de biocombustíveis a partir de novas fontes de carbono (CARVALHO et al., 2019).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os avanços tecnológicos alcançados por meio de técnicas de biologia molecular e engenharia genética possibilitam maior compreensão sobre os sistemas biológicos e como estes podem ser melhorados a partir do desenvolvimento de genótipos de plantas com maiores teores de fibras, a otimização das etapas de pré-tratamento, o melhoramento de microrganismos para a produção de enzimas e para a fermentação de hexoses e pentoses simultaneamente.

REFERÊNCIAS

- ADITIYA, H. B.; MAHLIA, T. M. I.; CHONG, W. T.; NUR, H.; SEBAYANG, A. H. Second generation bioethanol production: A critical review. **Renewable and sustainable energy reviews**, v. 66, p. 631-653, 2016.
- ANP (2021). Agência Nacional do Petróleo, Biocombustíveis e Gás Natural. **Biocombustíveis**. Disponível em: <https://www.gov.br/anp/pt-br/assuntos/qualidade-de-produtos/biocombustiveis>. Acesso em 25/10/2021.
- ARAUJO, A.; MICHALCZECHE, V. A. L.; SOUTO, B. D. M.; RODRIGUES, D. D. S.; QUIRINO, B. F. Prospecção e produção de uma nova xilanase visando aplicação biotecnológica. In: **Embrapa Agroenergia-Artigo em anais de congresso (ALICE)**. In: ENCONTRO DE PESQUISA E INOVAÇÃO DA EMBRAPA AGROENERGIA, 6., 2020, Brasília, DF. Anais... Brasília, DF: Embrapa, 2020., 2020.
- ARRUDA, A. G.; EVANGELISTA, I. V.; DE MENEZES, L. S.; FISCHER, J.; CARDOSO, V. L.; SANTOS, L. D.; GUIDINI, C. Z. Production of enzymatic complex from agro-industrial biomass and its application in combustible ethanol. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 6, p. e40410613705-e40410613705, 2021.
- BRINKMAN, L. J. M.; CUNHA, M. P.; HEIJNEN, S.; WICKE, B.; GUILHOTO, J. J. M.; WALTER, A.; FAAIJ, A.; HIL, S. Interregional assessment of socio-economic effects of

sugarcane ethanol production in Brazil. **Renewable and sustainable energy reviews**, n. 88, p. 347-362, 2018.

CAMELO, A.; LÉO, P.; BALDANI, J. I.; DOS SANTOS, P. H. L.; MATAI, A. E. M. RenovaBio e biomassa vegetal no Brasil: Biotecnologia que possibilita alta produtividade sustentável. IV Congresso Internacional de Biomassa, **Anais...** Curitiba, PR – 2019.

CARVALHO, L. M. et al. Bioinformatics applied to biotechnology: A review towards bioenergy research. **Biomass and Bioenergy** v. 123, p. 195-224, 2019.

CHENG, CHI & BAO, TENG & YANG, SHANG-TIAN. Engineering Clostridium for improved solvent production: recent progress and perspective. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v.103, p.1-18, 2019.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO – CONAB. **Acomp. safra bras. cana**, v. 7 - Safra 2020/21, n. 4 - Quarto levantamento, Brasília, p. 1-57, maio 2021. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cana/boletim-da-safra-de-cana-de-acucar>>. Acesso em: 20 mai. 2021.

DELGADO, F.; SOUSA, M. E. DE; ROITMAN, T. **Bicombustíveis**, 2017.

EDEH, I. Bioethanol Production: An Overview. **Bioethanol Technologies**, 2020.

EMBRAPA - **Mistura de enzimas mostrou alto desempenho para gerar etanol a partir de bagaço de cana.** EMBRAPA, 27 mai. 2020. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/52639673/mistura-de-enzimas-mostrou-alto-desempenho-para-gerar-etanol-a-partir-de-bagaco-de-cana>> Acesso em: 10 out. 2021

FIVGA, A.; SPERANZA, L. G.; BRANCO, C. M.; OUADI, M.; HORNUNG, A. A review on the current state of the art for the production of advanced liquid biofuels. **Aims Energy**, v. 7, n. 1, p. 46-76, 2019.

FLORENCIO, C.; BADINO, A. C.; FARINAS, C. S. Desafios relacionados à produção e aplicação das enzimas celulolíticas na hidrólise da biomassa lignocelulósica. **Química Nova**, v. 40, p. 1082-1093, 2017.

GUIDUCCI, R.; MOLINARI, H. B. C.; PACHECO, T.; KOBAYASHI, A. Avaliação de impacto ex ante da adoção do ativo tecnológico cana flex para produção de etanol de segunda geração. In: **Embrapa Agroenergia-Artigo em anais de congresso (ALICE)**. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ECONOMIA, ADMINISTRAÇÃO E SOCIOLOGIA RURAL, 58., 2020, Foz do Iguaçu. Cooperativismo, inovação e sustentabilidade para o desenvolvimento rural: anais... Foz do Iguaçu: UNIOESTE, 2020., 2020.

HEMANSI, G. R.; YADAV, G.; KUMAR, G.; YADAV, A.; SAINI, J. K.; KUHAD, R. C. Second generation bioethanol production: the state of art. **Sustainable approaches for biofuels production technologies**, p. 121-146, 2019.

JEDRZEJCZYK, M., SOSZKA, E., CZAPNIK, M., RUPPERT, A. M., & GRAMS, J. Physical and chemical pretreatment of lignocellulosic biomass. **Second and Third Generation of Feedstocks**, p. 143–196, 2019.

JUNG, J. H.; ALTPETER, F. TALEN mediated targeted mutagenesis of the caffeic acid O-methyltransferase in highly polyploid sugarcane improves cell wall composition for production of bioethanol. **Plant Molecular Biology**, v. 92, n. 1-2, p. 131–142, 2016. DOI: 10.1007/s11103-016-0499-y.

LOSEKANN, L.; TAVARES, A. **Transição energética e potencial de cooperação nos BRICS em energias renováveis e gás natural**. 2021.

MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA (MME). Resenha Energética Brasileira - Exercício de 2018. Edição 2019, v.3, Brasília- DF, p. 1-32, 2019. Disponível em: <<http://www.mme.gov.br/web/guest/publicacoes-e-indicadores>>. Acesso em: 29 de julho de 2019.

MOLINARI, H.; VIEIRA, L.; SILVA, N.; PRADO, G; LOPES FILHO, J. H. Tecnologia CRISPR na edição genômica de plantas: biotecnologia aplicada à agricultura. Embrapa Agroenergia-Livro científico (ALICE), 2020.

MUSSATTO, S. I.; YAMAKAWA, C. K.; VAN DER MAAS, L.; DRAGONE, G. New trends in bioprocesses for lignocellulosic biomass and CO₂ utilization. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 152, p. 111620, 2021.

PATEL, A.; SHAH, A. Integrated lignocellulosic biorefinery: Gateway for production of second generation ethanol and value added products. **Journal of Bioresources and Bioproducts**, 2021.

SARRIS, D.; PAPANIKOLAOU, S. Biotechnological production of ethanol: biochemistry, processes and technologies. **Engineering in life sciences**, v. 16, n. 4, p. 307-329, 2016.

TEIXEIRA, T. S.; SIQUEIRA, F. G.; BATISTA, R. D. Enzimas microbianas de desestruturação da parede celular: novas abordagens. **Revista Eletrônica de Energia**, v. 6, n. 1, 2017.

VIDAL, M. F. **Produção e uso de biocombustíveis no Brasil**. 2019.

ZABED, H.; SAHU, J. N.; SUELY, A., BOYCE, A. N.; FARU, G. Bioethanol production from renewable sources: Current perspectives and technological progress. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 71, p. 475-501, 2017.

SOBRE OS AUTORES

Juliana Silva Lemões - Doutora em Química pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Mestre em Química Tecnológica e Ambiental pela Universidade Federal do Rio Grande (FURG). Graduada em Química pela Universidade Federal de Pelotas

(UFPEL) e graduada em Tecnologia Ambiental pelo Centro Federal de Educação Tecnológica de Pelotas (CEFET/RS). Docente na Universidade Federal do Rio Grande (FURG).

Lucas Silva Lemões - Doutorando em Sistemas de Produção Agrícola Familiar na Universidade Federal de Pelotas. Mestre em Agronomia e graduado em Agronomia pela Universidade Federal de Pelotas (UFPEL).

Luize Silva Mascarenhas - Mestre em Fisiologia Vegetal e graduada em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas (UFPEL).

CAPÍTULO 3

PROCESSO DE PRODUÇÃO DE BIOPLÁSTICOS: INFLUENCIA DAS FONTES DE CARBONO E DE NITROGÊNIO

*Karine Laste Macagnan
Mariane Igansi Alves
Izadora Almeida Perez
Angelita da Silveira Moreira*

RESUMO

O poli(3-hidroxibutirato) [P(3HB)] é o bioplástico mais estudado dentre a família dos polihidroxialcanoatos (PHAs), termoplásticos de rápida biodegradabilidade e biocompatível. Para uma produção economicamente viável desses bioplásticos, além de a bactéria ser capaz de produzir e armazenar o biopolímero, é fundamental que se encontrem condições operacionais satisfatórias para que se possa produzir, recuperar e purificar PHAs com características adequadas. O objetivo desse trabalho foi desenvolver uma revisão bibliográfica analisando a influência das fontes de carbono e nitrogênio no processo de produção de PHAs. A fonte de carbono adequada varia dependendo das necessidades do microrganismo em relação à capacidade de absorção, sendo geralmente um monossacarídeo, como a glicose e a frutose, ou um dissacarídeo, como a sacarose. A fonte de carbono pode ser responsável por 25 a 45% dos custos totais de produção, assim, há uma necessidade de encontrar fontes mais econômicas para reduzir os custos de produção. Além dos açúcares tradicionais, uma grande variedade de substratos, como soro de leite, melaço de cana-de-açúcar, glicerol, amido de arroz e óleos vegetais têm sido utilizados com diferentes microrganismos para a produção de PHAs. Dentre as fontes de nitrogênio os compostos sulfato de amônio, ureia e cloreto de amônio e o componente complexo extrato de levedura são relatados. Este trabalho condensa resultados importantes sobre meios na produção de bioplásticos. Pode-se concluir que as fontes de carbono e de nitrogênio adicionadas nos meios de cultivo para produção de PHAs influenciam tanto no crescimento celular quanto no acúmulo do bioplástico.

Palavras-chave: Bioprocessos. Polihidroxialcanoatos. Poli(3-hidroxibutirato).

INTRODUÇÃO

Os plásticos convencionais, obtidos a partir do petróleo, devido a sua durabilidade e resistência, têm sido, por décadas, usados indiscriminadamente. Esses materiais provocam sérios impactos ambientais, seja nos aterros sanitários ou nos ambientes em que são erroneamente descartados (LUENGO et. al., 2003). O crescente interesse científico pela área ambiental, associado à área industrial pelo alto crescimento de consumo de plásticos, têm tornado, cada vez mais, necessários a pesquisa e o

desenvolvimento de substitutos ecologicamente corretos (VINHAS et. al., 2007). Uma das principais linhas de pesquisa desses novos materiais tem sido a obtenção, com o uso de fontes renováveis, de biopolímeros biodegradáveis e com características térmicas e mecânicas que permitam sua industrialização.

Bioprocessos podem ser empregados como ferramenta para obtenção de polímeros biodegradáveis microbianos da família dos polihidroxialcanoatos (PHAs) (MADISON; HUISMAN, 1999). Esses bioplásticos se degradam completamente em curto período de tempo pela ação enzimática de microrganismos sob condições apropriadas no meio ambiente, sendo essa a principal característica desses materiais; além disso, são termoplásticos e biocompatíveis ao ser humano (PIEMOLINI, 2004).

PHAs são acumulados no citoplasma microbiano como inclusões de poliésteres insolúveis, correspondendo a até 90% da massa celular (KUNASUNDARI; SUDESH, 2011). A síntese de PHAs, com a finalidade de reserva intracelular de energia e carbono para os microrganismos, ocorre normalmente quando há condições desfavoráveis de crescimento e excesso de carbono (MADISON; HUISMAN, 1999). A condição desfavorável ao crescimento caracteriza-se pela exaustão de nutrientes como nitrogênio, fósforo, enxofre, oxigênio (MADISON & HUISMAN, 1999).

São conhecidos mais de 300 microrganismos capazes de sintetizar PHAs, mas são poucos os efetivamente empregados na sua produção, incluindo *Ralstonia* sp., *Cupriavidus necator*, *Pseudomonas* sp. e *Escherichia coli* recombinante (CHANPRATEEP, 2010).

Dentre os PHAs, o P(3HB) é o biopolímero mais utilizado na produção de plásticos biodegradáveis, pois possui propriedades físicas, como ponto de fusão, grau de cristalinidade e temperatura de transição vítreia comparáveis ao polipropileno (PP) (CHANPRATEEP, 2010). O P(3HB) ainda é considerado de custo elevado, o que limita seu uso; em alguns casos chega a custar até cinco vezes mais do que o preço do plástico sintético PP. Entre a descoberta do P(3HB), em 1926, e sua produção industrial foram necessários investimentos para o avanço tecnológico na área de engenharia de biorreatores e otimização de bioprocessos (CHANPRATEEP, 2010). Para uma produção economicamente viável desse bioplástico, além de a bactéria ser capaz de produzir e armazenar o biopolímero, é fundamental que se encontrem condições operacionais satisfatórias para que se possa produzir, recuperar e purificar P(3HB)s com características adequadas (CHANPRATEEP, 2010).

O processo de síntese do P(3HB) ocorre, normalmente, em duas etapas: crescimento celular, utilizando meio de cultura complexo, seguida de uma fase de produção de polímero, a qual ocorre sob a condição de excesso de fonte de carbono e, geralmente, associada à limitação de um nutriente essencial como P, Fe, Mg ou N (KHANNA; SRIVASTAVA, 2005). O rendimento polimérico varia muito, em função do microrganismo produtor, dos meios utilizados e das condições operacionais; podem ser citadas produções de 2,39 a 63,0 g/L do polímero (KULPRECHA et al., 2009; ATLIC et al., 2011). O custo de produção por biotecnologia microbiana pode ser diminuído aumentando-se o acúmulo polimérico intracelular e/ou a concentração celular no caldo para produzir uma quantidade maior de polímero, adequando-se a combinação de nutrientes no meio de cultivo, ou ainda utilizando matérias-primas mais baratas como componentes de meio (KULPRECHA et al., 2009).

REFERENCIAL TEÓRICO

Polihidroxialcanoatos (PHAs)

A primeira determinação da composição de PHAs ocorreu em 1923, por Maurice Lemoigne, que verificou que culturas da bactéria *Bacillus subtilis*, quando sofriam autólise em água destilada, reduziam o pH devido à excreção de um ácido desconhecido. Logo, Lemoigne identificou que o ácido liberado pela autólise de *Bacillus megaterium* era o ácido 3-hidroxibutírico, originalmente acumulado no citoplasma bacteriano na forma de polímero, o poli(3-hidroxibutirato) (LEMOIGNE, 1926). Em 1958, a via funcional de P(3HB) foi proposta por Macrae e Wilkinson, que observaram que *B. megaterium* estocava o homopolímero especialmente quando a razão das fontes de glicose/nitrogênio no meio estava alta, e que a subsequente degradação ocorria rapidamente na ausência da fonte de carbono e energia (LUNDGREN et al., 1965). Então, Braunegg e colaboradores (1978) concluíram que P(3HB) era um material de reserva de carbono e energia.

A partir de 1974, com trabalhos iniciados por Wallen e Rohwedder, que analisaram amostras de lodo ativado, descobriu-se que outros hidroxialcanoatos (HA), além do 3-hidroxibutirato (3HB), podem compor os PHAs. Esses compostos são formados principalmente de 3-hidroxiácidos, mas unidades monoméricas do tipo 4, 5 e 6-hidroxialcanoatos já foram observadas (STEINBUCHEL; VALENTIN, 1995).

Os PHAs mais conhecidos são o poli(3-hidroxibutirato) [P(3HB)], o poli(3-hidroxivalerato) [P(3HV)] e o poli(hidroxibutirato-co-valerato) (PHVB); e dependendo do grupo substituinte (S) presente na sua estrutura, esses polímeros podem apresentar características de material duro e quebradiço, amorfos e/ou elastoméricos (TSUGE, 2002).

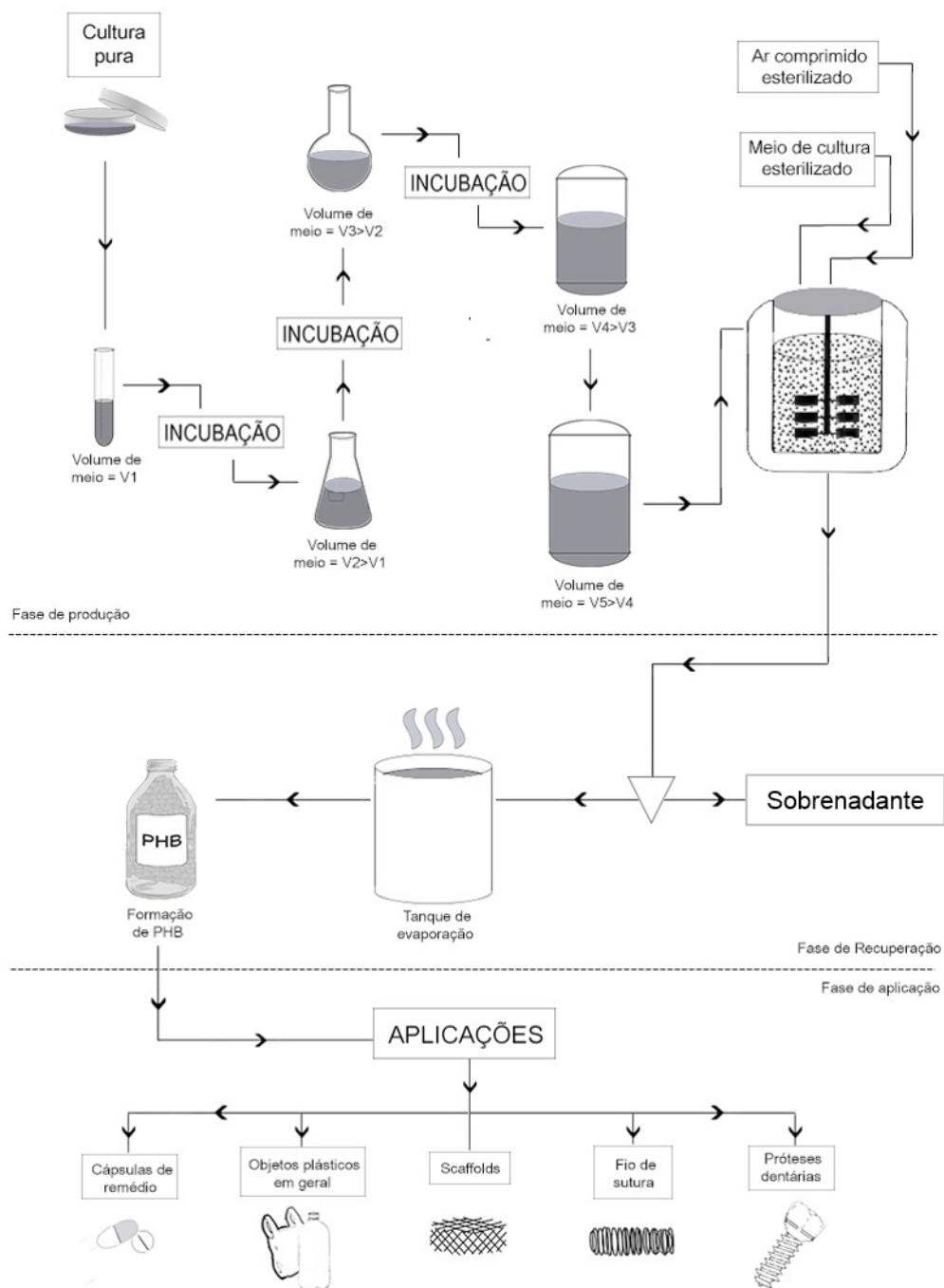
Assim, os polihidroxialcanoatos são definidos como homo ou heteropolíesteres, sintetizados e armazenados intracelularmente por numerosos procariotos. São acumulados pela célula microbiana em forma de grânulos, podendo chegar até 90% de seu peso seco (MADISON; HUISMAN, 1999). A função mais frequentemente atribuída a esses grânulos é a de reserva de carbono e energia; assim, quando há limitação de carbono ou energia os mesmos podem ser reutilizados para suprir essas necessidades (MADISON; HUISMAN, 1999).

O poli(3-hidroxibutirato) [P(3HB)], PHA mais estudado e caracterizado, é um poliéster alifático natural e biodegradável tipo homopolímero, composto por unidades monoméricas de quatro átomos de carbono (TSUGE, 2002). É solúvel em inúmeros solventes orgânicos e insolúvel em água (STEINBÜCHEL; FÜCHTENBUSCH, 1998).

Processo de produção de PHAs

A figura 1 apresenta um fluxograma do processo de produção de P(3HB). Usando uma cultura pura e incubando em um volume inicial de meio (V1), obtém-se o pré-inóculo. Após um certo tempo, aumenta-se o V1 para um volume maior (V2), e esse processo continua até chegar o volume final desejado (ex. V5), o qual corresponde ao inóculo final. O inóculo produzido é então transferido para um biorreator contendo ar comprimido e o meio de cultura esterilizado para iniciar o processo de produção do bioplástico. Para a realização da recuperação do P(3HB) o meio de cultura é centrifugado ou filtrado, e o sedimento, por sua vez, é extraído usando, geralmente, um solvente orgânico. Finalmente, os resíduos celulares são descartados e a fase orgânica é evaporada. Após, o P(3HB) pode ser utilizado na fabricação de diversos produtos, incluindo cápsulas farmacêuticas, objetos plásticos, *scaffolds*, fios de sutura e próteses dentárias (ALVES et al., 2017; RAZA et al., 2018).

