

Imobilização em suportes sólidos para aplicação na indústria alimentícia

Gabriela Kovaleski, Fanny Kovaleski, Anaís Kovaleski, Gabriel J. D. Domingues, Bertiene M. L. Barboza

Resumo: A imobilização em suportes sólidos é uma técnica crescente nos estudos e nas indústrias alimentícias. Possui vantagens e limitações, o que leva diversos pesquisadores a buscarem melhoria e ajuste dessa técnica. O objetivo deste trabalho é examinar o desenvolvimento da pesquisa sobre diferentes aplicações da imobilização em suportes sólidos nas indústrias alimentícias e, também, quais compostos ou microrganismos estão sendo mais utilizados para imobilizar. Desta forma, realizou uma revisão de literatura sistemática, resultando em 30 trabalhos relevantes, lidos na íntegra para assim analisá-los. Como resultado obteve-se quatro aplicações e seis compostos/microrganismos imobilizantes. A retenção/extração e produção de compostos foram as principais aplicações dessa técnica, e a enzima o microrganismo mais imobilizado.

Palavras chave: Imobilização, aplicações, suporte sólidos, alimentos.

Immobilization on solid supports for application in the food industry

Abstract: Immobilization on solid supports is a technique that has been used more in studies and in the food industries. It has advantages and limitations, which leads several researchers to seek improvement and adjustment of this technique. This paper aims to examine the development of research on different applications of immobilization on solid supports in the food industries and also which compounds or microorganisms are being most used for immobilization. Thus, a systematic literature review was conducted, resulting in 30 relevant papers, read in full to be analyzed. As a result, four applications and six immobilizing compounds / microorganisms were obtained. Retention / extraction and production of compounds were the main applications of this technique, and the enzyme the most immobilized microorganism according to the study.

Keywords: Immobilization, applications, solid support, food

1. Introdução

A imobilização celular é uma técnica biotecnológica na qual as células podem ser encapsuladas ou aprisionadas em um suporte (BOFO; CASTRO; MEDEIROS, 2005), e essas são impedidas de se mover independentemente do que está ao seu redor, para a fase aquosa do sistema em estudo (TAMPION & TAMPION, 1988). No espaço onde as células estão confinadas, são mantidas suas atividades catalíticas, em processos de operação contínua ou descontínua (COVIZZI et al., 2007).

Essa técnica iniciou-se em 1916 quando Nelson e Griffin relataram que a enzima invertase, quando adsorvida em carvão ativado, tinha a mesma atividade que a enzima solúvel, mas foi a partir dos anos 80 que os estudos começaram a evoluir (KOVALESKI, 2019). Hoje, as pesquisas estão relacionadas a novas técnicas, procedimentos, suportes, a diferentes microrganismos, etc.

Uma das técnicas utilizadas na imobilização celular é em superfície/suportes sólidos, onde a célula é ligada ao suporte através da adsorção, ligação eletrostática e ligação covalente. Segundo Mendes (2009, p.13) as principais características a serem observadas são: “área

superficial, permeabilidade, insolubilidade, capacidade de regeneração, morfologia e composição, natureza hidrofílica ou hidrofóbica, resistência ao ataque microbiano, resistência mecânica, custos e outras”.

