

IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS EM ARGILAS PARA A PRODUÇÃO DE ÉSTERES DE ETILA: UMA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA



<https://doi.org/10.22533/at.ed.411142514015>

Data de aceite: 28/01/2025

Deise Molinari

Doutora em Engenharia Química,
Universidade Estadual de Maringá,
Maringá, Paraná, Brasil

Ana Caroline Raimundini Aranha

Doutora em Engenharia Química,
Universidade Estadual de Maringá,
Maringá, Paraná, Brasil

Emerson Barrios Mogollón

Doutorando em Engenharia Química,
Universidade Estadual de Maringá,
Maringá, Paraná, Brasil

Lucas Silva Figueiredo

Engenheiro Químico e Especialista
de Engenharia de Petróleo e Gás,
Universidade Estadual do Oeste do
Paraná, Toledo, Paraná, Brasil

Bruno Rafael Del Rio Vieira

Doutorando em Engenharia Química,
Universidade Estadual de Maringá,
Maringá, Paraná, Brasil

Daiane Marques de Oliveira

Doutora em Engenharia Química,
Universidade Estadual de Maringá,
Maringá, Paraná, Brasil

RESUMO: Este artigo de revisão explora os avanços na modificação de argilas, com foco na ativação ácida e suas aplicações como suporte para imobilização de enzimas. São apresentados os principais estudos sobre a influência de diferentes ácidos, concentrações e condições de tratamento na estrutura e propriedades das argilas, como cristalinidade, área específica e porosidade. A imobilização enzimática, em particular de lipases, é discutida como uma estratégia promissora para aumentar a estabilidade e eficiência catalítica em processos industriais, incluindo a produção de biodiesel. A análise dos métodos de imobilização, como adsorção e ligação covalente, revela os desafios e oportunidades na utilização de argilas naturais e modificadas como suporte. Este trabalho contribui para a compreensão das interações entre as enzimas e os suportes, reforçando a importância da escolha criteriosa dos materiais e das condições de imobilização para aplicações específicas.

PALAVRAS-CHAVE: Argilas; Enzimas; Ésteres de Etila; Imobilização.

INTRODUÇÃO

A modificação e funcionalização de argilas para aplicações industriais, incluindo o uso como suporte para imobilização de enzimas, têm recebido destaque devido à versatilidade dessas matrizes naturais e sintéticas. As argilas, como a atapulgita e a bentonita, apresentam características estruturais e químicas que podem ser modificadas por tratamentos específicos, como ativação ácida, intercalação e pilarização, permitindo o ajuste de suas propriedades para diferentes finalidades. Estudos demonstram que os tratamentos com ácidos, como HCl, H₂SO₄ e H₃PO₄, são eficazes na remoção de impurezas e na modificação da cristalinidade, área específica e porosidade das argilas. Essas modificações são particularmente vantajosas para aplicações em catálise enzimática, como a imobilização de lipases (Foletto *et al.*, 2003; Hussin *et al.*, 2011; Pereira Neto *et al.*, 1993).

A imobilização enzimática em suportes de argila possibilita maior estabilidade operacional, facilidade de recuperação e reutilização das enzimas, o que é crucial em processos industriais, como a produção de biodiesel. No entanto, a escolha do método de imobilização e do suporte depende de fatores como a natureza química da enzima e as condições operacionais (Foletto *et al.*, 2003; Hussin *et al.*, 2011; Pereira Neto *et al.*, 1993). Este artigo de revisão aborda as principais estratégias de modificação de argilas, os avanços na ativação ácida e as aplicações dessas matrizes como suporte na imobilização de enzimas, destacando a relevância desse tema no desenvolvimento de processos sustentáveis e eficientes.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Enzimas

As enzimas são catalisadores biológicos formados por longas cadeias de aminoácidos, sendo bastante versáteis e possuindo propriedades que as tornam altamente requisitadas como catalisadores (Patel, 2002). A ação catalítica das enzimas ocorre em uma região chamada sítio ativo, que é composta por resíduos de aminoácidos chamados de grupos catalíticos (Berg *et al.*, 2012). A eficiência catalítica das enzimas é, em geral, muito maior que a dos catalisadores sintéticos ou inorgânicos (Lehningner *et al.*, 1993). Possuem um alto grau de especificidade por seus substratos e aceleram as reações químicas, além de atuar em condições brandas de temperatura, pH e pressão atmosférica e colaborar para a redução de problemas ambientais e toxicológicos (Lehningner *et al.*, 1993; Patel, 2002).

Cada enzima possui uma massa molar e um tamanho diferente, que irão depender de sua estrutura. Assim como as proteínas, as enzimas possuem massa molar que pode variar entre 12.000 até 1 milhão de Dáltons e, por isso, consideradas macromoléculas (Nelson; Cox, 2002). A nomenclatura para cada enzima é designada de dois nomes e uma classificação de quatro números. O nome aceito ou recomendado para uso cotidiano e

o nome sistemático usado para minimizar ambiguidade. As enzimas são classificadas e denominadas segundo a natureza das reações químicas que catalisam. São geralmente denominadas pela adição do sufixo –ase ao nome do substrato da enzima ou da frase que descreve a ação catalítica da enzima, por exemplo, a urease que catalisa a hidrólise da ureia (Voet; Voet, 2013).