Figura 1 - Processo de produção de P(3HB), com as etapas de produção, recuperação e aplicação



Fonte: ALVES et al., 2017, modificada.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizadas as palavras-chave “Bioplástico” (*Bioplastic*), “Polihidroxialcanoatos” (*Polyhydroxyalkanoate*), “Poli(3-hidrobutirato)” (*Poly(3-hydroxybutyrate*), “Bioprocesso” (*Bioprocess*), entre outras, para a busca de artigos científicos nos seguintes bancos de dados: Periódicos Capes, Science Direct, PubMed, Google Acadêmico e Scielo. Foram selecionados os trabalhos relacionados com a proposta e foi desenvolvida uma revisão narrativa.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A utilização de suplementos nutricionais ou indutores pode interferir na via metabólica dos microrganismos, proporcionando maior produção de células e agindo diretamente na síntese do polímero (SQUIO; ARAGÃO, 2004). Os meios de cultivo contendo sais minerais (meios minerais) são os mais utilizados quando se tem por finalidade o acúmulo de P(3HB) no citoplasma bacteriano. São compostos principalmente de sais como ácido cítrico ou citrato (0,1 a 1,7 g/L), cloretos de cálcio (0,01 a 0,02 g/L) e sódio (0,8 g/L), fosfatos de potássio (1,5 a 5,5 g/L) e sódio (0,6 a 9,0 g/L), sulfatos de amônio (1,0 a 5,0 g/L) e magnésio (0,2 a 1,2 g/L), associados a uma solução de oligoelementos ou elementos traços, a qual contém nutrientes em baixas concentrações. A solução de elementos traços pode conter ácido bórico, cloreto de manganês, bem como sulfatos de cobre, ferro, níquel e zinco (BARBOSA et al., 2005; GRIGULL et al., 2008; RAMADAS et al., 2009; FACCIN et al., 2013; NARANJO et al., 2013; RODRÍGUEZ-CONTRERAS et al., 2014). Além desses nutrientes, deve ser fornecida ao microrganismo uma fonte de carbono e de nitrogênio, as quais variam entre os trabalhos na literatura.

A fonte de carbono varia em relação às necessidades do microrganismo em relação à capacidade de absorção, sendo normalmente, monossacarídeo, como a glicose e frutose (BARBOSA et al., 2005), bem como um dissacarídeo, como a sacarose (FACCIN et al., 2013).

Barbosa e colaboradores (2005) utilizaram a frutose como fonte de carbono para obter um melhor desenvolvimento e crescimento da cepa nativa de *Ralstonia eutropha*. Para isso, analisaram a utilização de diferentes concentrações de frutose em processo conduzido como batelada alimentada em biorreator. Quando o microrganismo esgotava o açúcar disponível, adicionavam açúcar equivalente à concentração inicial do meio de

cultivo. Em todas as concentrações analisadas foram obtidas biomassas secas de 7,5 g/L, já para acúmulo de P(3HB) os melhores resultados, 66 e 57%, foram obtidos com as concentrações de 5 e 15 g/L, respectivamente, e em 10 g/L foi alcançado acúmulo de 44%. O tipo de fermentação em batelada alimentada é considerado como o método mais eficaz para se conseguir elevada densidade de cultivo celular (SUN et al., 2006). Com a técnica de alimentação de substrato adequado, as concentrações dos nutrientes principais (geralmente a fonte de carbono) podem ser mantidas a um nível ótimo de modo que ocasiona elevado rendimento e produtividade (SUN et al., 2007).

A fonte de carbono pode ser responsável por 25 a 45% dos custos totais de produção (NATH et al., 2008), portanto, há necessidade de encontrar fontes de carbono de menor custo para diminuir o valor agregado da produção de PHA. A abundância de carbono renovável contida em biomassa disponível em todo o mundo pode ser usada como matéria-prima para a produção. Muitos resíduos e subprodutos de indústrias agrícolas e lácteas são candidatos atrativos, uma vez que eles têm algumas das características pretendidas, baixo custo e alta disponibilidade.

Além dos açúcares tradicionais, uma grande variedade de substratos, tais como soro de leite (NATH et al, 2008), melaço de cana (SILVA et al., 2004; BENGSSON et al., 2010), glicerol (CAVALHEIRO et al., 2009; RODRÍGUEZ-CONTRERAS et al., 2014; NARANJO et al., 2013), amido de arroz (DALCANTON et al., 2010) e óleos vegetais (LEE et al., 2008) têm sido utilizados com diferentes microrganismos para a produção de PHAs (KIM, 2000). É relatado que, para a utilização dos resíduos agroindustriais como substratos de fermentação, esses devem ser submetidos à etapa de hidrólise para a liberação de açúcares facilmente metabolizáveis, através de acidificação ou métodos enzimáticos (VAN-THUOC et al., 2007).

Entre os subprodutos agrícolas mencionados, o melaço de cana tem sido amplamente utilizado em vários processos de fermentação comercial, porque contém vitaminas e nutrientes que ajudam a promover o crescimento e metabolismo microbiano (BENGSSON et al., 2010). Kanjanachumpol et al. (2013) avaliaram a influência de diferentes concentrações de melaço de cana (20, 40, 60 e 80 g/L) como fonte de carbono para *Bacillus megaterium* BA-019, em biorreatore de 10L. Com a concentração de melaço de 60 g/L foram obtidos os melhores resultados, tanto de massa celular seca quanto de acúmulo de P(3HB), 32,5 e 8,8 g/L, respectivamente, em apenas 12 h de produção. Kulprecha et al. (2009) também utilizaram o melaço de cana (20 g/L) como fonte de carbono e compararam com sacarose na mesma concentração; além disso, avaliaram o

sulfato de amônia e ureia (0,8 g/L) como fontes de nitrogênio para *Bacillus megaterium* BA-019. A biomassa seca e o rendimento de P(3HB) foram significativamente melhorados quando melaço, em vez de sacarose, foi usado como fonte de carbono, independentemente da fonte de nitrogênio. No que diz respeito à fonte de nitrogênio, foram obtidos maiores rendimentos de biomassa (7,05 g/L) e de P(3HB) (55,46%) com a utilização de ureia. Resultados de extrema relevância, uma vez que representam as fontes de carbono e nitrogênio de menor custo e facilmente disponíveis. O efeito observado no melaço de cana pode ser causado pela presença de outros nutrientes em sua composição. Além de glicose, frutose e sacarose, ácidos orgânicos, minerais e vitaminas, tais como a tiamina, riboflavina e piridoxina, as quais funcionam como fatores de crescimento, estão presentes, podendo resultar em elevado crescimento de células e de produção de P(3HB).

A ureia é a melhor fonte de nitrogênio devido à capacidade de *B. megaterium* BA-019 assimilar melhor do que os outros compostos nitrogenados. A ureia é uma pequena molécula polar não carregada e, em contraste com o sulfato de amônio, que existe em forma iônica, a taxa de absorção de ureia através da membrana celular é menos dependente do pH e mais rápida. Certamente, a utilização de uma fonte de nitrogênio barata como essa pode reduzir o custo de produção de P(3HB), se a cepa bacteriana utilizada puder utilizá-la de forma eficiente (BORMANN et al., 1998).

O glicerol, importante subproduto agrícola, é o principal resíduo da produção de biodiesel, representando aproximadamente 35% da produção. Apesar de o glicerol puro ser uma importante matéria-prima industrial, com aplicações em alimentos, medicamentos, cosméticos e indústrias de tabaco, o glicerol bruto tem um valor relativamente baixo devido à presença de impurezas. Para esse subproduto ser reaproveitado devem ser realizadas diversas etapas de purificação para a remoção das impurezas, sendo essas fases dispendiosas e, muitas vezes, fora do alcance da viabilidade econômica para plantas de pequeno e médio porte (YAZDANI; GONZALEZ, 2007). Conversões biológicas constituem oportunidades para sintetizar uma grande variedade de produtos com diversas funcionalidades. Glicerol pode ser usado como fonte de carbono substituindo açúcares em vários processos microbiológicos, e a produção de PHA é uma alternativa interessante para a transformação biológica de glicerol.

Cavalheiro et al. (2009) exploraram duas estratégias para melhorar a produção de PHAs: o aumento da produtividade de PHA em culturas de alta densidade e a utilização de resíduos de glicerol (GRP) como fonte primária de carbono para o crescimento de *Cupriavidus necator* DSM 545 e a síntese de polímeros. Nesse trabalho, os autores

avaliaram a produção de P(3HB) a partir de glicerol comercial (PG), substrato controle, e GRP. Utilizando PG, o acúmulo de P(3HB) foi de 62%, com produtividade de massa celular seca de 82,5 g/L, já com a utilização de GRP alcançaram acúmulo de 50% de P(3HB) e massa celular seca de 68,8 g/L. Naranjo et al. (2013) compararam a utilização de glicose e glicerol como fonte de carbono e alcançaram maior acúmulo de P(3HB) em *Bacillus megaterium* com glicerol, 62%; utilizando glicose o acúmulo foi de 59% para as mesmas condições de cultivo. Já Rodríguez-Contreras et al. (2014) associaram as duas fontes de carbono, alternando a alimentação no biorreatore com glicose e glicerol, conseguindo bons resultados, 65% e 68 g/L de acúmulo de P(3HB) e biomassa, respectivamente, para *Cupriavidus necator* DSM 545.

O amido e seus derivados são fontes de carbonos disponíveis em grande quantidade no Brasil. Nas indústrias de alimentos, o amido pode ser obtido de grãos como arroz, trigo e milho, e tubérculos como batata e mandioca (SARIKAVA et al., 2000). Determinados microrganismos, por não produzirem amilases, não possuem capacidade de utilizar o amido como fonte de carbono. Por isso, antes do processo biotecnológico, o amido deve ser hidrolisado a glicose (KIM, 2000). Rusendi e Sheppard (1995) utilizaram resíduo da indústria processadora de batatas para a produção de P(3HB) e, através de uma hidrólise enzimática, obtiveram glicose como fonte de carbono. Ainda vale destacar que o arroz hidrolisado apresenta concentrações satisfatórias da fonte de carbono metabolizável, além de possuir em sua composição cerca de 10 a 15% de proteínas que, hidrolisadas, servem como fonte de nitrogênio e fósforo para o microrganismo e, ainda, uma pequena porcentagem de lipídeos, fibras e minerais (aproximadamente 1%) (DALCANTON et al., 2010).

Dalcanton et al. (2010) utilizaram como meio de cultivo amido de arroz hidrolisado adicionado dos nutrientes que compõem o meio mineral. Além disso, realizaram a suplementação do meio com óleo de soja. Concluíram que a utilização de amido hidrolisado de arroz mostrou-se uma alternativa potencial para a produção de P(3HB), e a suplementação com óleo de soja, mesmo em pequenas quantidades, levou a um aumento na produção de P(3HB) (43%), comparado ao meio sem suplementação (35%).

Estudos de suplementação de cultivos utilizando os ácidos oleico e linoleico demonstraram que a adição leva a um aumento na produção de PHAs (SQUIO; ARAGÃO, 2004). Esses ácidos graxos fazem parte da composição de muitos óleos vegetais tornando-os uma possível alternativa de baixo custo para suplementação de cultivos. Grigull e colaboradores (2008) avaliaram diferentes concentrações de ácido oleico (0 a 3,0

g/L) em meio de cultivo mineral, associando glicose e frutose como fontes de carbono, para a linhagem de *Ralstonia eutropha* DSM 545. Concluíram que o ácido oleico foi consumido na fase exponencial de crescimento e o aumento da concentração desse suplemento alimentar ocasionou o aumento na taxa de crescimento bacteriano. Obtiveram rendimento de 6,96 g/L de biomassa com a suplementação de 3,0 g/L de ácido oleico, e nessa mesma concentração foi obtido o maior acúmulo de P(3HB) (1,16 g/L/h).

Ramadas et al. (2009) avaliaram diferentes fontes de carbono (farelo de trigo, amido de batata, bolo de óleo de gergelim, bolo de óleo de amendoim, mandioca em pó, pó de semente de jaca e farinha de milho) em cultivo de *Bacillus sphaericus* 5149. O meio de cultivo contendo o farelo de trigo como substrato mostrou-se mais eficiente beneficiando o crescimento celular, resultando em 15,5 g/L de biomassa, porém para o acúmulo de P(3HB), o uso do pó de semente de jaca e amido de batata resultaram em maior rendimento, 46 e 47%, respectivamente.

Macagnan et al. (2019) avaliaram o efeito de diferentes meios de cultura contendo diferentes fontes de nitrogênio (F4, ureia; BEI, triptose e extrato de levedura; MM, sulfato de amônio), e fontes de carbono (glicose, sacarose) no acúmulo de P(3HB) e crescimento celular de *Ralstonia solanacearum*. A melhor condição de cultivo foi o meio de cultura MM contendo sacarose, resultando em 5,7 g/L e acúmulo de 46,8%, totalizando 2,67 g/L de bioplástico. Esses resultados são intermediários quando comparados com outras bactérias.

Os resultados obtidos pelos trabalhos mencionados, referentes à fonte de carbono e nitrogênio, nesta revisão, podem ser observados na tabela 1.

Tabela 1. Rendimentos de massa celular seca e acúmulo de P(3HB) obtidos em cultivos com diferentes microrganismos, fontes de carbono e nitrogênio.

Microrganismo	Fonte de C/N	MCS (g/L)	P(3HB) (%)	Referência
<i>Ralstonia eutropha</i> ATCC 17697	Frutose 5 g/L	7,5	66,2	Barbosa et al. (2005)
	Frutose 10 g/L	7,5	44,5	
	Frutose 15 g/L	7,5	57,3	
<i>Cupriavidus necator</i>	Glicerol Comercial	82,5	62	Cavalheiro et al. (2009)
	Resíduo de Glicerol	68,8	50	
<i>Bacillus megaterium</i>	Glicose	7,1	59,1	Naranjo et al. (2013)
	Glicerol	7,7	62,4	
<i>Cupriavidus necator</i> <i>DSM 545</i> <i>Burkholderia</i>		68,5	64,5	Rodríguez-Contreras et al. (2014)
	Glicose + Glicerol	43,8	10,2	
<i>sacchari</i> <i>DSM 17165</i> <i>Ralstonia eutropha</i> <i>DSM 545</i>	Glicose + Frutose Ácido oleico (0 g/L)	6,96	1,16g/L/h	Grigull et al. (2008)

<i>Bacillus sphaericus</i>	Ácido oleico 0,3 g/L	1,02	0,17g/L/h	Ramadas et al. (2009)
	Ácido oleico 0,9 g/L	2,10	0,35g/L/h	
<i>Bacillus sphaericus</i>	Ácido oleico 1,5 g/L	2,64	0,44g/L/h	Ramadas et al. (2009)
	Ácido oleico 3,0 g/L	6,96	1,16g/L/h	
<i>Cupriavidus necator</i> DSM 545	Farinha de milho	1,5	3,3	Dalcanton et al. (2010)
	Farelo de trigo	15,5	6,8	
<i>Bacillus megaterium</i> BA-019	Mandioca em pó	2,5	6,4	Kanjanachumpol et al. (2013)
	Pó de semente de jaca	1,5	46,0	
<i>Bacillus megaterium</i> BA-019	Amido de batata	1,5	47,0	Kulpreecha et al. (2009)
	Bolo de óleo de gergelim	1,0	14,6	
<i>Ralstonia solanacearum</i> RS	Bolo de óleo de amendoim	1,5	18,7	Macagnan et al. (2019)
	Amido de milho com óleo de soja	11,64	43	
<i>Ralstonia solanacearum</i> RS	Amido de milho sem óleo de soja	12,4	35	Macagnan et al. (2019)
	Melaço de cana 20 g/L	10,9	2,9	
<i>Ralstonia solanacearum</i> RS	40 g/L	23,1	7,4	Macagnan et al. (2019)
	60 g/L	32,5	8,8	
<i>Ralstonia solanacearum</i> RS	80 g/L	29,5	7,8	Macagnan et al. (2019)
	Sacarose/Sulfato de amônia	1,96	28,57	
<i>Ralstonia solanacearum</i> RS	Sacarose/Ureia	2,83	30,2	Macagnan et al. (2019)
	Melaço/Sulfato de amônia	6,25	49,92	
<i>Ralstonia solanacearum</i> RS	Melaço/Ureia	7,05	55,46	Macagnan et al. (2019)
	Sacarose/Ureia	1,5	39,0	
<i>Ralstonia solanacearum</i> RS	Sacarose/Triptose e extrato de levedura	3,2	33,9	Macagnan et al. (2019)
	Sacarose/Sulfato de amônio	5,7	46,8	

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho apresenta resultados importantes no âmbito do processo de produção de bioplásticos. O aumento do acúmulo polimérico intracelular e/ou da concentração celular no caldo, para produzir uma quantidade maior de polímero, pode ser alcançado adequando-se a combinação de nutrientes no meio de cultivo. Assim, pode-se concluir que as fontes de carbono e de nitrogênio adicionadas nos meios de cultivo para produção de PHAs influenciam tanto no crescimento celular quanto no acúmulo do bioplástico.

REFERÊNCIAS

ALVES, M.I., MACAGNAN, K.L., RODRIGUES, A.A., ASSIS, D.A., TORRES, M.M., DE OLIVEIRA, P.D. FURLAN, L., VENDRUSCOLO, C.T., MOREIRA, A.S. (2017). Poly(3-hydroxybutyrate)-P(3HB): Review of production process technology. *Industrial Biotechnology*, 13(4), p. 192-208.

ATLIĆ, A., KOLLER, M., SCHERZER, D., KUTSCHERA, C., GRILLO-FERNANDES, E., HORVAT, P., CHIELLINI E., BRAUNEGG, G. (2011). Continuous production of poly([R]-3-hydroxybutyrate) by *Cupriavidus necator* in a multistage bioreactor cascade. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 91, p. 295–304.

BARBOSA, M., ESPINOSA, H.A., MALAGÓN, R.D., MORENO, S.N. (2005). Producción de Poli-bhidroxibutirato (PHB) por *Ralstonia eutropha* ATCC17697. *Universitas Scientiarum*, 1(10), p. 45–54.

BENGTSSON, S., PISCO, A.R., REIS, M.A.M., LEMOS, P.C. (2010). Production of polyhydroxyalkanoates from fermented sugarcane molasses by a mixed culture enriched in glycogen accumulating organisms. *Journal of Biotechnology*, 3(145), p. 253–263.

BORMANN, E.J., LEIBNER, M., BEER, B. (1998). Growth-associated production of polyhydroxybutyric acid by *Azotobacter beijerinckii* from organic nitrogen substrate. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1(49), p. 84–88.

BRAUNEGG, G., SONNLEITNER, B., LAFFERTY, R.M. (1978). A rapid gas chromatographic method for determination of Poly-β-hydroxybutyric acid in microbial biomass. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 6, p. 29-37.

BYROM, D. (1987). Polymer synthesis by microorganisms: technology and economics. *Tibtech*. 5. p. 246-250.

CAVALHEIRO, J.M.B.T., DE ALMEIDA, M.C.M.D., GRANDFILS, C., DE FONSECA, M.M.R. (2009). Poly(3-hydroxybutyrate) production by *Cupriavidus necator* using waste glycerol. *Process Biochemistry*. 5(44). p. 509–515.

CHANPRATEEP S. (2010) Current trends in biodegradable polyhydroxyalkanoates. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 110(6). p. 621-632.

DALCANTON, F., IENCZAK, J.L., FIORESE, M.L., ARAGÃO, G.M.F. (2010). Produção de poli(3-hidroxibutirato) por *Cupriavidus necator* em meio hidrolisado de amido de arroz com suplementação de óleo de soja em diferentes temperaturas. *Química Nova*. 3(33). p. 552–556.

FACCIN, D.J.L., RECH, R., SECCHI, A.R., CARDOZO, N.S.M., AYUB, M.A.Z. (2013) Influence of oxygen transfer rate on the accumulation of poly(3-hydroxybutyrate) by *Bacillus megaterium*. *Process Biochemistry*. 3(48). p. 420–425.

GRIGULL, V.H., SILVA, D.D., GARCIA, M.C.F., FURLAN, S.A., PEZZIN, A.P.T., SCHNEIDER, A.L.S.S. ARAGÃO, G.F. (2008). Production of Poly(3-hydroxybutyrate) from oleic acid by *Ralstonia eutropha*. *Food Technology and Biotechnology*. 46. p. 223–228.

KANJANACHUMPOL, P., KULPREECHA, S., TOLIENG, V., THONGCHUL, N. (2013). Enhancing polyhydroxybutyrate production from high cell density fed-batch fermentation of *Bacillus megaterium* BA-019. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 10(36). p. 1463–1474.

KHANNA, S., SRIVASTAVA, A.K. (2005). Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. *Process Biochemistry*. 40(2). p. 607-619.