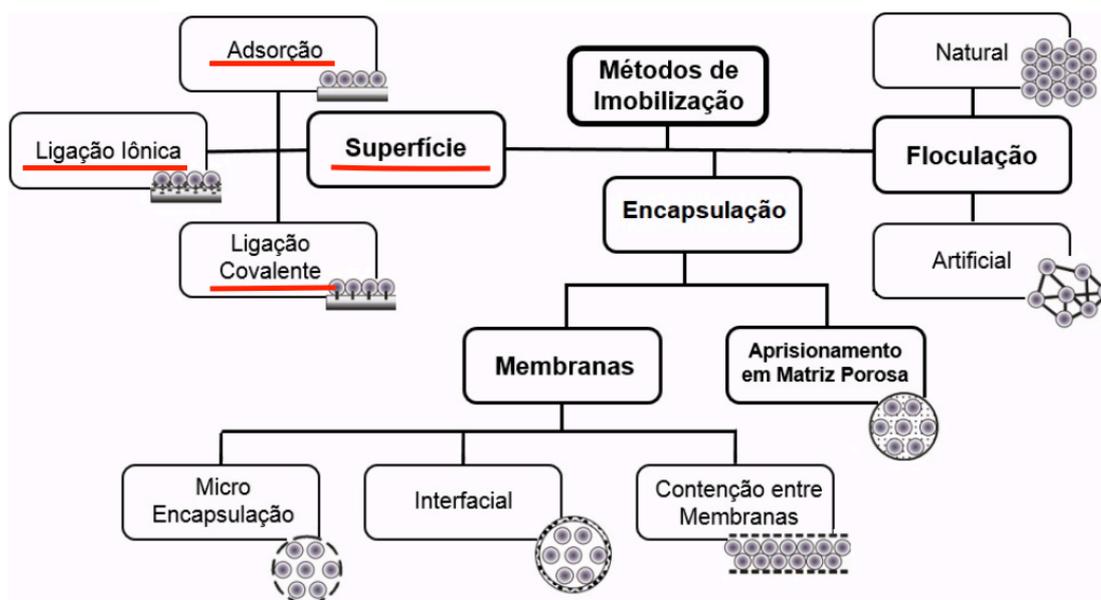
A indústria alimentícia é uma das grandes áreas que utiliza essa técnica por possuir vantagens quando comparado com o sistema de células livres, como o aumento de produção e diminuição de custos (Groboillot, 1994), eliminação de etapas do processo como etapas de extração, isolamento, filtração e purificação, reutilização das células, etc. Mas também há técnica com limitações: pode ser mais caro, a transferência de massa pode afetar a fisiologia e cinética do sistema e a matriz pode-se romper (COVIZZI et al., 2007).

O presente trabalho tem como objetivo revisar, através de pesquisas publicadas, as diferentes aplicações da técnica de imobilização em suporte sólido, e demonstrar quais compostos ou microrganismos estão sendo imobilizados para aplicar na indústria alimentícia.

2. Metodologia

O trabalho consistiu em uma revisão sistemática de literatura, um processo essencial para a compreensão inicial do tema pesquisado, com o objetivo de conhecer os estudos e autores de referência na área.

A revisão de literatura foi realizada na base de dados *Scopus*, os artigos encontrados foram migrados para o programa *Mendeley*, onde os autores puderam gerenciar os documentos de pesquisa. Para filtrar os documentos encontrados foram usadas Tags durante a leitura dos resumos diferenciando os artigos que deveriam ser lidos e excluídos da revisão. Para a seleção dos artigos era necessário apresentar na pesquisa a imobilização em suportes sólidos/superfície, como grifado na Figura 1, e os artigos que apresentavam os outros métodos foram excluídos.



Fonte: Kovaleski (2019)

Figura 1- Diferentes Métodos da Imobilização

A fim de relacionar os temas em questão, na pesquisa pelo *Scopus* utilizou-se as palavras-chave “*Immobilization*”, “*solid supports*” e “*food*”. Todas as palavras deveriam estar presentes em “Title, Abstract, Keywords. Assim, o próximo tópico traz os resultados e discussão dos artigos encontrados.

3. Resultados

A busca sistemática resultou em 58 artigos publicados em revistas e conferências, sendo que apenas 30 estudos relatam a imobilização em suportes sólidos na indústria alimentícia e foram considerados relevantes para a pesquisa. Através desses artigos, primeiramente construiu-se um gráfico (Gráfico 1) para demonstrar as aplicações dessa técnica biotecnológica.