Catalisadores inorgânicos como ácidos, bases, óxidos e metais, geram subprodutos indesejáveis e ainda podem apresentar grande dificuldade de separação dos produtos após a reação, porém, tudo isso pode ser contornado com a utilização de enzimas, o que é muito importante do ponto de vista industrial (Bom; Pereira, 1999), principalmente, pelo fato de diminuir o custo energético, visto o aumento da preocupação com o ambiente e com a qualidade dos produtos (Matos, 2011).

É certo que o uso de enzima possui um custo maior, mas isso pode ser minimizado com técnicas de imobilização. O uso de enzimas imobilizadas pode contribuir para a viabilidade de processos enzimáticos, pois torna a enzima reaproveitável e proporciona sua separação do meio reacional, o que acarreta na economia significativa no custo global do processo, desde que o procedimento de imobilização não seja muito dispendioso, haja boa recuperação da atividade enzimática e que a meia-vida operacional da enzima imobilizada seja suficientemente longa (Awadallak *et al.*, 2013).

A classe das enzimas hidrolíticas é a que encontra maior aplicação em vários setores industriais. Dentre estas enzimas pode-se destacar as lipases que promovem as reações de esterificação e transesterificação.

Lipases

As lipases fazem parte da família das hidrolases, também conhecidas como glicerol-éster hidrolases (E.C.3.1.1.3), de acordo com o Comitê de Nomenclaturas da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (NC-IUBMB). São enzimas que catalisam a hidrólise total ou parcial de triacilgliceróis (TAG), diacilgliceróis (DAG), monoacilgliceróis (MAG), glicerol e ácidos graxos livres (AGL). São capazes de catalisar reações de hidrólise e síntese de grupos ésteres de diversos compostos (Babicz *et al.*, 2010). Lipases também podem atuar em reações de síntese, como transesterificação e esterificação (Guldhe *et al.*, 2015).

São amplamente encontradas na natureza, podendo ser extraídas de plantas, animais ou/e principalmente de microrganismos naturais ou geneticamente modificados (Schmid; Verger, 1998).

Algumas lipases são enzimas de interface e tem como traço característico a sua ativação em meio a uma interface hidrofóbica e, na ausência dessas interfaces, alguns elementos de sua estrutura secundária, que é uma α -hélice curta e anfífila chamada de “lid” ou tampa, cobrem seus sítios ativos impedindo o contato com outros substratos.

Quando em contato com uma interface ocorre o fenômeno da ativação superficial, em que essas estruturas “se abrem” expondo sua parte hidrofóbica que poderá interagir com a interface, conferindo funcionalidade à enzima (Batista, 1998).

Esse fenômeno não pode ser utilizado para classificar lipases, pois nem todas apresentam uma “lid” que recobre o sítio ativo (Schmid; Verger, 1998). Existem lipases conhecidas como regiosseletivas ou regiospecíficas, que representa a capacidade de atuar em ligações específicas nos triacilgliceróis, como por exemplo, nas ligações de posições 1,3 da molécula de triacilglicerol. Ainda existem também, as lipases não regiosseletivas, que podem atuar nas posições 1,2 e 3 da molécula de triacilglicerol (Li *et al.*, 2010).

A principal configuração de lipase pertence ao grupo das α/β hidrolase, sendo composto por seis α -hélices e oito folhas- β intercaladas. O sítio catalítico é composto por uma tríade formada por Ser-His-Asp (Glu em vez de Asp para algumas lipases) (Arand *et al.*, 2005; Bornscheuer, 2002).

Mecanismos de Atuação das Lipases nas Reações de Esterificação, Transesterificação e Hidrólise

No caso de reações de modificação de lipídeos, as lipases diminuem a energia de ligação entre o carbono ligado ao oxigênio (por simples ligação) nos ésteres. Essa posição se torna reativa (Marangoni; Rousseau, 1995), permitindo a hidrólise dos ésteres carboxílicos em meio aquoso ou a reação reversa de esterificação dos ácidos carboxílicos em meio a solventes orgânicos e, ainda, a esterificação cruzada (transesterificação) em meio alcoólico (Reetz, 2002).

As etapas do mecanismo de esterificação das lipases são as seguintes:

- 1 - Quando o lipídeo se liga ao sítio catalítico, há uma interação entre a amina da Histidina (His) e a hidroxila presente na Serina (Ser), que por sua vez, ataca o carbono do grupo carbonil do substrato, formando um intermediário tetraédrico.
- 2 - Em seguida, os elétrons do resíduo de Histidina que estão presentes no hidrogênio ligado à amina, retornam para a histidina, e então o próton (H^+) é atacado pelo oxigênio da hidroxila do ácido graxo liberando uma molécula de água e deixando a enzima na sua forma acilada.
- 3 - Posteriormente, outro tetraedro intermediário é formado, quando a carbonila ($C=O$) presente no éster formado com a Serina sofre um ataque dos elétrons presentes no oxigênio do álcool.
- 4 - Por fim, o átomo de oxigênio presente na enzima formado pelo complexo é eliminado, e os elétrons da Histidina que estão presentes no hidrogênio ligado à amina, retornam novamente para a Histidina e o próton formado (H^+) volta para o oxigênio ligado ao resíduo da Serina. Então, o sítio catalítico da enzima retorna ao seu estado inicial e a molécula de monoéster alquílico é liberada (Al-Zuhair *et al.*, 2007).