- KIM, B.S. (2000). Production of poly(3-hydroxybutyrate) from inexpensive substrates. *Enzyme Microbiology and Technology*. 27. p. 774-777.
- KULPREECHA, S., BOONRUANGTHAVORN, A., MEKSIRIPORN, B., THONGCHUL, N. (2009). Inexpensive fed-batch cultivation for high poly(3-hydroxybutyrate) production by a new isolate of *Bacillus megaterium*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 3(107). p. 240–245.
- KUNASUNDARI, B., SUDESH, K. (2011). Isolation and recovery of microbial polyhydroxyalkanoates. *Express Polymer Letters*. 5(7). p. 620–634.
- LEE, W.H., LOO, C.Y., NOMURA, C.T., SUDESH, K. (2008). Biosynthesis of polyhydroxyalkanoate copolymers from mixtures of plant oils and 3-hydroxyvalerate precursors. *Bioresource Technology*. 15(99). p. 6844–6851.
- LEMOIGNE, M. (1926). Produits de déshydratation et de polymerisation de l'acide β -oxobutyrique. *Bulletin Societe Chimique Biological*. 8. p. 770–782.
- LUENGO, J.M., GARCÍA, B., SANDOVAL, A., NAHARROY, G., OLIVEIRA, E.R. (2003). Bioplastics from microorganisms. *Current Opinion in Microbiology*. 6. p. 251-260.
- LUNDGREN, D.G., ALPER, R., SCHNAITMAN, C., MARCHESSAULT, R.H. (1965). Characterization of Poly- β -Hydroxybutyrate Extracted from Different Bacteria. *Journal of Bacteriology*. 89(1). p. 245–251.
- MADISON, L.L., HUISMAN, G.W. (1999). Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 63. p. 21-53.
- NARANJO, J.M., POSADA, J.A., HIGUITA, J.C., CARDONA, C.A. (2013). Valorization of glycerol through the production of biopolymers: The PHB case using *Bacillus megaterium*. *Bioresource Technology*. 133. p. 38–44.
- NATH, A., DIXIT, M., BANDIYA, A., CHAVDA, S., DESAI, A.J. (2008). Enhanced PHB production and scale up studies using cheese whey in fed batch culture of *Methylobacterium* sp. ZP24. *Bioresource Technology*. 13(99). p. 5749–5755.
- RAMADAS, N.H., SINGH, S.K., SOCCOL, C.R., PANDEY, A. (2009). Polyhydroxybutyrate production using agro-industrial residue as substrate by *Bacillus sphaericus* NCIM 5149. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 1(52). p. 17–23.
- RAMSAY, J.A., BERGER, E., VOYER, R., CHAVRIE, C., RAMSAY, B.A. (1990). Extraction of poly- β -hydroxybutyrate using chlorinated solvents. *Biotechnology Techniques*. 8. p. 589-584.
- RAZA, Z.A., ABID, S., BANAT, I.M. (2018). Polyhydroxyalkanoates: Characteristics, production, recent developments and applications. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 126. p. 45–56.
- RODRÍGUEZ-CONTRERAS, A., KOLLER, M., DIAS, M.M.S., CALAFELL, M., BRAUNEGG, G., MARQUÉS-CALVO, M.S. (2013). Novel poly[(r)-3-hydroxybutyrate]-

producing bacterium isolated from a bolivian hypersaline lake. *Food Technology and Biotechnology*. 51(1). p. 123-130.

RUSENDI, D., SHEPPARD J.D. (1995). Hydrolysis of potato processing waste for the production of poly- β -hydroxybutyrate. *Bioresource Technology*. 2(54). p. 191.

SARIKAVA, E., HIGASA, T., ADACHI, M., MIKAMI, B. (2000). Comparison of degradation abilities of α - and β -amylases on raw starch granules. *Process Biochemistry*. 7(35). p. 711-715.

SILVA, L.F., TACIRO, M.K., MICHELIN, M.E., RAMOS, M.E., CARTER, J.M., PRADELLA, J.G., GOMEZ, J.G. (2004). Poly-3-hydroxybutyrate (P3HB) production by bacteria from xylose, glucose and sugarcane bagasse hydrolysate. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 6(31). p. 245-254.

SQUIO, C.R., ARAGÃO, G.M.F. (2004). Estratégias de cultivo para produção de plásticos biodegradáveis poli(3-hidroxibutirato) e poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) por bactérias. *Química Nova*. 27(4). p. 615-622.

STEINBÜCHEL, A., FÜCHTENBUSCH, B. (1998). Bacterial and other biological systems for polyester production. *Tibtech*. 16. p. 419-427.

STEINBÜCHEL, A., VALENTIN, H.E. (1995). Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids. *Biotechnology and Bioengineering*. 128. p. 219-228.

SUN, Z., RAMSAY, J.A., GUAY, M., RAMSAY, B.A. (2007). Carbon limited fed-batch production of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates from nonanoic acid by *Pseudomonas putida* KT2440. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1(74). p. 69-77.

SUN, Z., RAMSEY, J.A., GUAY, M., RAMSEY, B.A. (2006). Automated feeding strategies for highcell-density fed-batch cultivation of *Pseudomonas putida* KT2440. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 4(71). p. 423-431.

VAN-THUOC, D., QUILLAGUAMAN, J., MAMO, G., MATTIASSON, B. (2007). Utilization of agriculture residues for poly (3-hydroxybutyrate) production by *Halomonas boliviensis* LC1. *Journal of Applied Microbiology*. 2(104). p. 420-428.

VINHAS, G.M., ALMEIDA, Y.M.B., LIMA, M.A.G.A. (2007). Estudo das propriedades e biodegradabilidade de blendas de poliéster/amido submetidas ao ataque microbiano. *Química Nova*. 6. p. 1587-1588.

YAZDANIE, S.S., GONZALEZ, R. (2007). Anaerobic fermentation of glycerol: A path to economic viability for the biofuels industry. *Current Opinion in Biotechnology*. 3(18). p. 213-219.

SOBRE AS AUTORAS

Karine Laste Macagnan. Doutora e Mestre em Ciências pela Universidade Federal de Pelotas (UFPel). Graduada em Biotecnologia pela UFPel e Licenciada em Biologia pela Universidade de Franca (UNIFRAN). Docente na Prefeitura Municipal de Rio Grande.

Mariane Igansi Alves. Doutora e Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela Universidade Federal de Pelotas (UFPel). Graduada em Química de Alimentos pela UFPel e Licenciada em Química pela Universidade de Franca (UNIFRAN).

Izadora Almeida Perez. Doutoranda em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Pelotas (UFPel). Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela UFPel. Graduada em Química de Alimentos pela UFPel.

Angelita da Silveira Moreira. Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas (UFPel). Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Graduada em Farmácia e Bioquímica pela Universidade Católica de Pelotas (UCPel). Docente na Universidade Federal de Pelotas (UFPel).

CAPÍTULO 4

VACINAS CONTRA A CÁRIE DENTÁRIA: UMA ALTERNATIVA POSSÍVEL?

*Marina de Brito Teixeira
Natália Gonçalves Macedo
Paula Fernandes e Silva
Salma B Salybi*

RESUMO

A cárie é considerada uma doença crônica multifatorial que atinge a população em âmbito global. O objetivo desse estudo foi analisar por meio de uma revisão bibliográfica o desenvolvimento de vacinas contra a cárie dentária ao longo dos anos e quais as principais limitações encontradas para que esta se torne uma realidade. Esse estudo é uma revisão narrativa da literatura, na qual foram consultados em bases de dados como: PubMed, Scielo e Google Acadêmico. Não houve restrição de data de publicação e a literatura foi consultada até outubro de 2021. O desenvolvimento das lesões cariosas é de origem multifatorial complexa, mediada por biofilme bacteriano, onde há um desequilíbrio da flora oral e bactérias acidogênicas e acidúricas obtêm uma vantagem seletiva sobre os demais micro-organismos. A saúde pública tem como objetivo a prevenção e a eliminação da doença cárie e para que isso ocorra há décadas estão sendo desenvolvidas as vacinas contra a cárie dentária. Foram propostos a imunização ativa e a imunização passiva, no entanto, o foco das pesquisas atuais está em torno da imunização ativa, devido às limitações da imunização passiva. E, apesar de décadas de pesquisa, ainda não está disponível no mercado nenhuma vacina contra a cárie.

Palavras-chave: Desbiose oral. Imunização ativa. *Streptococcus mutans*.

INTRODUÇÃO

A cárie dental é uma doença crônica, sendo uma das mais comuns globalmente (ALAM et al., 2018). Apesar dos grandes avanços de cuidados em saúde oral nas últimas décadas, como a fluoretação das águas e o uso de dentífricos fluoretados, a cárie dental ainda representa um grande problema de saúde pública, especialmente em países subdesenvolvidos (MORAES et al., 2021). A complexa relação de fatores biológicos e ambientais, somada às condições sociais, elevam o processo de polarização da doença na população mais carente, pois atinge de forma desigual as camadas sociais sendo mais expressiva em grupos de vulnerabilidade econômica (VILAR et al., 2020).

A dificuldade de acesso aos tratamentos odontológicos, o baixo nível de instrução e conhecimento, associados a uma higiene bucal deficiente e uma dieta inadequada, promovem o surgimento da cárie dentária (QUEIROZ et al., 2018). Dados epidemiológicos globais trazem que, na última década, houve um aumento alarmante na prevalência da cárie dentária tanto em crianças quanto em adultos. A prevalência em crianças de 3 a 5 anos foi maior em países de baixa renda, além de revelar que crianças em idade pré-escolar que apresentam lesões cariosas também possuem baixa qualidade de vida (FRENCKEN et al. 2017).

Novas terapias preventivas de cárie podem ser desenvolvidas inibindo a formação de biofilme por meio da supressão de *estreptococos mutans* (ALAM et al., 2018). O tratamento da cárie carece de inúmeros recursos físicos, humanos e financeiros. Nesse sentido, a prevenção é o principal objetivo da saúde pública, bem como a eliminação da doença (SHIVAKUMAR, et al. 2009). Para que isso ocorra, há décadas estão sendo desenvolvidas as vacinas contra a cárie dentária. Essas vacinas vêm sendo estudadas há mais de 40 anos, no entanto, ainda não existe nenhuma disponível no mercado apesar das inúmeras pesquisas laboratoriais ao longo desse período (PATEL, 2019). Para que medidas possam ser desenvolvidas e instituídas na prevenção e controle da doença é fundamental conhecer suas causas.

Analizar a literatura acerca das dificuldades encontradas para o seu desenvolvimento ajuda a compreender quais limitações precisam ser superadas para que a vacina contra as cáries possa ser disponibilizadas à população. Portanto, o objetivo deste estudo foi analisar por meio de uma revisão narrativa da literatura, o desenvolvimento das vacinas contra a cárie dentária ao longo dos anos e quais as principais limitações encontradas para que esta se torne uma realidade.

MATERIAIS E MÉTODOS

A fim de desenvolver uma revisão narrativa da literatura, foram consultadas as bases de dados PubMed, Scielo e Google Acadêmico, com as seguintes palavras-chave: “carie vaccine”, “caries vaccine”, “dental caries vaccine”, “*Streptococcus mutans*” sem restrição de data, até outubro de 2021. Artigos semelhantes sugeridos pelas plataformas também foram analisados. Os resultados que corresponderam ao tema desejado foram lidos na íntegra e interpretados a fim de serem incluídos neste estudo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um dos primeiros modelos desenvolvido para tentar explicar a etiologia da cárie surgiu em 1960 sendo proposto por Keyes, sendo esta o resultado da interação entre o hospedeiro, a dieta cariogênica e os micro-organismos presentes na cavidade bucal, conhecidos como fatores determinantes. Em 1978, Newbrun adicionou o fator tempo, o qual seria necessário para que os três fatores anteriores associados promovessem a desmineralização do dente. No entanto, não foi possível explicar a ocorrência da doença na população. No modelo proposto de Manji e Ferjeskov, em 1970, a cárie apresenta-se como uma doença multifatorial e possui modificadores, tais como fatores comportamentais, econômicos e sociais envolvidos nesse processo (BRAGA et al. 2008; ANTUNES et al. 2004).

Figura 1 - Diagrama adaptado de Manji e Ferjeskov (1990) para explicar os fatores etiológicos determinantes (círculo interno) e modificadores (círculo externo) da doença cárie



Fonte: elaborado pelas autoras.

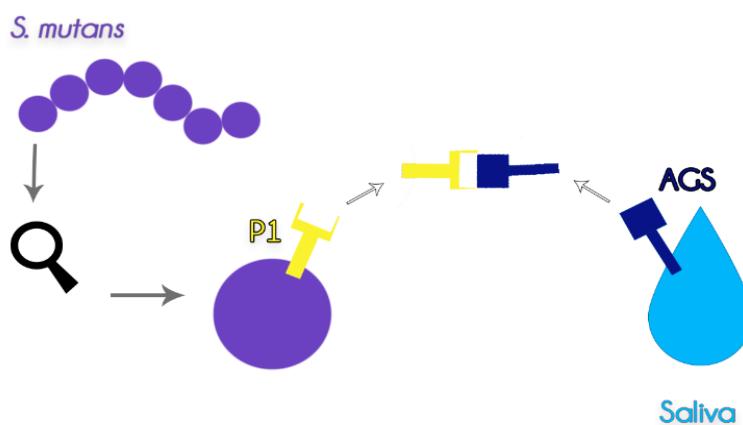
A doença se caracteriza pela dissolução e destruição do tecido dental mineralizado (YANG et al., 2019). O desenvolvimento das lesões cariosas é de origem multifatorial complexa, mediada por biofilme bacteriano, resultado de um desequilíbrio da flora oral e bactérias acidogênicas e acidúricas, as quais obtêm uma vantagem seletiva sobre os demais micro-organismos (ALAM et al., 2018). Mais de 700 espécies diferentes de

bactérias são encontradas na microbiota oral humana. De todas, as espécies *Lactobacillus* (produtoras de ácido láctico) e as do grupo mutans (estreptococos orais) desempenham papel primordial no processo cariogênico (MEIERS et al., 1982).

Relacionado ao fator microbiológico da doença, as bactérias cariogênicas mais frequentemente associadas ao início e progressão das lesões são as *Streptococcus mutans* (ALAM et al., 2018; BATISTA et al., 2017). O estágio da lesão pode influenciar na variedade microbiana da lesão, sendo a progressão acompanhada pelo aumento da acidez do biofilme e diminuição da variabilidade bacteriana. Outras espécies de estreptococos (*S. salivarius*, *S. vestibulare*, *S. parasanguinis*), bem como lactobacilos (*L. gasseri*, *L. johnsonii*, *L. casei*, *L. paracasei*) e espécies de *Veillonella* (*V. atypica*, *V. dispar*, *V. parvula*) já foram isoladas de lesões cariosas (ALAM et al., 2018).

A virulência do *S. mutans* é complexa, mas o mecanismo fundamental para o desenvolvimento da doença é através da adesão à superfície dentária, que se dá através da alta afinidade entre uma proteína de superfície da bactéria (chamada P1, antígeno I / II, antígeno B ou PAc) e a aglutinina salivar (AGS), um complexo composto de alto peso molecular, formado principalmente por receptor do tipo Scavenger e Cisteína GP340, presente na película adquirida adsorvida na superfície dental. A proteína P1 é do tipo adesina e possui, pelo menos, dois sítios de ligação para a AGS, a qual possui diferentes especificidades de ligação de acordo com o estado, sendo estes fase fluída ou fase de superfície (BATISTA et al., 2017).

Figura 2 - Esquema de ligação entre a proteína de superfície bacteriana (P1) e a aglutinina salivar (AGS).



Fonte: Elaborado pelas autoras.

A adesão da *S. mutans* através da proteína P1 se dá independente da sacarose (BATISTA et al., 2017), porém este açúcar é importante no desenvolvimento das lesões, pois a parede celular da bactéria possui glucosiltransferases (GTF), as quais interagem com a sacarose, formando glucanas insolúveis em água, proporcionando uma complexa estrutura ao biofilme e facilitando a adesão à superfície dentária (ALAM et al., 2018). Há três formas de GTFs (GTF-S, GTF-SI e GTF-I), as quais podem produzir glucanas solúveis ou insolúveis em água e cada uma tem um papel na patogênese da cárie (JIANG et al., 2017). A natureza acidogênica da *S. mutans* através capacidade de metabolização de uma grande quantidade de carboidratos leva a produção de ácido láctico, o qual se difunde na estrutura dental e pode dissolver o mineral do esmalte e da dentina, resultando nas lesões cariosas (ALAM et al., 2018).

Foi a partir de 1970, após Bowen ter introduzido o princípio da imunização contra a cárie em macacos, que pesquisadores iniciaram testes experimentais em animais com a finalidade de induzir uma resposta específica de IgA salivar para suprimir a atividade cariogênica (BOWEN, 1969). Como a IgA é a imunoglobulina presente na saliva e esta fica em contato direto com as superfícies dentárias, o desenvolvimento de uma vacina que induzisse uma resposta contra o *S. mutans* seria o alvo principal de combate a formação bacteriana na cavidade oral (CHERUKURI, et al. 2020).

A partir disso, dois tipos de imunizações foram propostos: a imunização passiva e a imunização ativa. A imunização passiva utiliza anticorpos monoclonais extraídos de plantas transgênicas, gema de ovo e do leite bovino para atuar contra o *S. mutans*, entretanto, essa abordagem necessita de aplicações repetidas e em maiores quantidades e, devido a isso, o foco das pesquisas atuais estão em torno da imunização ativa (PATEL, 2019).

Na imunização ativa, os primeiros estudos experimentais em ratos, utilizando a vacina anti-idiotípica que é específica para anticorpos contra o *S. mutans*, diminuíram a atividade de cárie através da administração por via oral (JACKSON et al. 1990).

Em 1990, pesquisadores realizaram um ensaio clínico com 245 crianças de sete anos, as quais receberam aleatoriamente uma vez por semana, durante 16 semanas, comprimidos contendo piridoxina (Vitamina B6) e bactérias lácticas mortas pelo calor ou comprimidos de placebo apenas com piridoxina. O grupo que recebeu comprimidos contendo piridoxina (Vitamina B6) e bactérias lácticas mortas pelo calor mostrou uma redução de 42 % na incidência da cárie dental em comparação ao grupo que recebeu comprimidos de placebo após dois anos de acompanhamento (Bayona-González A,

López-Cámara V, Gómez-Castellanos A, 1990). Esse estudo propôs um futuro projeto de avaliação de vacina contra cárie dentária.

Em 1994, o estudo de Childers NK, Zhang SS, Michalek SM forneceram a primeira evidência para o uso de uma vacina oral desidratada de lipossoma-proteína em humanos. (Childers NK, Zhang SS, Michalek SM, 1994). Outros meios de aplicação já investigados, como o nasal e até mesmo a aplicação direta na gengiva também foram testadas em animais em experimentos iniciais, os quais resultaram na queda da colonização bacteriana e atividade cariogênica (LEHNER, et al. 1989).

Em humanos, os estudos que abordam a imunização ativa ainda estão um pouco restritos. Isso ocorre devido a sua principal desvantagem que é a reatividade causada por抗ígenos presentes no tecido cardíaco, os quais levam a necessidade de detecção e isolamento dos抗ígenos considerados “protetores” para que esse tipo de imunização seja segura para humanos (HUDA, et al. 2017). Os estudos iniciais encontrados sobre o tema mostraram uma eficácia da administração por via oral. Cápsulas contendo *Streptococcus sobrinus* induziram de forma eficiente a produção de IgA salivar e a diminuição de cárie (MESTECKY, et al. 1978), no entanto, outros achados confrontavam esse resultado, demonstrando que essa indução nem sempre ocorre (GANHBERG, 1983). Outras aplicações sem ser por via oral também trouxeram resultados satisfatórios, como pela aplicação tópica e por via nasal (CHILDERS, et al. 2002; CHILDERS, et al. 1994).

Para tentar contornar a complicação gerada com os tecidos do coração humano, foram desenvolvidas as vacinas de subunidade, ou seja, vacinas que visam diversas propriedades de virulência, ou seja, compostas por抗ígenos que estimulam o sistema imune a produzir anticorpos, aumentar sua produção e eliminar respostas imunológicas indesejáveis. Isso por conter, neste caso, a parte funcional do genoma responsável por produzir Ag I/II (adesinas presentes no *S. mutans*), GTFs (glucosiltransferases) ou GBP (proteína de ligação ao glucano). Atualmente, as sequências do genoma de cepas de *S. mutans* já estão disponíveis, o que pode acelerar o desenvolvimento de vacinas de subunidades. Vacinas de subunidades são candidatas desejáveis e serão avaliadas em modelos de estudos com animais ou em ensaios clínicos em humanos (ZHANG, 2013). Em animais, os testes demonstraram que houve a indução de anticorpos IgA anti- Ag I/II, além de resposta imunogênica em ratos de proteção contra *S. mutans* (CHERUKURI et al. 2020; SMITH et al. 2005).

Quando relacionado ao plasmídeo de DNA anti-cárie direcionado pGJA-P / VAX , desenvolvido contra os determinantes抗ígenicos de (*S. mutans*), respostas de anticorpos

em camundongos e macacos foram induzidas. Os resultados mostraram que as respostas específicas de anticorpos IgA salivar são induzidas após a vacinação intranasal com pGJA-P / VAX (XU, et al. 2006). Apesar dos estudos experimentais utilizando ratos demonstrarem resultados satisfatórios, extrapolar para os seres humanos é ainda considerada uma limitação. O tempo de duração dos ensaios, as características específicas do animal, o teor de sacarose administrado e grandes doses infecciosas podem não simular o tempo e as condições reais do desenvolvimento da doença no homem, mesmo que os componentes patogênicos utilizados do *S. mutans* sejam de origem humana (SILVA et al. 2013; CHARONE et al. 2012; SMITH, 2010).

A utilização de macacos experimentada por Bowen em 1970 foi o primeiro ensaio utilizando um animal com características mais próximas ao ser humano (fisiologia, colonização, dentição), no entanto, as desvantagens apresentadas como o elevado custo para os ensaios, o grande porte do animal e o seu número limitado para estudos, diminuiu a utilização de macacos em pesquisa (DELGADO, 2014; SILVA et al. 2013). Dessa forma, o desenvolvimento de uma vacina contra a cárie dentária depende de ensaios clínicos realizados em humanos para que se possa estabelecer uma resposta imune segura (SINGH et al. 2013), devido a presença de uma flora oral microbiana já estabelecida. No entanto, obstáculos bioéticos de estudos com humanos também precisam ser enfrentados (DELGADO, 2014).