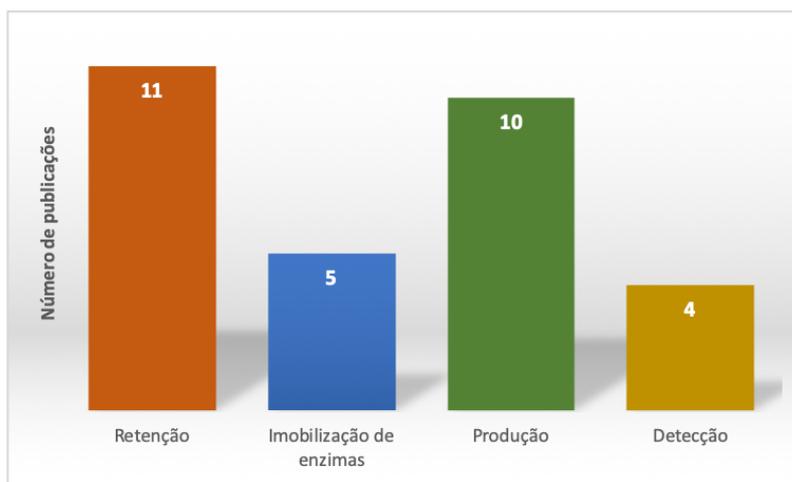


Gráfico 1- Aplicações da imobilização em suportes sólidos na indústria alimentícia

Com o gráfico, observa-se que 37% dos artigos encontrados estudam a imobilização em suportes sólidos para retenção/extração/filtração de compostos, 17% estudam a imobilização de enzimas para aplicação em alimentos, 33% produzem algum composto, e 13% fazem a detecção de componentes através dos suportes sólidos.

A retenção de compostos através da imobilização em suportes sólidos começa com a preocupação da emissão de eteno gerado nas indústrias, e através de bactérias imobilizadoras de eteno Ginkel et al. (1986) reduziram essa emissão. Em 2016 Prasety et al. também se preocupam com as toxinas liberadas pelas indústrias, mas utilizaram a imobilização de enzimas para a retenção.

Melo et al. (2004) e Raikovi et al. (2019) utilizaram suportes sólidos para extração em fase sólida de pesticidas em uvas, e toxinas presentes em grãos, respectivamente. Outra pesquisa também demonstra a retenção de uma toxina (ocratoxina A) presente em grãos, cereais e carnes, na qual conseguiu-se 91% de rendimento de recuperação da toxina em amostras de cerveja (RHOUATI et al., 2011).

A formação de proteínas residuais ainda é um problema para a instabilidade de bebidas, pois essas moléculas podem precipitar durante o armazenamento causando o aparecimento de sedimentos. Liburdi, Benucci e Esti (2013) e Benucci et al. (2018) imobilizaram enzimas em suportes sólidos para melhorar a estabilidade de vinhos através de enzimas proteolíticas ligadas covalentemente nos suportes. Em sucos de frutas, como de maçã e uva, essa técnica

ajuda na preservação dos sucos, utilizando compostos antimicrobiano e anticorpos imobilizados para a extração de compostos (GÓMEZ, 2019; TURRILLAS, 2011).

A aplicação de antimicrobianos para preservação de alimentos pode ser um problema por possuírem odores fortes e também pela demanda de alimentos naturais, sem compostos químicos. Uma das alternativas para esses problemas é introduzir antimicrobianos imobilizados em suportes sólidos, para que esses não fiquem em contato direto com os componentes alimentares, como fizeram Ribes et al. (2017) e Ibargure et al. (2016).

A produção de compostos através de microrganismos imobilizados em suportes sólidos também é uma forma de melhorar e aumentar a produção. Karimi et al. (2014) imobilização endoinulinase para a produção em larga escala de xarope com alto teor de frutose. Huallanco et al. (2010) estudaram um modelo para a obtenção de frutooligossacarídeos, que são adoçantes alternativos em alimentos. Produção de emulsificantes por lipases imobilizadas também foi estudado (PLOU et al., 1996). Na fermentação alcoólica também é possível utilizar os suportes com microrganismos, como em cerveja, suco de uva e a produção de bioetanol (MOROZOY et al., 2019; BERLOWSKA et al., 2013; IZMIRLIGL & DEMIRCI, 2016).