O mecanismo da transesterificação enzimática segue caminho semelhante, porém ocorre a liberação de uma molécula de di ou monoglicerídeo ao invés de uma molécula de água a partir da decomposição do primeiro intermediário tetraédrico. No mecanismo de hidrólise a água ocupa o lugar do álcool, que é liberado após a formação do complexo acil-lipase, então, um segundo ataque nucleofílico acontece, realizando a hidrólise deste complexo enzimático, formando um ácido graxo que é liberado (Jaeger *et al.*, 1999).

Lipase de Burkholderia cepacia

A lipase de *Burkholderia cepacia* é uma das enzimas que podem ser utilizada na produção de ésteres. A lipase produzida pela bactéria *Burkholderia cepacia* (LBC) foi reclassificada com este nome em 1995, até então, se chamava *Pseudomonas cepacia*. Aplicada geralmente em reações orgânicas, da mesma forma que a maior parte das lipases que necessita de uma interface orgânico-aquosa capaz de deslocar a tampa que regula o acesso ao seu sítio ativo. É uma enzima não regiosseletiva com massa molar de 33 kDa, ponto isoelétrico em pH 5,2 e de tamanho de 5 nm (Padilha *et al.*, 2012; Schmid; Verger, 1998). A LBC contém um íon de cálcio (Ca^{2+}) em sua estrutura, que estabiliza o ponto em que ocorre a conexão das folhas- β presentes nos resíduos de aminoácidos 214-218 (Trodler *et al.*, 2009).

A lipase de *Burkholderia cepacia*, possui elevada tolerância na presença de álcoois de cadeia curta em relação às demais, por exemplo, é tolerante em relação ao metanol e etanol, o que favorece a sua utilização tanto na hidrólise quanto nas reações de esterificação e, por isso, tem sido utilizada em estudos para a produção enzimática de biodiesel (Jegannathan *et al.*, 2009; Kaieda *et al.*, 2001).

Imobilização Enzimática

A imobilização começou a ser estudada no início do século passado, ao se observar que uma preparação biológica com atividade invertásica que havia sido adicionada em carvão ativado, mantinha a capacidade de hidrolisar sacarose mesmo após ser lavada. O número de publicações sobre imobilização de enzimas teve aumento a partir de 1960. Em 1971, a primeira conferência em Engenharia Enzimática estabeleceu o uso da terminologia enzima imobilizada para os biocatalisadores ligados a suportes insolúveis ou confinados em espaços físicos definidos (Bom; Pereira, 1999).

A grande dificuldade se encontra em estabilizar as enzimas em meio orgânico para repetidos usos, uma vez que, dependendo do tipo, fonte, pureza e reações a serem utilizadas, estão sujeitas à inativação por fatores químicos, físicos ou biológicos, durante o uso ou quando armazenadas (Faber, 1997; Fernandez-Lafuente *et al.*, 1998; Reetz; Jaeger, 1997). A produção e purificação das enzimas para uso como biocatalisadores, são conhecidas por serem onerosas. A imobilização pode ser utilizada para promover o

aumento da estabilidade, da vida útil (Terrasan *et al.*, 2019), reusabilidade da enzima, a viabilidade de aumento de escala (scale-up) e a automação do processo, com diminuição dos custos de purificação dos produtos (Sinha *et al.*, 2012). Souza *et al.* (2017) comentam que o uso da enzima na forma solúvel também pode contaminar o produto final, além da dificuldade de recuperação da enzima. A imobilização pode acabar com desvantagens como perda de atividade devido às condições do processo ou inibição pelo substrato ou produto. Frente a estes problemas, técnicas de imobilização vêm sendo desenvolvidas para fornecer estabilidade para as enzimas e facilitar sua recuperação e reutilização.

A imobilização das enzimas irá depender dos tipos de interações existentes entre o suporte e a enzima (Datta *et al.*, 2013). Os métodos utilizados para imobilizar lipases podem envolver tanto processos físicos quanto químicos. Tais técnicas incluem a adsorção em um suporte sólido insolúvel, que pode ocorrer por interações covalentes e não covalentes (Mateo *et al.*, 2007; Villeneuve *et al.*, 2000), por ligações cruzadas intermoleculares de enzimas por reagentes bifuncionais ou multifuncionais (Faber, 1997; Fernandez-Lafuente *et al.*, 1998; Reetz; Jaeger, 1997).

Outros métodos que podem ser utilizados são o aprisionamento e o encapsulamento de enzimas, sem a ocorrência de ligações físicas e/ou químicas na superfície de um suporte sólido. Na encapsulação, a enzima é recoberta pela matriz utilizada, enquanto no aprisionamento, a enzima é introduzida dentro da matriz (Mohamed *et al.*, 2015). Nestes casos, há uma delimitação por uma “barreira física”, que impede a sua liberação para o meio externo, mas não restringe a sua mobilidade dentro do sistema. Desse modo, as enzimas são protegidas e ficam menos susceptíveis às mudanças estruturais, pois o biocatalisador fica confinado em uma área da qual ele não pode sair, mas na qual permanece cataliticamente ativo (Fernández-Fernández *et al.*, 2013; Villeneuve *et al.*, 2000).