Estudos recentes trazem perspectivas para o avanço das pesquisas sobre o assunto. É de extrema importância que a vacinação contra a cárie seja segura a fim de não causar a chamada reatividade cruzada no coração humano após sua aplicação e ao mesmo tempo verificar se é uma opção viável. Deve-se considerar testes levando em consideração estágios da idade (CHERUKURI, 2020), já que autores defendem a imunização a partir dos 6 meses de vida (PINTO, 2005) ou aos 12 meses (KAUR, 2014; SHANMUGAN, 2013; GAMBIR, 2013; NEGRINI, 2009), devido a capacidade da criança nessa faixa etária em produzir resposta imune através do IgA salivar. Outra perspectiva é aprimorar a utilização da nanotecnologia, pesquisar novos genes de virulência alvo ou proteínas antigênicas, focar na melhor técnica de administração, se via oral, nasal, tópica já testadas em ensaios experimentais anteriores. Existe a necessidade de estudos multicêntricos que comparem vacinas diferentes, unindo o esforço e trabalho de vários pesquisadores, além de padronizar os estudos *in vitro* e focar em medidas de desfecho ensaios em humanos para se estabelecer o período de imunização, dosagem e a eficácia

da vacina desenvolvida (PATEL, 2019) para que assim seja possível disponibilizar uma vacina eficaz à população a curto ou médio prazo.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Conclui-se que a cárie é um problema de saúde pública no âmbito global. E na busca pela prevenção dessa doença, ao longo dos anos, o desenvolvimento das vacinas contra a cárie dentária vem sendo estudado e testado. Há dois tipos de imunização propostas: a imunização passiva e a imunização ativa. No momento, as pesquisas estão voltadas para a imunização ativa. Entretanto, ainda não há uma vacina disponível no mercado, já que uma das principais limitações no desenvolvimento da vacina em humanos é devido a reatividade causada pelos抗ígenos no tecido cardíaco.

REFERÊNCIAS

- ALAM, M. K. et al. Synthetic antigen-binding fragments (Fabs) against *S. Mutans* and *S. Sobrinus* inhibit caries formation. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–9, 2018.
- ANTUNES, J. L. F. et al. Measuring inequalities in the distribution of dental caries. **Community of Dental Oral Epidemiology**, v. 32, n. 1, p. 41-48, 2004.
- BAYONA AG, LÓPEZ VC, GÓMEZ AC. Final results of a dental caries clinical trial using heat killed lactic bacteria (Streptococci and Lactobacilli) orally. **Pract Odontol**. 1990 Jun;11(6):41-7.
- BATISTA, M. T. et al. LT adjuvant modulates epitope specificity and improves the efficacy of murine antibodies elicited by sublingual vaccination with the N-terminal domain of *Streptococcus mutans* P1. **Vaccine**, v. 35, n. 52, p. 7273–7282, 2017.
- BOWEN, W. H. A vaccine against dental caries. A pilot experiment in monkeys (Macaca irus). **Brazilian Dental Journal**, v. 26, p.159-160, 1969.
- BRAGA, M. M. et al. A doença Cárie Dentária. **Selantes de fossas e fissuras: quando como e por quê?** 1. ed. São Paulo: Livraria Santos Editora, 2008.
- CHARONE, S. et al. Vacina anticárie: o estado da arte. **PerioNews**, v. 6, n. 1, p, 89-93, 2012.
- CHERUKURI, G. et al. Insight into status of dental caries vaccination: a review. **Journal of Conservative Dentistry**, v. 23, n. 6, p. 544-549, 2020.

CHILDERS, N. K. et al. Oral immunization of humans with dehydrated liposomes containing *Streptococcus mutans* glucosyltransferase induces salivary immunoglobulin A2 antibody responses. **Oral Microbiology Immunology**, v.9, p. 146–153, 1994.

CHILDERS, N. K. et al. Humans immunized with *Streptococcus mutans* antigens by mucosal routes. **Journal of Dental Research**, v.81, n. 1, p. 48–52, 2002.

DELGADO, J. C. R. Vacina contra a cárie dentária: perspectivas e preocupações. Uma opção possível? Dissertação de Mestrado – **Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz**, Portugal, 2014.

FRENCKEN, J. E. et al. Global epidemiology of dental caries and severe periodontitis - A comprehensive review. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 44, n. 18, p. 94-105, 2017.

GAHNBERG, L. KRASSE, B. Salivary immunoglobulin A antibodies and recovery from challenge of *Streptococcus mutans* after oral administration of *Streptococcus mutans* vaccine in humans. **Infection and Immunity**, v.39, p. 514–519, 1983.

GAMBHIR, R. S. et al. Vaccine against dental caries- an urgent need. **Journal of Vaccines & Vaccination**, v. 3, n. 2, 2012.

HUDA, S. et al. Dental caries vaccine availability: Challenges for the 21st century. **Journal Immunology Immunotherapy**, v. 1, n. 1, p.1-7, 2017.

JACKSON, S. et al. Liposomes containing anti-idiotypic antibodies: An oral vaccine to induce protective secretory immune responses specific for pathogens of mucosal surfaces. **Infection and Immunity**, v.58, p.1932–1936, 1990.

JIANG, H. et al. Enhanced immune response to a dual-promoter anti-caries DNA vaccine orally delivered by attenuated *Salmonella typhimurium*. **Immunobiology**, v. 222, n. 5, p. 730–737, 2017.

KAUR, A. Immunology of dental caries and Bibliografia 87 caries vaccine-Part II. **International Journal of Pharmacy and Biomedical Sciences**, v. 5, n. 1, p.03-08, 2014.

LEHNER, T. et al. Local oral immunization with synthetic peptides induces a dual mucosal IgG and salivary IgA antibody response and prevents colonization of *Streptococcus mutans*. **Immunology**, V. 67, p.419–424, 1989.

MEIERS, J. C. et al. A microbiological analysis of human early carious and non-carious fissures. **Journal of Dental Research**, v. 61, n. 3, p. 460-464, 1982.

MESTECKY, J. et al. Selective induction of an immune response in human external secretions by ingestion of bacterial antigen. **Journal of Clinical Investigation**, v.61, p.731–737, 1978.

MORAES, R. B. et al. Availability of public dental care service and dental caries increment in children: a cohort study. **Journal of Public Health Dentistry**, v. 81, n. 1, p. 57–64, 2021.

NEGRINI, T. C. et al. Fundamental mechanisms of immune response to oral bacteria and the main perspectives of a vaccine against dental caries: a brief review. **Revista Odonto Ciência**, v. 24, n. 2, p. 198-204, 2009.

PATEL, M. Dental caries vaccine: are we there yet? **Letters Applied Microbiology**, v. 70, n. 1, p. 1-11, 2019.

PINTO, L. P. et al. Aspectos imunológicos da cárie dentária. **Revista da Faculdade de Odontologia de Porto Alegre**, v. 46, n.1, p.19-22, 2005.

QUEIROZ, F. S. et al. Cárie dentária e fatores associados em crianças de 5 anos de idade no município de Patos-PB. **Revista Archives of Health Investigation**, v.7, n. 5, p. 190-194, 2018.

SHANMUGAM, K. T. et al. Dental caries vaccine - a possible option? **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 7, n. 6, p. 1250-1253, 2013.

SHIVAKUMAR, K.M, et al. Dental caries vaccine. **Indian Journal of Dental Research**, v. 20, n.1, p. 99-106, 2009.

SILVA, A. C. et al. Caries vaccine: current reality or remote future? In Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education . A. Méndez-Vilas (ed.). Badajoz, Espanha: Formatech research center, v.3, p. 1548-1552, 2013.

SINGH, V. et al. Caries vaccine: a review. **Heal Talk-a Journal of Clinical Dentistry**, v. 6, n. 1, p. 20-23, 2013.

SMITH, D. J. et al. Immunological and protective effects of diepitopic subunit dental caries vaccines. **Infection Immunity**, v. 73, p. 2797–2804, 2005.

SMITH, D. J. Dental caries vaccines: prospects and concerns. **Expert Review of Vaccines**, v. 9, n. 1, p. 1-3, 2010.

VILAR, M. O. et al. Prevalência de cárie dentária em crianças em condição de vulnerabilidade social. **Id Online Revista Multidisciplinar e de Psicologia**, v. 14, n. 9, p. 577-587, 2020.

ZHANG S. Dental caries and vaccination strategy against the major cariogenic pathogen, Streptococcus mutans. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 14, n.11, p. 960-966, 2013.

YANG, H. et al. Anti-caries vaccine based on clinical cold-adapted influenza vaccine: A promising alternative for scientific and public-health protection against dental caries. **Medical Hypotheses**, v. 126, n. 32, p. 42–45, 2019.

SOBRE AS AUTORAS

Marina de Brito Teixeira - Cirurgiã-dentista pela Universidade Federal de Pelotas (UFPEL). Mestre em Clínica Odontológica com ênfase em Prótese Dentária (UFPEL). Doutoranda em Clínica Odontológica com ênfase em Prótese Dentária (UFPEL).

Natália Gonçalves Macedo - Cirurgiã-dentista pela Universidade Federal de Pelotas (UFPEL). Especialista em Endodontia pela Faculdade Menino Deus (FAMED). Mestranda em Endodontia pela Universidade Federal de Pelotas (UFPEL).

Paula Fernandes e Silva - Cirurgiã-dentista pela Universidade Federal de Pelotas (UFPEL). Especialista em Saúde Coletiva pela Universidade Cruzeiro do Sul (UNICSUL). Mestranda em Dentística e Cariologia pela Universidade Federal de Pelotas (UFPEL).

Salma Rose Buchnveitz Salybi - Cirurgiã-dentista pela Universidade Federal de Pelotas (UFPEL). Mestre em Clínica Odontológica com ênfase em Prótese Dentária (UFPEL). Doutoranda em Clínica Odontológica com ênfase em Prótese Dentária (UFPEL).

CAPÍTULO 5

MICROENCAPSULAÇÃO DE PROBIÓTICOS POR SPRAY DRYER

*Izadora Almeida Perez
Karine Laste Macagnan
Camila Waschburger Ames
Angelita da Silveira Moreira*

RESUMO

Os probióticos são microrganismos vivos que, quando consumidos em concentrações adequadas, exercem diversos benefícios à saúde do consumidor. Os efeitos favoráveis incluem a modulação da resposta imune, manutenção da barreira intestinal e prevenção e tratamento de infecções. Porém as condições de processamento, armazenamento, consumo e passagem pelo trato digestório podem prejudicar a viabilidade dos probióticos, sendo que diversos estudos relatam a baixa capacidade de sobrevivência dos microrganismos em produtos formulados com células livres. Portanto, é de suma importância identificar e otimizar processos que visem manter essa viabilidade por um período prolongado. A microencapsulação por *spray dryer* surge como uma alternativa promissora, a qual protege as células frente a fatores adversos, prolonga o período de armazenamento, possui facilidade de operação e boa relação entre custo e benefício. Com este estudo objetivou-se realizar uma revisão narrativa sobre microencapsulação de probióticos utilizando o método de *spray dryer*. Através da literatura consultada, concluiu-se que a técnica de microencapsulação por *spray dryer* aumenta consideravelmente a estabilidade dos probióticos durante o armazenamento, sendo que a viabilidade dos microrganismos e a eficiência de encapsulação estão diretamente relacionadas aos parâmetros de secagem e aos agentes encapsulantes utilizados.

Palavras-chave: Agente encapsulante. Parâmetros de secagem. Viabilidade.

INTRODUÇÃO

Probióticos são definidos como microrganismos vivos que, quando ingeridos em quantidades suficientes, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (BRASIL, 2018), destacando-se os efeitos antagônicos na microbiota intestinal e estímulo ao sistema imune, resultando em aumento da resistência contra microrganismos patogênicos (COOK et al., 2012). Entretanto, é importante destacar que para que os probióticos exerçam essas funções, eles devem estar em concentração adequada, sendo esta em torno de 10^6 - 10^7 UFC g⁻¹, durante toda a vida útil do produto em que estiverem presentes, além de resistir às barreiras do trato digestório (IBARRA et al., 2012; KENT; DOHERTY, 2014).

Quando aplicados em alimentos com alegação de propriedade funcional, os microrganismos devem, inicialmente, possuir resistência às operações de processamento. Porém, alguns tipos de alimentos passam por etapas que podem ser desfavoráveis à sobrevivência dos microrganismos, como a utilização de temperaturas extremas. Além disso, têm-se as características intrínsecas do alimento, como sua composição, seu armazenamento e condições de consumo, as quais irão afetar diretamente na viabilidade. A sobrevivência reduzida de microrganismos probióticos quando adicionados como células livres a alguns alimentos, principalmente não lácteos, já foi relatada em diversos estudos (AKIN et al., 2007; CAVALHEIRO et al., 2015).

A secagem por *spray dryer* ou atomização é um dos métodos mais utilizados para a secagem de diversas matérias-primas e produtos alimentícios e farmacêuticos. Também tem sido usada para preservação e encapsulamento de microrganismos probióticos. Esse método, quando associado a um encapsulante adequado, protege os microrganismos tanto em relação ao alimento em que será aplicado, temperaturas de processamento e tempo de armazenamento, como em relação às condições gastrointestinais, como o meio ácido, sais biliares e presença de oxigênio (FAREEZ et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2007).

Essa técnica é altamente adequada para aplicações industriais, possui elevada reprodutibilidade, rapidez e custo relativamente baixo, quando comparada a outros métodos. Além disso, gera uma maior estabilidade aos microrganismos e prolonga o período de armazenamento, estendendo a vida útil. A utilização de temperaturas elevadas é a principal desvantagem; entretanto, a aplicação de um agente encapsulante adequado pode proteger o microrganismo frente a essa condição (CARMO et al., 2015; RAY et al., 2016). Mas é importante ressaltar que a secagem por *spray dryer* apresenta a desvantagem de redução na viabilidade do microrganismo, resultante da temperatura e da perda de água que ocorre durante a realização da técnica. Para reduzir esse problema pode-se utilizar agentes encapsulantes com capacidade termoprotetora. O agente encapsulante ideal deve apresentar baixa viscosidade, tendo em vista que viscosidades elevadas dificultam a manipulação e reduzem o rendimento do processo; não deve apresentar reatividade com o núcleo; deve ter a capacidade de selar e ser impermeável ao material ativo (BURGAIN et al., 2011; SUNNY-ROBERTS; KNORR, 2009).

Objetivou-se desenvolver uma revisão narrativa sobre microencapsulação de probióticos utilizando o método de *spray dryer*, além de apresentar os principais agentes encapsulantes e parâmetros de secagem utilizados, bem como resultados obtidos por diferentes autores.

REFERENCIAL TEÓRICO

Microrganismos probióticos

Os probióticos são definidos como microrganismos vivos, os quais, quando ingeridos em quantidades suficientes, conferem benefício à saúde do hospedeiro. Esses microrganismos ocasionam diversos efeitos benéficos e são pertencentes a diferentes gêneros e espécies (BRASIL, 2018; FAO/WHO, 2002).

A viabilidade dos probióticos pode ser afetada por inúmeros fatores, como a cepa utilizada e ingredientes adicionados ao longo da produção do alimento. Além disso, o teor de oxigênio e temperatura de armazenamento são fatores que influenciam. É importante ressaltar que as concentrações recomendadas de probióticos devem ser mantidas durante todo o processamento do produto, bem como serem capazes de resistir às barreiras do organismo humano como por exemplo o contato com enzimas, pH do estômago e sais biliares (CRUZ et al., 2009).

Saad et al. (2011) citaram as três principais formas de ações benéficas dos microrganismos probióticos ao serem consumidos. A primeira é a capacidade de modular o sistema imune do hospedeiro, tanto o sistema inato, quanto o adquirido. A segunda forma seria o efeito direto sobre microrganismos comensais ou patogênicos, atuando, dessa forma, na prevenção e tratamento de infecções e restauração do equilíbrio da mucosa intestinal. Há ainda o efeito de eliminação de toxinas produzidas pelo metabolismo de outros microrganismos, ocasionando a desintoxicação do intestino.

Dentre os efeitos imunológicos causados pela ingestão de probióticos, pode-se citar o aumento da secreção de interferon gama, devido, provavelmente, à decorrência do desvio da resposta imunológica para um perfil Th1. Desta forma, pacientes com dermatite atópica, bem como alergia a leite são auxiliados, podendo desenvolver uma resposta tolerogênica. Além disso, evidências sugerem a redução de enzimas β -glicuronidase e nitroreductase, as quais são sintetizadas por bactérias patogênicas; esse fator ocasiona a hidrólise de compostos carcinogênicos, com consequente redução de substâncias nocivas, diminuindo o risco de neoplasia (LEBLANC; PERDIGÓN, 2005; POHJAVUOR, et al., 2004).

A aplicação dos microrganismos probióticos é geralmente realizada em produtos lácteos, tendo em vista que esses são muito favoráveis para a sua viabilidade e sobrevivência devido à presença de lactose (utilizada como substrato), à atividade de água

adequada e à faixa de pH favorável. Entretanto, os avanços nas pesquisas em desenvolvimento e tecnologia têm propiciado a incorporação dos probióticos em uma ampla diversidade de matrizes alimentares, através de técnicas de proteção dos microrganismos. Dentre as tecnologias estudadas pode-se citar técnicas que utilizam secagem, gerando a preservação do microrganismo (ALTAMIRANO-FORTOUL et al., 2012; CASTRO-CISLAGHI et al., 2012; IBARRA et al., 2012).

Microencapsulação por *spray dryer*

De modo geral, a utilização de técnicas de secagem, onde soluções no estado líquido passam para o estado sólido, gera produtos com estabilidade superior, aumenta o tempo de armazenamento, prolongando a vida útil do produto, além de poder preservar compostos biologicamente ativos, com a presença de agentes encapsulantes (BURGAIN et al., 2011).

A microencapsulação pode ser definida como um processo que imobiliza e gera proteção aos microrganismos através de um material encapsulante. As partículas que são geradas possuem diâmetros de tamanho pequeno, podendo variar de nanômetros a poucos milímetros. Sua estrutura pode ser mantida em condições adversas do meio, sendo que o conteúdo da cápsula deve ser liberado somente no sítio de ação adequado que, no caso dos probióticos, é o intestino (BORGOGNA et al., 2010). Segundo Cook et al. (2012), a liberação controlada do conteúdo das cápsulas pode ocorrer por diferentes mecanismos, como mudança no pH, estresse mecânico, temperatura, ação de enzimas, tempo, fermentação bacteriana, entre outros. Kailasapathy (2009) afirma que essa tecnologia fornece uma barreira física aos microrganismos, o que aumenta a resistência a condições adversas.

De acordo com Carmo et al. (2015), a técnica de microencapsulação por *spray dryer* é uma das mais utilizadas, tendo bastante destaque na área de probióticos, pois possui elevada facilidade de operação e boa relação entre custo e benefício. Nesse método têm-se uma solução de trabalho, contendo o agente encapsulante e o núcleo ou material ativo, que passa do estado líquido para o estado sólido através da rápida desidratação do líquido com a utilização de temperaturas elevadas, resultando em um produto pulverulento. O funcionamento do equipamento conta com um bico injetor, responsável por realizar a aspersão de pequenas gotículas da solução de trabalho no interior de uma câmara de secagem, a qual possui circulação de ar superaquecido que, ao entrar em contato com as

gotículas de pequeno diâmetro da amostra, proporciona a rápida desidratação e formação das microcápsulas.

A secagem de microrganismos probióticos por *spray dryer* é uma técnica promissora, sendo adequada para soluções protetoras, gerando pós com concentrações elevadas de microrganismos viáveis, facilitando o manuseio e armazenamento das culturas probióticas, bem como suas subsequentes aplicações em alimentos funcionais. Entretanto, para que os resultados da microencapsulação sejam satisfatórios, com culturas encapsuladas viáveis e com tamanho de partícula desejado, é importante que os ajustes e controle de condições de processamento como temperaturas de entrada e saída do ar sejam feitos devidamente (KAILASAPATHY, 2002; RODRÍGUEZ-HUEZO et al., 2007).

MATERIAIS E MÉTODOS

Esse estudo foi realizado através de uma pesquisa em bases de dados científicos, como: Periódicos Capes, Science Direct, PubMed, Google Acadêmico, Scielo, entre outros. Utilizou-se as seguintes palavras-chave para a busca: *spray dryer*, microencapsulação (microencapsulation), probiótico (probiotic). Selecionou-se os trabalhos encontrados na pesquisa e desenvolveu-se uma revisão narrativa.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 mostra condições e microrganismos utilizados, bem como resultados obtidos com diferentes encapsulantes, na microencapsulação de probióticos por *spray dryer*, relatados por diversos autores.

Tabela 1 - Condições utilizadas e resultados obtidos nos processos de microencapsulação de probióticos por spray dryer.

Microrganismo utilizado	Material encapsulante	Parâmetros de secagem	Eficiência de encapsulação	Tempo da avaliação da viabilidade (dias)	Viabilidade inicial da microcápsula (log UFC g ⁻¹)	Viabilidade final da microcápsula (log UFC g ⁻¹)	Referências
<i>Bifidobacterium</i> Bb-12	Soro de leite	Temperatura de entrada e de saída de ar de 150 °C e de 50-60 °C, respectivamente. Fluxo de alimentação de 0,36 L h ⁻¹ *, e pressão de ar do compressor de 7,1 kgf cm ⁻² *	-	84*	> 9	> 9	CASTRO-CISLAGHI et al., 2012.
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> B442	Amido de arroz nativo e inulina	Temperaturas de entrada de 135, 145 ou 155 °C. Taxa de alimentação de 0,84 L h ⁻¹ *	-	32	De 8,66 a 9,08	de 7,08 a 8,77 (4 °C) e de 6,65 a 8,79 (25 °C)	AVILA-REYES et al., 2014.
<i>Lactobacillus acidophilus</i> La-5	Leite em pó desnatado ou soro de leite em pó doce	Temperaturas de entrada e saída de 180 e 85-95 °C, respectivamente. Pressão do ar de 5,0 kgf cm ⁻² , taxa de fluxo de alimentação de 0,48 L h ⁻¹ *	75,4% para soro de leite 77,7% para leite desnatado	90	Em torno de 7	Redução média de 0,43 em todos os tratamentos	MACIEL et al., 2014.