O aumento da produção da lisozima humana por *Kluyveromyces lactis* foi estudada por ser mais eficaz em comparação com a lisozima do ovo de galinha (ERCAN & DEMIRCI, 2014). A produção de produtos lácticos aumentara devido um maior crescimento celular nos suportes sólidos (TEH et al., 2010). Em 2003 e 2005 os autores Bergmaier, Champagne e Lacroix, estudaram o crescimento e a produção de exopolissacarídeos através de *Lactobacillus rhamnosus* imobilizados por adsorção em suportes.

O melhoramento da imobilização de enzimas ainda é presente nas pesquisas, diversificando os suportes, microrganismos, meio, etc. Veesar, Solangi e Memon (2015) vê esse melhoramento como alternativa de custos das enzimas nas indústrias. Junqueir et al. (2019) imobilizaram enzimas produzidas por fermentação de resíduos de acerola, goiaba, mandioca e macarujá. A enzima transglutaminase é empregada nas indústrias alimentícias para modificação e marcação de proteínas por isso Grigolett et al. (2017) e Zhou et al. (2016), estudaram como imobilizar essa enzima em suportes.

Para a detecção de compostos em alimentos é utilizado microrganismos imobilizados em suportes sólidos, chamados de biossensores e imunosensores. Traços de íons metálicos em amostras de alimentos infantis foram determinados através de biossorvente (BAYTAK & TURKER, 2005). Biossensores foram utilizados para detectar pesticidas, glicose e cloranfenicol em amostras (POUREASL et al., 2014; PARK & KIM et al., 2016; TOFINO et al., 2001).

Através dessa revisão também foi possível observar quais compostos ou microrganismos estão sendo imobilizados para aplicar na indústria alimentícia (Gráfico 2).

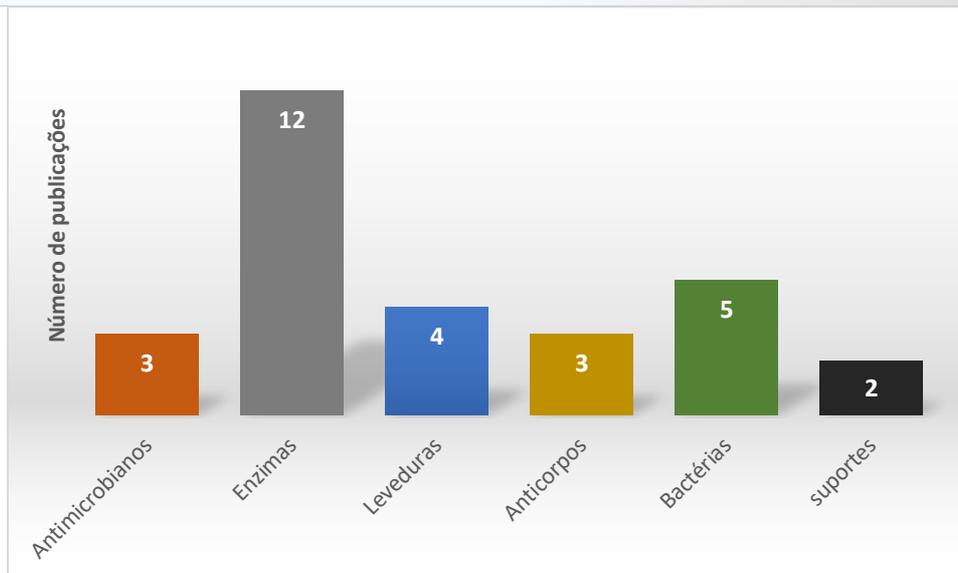


Gráfico 2- Agentes imobilizadores em suportes sólidos na indústria alimentícia

Encontrou-se 5 agentes imobilizantes: 40% dos artigos encontrados estudam imobilizam enzimas, 3% de anticorpos e antimicrobianos, 4% leveduras e 5% bactérias. Também há 2% dos estudos utilizando apenas suportes sólidos, sem agentes imobilizantes.