Dependendo da técnica de imobilização as propriedades do biocatalisador podem ser aprimoradas, tais como estabilidade, seletividade, atividade, pH e temperatura (Faber, 1997; Fernandez-Lafuente *et al.*, 1998; Poppe *et al.*, 2015; Reetz; Jaeger, 1997). Combinações de diferentes métodos de imobilização, como a adsorção em um suporte seguida de um posterior aprisionamento em uma matriz por método sol-gel, também podem ser utilizados (Knežević *et al.*, 2004). Muitas vezes as condições do método de ligação cruzada são intensas e a atividade da enzima imobilizada é baixa, por isso, o mesmo também pode ser combinado com o método de adsorção para obter um melhor efeito imobilizado (Zhang *et al.*, 2012).

Cabe ressaltar que não há um método universal de imobilização, cujo procedimento se aplique eficazmente para qualquer sistema enzimático, mas deve-se levar em conta, especialmente, a estabilidade alcançada após o processo de imobilização (Hanefeld *et al.*, 2009; Villeneuve *et al.*, 2000).

A enzima quando imobilizada retém sua configuração estrutural devido às ligações de hidrogênio ou a formação de complexos que ocorrem na superfície do material. Isto leva a uma dificuldade na vibração da enzima levando a um aumento da estabilidade térmica. Pode-se observar, também, que o micro ambiente da superfície do suporte tem cargas que podem causar uma mudança no pH ótimo da enzima, ocasionando uma mudança na faixa de pH na qual a enzima atua (Faber, 1997; Fernandez-Lafuente *et al.*, 1998; Reetz; Jaeger, 1997).

Assim, os diferentes métodos de imobilização de enzimas têm sido classificados de acordo com a natureza da interação enzima-suporte e pode ser dividida de acordo a Figura 1.

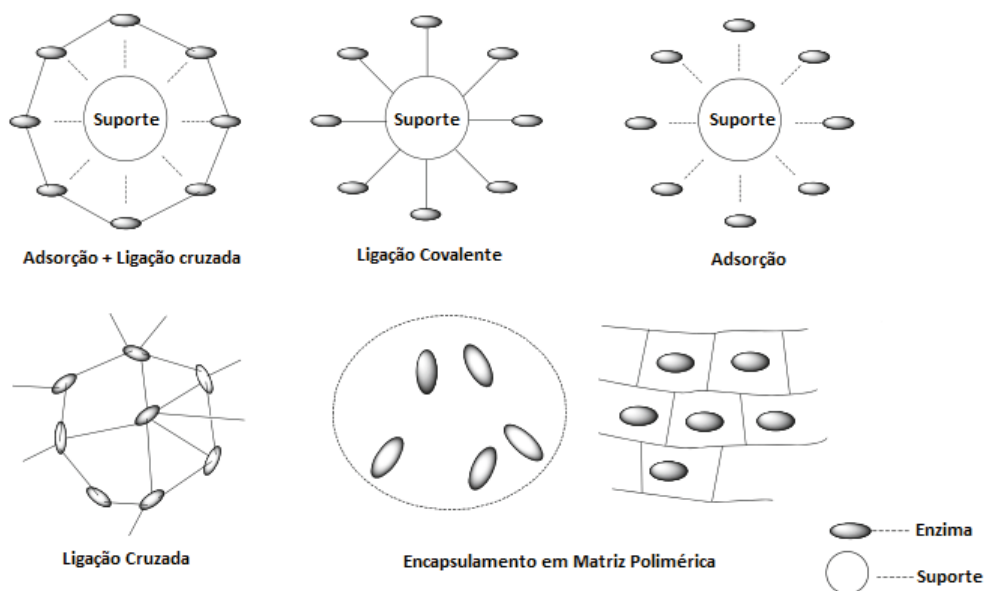


Figura 1 - Métodos de imobilização de enzimas.

Fonte: Adaptado de Zhang *et al.* (2012).

Adsorção Física

A adsorção física é o método de imobilização enzimática mais comum e simples e ocorre pelo simples contato entre a enzima e o suporte. Basicamente, a enzima é imobilizada em um suporte sólido poroso ou não e inerte, no qual a enzima pode ser adsorvida tanto na superfície quanto no interior dos poros, por meio de baixas energias de ligação. A ligação da enzima com o suporte sólido pode ocorrer por interações fracas, como forças van der Waals, ligações de hidrogênio, interações dipolo-dipolo, interações hidrofóbicas (forças entrópicas), mas também pode ocorrer adsorção iônica via interações eletrostáticas. Alguns parâmetros são de extrema importância na adsorção física, como o tamanho da enzima a ser adsorvida, a área específica do suporte, as propriedades morfológicas, a química da superfície e o pH do meio de imobilização (Villeneuve *et al.*, 2000).

Esta é uma estratégia bastante promissora porque permite a reutilização do suporte por dessorção de moléculas de enzimas inativas do microambiente (Hernández *et al.*, 2011). Interações de van der Waals e forças entrópicas estão envolvidas na ligação quando uma enzima é imobilizada em uma superfície hidrofóbica. Assim, são responsáveis por assegurar estabilidade nas interações das enzimas com esses materiais, desde que ambos tenham uma larga área específica lipolítica. Durante o processo de imobilização, pode ocorrer um aumento da entropia, porque uma molécula de enzima pode deslocar um grande número de moléculas de água tanto do suporte quanto de sua própria superfície. Dessa forma, este aumento passa a ser a força motriz entre as interações, uma vez que a imobilização poderá ocorrer devido às mudanças provocadas no microambiente da enzima e da interface (Hanefeld *et al.*, 2009).