Microrganismo utilizado	Material encapsulante	Parâmetros de secagem	Eficiência de encapsulação	Tempo da avaliação da viabilidade (dias)	Viabilidade inicial da microcápsula (log UFC g ⁻¹)	Viabilidade final da microcápsula (log UFC g ⁻¹)	Referências
<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	Soro de queijo	Temperatura do ar de entrada e de saída de 160 °C e de 55-60 °C, respectivamente. Fluxo de alimentação de 0,36 L h ⁻¹ , e pressão de ar do compressor de 7,1 kgf cm ² *	93.12%	-	-	-	ILHA et al., 2015.
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> (MTCC 5422)	Frutooligossacarídeo, isolado de proteína de soro de leite e isolado de proteína de soro de leite desnatado	Temperatura de entrada e de saída de 110 °C e de 55 °C, respectivamente. Taxa de fluxo de alimentação de 0,24 L h ⁻¹ . Pressão do ar de 2 kgf cm ² *	70,8 a 98,63%	60	De 7,3 a 9,8	Redução em torno de 1	RAJAM e ANANDHARAMAKRISHNA N, 2015.
<i>Ligilactobacillus salivarius</i> NRRL B-30514	Leite desnatado reconstituído, sacarose, trealose e lactose	Temperatura de entrada de 170 °C e temperaturas de saída de 98-100, 94-96, 90-92, 84-86, 80-82, 74-76 e 70-72 °C	-	14*	De 4,68 a 7,22	De 3,21 a 5,20	ZHANG; LIN e ZHONG, 2016.
<i>Bifidobacterium infantis</i> ATCC 15679 e <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> ATCC 8014	Mucilagem e proteína solúvel extraídas de sementes de chia e linhaça	Temperaturas de entrada e saída de ar de 110 °C e 75-80 °C, respectivamente e 0,36 L h ⁻¹ * de alimentação	94.8% para <i>B. infantis</i> e 88.3% para <i>L. plantarum</i>	45	10,25 para <i>B. infantis</i> e 9,69 para <i>L. plantarum</i>	10,11 para <i>B. infantis</i> e 9,55 para <i>L. plantarum</i>	BUSTAMANTE et al., 2017

Microrganismo utilizado	Material encapsulante	Parâmetros de secagem	Eficiência de encapsulação	Tempo da avaliação da viabilidade (dias)	Viabilidade inicial da microcápsula (log UFC g ⁻¹)	Viabilidade final da microcápsula (log UFC g ⁻¹)	Referências
<i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-5	Caseinato de sódio, isolado de proteína de soja, proteína de ervilha, glicose D + e maltodextrina	Temperatura de entrada e de saída de 150 °C e de 65 °C, respectivamente. Taxa de fluxo de alimentação de 1,2 L h ⁻¹ * pressão de ar do compressor de 4,1 kgf cm ² *	-	56*	De 6,69 a 9,20	De 2,58 a 7,90 (25 °C) De 2,65 a 7,57 (30 °C) e 0 a 6,63 (35 °C)	DIANAWATI et al., 2017.
<i>Lacticaseibacillus casei</i> Shirota	Maltodextrina, dextrose, goma arábica e leite desnatado reconstituído	Temperatura de entrada e de saída de 160 °C e entre 64 e 68 °C, respectivamente. Fluxo de alimentação de 0,54 L h ⁻¹ *	De 82,9% a 95,4%	60	Entre 8 e 9	Redução entre 4,4-39,37 e 9,49- 64,3% durante o armazenamento a 4 e 24 °C, respectivamente	GUL, 2017.
<i>Lacticaseibacillus casei</i> LK-1	Leite desnatado, trealose e maltodextrina	Temperatura de saída do ar de 70 °C. Taxa de fluxo de alimentação de 0,32 L h ⁻¹ *	92,9% para leite desnatado, 56,3% para trealose e 34,6% para maltodextrina	70*	Em torno de 9	-	LIAO et al., 2017.
<i>Lactobacillus pentosus</i>	Mistura de amido e pulque	Temperatura de entrada do ar de 92-148 °C. A taxa de fluxo de alimentação de 0,24 L h ⁻¹ *	De 79,2% a 98,4%	84*	9	9 (4 °C) e menos de 6 (30 °C) a partir da 6 ^a semana	HERNÁNDEZ-LÓPEZ et al., 2018.
<i>Lactobacillus zae</i> LB1	Caseinato de sódio, alginato de sódio e proteína de soja	Temperatura de entrada e de saída de 170 °C e 80 °C, respectivamente. Taxa de fluxo de alimentação de 0,3 L h ⁻¹ *.	Em torno de 85%	112*	Em torno de 9	-	LIU et al., 2018.

Microrganismo utilizado	Material encapsulante	Parâmetros de secagem	Eficiência de encapsulação	Tempo da avaliação da viabilidade (dias)	Viabilidade inicial da microcápsula (log UFC g ⁻¹)	Viabilidade final da microcápsula (log UFC g ⁻¹)	Referências
<i>Lactobacillus acidophilus</i> La-5	Goma arábica, maltodextrina, inulina, amido de milho e trealose	Temperatura de entrada e de saída de 130 °C e de 76 °C, respectivamente. Taxa de alimentação de 0,48 L h ⁻¹ e pressão do ar de 6,1 kgf cm ⁻² *	De 89,7% para goma arábica a 94,3% para amido	120	De 10,01 a 10,98	5,46 a 6,81 (25 °C) 7,08 a 8,40 (-18 °C) 7,78 a 9,33 (7 °C)	NUNES et al., 2018.
<i>Lactobacillus acidophilus</i> (NCDC 016)	Maltodextrina e goma arábica	Temperatura de saída de ar de 55 °C. Taxa de fluxo de alimentação de 0,48 L h ⁻¹ *	De 65% a 89,15%	-	7,30 a 9,97	-	AREPALLY e GOSWAMI, 2019.
<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i> GG	Xantana Pruni de baixa viscosidade e aerosil®	Temperatura de entrada e de saída de 110 °C e de 65 °C, respectivamente. Taxa de alimentação de 0,4 L h ⁻¹ . Pressão do ar de 2 - 4 kgf cm ⁻² e vazão de ar comprimido 40 kgf cm ⁻² .	De 85,14% a 99,31%	120	8,08 a 9,43	3,60 a 5,21 (±25 °C) 7,04 a 8,81 (-20 °C) 7,11 a 8,81(7 °C)	PEREZ, 2021.

*Valores originais foram convertidos, pois a unidade foi padronizada.

A sobrevivência dos probióticos após o microencapsulamento depende, além da resistência do próprio microrganismo, do tipo e da concentração de material encapsulante e das condições utilizadas no processo e armazenamento. A maioria dos estudos utiliza bactérias dos gêneros *Lactobacillus*, *Lactococcus* e *Bifidobacterium*, devendo levar em consideração as características de resistência da cepa bacteriana, a fim de obter-se uma elevada eficiência e viabilidade probiótica nas microcápsulas (HUANG et al., 2017).

Foram relatados diversos agentes encapsulantes como biopolímeros (goma arábica e goma xantana), proteínas de ervilha, de soja e de soro de leite, soro de leite, açúcares (maltodextrina, trealose, glicose, lactose e sacarose), amido de milho, entre outros (Tabela 1). Segundo Jafari et al. (2008), os carboidratos, as proteínas e os biopolímeros emergentes são as três principais classes de materiais de parede utilizados e adequados para a elaboração de microcápsulas através da utilização de *spray dryer*. O agente encapsulante possui a função de proteger o material ativo da cápsula quanto às condições adversas do ambiente ao qual é exposto, evitando que haja uma exposição inadequada (SOHAIL et al., 2011).

Através dessa revisão foi verificada a utilização de diversas temperaturas de entrada (170 a 92°C) e de saída (100 a 55 °C) do ar. A combinação da temperatura e tempo de secagem é um fator de extrema importância em estudos relacionados às microcápsulas probióticas, devido à sensibilidade das células bacterianas a altas temperaturas. Assim, a cinética da secagem irá determinar o grau de inativação bacteriana, exigindo cuidado em relação à temperatura em função do tempo (WANG et al., 2016).

A utilização de xantana de baixa viscosidade, especialmente xantana Pruni de baixa viscosidade, para preservação ou liberação controlada de probióticos foi objeto do pedido de patente BR 102018068723-9 A2 (MOREIRA et al., 2018). Fioravante (2019) desenvolveu microcápsulas de *Lactobacillus acidophilus* utilizando xantana Pruni de baixa viscosidade como agente encapsulante, através de secagem em *spray dryer*, posteriormente, aplicou em um gelado comestível e avaliou a viabilidade dos probióticos livres e microencapsulados por até 21 dias de armazenamento. Em todos os dias de avaliação, a concentração de células viáveis probióticas foi maior estatisticamente no gelado comestível com os probióticos microencapsulados, mostrando a efetividade da proteção da microcápsula frente às condições intrínsecas do gelado comestível.

Maciel et al. (2014) avaliaram, sob as condições de digestão simulada, a resistência de *L. acidophilus* La-5 microencapsulado em *spray dryer* utilizando leite em pó desnatado ou soro de leite em pó doce como agentes encapsulantes comparado com a das células

livres do mesmo probiótico. No final do processo a viabilidade do microrganismo encapsulado com soro de leite doce e com leite em pó desnatado foi de 5,97 e 6,92 log UFC g⁻¹, respectivamente, enquanto para as células livres foi de 3,08 log UFC g⁻¹. Gul (2017) avaliou a resistência às condições de digestão simulada de *Lacticaseibacillus casei Shirota* livre e microencapsulado em *spray dryer* utilizando combinações de maltodextrina, leite desnatado reconstituído e goma arábica como agentes encapsulantes. A viabilidade das células livres foi completamente perdida após o período de 1 h em condições gástricas simuladas, sob pH 2,0. No final do período de exposição, a redução dos microrganismos encapsulados variou de 17,83% a 61,59%, demonstrando a importância do microencapsulamento.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Pode-se concluir que a estabilidade e a viabilidade das culturas probióticas, ao longo do período de armazenamento, aumentam significativamente com a utilização do método de microencapsulação por *spray dryer*, quando comparadas com células livres. Além disso, os parâmetros utilizados no equipamento, bem como o tipo e a concentração do material encapsulante influenciam diretamente na sobrevivência dos microrganismos.

REFERÊNCIAS

- AKIN, M. B.; AKIN, M. S.; KIRMACI, Z. Effects of inulin and sugar levels on the viability of yogurt and probiotic bacteria and the physical and sensory characteristics in probiotic ice-cream. **Food Chemistry**, v. 104, p. 93-99, 2007.
- ALTAMIRANO-FORTOUL, R.; MORENO-TERRAZAS, R.; QUEZADA-GALLO, A.; ROSSEL, C. M. Viability of some probiotic coatings in bread and its effect on the crust mechanical properties. **Food Hydrocolloide**, v. 29, p. 166–74, 2012.
- AREPALLY, D.; GOSWAMI, T. K. Effect of inlet air temperature and gum Arabic concentration on encapsulation of probiotics by spray drying. **LWT - Food Science and Technology**, v. 99, p.583-593, 2019.
- AVILA-REYES, S. V.; GARCIA-SUAREZ, F. J.; JIMÉNEZ, M. T.; MARTÍN-GONZALEZ, M. F. S.; BELLO-PEREZ, L. A. Protection of *L. rhamnosus* by spray drying using two prebiotics colloids to enhance the viability. **Carbohydrate Polymers**. Vol. 102, p.423-430, 2014.
- BORGOGNA, M.; BELLICH, B.; ZORZIN, L.; LAPASIN, R.; CESÀRO, A. Food microencapsulation of bioactive compounds: rheological and thermal characterisation of non-conventional gelling system. **Food Chemistry**, v. 122, n. 2, p. 416–423, 2010.

BRASIL. **Resolução - RDC N° 241, de 26 de julho de 2018.** Dispõe sobre os requisitos para comprovação da segurança e dos benefícios à saúde dos probióticos para uso em alimentos. Brasília: Ministério da Saúde, 2018. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/3898888/RDC_241_2018_.pdf/941cda52-0657-46dd-af4b-47b4ee4335b7>. Acesso em: 07 nov. 2021.

BURGAIN, J.; GAIANI, C.; LINDER, M.; SCHER, J. Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. **Journal of Food Engineering**, v. 104, n. 4, p. 467-483, 2011.

BUSTAMANTE, M.; OOMAH, B. D.; RUBILAR, M.; SHENE, C. Effective *Lactobacillus plantarum* and *Bifidobacterium infantis* encapsulation with chia seed (*Salvia hispanica L.*) and flaxseed (*Linum usitatissimum L.*) mucilage and soluble protein by spray drying. **Food Chemistry**, v. 216, p. 97-105, 2017.

CARMO, E. L.; FERNADES, R. V. B.; BORGES, S. V. Microencapsulação por spray drying, novos biopolímeros e aplicações na tecnologia de alimentos. **Revista de Engenharia Química e Química**, v. 1, n. 2, p. 30-44, 2015.

CASTRO-CISLAGHI, F. P.; SILVA, C. dos R.; FRITZEN-FREIRE, C. B.; LORENZ, J. G.; SANT'ANNA, E. S. *Bifidobacterium Bb-12* microencapsulated by spray drying with whey: Survival under simulated gastrointestinal conditions, tolerance to NaCl, and viability during storage. **Journal of Food Engineering**, v. 113, p. 186-193, 2012.

CAVALHEIRO, C.P.; ETCHEPARE, M.A.; SILVEIRA, M.F.; MENEZES, C.; MENEZES, C.R.; FRIES, L.L.M. Encapsulação: alternativa para a aplicação de microrganismos probióticos em alimentos termicamente processados. **Ciência e Natura**, v.37, Ed. Especial-Nano e Microencapsulação de compostos bioativos e probióticos em alimentos, p. 65-74, 2015.

COOK, M. T.; TZORTZIS, G.; CHARALAMPOPOULOS, D.; KHUTORYANSKIY, V. V. Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 162, p. 56-67, 2012.

CRUZ, A. G.; BURITI, F. C. A.; SOUZA, C. H. B.; FARIA, J. A. F.; SAAD, S. M. I. Probiotic cheese: Health benefits, technological and stability aspects. **Trends in Food Science & Technology**, v. 20, n. 8, p. 344-354, 2009.

DIANAWATI, D.; LIM, S. F.; OOI, Y. B. H.; SHAH, N. P. Effect of Type of Protein-Based Microcapsules and Storage at Various Ambient Temperatures on the Survival and 105 Heat Tolerance of Spray Dried *Lactobacillus acidophilus*. **Journal of Food Science**, v. 82, Nº. 9, p. 2134-2141, 2017.

FAREEZ, I. M.; LIM, S. M.; MISHRA, R. K.; RAMASAMY, K. Chitosan coated alginate-xanthan gum bead enhanced pH and thermotolerance of *Lactobacillus plantarum* LAB12. **International Journal of Biological Macromolecules**. p. 1419–1428, 2015.

FIORAVANTE, J. B. **Probiótico *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 preservado em microcápsula de xantana e sílica pirogênica.** Tese (Doutorado em Ciências e Tecnologia de Alimentos). Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos -Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2019.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANISATION OF THE UNITED NATIONS AND WHO WORKING GROUP. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. [s. l.], p. 1–11, 2002. Disponível em: <<http://www.fao.org/es/ESN/Probio/probio.htm>> Acesso em: 07 nov. 2021.

GUL, O. Microencapsulation of *Lactobacillus casei* Shirota by spray drying using different combinations of wall materials and application for probiotic dairy dessert. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 41, p. 1-9, 2017.

HERNÁNDEZ-LOPEZ, Z.; RANGEL-VARGAS, E.; CASTRO-ROSAS, J.; GÓMEZ-ALDAPA, C. A.; CADENA-RAMÍREZ, A.; ACEVEDO-SANDOVAL, O. A.; GORDILLO-MARTÍNEZ, A. J.; FALFÁN-CORTÉS, N. Optimization of a spray-drying process for the production of maximally viable microencapsulated *Lactobacillus pentosus* using a mixture of starch-pulque as wall material. **LWT - Food Science and Technology**, v. 95, p. 216-222, 2018.

HUANG, S.; CAUTY, C.; DOLIVET, A.; LE LOIR, Y.; CHEN, X. D.; SCHUCK, P.; JAN, G.; JEANTET, R. Double use of highly concentrated sweet whey to improve the biomass production and viability of spray-dried probiotic bacteria. **Journal of Functional Foods**, v. 23, p. 453-463, 2016.

IBARRA, A.; ACHA, R.; CALLEJA, M. T.; CHIRALT-BOIX, A.; WITTIG, E. Optimization and shelf life of a low-lactose yogurt with *Lactobacillus rhamnosus* HN001. **Journal Dairy Science**, v. 95, p. 3536–3548, 2012.

ILHA, E. C.; SILVA, T.; LORENZ, J. G.; ROCHA, G. de O.; SANT'ANNA, E. S. *Lactobacillus paracasei* isolated from grape sourdough: acid, bile, salt, and heat tolerance after spray drying with skim milk and cheese whey. **European Food Research and Technology**, v. 240, p. 977–984, 2015.

JAFARI, S. M.; ASSADPOOR, E.; HE, Y.; BHANDARI, B. Encapsulation efficiency of food flavours and oils during spray drying. **Drying Technology**, v. 26, n. 7, p. 816-835, 2008.

KAILASAPATHY, K. Microencapsulation of probiotic bacteria: Technology and potential applications. **Current Issues in Intestinal Microbiology**, v. 3, p. 39–48, 2002.

KAILASAPATHY, K. Encapsulation Technologies for functional foods and nutraceutical product development. **CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources**, v. 4, n. 6, 2009.

KENT, R. M.; DOHERTY, S. B. Probiotic bacteria in infant formula and follow-up formula: microencapsulation using milk and pea proteins to improve microbiological quality. **Food Research International**, v. 64, p. 567-576, 2014.

LEBLANC, A. M.; PERDIGÓN, G. Reduction of betaglucuronidase and nitroreductase activity by yogurt in a murine colon cancer model. **Biocell**, v. 29, p. 15-24, 2005.

LIAO, L.; WEI, X.; GONG, X.; LI, J.; HUANG, T.; XIONG, T. Microencapsulation of *Lactobacillus casei* LK-1 by spray drying related to its stability and in vitro digestion. **LWT - Food Science and Technology**, v. 82, p. 82-89, 2017.

LIU, H.; GONG, J.; CHABOT, D.; MILLER, S. S.; CUI, S. W.; ZHONG, F.; WANG, Q. Improved survival of *Lactobacillus zeae* LB1 in a spray dried alginate-protein matrix. **Food Hydrocolloids**, v. 78, p. 100-108, 2018.

MACIEL G. M.; CHAVES, K. S.; GROSSO, C. R. F.; GIGANTE, M. L. Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* La-5 by spray-drying using sweet whey and skim milk as encapsulating materials. **Journal of Dairy Science**, v. 97, p.1991-1998, 2014.

MOREIRA, A. da S.; FIORAVANTE, J. B.; VENDRUSCOLO, C. T.; MACAGNAN, K. L. **Microcápsulas à base de xantana para preservação ou liberação controlada de probióticos e composição para microcápsulas à base de xantana**. Depositante: Universidade Federal de Pelotas. BR nº 1020180687239. Depósito: 14 de setembro de 2018.

NUNES, G. L.; ETCHEPARE, M. de A.; CICHOSKI, A. J.; ZEPKA, L. P.; LOPES, E. J.; BARIN, J. S.; FLORES, E. M. de M.; SILVA, C. de B.; MENEZES, C. R. Inulin, hi-maize, and trehalose as thermal protectants for increasing viability of *Lactobacillus acidophilus* encapsulated by spray drying. **LWT - Food Science and Technology**, v. 89, p. 128-133, 2018.

OLIVEIRA, A. C.; MORETTI, T. S.; BOSCHINI, C.; BALIERO, J. C. C.; FREITAS, O.; FAVARO-TRINDADE, C. S. Stability of microencapsulated *B. lactis* (BI 01) and *L. acidophilus* (LAC 4) by complex coacervation followed by spray drying. **Journal of Microencapsulation**, p. 685-693, 2007.

PEREZ, I. A. **Xantana Pruni de baixa viscosidade como agente encapsulante e sílica pirogênica como antiagregante na estabilidade de probiótico microencapsulado em spray dryer**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2021.

POHJAVUORI, E.; VILJANEN, M.; KORPELA, R.; KUITUNEN, M.; TIITTANEN, M.; VAARALA, O.; SAVILAHTI, E. *Lactobacillus* GG effect in increasing IFN gamma production in infants with cow's milk allergy. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**. p. 114-131, 2004.

RAJAM, R.; ANANDHARAMAKRISHNAN, C. Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* (MTCC 5422) with fructooligosaccharide as wall material by spray drying. **LWT - Food Science and Technology**, v. 60, Part. 1, p. 773-780, 2015.

RAY, M.; GHOSH, K.; SINGH, S.; MONDAL, K. C. Folk to functional: An explorative overview of rice-based fermented foods and beverages in India. **Journal of Ethnic Foods**, v. 3, p. 5-18, 2016.

RODRÍGUEZ-HUEZO, M. E.; DURÁN-LUGO, R.; PRADO-BARRAGÁN, L. A.; CRUZ-SOSA, F.; LOBATO-CALLEROS, C.; ALVAREZ-RAMÍREZ, J.; VERNON-CARTER, E. J. Pre-selection of protective colloids for enhanced viability of *Bifidobacterium bifidum* following spray-drying and storage, and evaluation of aguamiel as thermoprotective prebiotic. **Food Research International**, v. 40, p. 1299–1306, 2007.