Como já citado, a imobilização celular começou com a imobilização de enzimas em 1916 e até hoje está sendo estudadas, pois essas geram produtos de grandes utilidades. Antimicrobianos são utilizados para a preservação de alimentos, para que durante o processamento não ocorra nenhuma contaminação. Alguns anticorpos foram utilizados para a detecção de compostos nos alimentos. As leveduras fornecem a fermentação de muitos produtos alimentares, por isso aumentar o crescimento celular e conseguir reutiliza-las é o ideal para as indústrias. As bactérias são diversificadas, podem ser utilizadas para a produção, retenção e detecção de compostos.

Os suportes sólidos também podem ser utilizados sem nenhum microrganismo, apresentando a função de extração de compostos, esses estudos são amplos pois além de serem utilizados para a indústria de alimentos também utiliza-se nas indústrias farmacêuticas, têxtil, detergentes, cosméticos, etc.

Um gráfico do número de publicações por ano foi construído para demonstrar a evolução dessa técnica na indústria alimentícia (Gráfico 3).

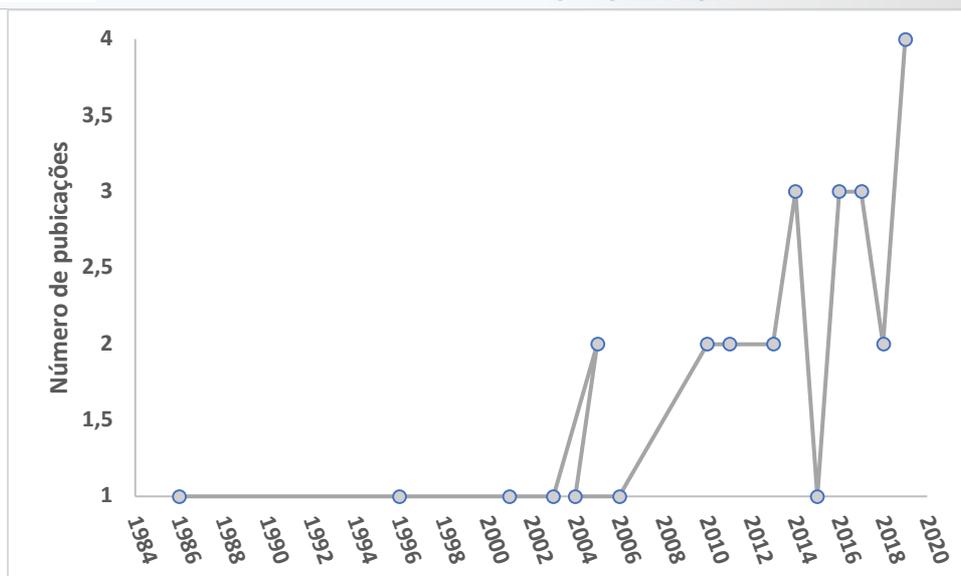


Gráfico 3- Evolução dos estudos da imobilização em suportes sólidos na indústria de alimento

Segundo Elakkiya, Prabhakaran e Thirumarimurugan (2016) a imobilização vem ganhando importância em diversas áreas nos últimos anos, e com esse trabalho observamos que nos estudos da imobilização para a indústria alimentícia também há um aumento.

4. Conclusão

Este estudo teve como principal objetivo conhecer de modo geral o que a academia aborda sobre a técnica de imobilização, buscando através de uma análise sistemática de literatura os artigos para analisar, desta forma cumprindo o objetivo proposto.

Com essa revisão sistemática percebe-se que a técnica de imobilização em suportes sólidos possui várias aplicações na indústria alimentícia, principalmente para a retenção e produção de compostos, também ressaltamos que as enzimas são os microrganismos mais estudados para imobilizar.

A contribuição deste trabalho está em reconhecer que há uma literatura dos temas em questões. Os autores reconhecem que a pesquisa foi limitada, podendo trazer em futuros estudos uma análise mais aprofundada e uma revisão de literatura mais abrangente em outras bases de dados.

Ficou evidente que muitos estudos buscam o melhoramento da técnica, assim, podemos concluir trazendo novas indagações para futuras pesquisas, como por exemplo, quais tipos de suportes estão sendo utilizados para a imobilização.