De acordo com a literatura a maioria das lipases quando sofre ativação interfacial, tem uma conformação aberta. Assim, quando imobilizadas em suportes hidrofóbicos é provável que as lipases assumam uma conformação ativa (Hanefeld *et al.*, 2009; Mateo *et al.*, 2007), pois essa estratégia estabiliza as moléculas de lipase na conformação aberta, promove a hiperativação e produz biocatalisadores altamente estáveis em diferentes condições experimentais (Hernández *et al.*, 2011). Assim, a adsorção de lipases em superfícies hidrofóbicas é muito útil para uma etapa de purificação, imobilização, hiperativação e estabilização da maioria das lipases. No entanto, as moléculas de lipase podem ser liberadas do suporte sob certas condições (alta temperatura, solventes orgânicos), uma vez que não existem ligações covalentes entre a enzima e a matriz de suporte (Rueda *et al.*, 2016).

A principal desvantagem deste método se deve à imobilização por interações mais fracas e a consequente inevitável perda por dessorção com a diminuição da atividade catalítica. Para a adsorção iônica essa desvantagem é menos pronunciada devido à formação de ligações íon-íon mais efetivas com o suporte. Deste modo, uma das grandes vantagens da adsorção física é que este método não altera significativamente a estrutura tridimensional da enzima levando a sua desnaturação (Hanefeld *et al.*, 2009).

Ligação Covalente

A imobilização covalente envolve os grupos funcionais dos resíduos de aminoácido da enzima, como por exemplo, $-NH_2$ de lisina e arginina, $COOH$ de ácido aspártico ou glutâmico e SH de cisteína, estes podem interagir covalentemente com grupos funcionais presentes na superfície de suportes ativados com grupos funcionais reativos (Idris; Bukhari, 2012). Os grupos envolvidos nas reações são os que aparecem com mais frequência na superfície, como os grupos amino das cadeias laterais de resíduos de lisina, que por sua vez, são bastante reativos (Brady; Jordaan, 2009). Alguns fatores podem ainda melhorar a reatividade desses grupos, como pH e força iônica (Mateo *et al.*, 2000).

Suportes com grupos reativos em sua superfície favorecem a formação da ligação com a enzima, tornando o biocatalisador mais estável, térmica e quimicamente, possibilitando o reuso do biocatalisador em novas reações. Este método proporciona vantagens como estabilidade reacional com relação ao pH, temperatura, solventes e ação de inibidores (Mendes *et al.*, 2011).

O método de ligação covalente é baseado na ligação forte entre o grupo amino das enzimas ao suporte, que sofrerá ativação do grupo ligante, por meio de um agente ativador. (Jesus *et al.*, 2018). O reagente ligante atuará como mediador da ligação entre o suporte funcionalizado e a enzima (Datta *et al.*, 2013). Existem diversos reagentes ligantes utilizados como braço espaçador, como o glioxal, epóxido, vinil-sulfona, glutaraldeído, entre outros (Vazquez-Ortega *et al.*, 2018). O glutaraldeído é um dos reagentes mais empregados, devido à simplicidade dos métodos de ativação e obtenção de preparações enzimáticas ativas e estáveis (Souza *et al.*, 2017). Este agente ativado por sua vez, irá atuar principalmente nos grupos aminos presentes nas enzimas, sobretudo dos aminoácidos residuais que podem ser encontrados nos sítios ativos (Barbosa *et al.*, 2012).

A imobilização pelo método de ligação covalente geralmente é mais demorada quando comparada com o processo de adsorção, devido ao número de etapas envolvidas. Na primeira etapa ocorre a adsorção das enzimas na superfície do suporte, seguida de formação de ligações covalentes entre os resíduos de lisina e os grupos reativos na superfície do suporte. Ocorre então, uma menor rigidez na molécula da enzima que favorece a reatividade para formação de ligações. Essa ligação ocorre dependendo do nível de reatividade do aminoácido Lisina em função do pH do meio, por isso, a variáveis tempo, pH e temperatura empregados são tão importantes para aumentar a formação de ligações entre a enzima e o suporte no processo de imobilização por ligação covalente (Mateo *et al.*, 2000).

Alguns autores como Knežević *et al.* (2004) consideram a imobilização covalente mais vantajosa do que outros métodos porque oferece a vantagem de prevenir possíveis perdas de atividade enzimática por dessorção das enzimas e minimiza consideravelmente as restrições difusionais ao substrato ou produto. Entretanto, em alguns casos de imobilização covalente, pode ocorrer a diminuição da atividade enzimática devido às modificações conformacionais no centro ativo da biomolécula, pois não há controle sobre a orientação apropriada da enzima no decorrer da imobilização (Bayramoglu *et al.*, 2011). Mendes *et al.* (2011) ainda reportam que, devido à interação mais forte entre a enzima e o suporte, esse método pode afetar a estrutura tridimensional da enzima, modificando seu sítio ativo diminuindo efetivamente a sua atividade catalítica.