SAAD, S. M. I.; CRUZ, A. G.; FARIA, J. A. F. **Probióticos e prebióticos em alimentos: Fundamentos e aplicações tecnológicas**. 1ed. São Paulo: Varela, 669p., 2011.

SOHAIL, A.; TURNER, M. S.; COOMBES, A.; BOSTROM, T.; BHANDARI, B. Survivability of Probiotics Encapsulated in Alginate Gel Microbeads Using a Novel Impinging Aerosols Method. **International Journal of Food Microbiology**, v. 145, n. 1, p. 162-68, 2011.

SUNNY-ROBERTS, E.O.; KNORR, D. The protective effect of monosodium glutamate on survival of *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Lactobacillus rhamnosus* E-97800 (E800) strains during spray-drying and storage in trehalose-containing powders. **International Dairy Journal**, v.19, p.209-214, 2009.

WANG, J.; HUANG, S.; FU, N.; JEANTET, R.; CHEN, X. D. Thermal aggregation of calcium-fortified skim milk enhances probiotic protection during convective droplet drying. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, n. 30, p. 6003-6010, 2016.

ZHANG, Y.; LIN, J.; ZHONG, Q. Effects of media, heat adaptation, and outlet temperature on the survival of *Lactobacillus salivarius* NRRL B-30514 after spray drying and subsequent storage. **LWT - Food Science and Technology**, v. 74, p. 441- 447, 2016.

SOBRE OS AUTORES

Izadora Almeida Perez. Doutoranda no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Pelotas (UFPel). Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela UFPel. Graduada em Química de Alimentos pela UFPel.

Karine Laste Macagnan. Doutora e Mestre em Ciências pela Universidade Federal de Pelotas (UFPel). Graduada em Biotecnologia pela UFPel e Licenciada em Biologia pela Universidade de Franca (UNIFRAN). Docente na Prefeitura Municipal de Rio Grande.

Camila Waschburger Ames. Doutoranda no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Pelotas (UFPel). Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela UFPel. Graduada em Química Industrial pela Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões - Santo Ângelo (URI).

Angelita da Silveira Moreira. Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas (UFPel). Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Graduada em Farmácia e Bioquímica pela Universidade Católica de Pelotas (UCPel). Docente na Universidade Federal de Pelotas (UFPel).

CAPÍTULO 6

LIPASES MICROBIANAS: FONTES E FATORES DE PRODUÇÃO

*Bruno Roswag Machado
Eduardo Silveira Ribeiro
Patrícia Silva Diaz
Susan Hartwig Duarte*

RESUMO

As lipases (EC 3.1.1.3) são amplamente encontradas na natureza e fazem parte de um importante grupo de enzimas que estão associadas às reações que envolvem lipídeos. Estas enzimas catalisam a hidrólise de acilgliceróis em glicerol e ácidos graxos livres e estão associadas ao metabolismo de lipídeos, assim como as esterases (EC 3.1.1.1), sendo ambas carboxilesterases. Fontes microbianas de lipases têm atraído cada vez mais o interesse de pesquisadores da área biotecnológica, principalmente por apresentarem características como estabilidade e maior eficiência nos processos comparadas aos catalisadores químicos, permitindo ampla aplicação industrial. A produção de lipases tem sido realizada, normalmente, por processo fermentativo submerso, quando bactérias e leveduras são os micro-organismos utilizados. Em contrapartida, a fermentação em estado sólido também tem se mostrado promissora, empregando fungos filamentosos. A utilização de co-produtos agroindustriais sólidos ou líquidos também vem sendo empregada para a produção de lipases microbianas com a finalidade de conciliar a sustentabilidade com a redução dos custos de processo. Além disso, a maioria das lipases de fontes microbianas apresenta uma faixa ótima de atividade e estabilidade para valores de pH entre 6,0-8,0 e temperatura entre 30-40 °C, o que facilita a sua utilização em diversos processos industriais que requerem condições moderadas de operação. O presente capítulo tem como objetivo realizar uma breve revisão sobre as fontes de produção de lipases microbianas e os fatores que influenciam a síntese dessas enzimas.

Palavras-chave: Catalisadores. Co-produtos. Enzimas.

INTRODUÇÃO

O aumento da demanda de indústrias, como alimentos, bebidas, biocombustíveis e limpeza impulsionam o crescimento do mercado de diversas enzimas (GRAND VIEW RESEARCH, 2020). Em 2019, o mercado global de enzimas foi avaliado em US \$ 9,9 bilhões e deve crescer a uma taxa composta de crescimento anual de 7,1% de 2020 a 2027 (RESEARCH e MARKETS, 2020).

Dentre as enzimas, as lipases são capazes de catalisar diferentes reações, como hidrólise ou síntese de ésteres, esterificações e transesterificações, apresentando como

importante característica a especificidade (GODOY et al., 2018). Devido a essa característica, essas enzimas vêm sendo estudadas com a finalidade de serem empregadas em diversos processos industriais (LAI et al., 2018).

Os micro-organismos são fontes promissoras para a produção em larga escala dessas enzimas por não estarem sujeitos aos efeitos sazonais, uma vez que as condições de processo podem ser controladas, são facilmente manipulados geneticamente e possuem pequeno tempo de geração (BHARATHI; RAJALAKSHMI, 2019). Diversos estudos mostram que as lipases microbianas são, em grande maioria, extracelulares tendo sua síntese induzida na presença de substratos específicos (MAGDOULI et al., 2017; PEREIRA-MEIRELLES; ROCHA-LEÃO; SANT'ANNA, 2000; TASKIN et al., 2016). Desta maneira, a fonte de carbono e de nitrogênio, pH, temperatura são os fatores que influenciam o rendimento na produção de lipase uma vez que afetam o metabolismo do micro-organismos (PASCOAL et al., 2018).

REFERENCIAL TEÓRICO

Lipases

As lipases (EC 3.1.1.3) são enzimas que catalisam a hidrólise de acilgliceróis em glicerol e ácidos graxos livres (GODOY et al., 2018). Estão associadas ao metabolismo de lipídeos, assim como as esterases (EC 3.1.1.1), sendo ambas carboxilesterases. A diferença entre essas enzimas está na seletividade quanto ao substrato, as lipases catalisam principalmente reações de substratos de cadeia longa, na interface água-óleo, enquanto que as esterases atuam em ésteres de cadeias curtas e solúveis (LAI et al., 2018). Essas enzimas também podem catalisar uma variedade de reações, dependendo das condições do sistema, como reações de esterificação, de transesterificação (interesterificação, alcóolise e acidólise), de aminólise (síntese de amidas) e lactonização (YADAV et al., 2019).

Estudos utilizando ensaios cristalográficos evidenciaram que, diferentemente das esterases, as lipases apresentam uma tampa (lid) que cobre o sítio ativo com uma curta α -hélice (Ser-His-Asp/Glu) (ERICSSON et al., 2008). Em ambientes aquosos, ou seja, sem a presença de substratos hidrofóbicos a tampa cobre o sítio catalítico e, consequentemente a lipase está inativa. Na presença de substratos hidrofóbicos (interface água-óleo) a tampa é aberta tornando a enzima ativa (GODOY et al., 2018).

O mercado global de lipase microbiana foi avaliado em US \$ 340 milhões em 2020 e espera-se que alcance US \$ 494,7 milhões no final de 2026, representando aumento de 5,4% durante o período (RESEARCH e MARKETS, 2020). Essa demanda de lipase microbiana ocorre, pois além de possuírem diversas aplicações, como produção de alimentos (HUANG et al., 2020; KENDIRCI et al., 2020), biodiesel (PATTANAIK et al., 2019), detergentes (PHUKON et al., 2020) e tratamento de efluentes (JOSHI; SHARMA; KUILA, 2019), os micro-organismos podem ser potenciais fornecedores regulares de enzimas, uma vez que não sofrem efeitos sazonais, podendo apresentarem crescimento mais acelerado comparados os animais e plantas (SALEHMIN; ANNUAR; CHISTI, 2014).

A maioria das lipases microbianas tem uma faixa ótima de atividade e estabilidade para valores de pH entre 6,0-8,0 e temperatura entre 30-40 °C (GODOY et al., 2018; JAVED et al., 2018). No entanto, essas propriedades podem variar significativamente dependendo da fonte, ou mesmo entre as isoformas produzidas por um micro-organismo sendo observado lipases de bactérias extremófilas, como *Geobacillus stearothermophilus* com estabilidade em temperaturas próximas a 70 °C (ABOL-FOTOUH; ALHAGAR; HASSAN, 2021).

Produção de lipases microbianas

Diversos organismos, como animais e plantas (PAHOJA, 2002), bactérias (JAVED et al., 2018) , fungos filamentosos (ILMI et al., 2017) e leveduras (BALOCH; UPAICHIT; CHEIRSILP, 2019; TASKIN et al., 2016; XIAOYAN et al., 2017) possuem habilidade de produzir lipases intra e/ou extracelulares. A biossíntese de lipases podem ser constitutiva e independente da presença do substrato (MADIGAN et al., 2016). No entanto, as lipases microbianas são principalmente enzimas extracelulares induzíveis, sintetizadas dentro da célula e exportadas para sua superfície ou ambiente externo na presença de compostos lipídicos (PEREIRA-MEIRELLES; ROCHA-LEÃO; SANT'ANNA, 2000). Assim, a presença de alguns substratos no meio de cultivo permite a expressão de genes que sinalizam o início da transcrição e, consequentemente, a síntese da enzima (FICKERS et al., 2005; FICKERS; DESTAIN; THONART, 2005).

Bactérias

Estudos relatam que bactérias gram-positivas (MA et al., 2018; SARASWAT et al., 2018) e gram-negativas (RIOS et al., 2018) possuem a habilidade de produzir lipases. As bactérias com potencial para a produção microbiana dessas enzimas normalmente são encontradas em habitats, como co-produtos, industriais de óleo, fábricas de processamento de óleo vegetal, laticínios, indústrias de papel e solo contaminado com óleos (BORAH; YADAV, 2014; JAVED et al., 2018).

Fungos filamentosos

Os fungos filamentosos são preferencialmente cultivados em fermentação em estado sólido (FES) para a produção de lipases, pois esses micro-organismos possuem a capacidade de produzir hifas tubulares alongadas com a função de colonizar a superfície do substrato para secretar metabólitos e enzimas com a finalidade de absorver os nutrientes (OJEDA-HERNÁNDEZ et al., 2018). Além disso, devido ao emprego de FES para a produção de lipases por fungos filamentosos, co-produtos da agroindústria vêm sendo utilizados como suporte sólido ou fonte de carbono com a finalidade de conciliar a sustentabilidade com a redução dos custos de processo (SALIHU et al., 2012).

Leveduras

Trabalhos recentes da literatura mostram que as leveduras *Candida* sp. (LIMA et al., 2019; MONTEIRO et al., 2020), *Rhodotorula* sp. (TASKIN et al., 2016) e *Yarrowia* sp. (MAGDOULI et al., 2017) são maiores produtoras de lipase. Diferentemente dos fungos filamentosos, a produção de lipase de levedura é preferencialmente realizada em fermentação submersa (FSm), pois nos micro-organismos unicelulares a absorção de nutrientes e a transferência de oxigênio no meio líquido se mostram mais efetivas, além da facilidade de controle das variáveis do processo, que podem ser facilmente ajustadas (SHREYA et al., 2018).

Fatores que influenciam a produção de lipases microbianas

Além do tipo de micro-organismos utilizado, a composição da fonte de carbono, fonte de nitrogênio, pH inicial, temperatura e agitação influenciam a produção de lipases microbianas (Tabela 1).

Fontes de carbono

A localização das lipases e a quantidade produzida em micro-organismos estão intimamente ligadas aos tipos de fontes de carbono lipídicas ou não lipídicas (MAGDOULI et al., 2017; SATHISH YADAV et al., 2011). Assim, a produtividade dessas enzimas pode aumentar quando são utilizados substratos lipídicos sob a forma de emulsão. Esses substratos, normalmente denominados indutores, são fontes lipídicas, tais como azeite de oliva, ácidos graxos livres, ésteres hidrolisáveis, gordura animal, óleos vegetais, co-produtos agroindustriais, dentre outros que são de grande interesse para a produção de lipases.

Borah e Yadav (2014) isolaram a cepa de *Bacillus cereus* DRDU1 em local contendo hidrocarbonetos petroquímicos, tais como diesel, petróleo bruto e óleo de motor usado. Os autores avaliaram o potencial de degradação desses compostos pela bactéria na concentração de 2% (v.v⁻¹) como única fonte de carbono. Os autores observaram que a partir de 7 dias houve incremento significativo na produção de lipase extracelular.

Taskin et al. (2016) isolaram a levedura *Rhodotorula glutinis* HL 25 de amostras de solo e avaliaram a produção de lipases com células livres e imobilizadas em *beads* de 3 mm. A produção de lipases aumentou 138,6% para as células livres com 40 g L⁻¹ de azeite de oliva e 122,3 % para as células imobilizadas com 50 g L⁻¹, comparados aos seus respectivos controles (sem azeite de oliva). A influência do Triton X-100 (1 a 12,5 g L⁻¹) como surfactante também foi avaliada, sendo constatado incremento de 46,4% utilizando 5 g L⁻¹ na produção de lipase livre. Quando utilizando 40 g L⁻¹ de azeite de oliva como fonte de carbono com 7,5 g L⁻¹ do surfactante incremento de 52,3% foi observado.

Larik et al. (2016) estudaram o potencial de biodegradação de compostos oleosos pelo consórcio bacteriano A2457 formado por cepas bacterianas de *Stenotrophomonas maltophilia*, *Bacillus cereus* e *Bacillus pumilus*, utilizando concentrações 10% (v.v⁻¹) dos substratos óleo de motor e o óleo diesel em FSm. O consórcio apresentou produção

significativa de biossurfactantes e lipase durante os cultivos de 28 dias. Após análise qualitativa, avaliaram que o consórcio A2457 produziu lipase em ambos os óleos estudados quando comparados ao controle.

Musa et al. (2017) realizaram cultivos com cepas de *Trichoderma* usando cacho de frutos vazios de dendê em FSm. Os autores concluíram que esse subproduto agroindustrial é um substrato barato para melhorar a secreção de lipase em todas as cepas e que *Trichoderma* sp. 1 apresentou os melhores resultados de produção.

Magdouli et al. (2017) cultivaram a *Yarrowia lipolytica* SM7 em FSm contendo glicerol como fonte de carbono e suplementou com azeite de oliva, óleo vegetal e Triton X-100. A produção máxima de lipases foi observada em 24 e 74 h de cultivo, para os indutores empregados.

Kadri et al. (2018), avaliaram a influência de diferentes concentrações de óleo de motor (3%, 5%, 7,5% e 10% v.v⁻¹) como única fonte de carbono em cultivos da bactéria *Alcanivorax borkumensis* em biorreatores agitados de 5 L, sendo 3% de n-hexadecano única fonte de carbono no controle. O óleo de motor residual demonstrou melhores resultados como indutor da produção de lipase para 5%, representando aumento de 194,1% na produção de lipase comparado ao controle.

Pereira-Meirelles; Rocha-Leão; Sant'anna, (2000) testaram resíduo de manga (casca, tegumento e semente) como substrato para produção de lipase por *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 em FSm. Os autores concluíram que o tegumento era um único resíduo que apresentou resultados promissores para a produção da enzima nesse microrganismo. Braz et al. (2020) usaram o fungo filamentoso *Mucor circinelloides* URM 4182 para produzir lipase em FSm usando soro de queijo como única fonte de nutrientes e foi relatado que os microrganismos produziram lipase durante todo o período de fermentação com atividade máxima entre 96 e 120 h.

Nema et al. (2019) estudaram a produção de lipase usando *Aspergillus niger* MTCC 872 por FES usando uma mistura de substrato lignocelulósicos como casca de arroz, torta de algodão e casca de grama vermelha. Observou-se que a torta de algodão e a casca de grama vermelha são os principais componentes dos nutrientes e a casca de arroz proporcionou a melhor área superficial para o crescimento dos fungos. Os melhores resultados foram observados em 24 h de cultivo com a mistura dos três substratos em relação ao ensaio com mistura de dois ou apenas um substrato. A melhor proporção de substrato foi de 2: 1: 1 para casca de arroz, casca de grama vermelha e torta de algodão, respectivamente.

Tabela 1 - Trabalhos que avaliaram a produção e os fatores que influenciam a produção de lipases em diferentes micro-organismos

Micro-organismo	Fontes de carbono	Temperatura (°C)	pH inicial	Agitação (rpm)	Sistema de cultivo	Máxima produção de lipase (U mL ⁻¹)	Tempo de máxima produção de lipase (h)	Referências
<i>Aspergillus niger</i> 65I6	Efluente do processamento de <i>Jatropha curcas</i>	30	-	-	FES	5,6	72	ILMI ET AL., 2017
<i>Rhizomucor miehei</i> CBS 360.62	Efluente do processamento de <i>Jatropha curcas</i>	30	-	100	FSm	14,6	96	ILMI et al., 2017
<i>Yarrowia lipolytica</i> M53	Óleo residual de cozinha	28	-	200	FSm	6	100	XIAOYAN ET AL. , 2017
<i>Y. lipolytica</i> Wt-11	Azeite de oliva	28	7	150	FSm	7	24	PING et al., 2018
<i>Aspergillus niger</i> MTCC 872	Casca de arroz e Sementes de algodão	40	-	-	FES	25	48	NEMA et al., 2019
<i>Bacillus niacini</i> EMB-5	Efluente do processamento de óleo de palma	37	5	150	FSm	40	45	OYEDELE et al., 2019

Fonte de nitrogênio

Várias fontes de nitrogênio orgânico (extrato de levedura, triptona e peptona) e inorgânico (sais de amônio, nitrato de sódio e ureia) estão sendo usados para a produção de lipases por diferentes micro-organismos (BALOCH; UPAICHIT; CHEIRSILP, 2019; PING et al., 2018). As fontes inorgânicas de nitrogênio podem ser usadas rapidamente, enquanto as fontes de nitrogênio orgânico fornecem fatores de crescimento celular e aminoácidos, que são necessários para o metabolismo celular e síntese enzimática fornecendo produtividade de lipase (PRIYANKA et al., 2019).

Ping et al. (2018) avaliaram diferentes fonte de nitrogênio (extrato de levedura, peptona, água de maceração de milho, sulfato de amônia, farinha de feijão e extrato de carne) na produção de lipase extracelular por *Y. lipolytica* Wt-11 e *Y. lipolytica* Mut-16. A melhor fonte de nitrogênio para ambas as cepas foi farinha de feijão para ambas as cepas.

Priyanka et al. (2019) produziram lipase de *Pseudomonas reineckii* utilizando diferentes fontes orgânicas e inorgânicas como fonte de nitrogênio. A produção foi observada para todas as fontes, porém, incremento na produção da enzima foi observado quando o meio de cultivo foi suplementado com aminoácidos específicos; como alanina, glicina, lisina e serina.

Baloch; Upaichit; Cheirsilp, (2019) investigaram a utilização de 4 g L⁻¹ de diferentes fontes de nitrogênio orgânicas (extrato de levedura e peptona) e inorgânicas (NH₄NO₃ e ureia) na produção lipase pela levedura *Dipodascus capitatus* A4C. Os melhores resultados foram obtidos utilizando ureia, seguido de extrato de peptona, extrato de levedura e nitrato de amônia. As fontes orgânicas proporcionaram os melhores resultados devido à aminoácidos e peptídeos, vitaminas e carboidratos solúveis em água encontrado nesses substratos, enquanto as fontes de nitrogênio inorgânico continham apenas nutrientes que satisfazem os requisitos mínimos para o crescimento da levedura.

Temperatura e pH

A temperatura e o pH também desempenham um papel importante na produção de lipases microbianas. A literatura evidencia que as condições de pH alcalino ou neutro aumentam a produção de lipase em células bacterianas e de levedura (BHARATHI; RAJALAKSHMI, 2019).

A temperatura para a produção de lipase pode variar de acordo com a fonte microbiana , entretanto, estudos mostram que a faixa de temperatura de 28-37 °C é a mais empregada para a produção de lipase , garantindo maior rendimento (MAGDOULI et al., 2017; PASCOAL et al., 2018). Outros estudos ainda mostram que a temperatura ideal para a síntese da lipase é 28 °C (SAYGÜN; ŞAHİN-YESİLÇUBUK; ARAN, 2014; XIAOYAN et al., 2017).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As lipases são excelentes catalisadores biológicos que atuam na hidrólise de acilgliceróis em glicerol e ácidos graxos livres, além de reações de síntese de ésteres, esterificações e transesterificações. Em decorrência disso, diversos estudos e aplicações vêm surgindo nos últimos anos com relação à produção de lipases, principalmente, de fontes microbianas. Isso ocorre devido às altas produtividades obtidas por estas enzimas por alguns micro-organismos, se comparado a fontes animais e vegetais.

Além disso, os cultivos microbianos para obtenção de bioproductos, como é o caso das lipases, proporciona um destino mais adequado para alguns co-produtos, como glicerol residual da síntese de biodiesel, óleos derivados de petróleo, óleos residuais de fritura e materiais lignocelulósicos, visto que esses compostos podem ser empregados como substratos para a produção dessas enzimas.

REFERÊNCIAS

- ABOL-FOTOUH, D.; ALHAGAR, O. E. A.; HASSAN, M. A. Optimization, purification, and biochemical characterization of thermoalkaliphilic lipase from a novel *Geobacillus stearothermophilus* FMR12 for detergent formulations. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 181, p. 125–135, 2021.
- BALOCH, K. A.; UPAICHIT, A.; CHEIRSILP, B. Use of low-cost substrates for cost-effective production of extracellular and cell-bound lipases by a newly isolated yeast *Dipodascus capitatus* A4C. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 19, n. December 2018, p. 101102, 2019.
- BHARATHI, D.; RAJALAKSHMI, G. Microbial lipases: An overview of screening, production and purification. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 22, n. June, p. 101368, 2019.
- BORAH, D.; YADAV, R. N. S. Biodegradation of petroleum oil by a novel *Bacillus cereus* strain DRDU1 from an automobile engine. **International Journal of Environmental Research**, v. 8, n. 4, p. 1287–1294, 2014.