Referências

ALVARADO-HUALLANCO, Mónica B.; MAUGERI-FILHO, Francisco. Kinetics and modeling of fructo-oligosaccharide synthesis by immobilized fructosyltransferase from *Rhodotorula* sp. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 85, n. 12, p.1654-1662, 9 nov. 2010.

- BAYTAK, S; TURKER, A. R. The use of immobilized on Amberlite XAD-4 as a new biosorbent for the column preconcentration of iron(III), cobalt(II), manganese(II) and chromium(III). **Talanta**, v. 65, n. 4, p.938-945, 28 fev. 2005.
- BENUCCI, Ilaria et al. Chitosan/clay nanocomposite films as supports for enzyme immobilization: An innovative green approach for winemaking applications. **Food Hydrocolloids**, v. 74, p.124-131, jan. 2018.
- BERGMAIER, D.; CHAMPAGNE, C.P.; LACROIX, C. Exopolysaccharide production during batch cultures with free and immobilized *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, n. 5, p.1049-1057, nov. 2003.
- BERGMAIER, D.; CHAMPAGNE, C.P.; LACROIX, C. Growth and exopolysaccharide production during free and immobilized cell chemostat culture of *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, n. 2, p.272-284, fev. 2005.
- BERLOWSKA, Joanna; KREGIEL, Dorota; AMBROZIAK, Wojciech. Enhancing adhesion of yeast brewery strains to chamotte carriers through aminosilane surface modification. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 29, n. 7, p.1307-1316, 19 fev. 2013.
- BOFO, D. C. S.; CASTRO, H. F.; MEDEIROS, M. B. Comparação da eficiência de imobilização das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* CB-IX (osmotolerantes) e *S. Cerevisiae* ATCC 9763, em bagaço e cana-de-açúcar. **Brazilian Journal of Food Technology**, São Paulo, mar. 2005.
- COVIZZI, L. G.; *et al.* Imobilização de células microbianas e suas aplicações biotecnológicas. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas, Londrina**, v. 28, n. 2, p. 143-160, jul/dez. 2007.
- ERCAN, Duygu; DEMIRCI, Ali. Enhanced human lysozyme production in biofilm reactor by *Kluyveromyces lactis* K7. **Biochemical Engineering Journal**, v. 92, p.2-8, nov. 2014.
- ELAKKIYAL, M.; PRABHAKARAN, D.; THIRUMARIMURUGAN, M. Methods of cell immobilization and its applications. **International Journal of Innovative Research in Science**, v. 5, n.4, 2016.
- ESTEVE-TURRILLAS, Francesc A. et al. Development of immunoaffinity columns for pyraclostrobin extraction from fruit juices and analysis by liquid chromatography with UV detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 30, p.4902-4909, jul. 2011.
- GRIGOLETTO, Antonella et al. Covalent immobilisation of transglutaminase: stability and applications in protein PEGylation. **Journal of Drug Targeting**, v. 25, n. 9-10, p.856-864, 13 ago. 2017.
- GROBOILLOT, A. et al. immobilization of cells for application in the food industry. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 14, p. 75-107, 1994.
- IBARGUREN, Carolina et al. Adsorption of Nisin on Montmorillonite: A Concentration Strategy. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 41, n. 2, jun. 2016.