Suportes para a Imobilização de Enzimas

A escolha do suporte é crucial na imobilização enzimática para se obter um biocatalisador insolúvel, ativo, estável e reutilizável (Talbert; Goddard, 2012). Não há um suporte universal para todas as enzimas e suas aplicações, mas a escolha do suporte dependerá da reação na qual o derivado imobilizado será aplicado, o biocatalisador a ser utilizado, e custos envolvidos no processo (Dalla-Vecchia *et al.*, 2004).

A estrutura física e composição química do material do suporte podem influenciar a capacidade de adsorção e a retenção das propriedades catalíticas da enzima, afetando a atividade e a estabilidade do biocatalisador imobilizado (Talbert; Goddard, 2012).

As características desejáveis nos suportes são as seguintes: possuir estabilidade térmica e física, ser inerte, ter alta afinidade para proteínas, presença de grupos funcionais reativos para reações diretas com enzimas e/ou para modificações químicas, regenerabilidade, resistência à força mecânica e rigidez, principalmente se o mesmo for muito denso para ser utilizado em um biorreator (Palla *et al.*, 2011). Outros autores também chamam a atenção para a relevância dos aspectos morfológicos e a química de superfície, tais como a área específica, a forma, a distribuição e tamanho de poros, caráter hidrofóbico/hidrofílico da superfície, presença de cargas superficiais, estabilidade química, e composição da superfície dos materiais (Hanefeld *et al.*, 2009; Talbert; Goddard, 2012; Villeneuve *et al.*, 2000).

Há uma enorme variedade de suportes naturais ou sintéticos, orgânicos ou inorgânicos, hidrofóbicos, hidrofílicos ou híbridos, orgânicos/inorgânicos sintéticos que podem ser empregados para a imobilização de lipases. Inicialmente, os materiais mais utilizados na imobilização foram inorgânicos, como sílica, alumina e terra diatomácea. Sendo que mais recentemente, outros materiais para imobilização de enzimas têm sido apresentados na literatura e vêm sendo bastante aplicados, por exemplo, materiais inorgânicos, filmes poliméricos, polímeros hidrofóbicos, biopolímeros como quitosana e celulose, resinas de troca iônica/hidrofílicas, argilas modificadas, silicatos mesoporosos e materiais híbridos nanoestruturados, nanopartículas magnéticas, entre outros (Barbosa *et al.*, 2011; Dong *et al.*, 2014; Jun *et al.*, 2013; Kamel *et al.*, 2011; Martin *et al.*, 2019; Netto *et al.*, 2013; Salis *et al.*, 2009; Santin *et al.*, 2014; Villeneuve *et al.*, 2000).

O uso de suportes pode evitar a inibição da enzima por fatores externos, possibilitando a recuperação do biocatalisador e a utilização contínua. A imobilização de lipases em uma matriz sólida pode aumentar seu tempo de vida e melhorar a estabilidade térmica da enzima, por conferir uma estrutura mais rígida à mesma. Porém, se o suporte sólido exerce interações desfavoráveis com a proteína, ou se a conformação da enzima é modificada durante a imobilização, a enzima pode sofrer efeitos negativos, como a redução da estabilidade e da atividade catalítica (Foresti; Ferreira, 2007).

Na presença de uma superfície hidrofóbica, a lipase sofre uma ativação interfacial e o equilíbrio de suas formas é deslocado para a conformação aberta. Neste caso, a região do sítio ativo da enzima interage com o suporte por adsorção hidrofóbica, uma vez que o reconhece como similar aos seus substratos naturais. Assim, a lipase é imobilizada em sua conformação ativa (Hanefeld *et al.*, 2009; Mateo *et al.*, 2007). Fernández-Lorente *et al.* (2007) reportam que, a imobilização de lipases por adsorção em suportes hidrofóbicos é uma técnica importante para aumentar a especificidade das lipases por substratos hidrofóbicos.

Contudo, particularmente, para que os sistemas de biocatalisadores imobilizados tenham potencial de aplicação industrial, não basta apenas que sejam ativos e estáveis, mas que também sejam de baixo custo e possam ser repetidamente utilizados (Hanefeld *et al.*, 2009). Como exemplo, tem-se os materiais argilosos.

Argilas

Algumas substâncias são classificadas como mineral, que é um elemento ou composto químico inorgânico que é normalmente cristalino e que se formou como resultado de um processo geológico; portanto, um mineral tem composição química e propriedades cristalográficas bem definidas (Nickel, 1995). Rocha é um agregado de cristais de um ou mais minerais. O nome de um mineral deve terminar em “ita” e o de uma rocha em “ito”, segundo a IMA – International Mineralogical Association (Coelho *et al.*, 2007).

Existem algumas exceções como, por exemplo, quartzo (mineral), caulim e bentonita que são nomes de rochas e também de argilas. É fato que também é usual chamar a rocha pelo nome do mineral como, por exemplo, talco (mineral) que é usado para designar a rocha rica neste mineral e desse modo o nome correto talcito, raramente é usado. Outros exemplos são o termo caulinita em lugar de caulim e esmectita e montmorilonita em vez de bentonita (Coelho *et al.*, 2007).