ERICSSON, D. J. et al. X-ray Structure of *Candida antarctica* Lipase A Shows a Novel Lid Structure and a Likely Mode of Interfacial Activation. **Journal of Molecular Biology**, v. 376, n. 1, p. 109–119, 2008.

FICKERS, P. et al. Identification and characterisation of LIP7 and LIP8 genes encoding two extracellular triacylglycerol lipases in the yeast *Yarrowia lipolytica*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 42, n. 3, p. 264–274, 2005.

FICKERS, P.; DESTAIN, J.; THONART, P. Methyl oleate modulates LIP2 expression in the lipolytic yeast *Yarrowia lipolytica*. **Biotechnology Letters**, v. 27, n. 22, p. 1751–1754, 2005.

GODOY, L. C.- et al. **Chapter 1 Lipases : An Overview**. [s.l: s.n.]. v. 861

HUANG, Y. YAN et al. Preparation of yogurt-flavored bases by mixed lactic acid bacteria with the addition of lipase. **Lwt**, v. 131, n. May, p. 109577, 2020.

ILMI, M. et al. Utilisation of Jatropha press cake as substrate in biomass and lipase production from *Aspergillus niger* 65I6 and *Rhizomucor miehei* CBS 360.62. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 9, n. November 2016, p. 103–107, 2017.

JAVED, S. et al. Bacterial lipases: A review on purification and characterization. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 132, p. 23–34, 2018.

JOSHI, R.; SHARMA, R.; KUILA, A. Lipase production from *Fusarium incarnatum* KU377454 and its immobilization using Fe₃O₄ NPs for application in waste cooking oil degradation. **Bioresource Technology Reports**, v. 5, n. November 2018, p. 134–140, 2019.

KADRI, T. et al. Bench-scale production of enzymes from the hydrocarbonoclastic bacteria *Alcanivorax borkumensis* and biodegradation tests. **Journal of Biotechnology**, v. 283, n. July, p. 105–114, 2018.

KENDIRCI, P. et al. Production of enzyme-modified cheese (EMC) with ripened white cheese flavour: II- effects of lipases. **Food and Bioproducts Processing**, v. 122, p. 230–244, 2020.

LAI, O. M. et al. **Lipase/Esterase: Properties and industrial applications**. [s.l.] Elsevier, 2018.

LARIK, I. A. et al. Biodegradation of Petrochemical Hydrocarbons Using an Efficient Bacterial Consortium: A2457. **Arabian Journal for Science and Engineering**, v. 41, n. 6, p. 2077–2086, 2016.

LIMA, R. N. et al. Versatility of *Candida antarctica* lipase in the amide bond formation applied in organic synthesis and biotechnological processes. **Molecular Catalysis**, v. 466, n. July 2018, p. 75–105, 2019.

MA, R. J. et al. Production enhancement of the extracellular lipase LipA in *Bacillus subtilis*: Effects of expression system and Sec pathway components. **Protein Expression and Purification**, v. 142, p. 81–87, 2018.

- MAGDOULI, S. et al. Valorization of raw glycerol and crustacean waste into value added products by *Yarrowia lipolytica*. **Bioresource Technology**, v. 243, p. 57–68, 2017.
- MONTEIRO, R. R. C. et al. Biotechnological relevance of the lipase A from *Candida antarctica*. **Catalysis Today**, n. November 2019, p. 1–14, 2020.
- MUSA, H. et al. Turning oil palm empty fruit bunch waste into substrate for optimal lipase secretion on solid state fermentation by *Trichoderma* strains. **Process Biochemistry**, v. 63, n. September, p. 35–41, 2017.
- NEMA, A. et al. Production and optimization of lipase using *Aspergillus niger* MTCC 872 by solid-state fermentation. **Bulletin of the National Research Centre**, v. 43, n. 1, 2019.
- OJEDA-HERNÁNDEZ, D. D. et al. Solid-state fermentation as an economic production method of lipases. **Methods in Molecular Biology**, v. 1835, p. 217–228, 2018.
- OYEDELE, S. A. et al. Enhanced lipolytic activity potential of mutant *Bacillus niaci* EMB-5 Grown on Palm Oil Mill Effluent (POME) and biochemical characterization of purified lipase. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 18, n. November 2018, p. 101017, 2019.
- PAHOJA. A Review of Enzymatic Properties of Lipase in Plants, Animals and Microorganisms. **Journal of Applied Sciences**, v. 2, n. 4, p. 474–484, 15 Mar. 2002.
- PASCOAL, A. et al. REVIEW: Novel sources and functions of microbial lipases and their role in the infection mechanisms. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 104, p. 119–126, 2018.
- PATTANAIK, L. et al. **Biofuels from agricultural wastes**. [s.l.] Elsevier Inc., 2019.
- PEREIRA-MEIRELLES, F. V.; ROCHA-LEÃO, M. H. M.; SANT'ANNA, G. L. Lipase location in *Yarrowia lipolytica* cells. **Biotechnology Letters**, v. 22, n. 1, p. 71–75, 2000.
- PHUKON, L. C. et al. Production and characterisation of lipase for application in detergent industry from a novel *Pseudomonas helmanticensis* HS6. **Bioresource Technology**, v. 309, n. April, p. 123352, 2020.
- PING, L. et al. Improvement of extracellular lipase production by a newly isolated *Yarrowia lipolytica* mutant and its application in the biosynthesis of L-ascorbyl palmitate. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 106, p. 302–311, 2018.
- PRIYANKA, P. et al. Isolation, purification and characterization of a novel solvent stable lipase from *Pseudomonas reinekei*. **Protein Expression and Purification**, v. 153, p. 121–130, 2019.
- RIOS, N. S. et al. Biotechnological potential of lipases from *Pseudomonas*: Sources, properties and applications. **Process Biochemistry**, v. 75, n. July, p. 99–120, 2018.
- SALEHMIN, M. N. I.; ANNUAR, M. S. M.; CHISTI, Y. High cell density fed-batch fermentation for the production of a microbial lipase. **Biochemical Engineering Journal**, v. 85, p. 8–14, 2014.

SALIHU, A. et al. Lipase production: An insight in the utilization of renewable agricultural residues. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 58, p. 36–44, 2012.

SARASWAT, R. et al. Production and purification of an alkaline lipase from *Bacillus* sp. for enantioselective resolution of (±)-Ketoprofen butyl ester. **3 Biotech**, v. 8, n. 12, p. 1–12, 2018.

SATHISH YADAV, K. N. et al. Differential induction, purification and characterization of cold active lipase from *Yarrowia lipolytica* NCIM 3639. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 22, p. 10663–10670, 2011.

SAYGÜN, A.; ŞAHİN-YEŞİLÇUBUK, N.; ARAN, N. Effects of different oil sources and residues on biomass and metabolite production by *Yarrowia lipolytica* YB 423-12. **JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 91, n. 9, p. 1521–1530, 2014.

SHREYA et al. Optimization of culture conditions for extracellular fungal lipase production by submerged fermentation process. **Plant Science Today**, v. 5, n. 3, p. 135–141, 2018.

TASKIN, M. et al. Lipase production with free and immobilized cells of cold-adapted yeast *Rhodotorula glutinis* HL25. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 8, p. 97–103, 2016.

XIAOYAN, L. et al. A cost-effective process for the coproduction of erythritol and lipase with *Yarrowia lipolytica* M53 from waste cooking oil. **Food and Bioproducts Processing**, v. 103, p. 86–94, 2017.

SOBRE OS AUTORES

Bruno Roswag Machado, possui graduação em Engenharia Bioquímica pela Universidade Federal do Rio Grande (FURG). Mestrando em Engenharia e Ciência de Alimentos pela Universidade Federal do Rio Grande (FURG).

Eduardo Silveira Ribeiro, possui graduação em Engenharia Bioquímica pela Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Especialização em MBA em Engenharia de Produção e Gestão da Qualidade pelo Centro Universitário UNIFACEAR, Mestrado em Biotecnologia e Biociências pela Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Doutorando em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas (UFPel).

Patrícia Silva Diaz, possui graduação em Engenharia Química pela Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial pela Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Doutorado em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas (UFPel). Docente na Universidade Federal de Pelotas (UFPel).

Susan Hartwig Duarte, possui graduação em Engenharia de Alimentos pela Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Mestrado e Doutorado em Engenharia de Alimentos pela Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Docente na Universidade Federal do Rio Grande (FURG).

CAPÍTULO 7

IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES

*Eduardo Silveira Ribeiro
Bruno Roswag Machado
Susan Hartwig Duarte
Patrícia Silva Diaz*

RESUMO

A indústria biotecnológica tem se destacado cada vez mais no cenário atual devido à ampla utilização de enzimas como biocatalisadores. Por consequência, as pesquisas nessa área também têm recebido um destaque maior. Enzimas são macromoléculas biológicas que possuem atividade catalítica. Elas são capazes de aumentar a taxa de reações bioquímicas a partir da diminuição da energia de ativação requerida pelo processo, sem alterar o equilíbrio da reação. Dentre as diversas enzimas existentes, as lipases se destacam por possuírem diversas aplicações, como por exemplo, na área de biocombustíveis, biossensores, emolientes, emulsificantes, hidrólise de óleos, entre outras. Entretanto, a utilização de enzimas solúveis em processos industriais possui algumas limitações, como o alto custo e instabilidade enzimática em diferentes condições de processo (pH, temperatura, presença de sais ou surfactantes). Para solucionar esses problemas, destaca-se a imobilização enzimática. Enzimas imobilizadas possuem uma estabilidade maior, um aumento das suas propriedades funcionais, além de permitir a sua reutilização, diminuindo os custos do processo. A imobilização enzimática pode ser dividida em três grandes técnicas: adsorção (fissorção ou quimissorção), *cross-linking* e encapsulação. Nos últimos anos, tem aumentado o número de pesquisas a respeito da aplicação de todas essas metodologias visando a imobilização e aplicação de lipases. O presente trabalho visa realizar uma revisão sobre as principais metodologias de imobilização enzimática e a aplicação dessas técnicas em lipases, assim como discutir suas principais vantagens e aplicações.

Palavras-chave: adsorção, *cross-linking*, encapsulação.

INTRODUÇÃO

A indústria biotecnológica tem se destacado cada vez mais no cenário atual devido à ampla utilização de enzimas como biocatalisadores. Dentro desse contexto, o desenvolvimento de tecnologias baseadas em enzimas torna-se uma alternativa sustentável frente aos métodos convencionais devido a sua especificidade, obtenção a partir de fontes renováveis e menor impacto ambiental (ALI et al., 2018).

Enzimas são macromoléculas biológicas que possuem atividade catalítica. Elas são capazes de aumentar a taxa de reações bioquímicas com a diminuição da energia de ativação requerida pelo processo, sem que ocorra alteração do equilíbrio da reação (MOHAMAD et al., 2015). As lipases (E.C. 3.1.1.3) fazem parte de uma classe de enzimas conhecidas como hidrolases. Elas possuem alta atividade catalítica em meio não aquoso e juntamente com suas propriedades enantioseletivas, catalisam a transesterificação de triglicerídeos para produzir biodiesel e glicerol. Muitas lipases se tornam ativas em solventes orgânicos e são capazes de catalisar uma série de reações químicas, como por exemplo, síntese de peptídeos, esterificação e transesterificação, acilação regiosseletiva de glicóis e mentol, entre outras, o que possibilita sua aplicação em diversas áreas (SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001).

Entretanto, a utilização de enzimas solúveis em processos industriais possui algumas limitações, como o alto custo e instabilidade enzimática em diferentes condições de processo (pH, temperatura, presença de sais ou surfactantes). Visando solucionar esses problemas, a imobilização enzimática se destaca por ser capaz de aumentar a estabilidade da enzima, diminuir a inibição causada pelo produto, assim como melhorar as propriedades funcionais da enzima. Além disso, a imobilização enzimática ainda permite o reaproveitamento da enzima, uma vez que ela se torna facilmente separável do meio e, por consequência, diminui os custos do processo (SHELDON; VAN PELT, 2013). Diferentes metodologias podem ser aplicadas para a imobilização de uma enzima, e tais procedimentos podem ser divididos em três grandes técnicas: adsorção (fissorção ou quimissorção), *cross-linking* e encapsulação (NGUYEN; KIM, 2017; RIBEIRO et al., 2021). Sendo assim, o presente trabalho visa fazer uma revisão teórica a respeito das principais técnicas de imobilização enzimática e sua aplicação na imobilização de lipases. Discutindo as principais vantagens e desvantagens de cada metodologia e elucidando os principais desafios dentro desse contexto.

REFERENCIAL TEÓRICO

IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA

Existem diversos métodos para imobilizar uma enzima em um suporte. Eles podem ser divididos em adsorção (fissorção ou quimissorção), *cross-linking*, (entre as próprias enzimas ou entre as enzimas e o suporte), e encapsulação, de acordo com a Figura 1.

Cada estratégia possui suas vantagens e desvantagens, e a escolha de cada uma delas vai depender de uma série de fatores, como das características físico-químicas da própria enzima e do substrato, da necessidade ou não de uma forte ligação entre a enzima e o suporte, assim como o número de vezes que se pretende reutilizar a enzima (RIBEIRO et al., 2021).

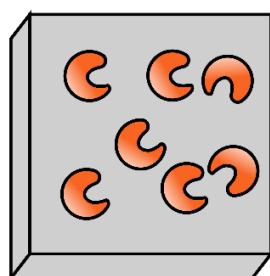
É importante destacar que além do método de imobilização a ser utilizado, também é importante fazer a escolha do suporte correto. A escolha do suporte ideal deve abranger algumas características importantes, como estabilidade química e térmica, ser inerte, ser renovável, com boas características mecânicas e possuir uma boa afinidade com a lipase, assim como possuir grupos funcionais capazes de interagir com a lipase em questão, além de possuir um baixo custo de produção (RODRÍGUEZ-RESTREPO; ORREGO, 2020; ZDARTA et al., 2018).

Dentro desse contexto de aplicação de lipases, a escolha de um suporte hidrofóbico destaca-se por ter uma interação melhor com essas enzimas além de possuir uma alta afinidade com triacilgliceróis e com ésteres de ácidos graxos, e não possuir afinidade com o glicerol. Essas características contribuem para a interação da enzima com o substrato e a posterior liberação do produto do sítio ativo da enzima dentro de alguns contextos, como na produção de biodiesel (WANG et al., 2018).

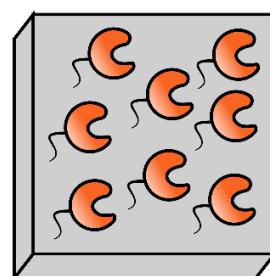
Figura 1: Imobilização enzimática pelas técnicas de adsorção física (fissorção) (A), adsorção química (quimissorção) (B), cross-linking entre as enzimas (C), cross-linking entre as enzimas e o suporte (D) e encapsulação (E).

Adsorção

A

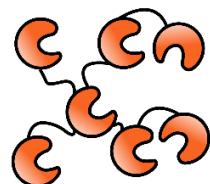


B

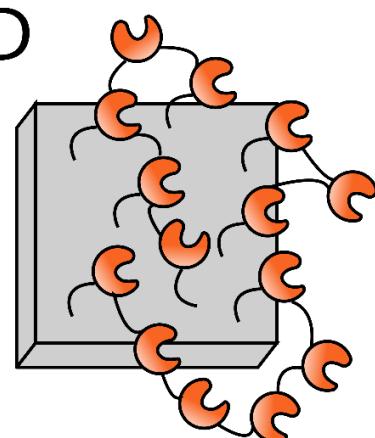


Cross-linking

C

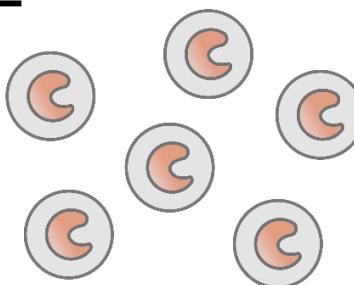


D



Encapsulação

E



Fonte: Autor

ADSORÇÃO

A adsorção física, também chamada de fisissorção, foi o primeiro método a ser descrito por Nelson e Grifin (1916), quando eles conseguiram adsorver a invertase (E.C. 3.2.1.26) em carvão. Esse procedimento de imobilização necessita, basicamente, que o suporte seja imerso em uma solução que contenha a enzima e seja incubado, por determinado tempo, para que a adsorção física ocorra. Essa adsorção ocorre através de ligações fracas e não específicas, como ligações de hidrogênio, forças de Wander Waals ou interações hidrofóbicas. Entretanto, é devido a essas ligações fracas que esse método constitui um processo reversível, onde a enzima pode ser lixiviada do suporte para o meio dependendo das condições do meio e das interações que estão ocorrendo. No geral, esse método possui como vantagens sua simplicidade, baixo custo e uma tendência a preservar a estrutura nativa da enzima. Entretanto, como já explicado, pode ocorrer lixiviação da enzima e as ligações que prendem a enzima ao suporte, por não serem específicas, não garantem que a enzima irá se ligar ao suporte com a adequada orientação, podendo ainda impedir que o substrato alcance o sítio ativo da enzima (HWANG; GU, 2013; NGUYEN; KIM, 2017). Uma forma de contornar esse problema da lixiviação seria a escolha de um suporte hidrofóbico, visto que a lipase possui uma capacidade natural para interagir com esse tipo de suporte, gerando uma interação hidrofóbica mais forte entre ambos e assegurando melhor a ligação da enzima ao suporte (ZHONG et al., 2020).

Por outro lado, a adsorção química, também conhecida como quimissorção, é um método amplamente utilizado, no qual a ligação entre a enzima e o suporte ocorre através de ligações covalentes, tornando o processo irreversível. Esse método possui como vantagem uma baixa lixiviação da enzima devido às fortes ligações que a mantém presa ao suporte, e uma camada mais uniforme formada pelas enzimas na superfície do suporte em comparação à adsorção física. Em contrapartida, as fortes ligações que mantém a enzima presa ao suporte também são capazes de desnaturar a mesma, diminuindo sua atividade catalítica, podendo até mesmo resultar em sua inativação (MARRAZZA, 2014; NGUYEN; KIM, 2017).

CROSS-LINKING

O *cross-linking* é um método baseado na formação de ligações intermoleculares entre as moléculas de enzimas, ou entre essas moléculas e o suporte, através de

reagentes bifuncionais ou multifuncionais, como o glutaraldeído, diisocianato de hexametileno, entre outros (JEGANNATHAN et al., 2008). Essa técnica foi descrita pela primeira vez na década de 1960, a qual consistia em utilizar a enzima na sua forma solúvel ou cristalizada, utilizando um agente bifuncional, sendo o glutaraldeído o mais utilizado, para ligar essas enzimas, através da sua reação com os grupos NH₂ da superfície da proteína. A aplicação dessa técnica com a enzima na sua forma solúvel, tem como consequências uma baixa atividade de retenção, baixa reprodutibilidade e baixa estabilidade mecânica, em comparação com a utilização da técnica com a enzima cristalizada. Entretanto, essa segunda opção necessita de um procedimento bastante complexo e laborioso para sua aplicação e a utilização de uma enzima com alto nível de pureza (QUIOCHE; RICHARDS, 1964; QUIOCHE; RICHARDS, 1966).

Com o passar do tempo essa técnica passou por atualizações e, mais recentemente, chegou-se à conclusão que precipitar a enzima diretamente do meio aquoso e em seguida aplicar o processo de *cross-linking*, levava ao desenvolvimento de uma nova técnica, com características distintas das opções anteriores. Essa metodologia além de ser rápida e mais simples que as anteriores, ainda oferece a vantagem de um baixo custo no processamento da enzima (*salting out*, precipitação por solvente e etc.) (LANFRANCHI et al., 2018; SHELDON; SCHOEVAART; VAN LANGEN, 2005).

ENCAPSULAÇÃO

Nesse tipo de metodologia, a enzima não necessita estar diretamente ligada à superfície do suporte, mas aprisionada dentro do mesmo, normalmente, dentro de uma rede polimérica que permite apenas a difusão do substrato até a enzima e, posteriormente, a difusão do produto para fora do suporte, enquanto a enzima permanece restringida dentro do suporte. Essa metodologia possui como principal vantagem o fato de melhorar a estabilidade enzimática, uma vez que essa encapsulação promove uma melhora no microambiente da enzima, impedindo que as condições adversas do meio, como pH e temperaturas extremas, desnaturem a enzima. Destaca-se também que esse tipo de metodologia possui como vantagem uma baixa lixiviação da enzima quando o poro do suporte for menor que o tamanho da enzima. Entretanto, esse método apresenta duas principais desvantagens: baixa transferência de massa e uma limitação física que acarreta em baixa capacidade de carregamento da enzima dentro do suporte. Ambas desvantagens podem acarretar em baixa atividade enzimática (NGUYEN; KIM, 2017).