- IZMIRLIOGLU, Gulden; DEMIRCI, Ali. Ethanol production in biofilm reactors from potato waste hydrolysate and optimization of growth parameters for *Saccharomyces cerevisiae*. **Fuel**, v. 181, p.643-651, out. 2016.
- JUNQUEIRA, L.I. Partial Characterization and Immobilization of Carboxymethylcellulase from *Aspergillus Niger* Produced by Solid-State Fermentation. **Revista Mexicana de Ingeniería Química**, v. 18, n. 1, p.241-250, 1 abr. 2019.
- KARIMI, Mahsan et al. Immobilization of endo-inulinase on poly-d-lysine coated CaCO₃ micro-particles. **Food Research International**, v. 66, p.485-492, dez. 2014.
- KOVALESKI, Gabriela. **Estudo da imobilização celular de *Saccharomyces cerevisiae* em alginato de cálcio**. 2019. 79 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa 2019.
- LIBURDI, Katia; BENUCCI, Ilaria; ESTI, Marco. Study of Two Different Immobilized Acid Proteases for Wine Application. **Food Biotechnology**, v. 24, n. 3, p.282-292, 31 ago. 2010.
- MELO, Lucio F.C; COLLINS, Carol H.; JARDIM, Isabel C. S. F. New materials for solid-phase extraction and multiclass high-performance liquid chromatographic analysis of pesticides in grapes. **Journal of Chromatography A**, v. 1032, n. 1-2, p.51-58, abr. 2004.
- MENDES, A. A. **Seleção de suportes e protocolos de imobilização de lipases para síntese enzimática de biodiesel**. 2009. 194 f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2009.
- MOROZOVA, Ksenia; ARMANI, Mariachiara; SCAMPICCHIO, Matteo. Isothermal calorimetry for monitoring of grape juice fermentation with yeasts immobilized on nylon-6 nanofibrous membranes. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, p.20-35, 27 maio 2019.
- ORNELIS, Vincent et al. Counteracting in Vitro Toxicity of the Ionophoric Mycotoxin Beauvericin—Synthetic Receptors to the Rescue. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 84, n. 16, p.10422-10435, 8 ago. 2019.
- PARK, In-seon; KIM, Namsoo. Development of a chemiluminescent immunosensor for chloramphenicol. **Analytica Chimica Acta**, v. 578, n. 1, p.19-24, set. 2006.
- PEÑA-GÓMEZ, Nataly et al. Study of apple juice preservation by filtration through silica microparticles functionalised with essential oil components. **Food Control**, v. 106, p.1-15, dez. 2019.
- PLOU, Francisco J. et al. High-yield production of mono- and di-oleylglycerol by lipase-catalyzed hydrolysis of triolein. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 18, n. 1, p.66-71, jan. 1996.
- POURASL, Ali H et al. Analytical modeling of glucose biosensors based on carbon nanotubes. **Nanoscale Research Letters**, v. 9, n. 1, p.33-40, 2014.

PRASETYO, Endry Nugroho et al. Laccase oxidation and removal of toxicants released during combustion processes. **Chemosphere**, v. 144, p.652-660, fev. 2016.

PULIDO-TOFIÑO, P.; BARRERO-MORENO, J.M.; PÉREZ-CONDE, M.C. Sol-gel glass doped with isoproturon antibody as selective support for the development of a flow-through fluoroimmunosensor. **Analytica Chimica Acta**, v. 429, n. 2, p.337-345, fev. 2001.

RHOUATI, Amina et al. Development of an oligosorbent for detection of ochratoxin A. **Food Control**, v. 22, n. 11, p.1790-1796, nov. 2011.

RIBES, Susana et al. Eugenol and thymol immobilised on mesoporous silica-based material as an innovative antifungal system: Application in strawberry jam. **Food Control**, v. 81, p.181-188, nov. 2017.

TAMPION, J.; TAMPION, M.D. **Immobilized cells: principles and applications**. Cambridge University Press. 1988.

TEH, Sue-siang et al. Growth characteristics of agrowaste-immobilised lactobacilli in soymilk during refrigerated storage. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 45, n. 10, p.2089-2095, 24 ago. 2010.

VAN GINKEL, C. G. et al. Removal of ethene to very low concentrations by immobilised mycobacterium E3. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 36, n. 12, p.593-598, 24 abr. 2007.

VEESAR, Irshad Ali; SOLANGI, Imam Bakhsh; MEMON, Shahabuddin. Immobilization of α -amylase onto a calix[4]arene derivative: Evaluation of its enzymatic activity. **Bioorganic Chemistry**, v. 60, p.58-63, jun. 2015.

ZHOU, Jian Qin; HE, Ting; WANG, Jian Wen. The microbial transglutaminase immobilization on carboxylated poly(N-isopropylacrylamide) for thermo-responsivity. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 87-88, p.44-51, jun. 2016.