Os argilominerais são silicatos de Al, Fe e Mg hidratados, com estruturas cristalinas em camadas ou de estrutura fibrosa, constituídas por folhas ou camadas contínuas de tetraedros de SiO_4 , ordenados de forma hexagonal, condensados com folhas octaédricas de hidróxidos de metais trivalentes e divalentes. Devido à essas características os argilominerais são chamados de silicatos em camadas (*layer silicates*) e filossilicatos. Alguns argilominerais podem conter uma fração com dimensões na faixa de 1 a 100 nm (Coelho *et al.*, 2007).

A argila é uma rocha que possui elevado teor de partículas (cristais) de diâmetro geralmente abaixo de $2\ \mu\text{m}$. São sólidos naturalmente ativos porque têm áreas específicas superiores a $1,0\ \text{m}^2/\text{g}$ (Coelho *et al.*, 2007; Santos, 1989). As argilas podem conter argilominerais e alguns minerais como calcita, dolomita, gipsita, quartzo, aluminita e pirita, além de matéria orgânica e outras impurezas. Possuem capacidade de troca de cátions entre 3 e 150 meq/100g de argila (Santos, 1989).

Existem cerca de 40 argilominerais, em que poucas são industriais e especiais por possuírem algumas propriedades muito peculiares e específicas, levando a um maior valor tecnológico (Coelho *et al.*, 2007). A classificação dos argilominerais é feita com base nas semelhanças da composição química e da estrutura cristalina (Santos, 1989).

A subdivisão para os argilominerais cristalinos possui duas classes gerais. De acordo com o Comité Internacional pour l'Étude des Argiles, o primeiro são os silicatos cristalinos com estrutura em camadas ou lamelas, também chamados silicatos em folha (*sheet silicates*) ou filossilicatos, e o segundo são os silicatos cristalinos com estrutura fibrosa (*chain structure*) (Santos, 1989). Este último possui apenas dois argilominerais com estrutura fibrosa: sepiolita e paligorsquita/atapulgita, ou seja, a maior parte dos argilominerais encontrados na natureza pertence ao primeiro grupo com estrutura lamelar (Aguiar *et al.*, 2002).

As estruturas cristalinas podem ainda ser divididas em dois tipos, uma com camadas de 1:1 e outro com camadas de 2:1. A nomenclatura 1:1 e 2:1 se refere ao número de camadas de tetraedros SiO_4 e de octaedros de hidróxidos, respectivamente, que entram na constituição da célula unitária da estrutura cristalina do argilomineral. Portanto, o empilhamento de uma folha tetraédrica com uma folha octaédrica forma uma camada 1:1 e o empilhamento de duas folhas tetraédricas com uma folha octaédrica entre elas forma uma camada 2:1. Nas estruturas 1:1 se encontram a caulinita, as serpentinas e os argilominerais ferríferos. Nas estruturas 2:1 estão o talco-pirofilita, as micas, as esmectitas, as vermiculitas, as cloritas e atapulgita (Coelho *et al.*, 2007).

Estas estruturas cristalinas são constituídas por camadas tetraédricas de silício e octaédricas de alumínio. Os vértices dos grupos tetraédricos e octaédricos são compostos por átomos ou íons oxigênio e por íons hidroxila, que estão ao redor de pequenos cátions, geralmente, com certo grau de substituição isomórfica que são responsáveis pelo excesso de cargas elétricas negativas na superfície das plaquetas. Todas as posições da camada octaédrica podem ser preenchidas (formas trioctaédricas) ou somente dois terços delas podem estar preenchidas (formas dioctaédricas) (Coelho *et al.*, 2007; Santos, 1989).

De acordo com Zhu *et al.* (2015; 2016) as argilas ainda podem ser classificadas em tipo I e tipo II, dependendo do seu método de síntese. Enquanto a tipo I é sintetizada pela intercalação de pequenos cátions orgânicos, a tipo II é obtida pela modificação com surfactantes catiônicos, como o dialquil dimetil amônio e outros sais quaternários.

As argilas, em sua maioria, são hidrofílicas, o que acaba impedindo o seu uso como adsorvente de materiais hidrofóbicos não polares e/ou espécies orgânicas carregadas negativamente. Deste modo, é necessária a modificação química por meio do uso de surfactante catiônico, que combina as propriedades inorgânicas do material, com o ambiente de atuação hidrofóbico. A intercalação de surfactantes catiônicos, por meio da troca iônica com os cátions inorgânicos, altera a natureza química de partida do material de hidrofílico para hidrofóbico, enquanto se expande nos espaços entre camadas, para a adsorção de compostos orgânicos (Oliveira *et al.*, 2017).

A argila Spetrogel (tipo C) é uma variedade de argila organofílica comercial com alta afinidade por compostos orgânicos, portanto, é geralmente aplicada na remoção de compostos orgânicos derivados de petróleo (Maia, 2019).

O comportamento de adsorção em argilas do tipo II, como a Spectrogel, é bastante complexo, uma vez que geralmente apresentam pequena área específica e volume de poros e intercalares que podem se expandir na presença de água (Zhu *et al.*, 2015).

A Spectrogel é uma argila comercial do tipo bentonita. O nome bentonita foi usado pela primeira vez em uma argila plástica descoberta em Fort Benton, Wyoming-EUA (Darley; Gray, 1988). Bentonita pode ser definida como uma rocha constituída essencialmente por um argilomineral montmorilonítico (esmetítico) que é um hidrosilicato de alumínio, formado pela desvitrificação (processo de uma substância em estado de vidro passar para o estado cristalino) e subsequente alteração química de um material vítreo, de origem ígnea, usualmente um tufo ou cinza vulcânica em ambientes alcalinos de circulação restrita de água (Ross; Shannon, 1926). Segundo Silva e Ferreira (2008) é observada uma grande variedade de cores, com argilas de tonalidades rósea, verde, vermelha, creme, amarela, cinza e chocolate.