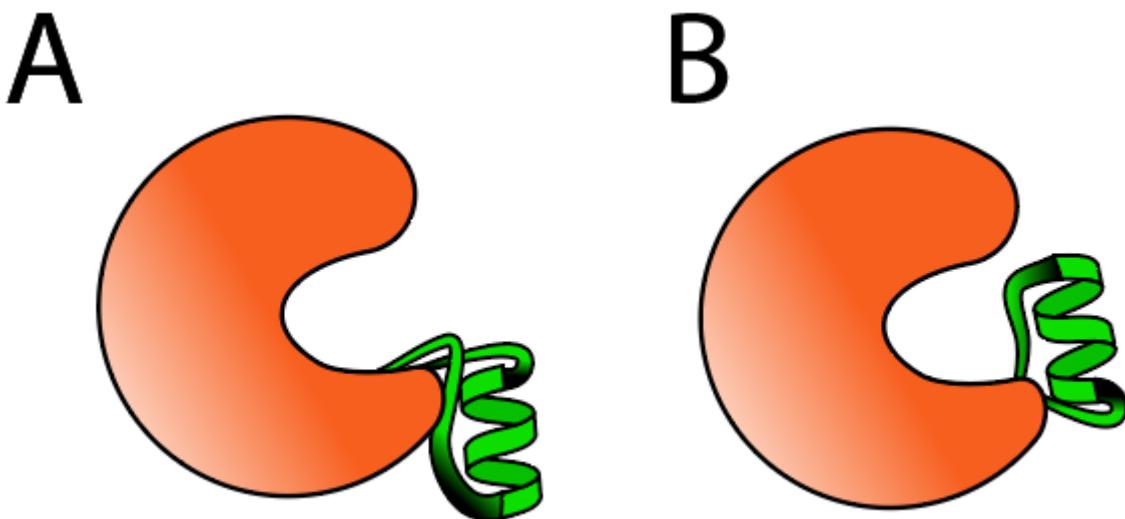
LIPASES IMOBILIZADAS

O primeiro trabalho sobre imobilização de lipases foi publicado em 1976, discutindo a respeito da especificidade de lipases imobilizada com relação a seus substratos. De lá para cá, cresceu muito as publicações a respeito desse tema, gerando centenas de artigos anualmente sobre o assunto e, por consequência, se expandiu também as áreas de aplicação desse tema. Atualmente, existem pesquisas nas mais diversas áreas, desde a área da Química, da Biotecnologia, Ciência e Tecnologia de Alimentos e Engenharia, entre outras (ALMEIDA et al., 2021).

É importante destacar que existe uma região flexível e conservada em diversas lipases conhecida como lid. Essa região pode assumir duas formas conformacionais distintas durante sua ativação interfacial, podendo acarretar na sua forma ativa (aberta) ou inativa (fechada), como mostra a Figura 2. Essa estrutura possui uma face interna hidrofóbica que interage com a parte hidrofóbica do sítio ativo. Em alguns casos, como a lipase B, extraída a partir de *Candida antarctica*, o lid é muito pequeno e não é capaz de cobrir todo o sítio ativo da enzima. Entretanto, em outros casos, como a lipase extraída a partir do *Bacillus thermocatenulatus*, a qual possui um lid duplo capaz de se mover simultaneamente durante a ativação interfacial e dificultar o processo de imobilização enzimática (CARRASCO-LÓPEZ et al., 2009; UPPENBERG et al., 1994). Na sua forma aberta, o lid se move e expõe sua tampa hidrofóbica para o meio. Dessa forma, o substrato é capaz de alcançar o sítio ativo da enzima. Entretanto, essa forma é instável em um meio aquoso e homogêneo. Nesse contexto, a imobilização da lipase em um suporte hidrofóbico é capaz de estabilizar a forma aberta da lipase (MANOEL et al., 2015; RUEDA et al., 2016).

De acordo com a literatura, a ativação interfacial da lipase é o principal fator a ser analisado dentro desse contexto de imobilização enzimática (BRZOZOWSKI et al., 1991). Como por exemplo, a lipase extraída de *Rhizopus delemar* que foi ativada quando imobilizada em cadeias enxertadas de polímeros anfifílicos presos ao suporte (YASUDA et al., 2009).

Figura 2: Lipase na sua conformação ativa (A) e inativa (B).



Fonte: Autor

De fato, existem diversos experimentos comprovando que a imobilização da lipase em suportes hidrofóbicos têm a capacidade de melhorar a sua ativação. Lee et al. (2009) utilizaram uma superfície na escala nanométrica modificada para ter caráter hidrofóbico para a imobilização de lipase suína pancreática através do método de fisissorção. Os resultados mostraram que os autores atingiram uma atividade específica de 154% em comparação com a enzima na sua forma livre e, os mesmos ainda foram capazes de reutilizar essa enzima durante 5 ciclos até resultar em queda na atividade (LEE et al., 2009).

Feng et al. (2012) também conduziram experimentos para elucidar o mecanismo de abertura do lid em lipases imobilizadas. Nos seus experimentos, eles compararam a conformação da lipase imobilizada pelo método de *cross-linking* e adsorção física em comparação com a enzima livre. Eles também concluíram que a lipase assume sua conformação ativa ao ser imobilizada em nanotubos de carbono (FENG; SUN; JI, 2012).

A hidrólise de óleos é uma das aplicações mais importantes da lipase, entretanto, uma baixa estabilidade e um alto custo dificultam a sua aplicação em larga escala (SHUAI et al., 2017). Uma das formas de contornar esse tipo de problema é a imobilização da lipase. Dentro desse contexto, já existem estudos mostrando a melhora da lipase imobilizada nesse tipo de aplicação. Li e Wu (2009) imobilizaram a lipase extraída de *Candida rugosa* em membranas de nanofibras feitas a partir de poliacrilonitrila para a hidrólise de óleo de soja. A partir desse método eles conseguiram alcançar 72% de

conversão da hidrólise do óleo de soja depois de 10 minutos de reação e foi possível atingir 85% de conversão depois de 1 hora e 30 minutos. Destaca-se que esse método de imobilização permitiu a reutilização da enzima por até vinte bateladas, com manutenção de 65% de sua atividade inicial (LI; WU, 2009).

A produção de biodiesel, sintetizado a partir da esterificação de ácidos graxos com álcoois de cadeias curtas ou pela transesterificação de triglicerídeos com álcoois de cadeias curtas consiste em outra grande aplicação das lipases (VASUDEVAN; BRIGGS, 2008). Dentro desse contexto, existem experimentos com relação à imobilização de lipase pelos mais diversos métodos, fisssorção, quimissorção, encapsulação e *cross-linking*, em que a enzima imobilizada oferece diversas vantagens em comparação à sua forma livre (ZHANG et al., 2012).

Além disso, já existem pesquisas com a imobilização de lipases em diversas outras áreas. Suas aplicações se estendem desde biossensores, detergentes, emulsificantes, cosméticos, perfumes, emolientes, saborizantes, entre outros (ALMEIDA et al., 2021; HUNG et al., 2003; IZRAEL ŽIVKOVIĆ et al., 2015).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Enzimas solúveis são capazes de catalisar diversas reações, entretanto, apenas dentro de suas condições ótimas de operação (pH, temperatura, presença de sais e etc.). Ao tratar especificamente sobre as lipases, pertencentes a uma classe de enzimas chamadas de hidrolases, ainda existe outro obstáculo a se transpor, conhecido como lid. Essa região, conservada na maioria das lipases, é uma tampa hidrofóbica capaz de ativar ou inativar a enzima.

Para contornar esses problemas, destaca-se a imobilização enzimática, uma vez que a mesma é capaz de aumentar a estabilidade da enzima, permitir a sua reutilização e diminuir os custos do processo. Ademais, no que concerne especificamente a imobilização de lipases, a utilização de um suporte hidrofóbico é capaz de interagir com o lid dessas enzimas e manter as mesmas sempre na forma ativada. A imobilização enzimática pode ser dividida em adsorção (fisssorção ou quimissorção), *cross-linking* e encapsulação. Cada uma dessas estratégias possui vantagens e desvantagens. Vale ressaltar que já existem pesquisas com todos estes métodos aplicados à imobilização de lipases. De fato, as pesquisas envolvendo imobilização de lipases tem aumentado bastante no decorrer no tempo, assim como a sua aplicação nas mais diversas áreas e pode-se esperar ainda

diversos avanços nessa área com relação a custos do processo, estabilidade enzimática, ativação enzimática, assim como novas tecnologias e aplicações para a imobilização enzimática de lipases.

REFERÊNCIAS

- ALI, M. ; HUSAIN, Q. ; SULTANA, S. ; AHMAD, M. . Immobilization of peroxidase on polypyrrole-cellulose-graphene oxide nanocomposite via non-covalent interactions for the degradation of Reactive Blue 4 dye. **Chemosphere**, v. 202, p. 198–207, 2018. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2018.03.073.
- ALMEIDA, F. L. C.; CASTRO, M. P. J.; TRAVÁLIA, B. M.; FORTE, M. B. S. Trends in lipase immobilization: Bibliometric review and patent analysis. **Process Biochemistry**, v. 110, p. 37–51, 2021. DOI: 10.1016/j.procbio.2021.07.005.
- BRZOZOWSKI, A. M.; DEREWENDA, U.; DEREWENDA, Z. S.; DODSON, G. G.; LAWSON, D. M.; TURKENBURG, J. P.; BJORKLING, F.; HUGE-JENSEN, B.; PATKAR, S. A.; THIM, L. A model for interfacial activation in lipases from the structure of a fungal lipase-inhibitor complex. **Nature**, v. 351, n. 6326, p. 491–494, 1991. DOI: 10.1038/351491a0.
- CARRASCO-LÓPEZ, C.; GODOY, C.; DE LAS RIVAS, B.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G. PALOMO, J. M.; GUISÁN, J. M.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; MARTÍNEZ-RIPOLL, M.; HERMOSO, J. A. Activation of Bacterial Thermoalkalophilic Lipases Is Spurred by Dramatic Structural Rearrangements. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 7, p. 4365–4372, 2009. DOI: 10.1074/jbc.M808268200.
- FENG, W.; SUN, X.; JI, P. Activation mechanism of *Yarrowia lipolytica* lipase immobilized on carbon nanotubes. **Soft Matter**, v. 8, n. 27, p. 7143, 2012. DOI: 10.1039/c2sm25231g.
- HUNG, T.; GIRIDHAR, R.; CHIOU, S.; WU, W. Binary immobilization of *Candida rugosa* lipase on chitosan. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 26, n. 1–2, p. 69–78, 2003. DOI: 10.1016/S1381-1177(03)00167-X.
- HWANG, E. T.; GU, M. B. Enzyme stabilization by nano/microsized hybrid materials. **Engineering in Life Sciences**, v. 13, n. 1, p. 49–61, 2013. DOI: 10.1002/elsc.201100225.
- IZRAEL ŽIVKOVIĆ, L. T.; ŽIVKOVIĆ, L. S.; BABIĆ, B. M.; KOKUNEŠOSKI, M. J.; JOKIĆ, B. M.; KARADŽIĆ, I. M. Immobilization of *Candida rugosa* lipase by adsorption onto biosafe meso/macroporous silica and zirconia. **Biochemical Engineering Journal**, v. 93, p. 73–83, 2015. DOI: 10.1016/j.bej.2014.09.012.
- JEGANNATHAN, K. R.; ABANG, S.; PONCELET, D.; CHAN, E. S.; RAVINDRA, P. Production of Biodiesel Using Immobilized Lipase—A Critical Review. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 28, n. 4, p. 253–264, 2008. DOI: 10.1080/07388550802428392.
- LANFRANCHI, E.; GRILL, B.; RAGHOEBAR, Z.; VAN PELT, S.; SHELDON, R. A.; STEINER, K.; GLIEDER, A.; WINKLER, M. Production of Hydroxynitrile Lyase from *Davallia tyermannii* (Dt HNL) in *Komagataella phaffii* and Its Immobilization as a CLEA to Generate a

Robust Biocatalyst. **ChemBioChem**, v. 19, n. 4, p. 312–316, 2018. DOI: 10.1002/cbic.201700419.

LEE, D.; PONVEL, K. M.; KIM, M.; HWANG, S.; AHN, I.; LEE, C. Immobilization of lipase on hydrophobic nano-sized magnetite particles. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 57, n. 1–4, p. 62–66, 2009. DOI: 10.1016/j.molcatb.2008.06.017.

LI, S.; WU, W. Lipase-immobilized electrospun PAN nanofibrous membranes for soybean oil hydrolysis. **Biochemical Engineering Journal**, v. 45, n. 1, p. 48–53, 2009. DOI: 10.1016/j.bej.2009.02.004.

MANOEL, E. A.; DOS SANTOS, J. C. S.; FREIRE, D. M. G.; RUEDA, N.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Immobilization of lipases on hydrophobic supports involves the open form of the enzyme. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 71, p. 53–57, 2015. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2015.02.001.

MARRAZZA, G. Piezoelectric Biosensors for Organophosphate and Carbamate Pesticides: A Review. **Biosensors**, v. 4, n. 3, p. 301–317, 2014. DOI: 10.3390/bios4030301.

MOHAMAD, N. R.; MARZUKI, N. H. C.; BUANG, N. A.; HUYOP, F.; WAHAB, R. A. An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 29, n. 2, p. 205–220, 2015. DOI: 10.1080/13102818.2015.1008192.

NELSON, J. M.; GRIFFIN, E. G. ADSORPTION OF INVERTASE. **Journal of the American Chemical Society**, v. 38, n. 5, p. 1109–1115, 1916. DOI: 10.1021/ja02262a018.

NGUYEN, H. H.; KIM, M. An Overview of Techniques in Enzyme Immobilization. **Applied Science and Convergence Technology**, v. 26, n. 6, p. 157–163, 2017. DOI: 10.5757/ASCT.2017.26.6.157.

QUIOCHE, F. A.; RICHARDS, F. M. INTERMOLECULAR CROSS LINKING OF A PROTEIN IN THE CRYSTALLINE STATE: CARBOXYPEPTIDASE-A. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 52, n. 3, p. 833–839, 1964. DOI: 10.1073/pnas.52.3.833.

QUIOCHE, F. A.; RICHARDS, F. M. The Enzymic Behavior of Carboxypeptidase-A in the Solid State *. **Biochemistry**, v. 5, n. 12, p. 4062–4076, 1966. DOI: 10.1021/bi00876a041.

RIBEIRO, E. S.; DE FARIAS, B. S.; CADAVAL JUNIOR, T. R. S.; PINTO, L. A. A.; DIAZ, P. S. Chitosan-based nanofibers for enzyme immobilization. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 183, p. 1959–1970, 2021. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2021.05.214.

RODRÍGUEZ-RESTREPO, Y. A.; ORREGO, C. E. Immobilization of enzymes and cells on lignocellulosic materials. **Environmental Chemistry Letters**, v. 18, n. 3, p. 787–806, 2020. DOI: 10.1007/s10311-020-00988-w.

RUEDA, N.; ALBUQUERQUE, T.; BARTOLOME-CABRERO, R.; FERNANDEZ-LOPEZ, L.; TORRES, R.; ORTIZ, C.; DOS SANTOS, J.; BARBOSA, O.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Reversible Immobilization of Lipases on Heterofunctional Octyl-Amino Agarose Beads

Prevents Enzyme Desorption. **Molecules**, v. 21, n. 5, p. 646, 2016. DOI: 10.3390/molecules21050646.

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. Production, purification, characterization, and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, v. 19, n. 8, p. 627–662, 2001. DOI: 10.1016/S0734-9750(01)00086-6.

SHELDON, R. A.; SCHOEVAART, R.; VAN LANGEN, L. M. Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs): A novel and versatile method for enzyme immobilization (a review). **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 23, n. 3–4, p. 141–147, 2005. ISSN: 1024-2422. DOI: 10.1080/10242420500183378.

SHELDON, R. A.; VAN PELT, S.. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. **Chem. Soc. Rev.**, v. 42, n. 15, p. 6223–6235, 2013. DOI: 10.1039/C3CS60075K.

SHUAI, W.; DAS, R. K.; NAGHDI, M.; BRAR, S. K.; VERMA, M. A review on the important aspects of lipase immobilization on nanomaterials. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 64, n. 4, p. 496–508, 2017. DOI: 10.1002/bab.1515.

UPPENBERG, J.; HANSEN, M. T.; PATKAR, S.; JONES, T. A. The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica*. **Structure**, v. 2, n. 4, p. 293–308, 1994. DOI: 10.1016/S0969-2126(00)00031-9.

VASUDEVAN, P. T.; BRIGGS, M. Biodiesel production—current state of the art and challenges. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 35, n. 5, p. 421, 2008. DOI: 10.1007/s10295-008-0312-2.

WANG, L.; YUAN, Z.; WEN, F.; CHENG, Y.; ZHANG, Y.; WANG, G. A bipolar passive DMFC stack for portable applications. **Energy**, v. 144, p. 587–593, 2018. DOI: 10.1016/j.energy.2017.12.039.

YASUDA, M.; NIKAIDO, H.; GLOMM, W. R.; OGINO, H.; ISHIMI, K.; ISHIKAWA, H. Enzyme immobilization on amphiphilic polymer particles having grafted polyionic polymer chains. **Biochemical Engineering Journal**, v. 48, n. 1, p. 6–12, 2009. DOI: 10.1016/j.bej.2009.06.011.

ZDARTA, J.; MEYER, A.; JESIONOWSKI, T.; PINELO, M. A General Overview of Support Materials for Enzyme Immobilization: Characteristics, Properties, Practical Utility. **Catalysts**, v. 8, n. 2, p. 92, 2018. DOI: 10.3390/catal8020092.

ZHANG, B.; WENG, Y.; XU, H.; MAO, Z. Enzyme immobilization for biodiesel production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, n. 1, p. 61–70, 2012. DOI: 10.1007/s00253-011-3672-x.

ZHONG, L.; FENG, Y.; WANG, G.; WANG, Z.; BILAL, M.; LV, H.; JIA, S.; CUI, J. Production and use of immobilized lipases in/on nanomaterials: A review from the waste to biodiesel production. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 152, p. 207–222, 2020. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.02.258.

SOBRE OS AUTORES

Eduardo Silveira Ribeiro, possui graduação em Engenharia Bioquímica pela Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Especialização em MBA em Engenharia de Produção e Gestão da Qualidade pelo Centro Universitário UNIFACEAR, Mestrado em Biotecnologia e Biociências pela Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Doutorando em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas (UFPel).

Bruno Roswag Machado, possui graduação em Engenharia Bioquímica pela Universidade Federal do Rio Grande (FURG). Mestrando em Engenharia e Ciência de Alimentos pela Universidade Federal do Rio Grande (FURG).

Susan Hartwig Duarte, possui graduação em Engenharia de Alimentos pela Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Mestrado e Doutorado em Engenharia de Alimentos pela Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Docente na Universidade Federal do Rio Grande (FURG).

Patrícia Silva Diaz, possui graduação em Engenharia Química pela Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial pela Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Doutorado em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas (UFPel). Docente na Universidade Federal de Pelotas (UFPel).

SOBRE AS ORGANIZADORAS

Estela Fernandes e Silva - É Biotecnologista pela Universidade Federal de Pelotas (2012), Licenciada em Biologia pela Universidade de Franca (2019), mestre (2014) e doutora (2018) pelo Programa de pós-graduação em Ciências Fisiológicas (PPG-CF) da Universidade Federal de Rio Grande (FURG). Tem experiência nas áreas de investigação de compostos antitumorais em linhagens resistentes a múltiplas drogas, criobiologia, toxicologia reprodutiva e testes in vitro para predição de fertilidade. Realizou pós-doutorado no período de abril de 2018 a fevereiro de 2019 desenvolvendo atividades junto ao Programa de Cooperação Acadêmica no projeto Resistência a Múltiplas Drogas em células tumorais - Estudo colaborativo para investigar o fenótipo e a sensibilidade a agentes quimioterápicos com diferentes alvos celulares.

Karine Laste Macagnan - Possui Graduação em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas (2012) e Formação Pedagógica para Graduados não Licenciados em Biologia pela Universidade de Franca (2019). Mestre e Doutora em Ciências pelo Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas (2014-2018). Foi bolsista de Desenvolvimento Tecnológico Industrial do CNPq - Nível B (2019 a 2021) e realizou pós-doutorado atuando como pesquisadora no Grupo de Pesquisa do CNPq "Biopolímeros Extracelulares e Intracelulares - produção, caracterização e aplicação". Desenvolve atividades de pesquisa no Laboratório de Biopolímeros CDTec/UFPel, com atuação na linha de pesquisa de produção, recuperação e caracterização de biopolímeros (extracelulares e intracelulares) obtidos através de processos fermentativos.

Tainá Figueiredo Cardoso - Bacharel em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas (2012), Mestrado em Ciências Fisiológicas - Fisiologia Animal Comparada pela Universidade Federal do Rio Grande (2014) e Doutorado em Producción Animal pela Universitat Autònoma de Barcelona (2018). Possui experiência na área de biotecnologia animal, com ênfase em genética/genômica e reprodução animal. Atualmente é pós-doutoranda pela Embrapa Pecuária Sudeste - São Carlos, SP, atuando principalmente com análises de dados massivos de genótipos e expressão gênica para estudos de associação e seleção genômica de características produtivas e estudos populacionais.

ÍNDICE REMISSIVO

Biomassas.....	25, 26, 31, 43
Bioplásticos.....	7, 9, 38, 39, 48
Biotecnologia.....	1, 2, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 21, 22, 23, 30, 34, 36, 37, 40, 51, 52, 78, 79, 91, 99, 103, 104, 105
Carbono.....	7, 16, 24, 25, 27, 28, 33, 38, 39, 40, 41, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 81, 83, 84, 85, 89, 100
Cárie dentária.....	7, 53, 54, 57, 59, 60, 61, 62
Etanol.....	7, 11, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 35
Lipases.....	8, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 87, 88, 89, 90, 92, 93, 94, 95, 98, 99, 100, 101, 102, 103
Lipases microbianas.....	8, 79, 80, 81, 82, 83, 87
Microencapsulação.....	7, 64, 66, 67, 68, 69, 74, 75
Nitrogênio.....	7, 38, 39, 40, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 81, 83, 87
Probióticos.....	7, 13, 15, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 73, 74, 75, 77, 78
Spray dryer.....	7, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 73, 74, 77
Vacinas.....	6, 7, 9, 17, 53, 54, 58, 59, 60

ISBN 978-658997392-8



A standard 1D barcode representing the ISBN number 978-658997392-8. The barcode is black on a white background, with vertical lines of varying widths.

9 786589 973928