Além disso, a bentonita pode ser cálcica, sódica e policatiônica. Quando sódica apresenta uma característica física muito particular de expandir várias vezes o seu volume e quando em contato com a água, forma géis tixotrópicos (Dantas *et al.*, 1984). No caso das argilas cálcicas ou policatiônicas, a quantidade de água adsorvida é limitada e as partículas continuam unidas umas às outras por interações elétricas e de massa. Essa, deve-se à força de atração entre as camadas, que é acrescida pela presença do cálcio, reduzindo a quantidade de água que poderá ser adsorvida, enquanto o cátion sódio provoca uma menor força atrativa, permitindo que uma maior quantidade de água penetre entre as camadas e seja então adsorvida (Silva; Ferreira, 2008).

Algumas bentonitas, após a troca catiônica, apresentam também, a propriedade de inchar em solventes orgânicos e um caráter organofílico bastante elevado. O tipo de bentonita sódica, o tipo de sal quaternário de amônio e o processo de obtenção da argila organofílica, irão definir os solventes orgânicos nos quais as argilas irão inchar (Barbosa *et al.*, 2006).

As bentonita em sua forma natural, sem nenhum tratamento, possui moderada carga negativa superficial, conhecida como capacidade de troca de cátions expressa em meq/100 g que varia de 80 a 150 meq/100 g de esmetita, elevada área específica, propriedades de intercalação de outros componentes entre as camadas e resistência à temperatura e a solventes (Silva; Ferreira, 2008).

As bentonitas são materiais importantes para as indústrias, porque são encontrados em abundância na natureza e, portanto, tem um baixo custo. Na sua forma estrutural, as argilas são hidrofílicas, sendo ineficientes para adsorção de compostos orgânicos. Quando submetidas a tratamentos químicos, como, por exemplo, com sais quaternários de amônio sua superfície pode ser alterada apresentando um caráter hidrofóbico e organofílico, as quais apresentam uma grande afinidade por compostos orgânicos. Devido ao caráter organofílico, as argilas modificadas, estão sendo estudadas visando ao seu uso na adsorção e retenção de resíduos industriais perigosos, de contaminantes orgânicos, de resíduos derivados de petróleo e no revestimento de tanques de óleo ou gasolina e de aterros (Bertagnolli, 2011; Nascimento *et al.*, 2014).

As argilas bentoníticas, esmectíticas e montmoriloníticas são extremamente versáteis quanto à sua capacidade de sofrer modificações (taylor made) de acordo com as propriedades desempenhadas em virtude das características físico-químicas resultantes de sua estrutura cristalina. Estas argilas apresentam 140 usos industriais superando em número de aplicações todas as outras argilas industriais reunidas (Silva; Ferreira, 2008).

O mercado de bentonita está concentrado nos Estados Unidos, em sequência na Alemanha e Turquia, se apresentando entre os principais produtores mundiais. O maior produtor mundial de bentonita é os Estados Unidos, e no Brasil os depósitos de argilas bentoníticas da Paraíba se constituem em um dos mais importantes sedimentos brasileiros deste bem mineral. De acordo com o Departamento Nacional de Produção Mineral (DNPM), no Brasil, a Paraíba apresenta-se como o principal Estado produtor de bentonita, com 87 % da produção nacional, seguido por São Paulo (7,3 %), Rio de Janeiro (4,4 %) e Paraná (0,2 %). A produção brasileira gira ao redor de 300 mil t/a, que representa 3 % do consumo mundial (Dantas *et al.*, 1984).

Ativação Ácida

Os tratamentos ou modificações de minerais de argila são divididos em: modificação física (tratamento térmico ou microondas) que envolve a alteração da composição química e estrutura cristalina pelo efeito da alta temperatura (acima de 200 °C), modificação química que é a alteração da estrutura e dos grupos funcionais de superfície e o tratamento de pilarização que envolve produtos químicos (Hussin *et al.*, 2011).

Tratamentos de argila com ácidos inorgânicos de concentração bastante elevada e, geralmente, em temperatura alta são conhecidos como ativação ácida (Pereira Neto *et al.*, 1993). Algumas argilas após serem ativadas quimicamente com ácidos, adquirem ou aumentam as propriedades adsorptivas. A ativação ácida altera a estrutura cristalina, a composição química e as propriedades físicas das argilas, transformando essas argilas em um insumo de grande importância para a indústria (Fioletto *et al.*, 2003; Pereira Neto *et al.*, 1993).

Esse tratamento muitas vezes pode substituir cátions intercambiáveis tais como os íons H^+ e Al^{3+} e outros cátions que ocupam os sítios tetraédricos e octaédricos, deixando grupos SiO_4 em grande parte intactos. Os sais solúveis são dissolvidos parcialmente com o ataque ácido, resultando numa redução dos teores de ferro e alumínio (Bhattacharyya; Gupta, 2008).

Geralmente, o ataque ácido provoca modificações nas propriedades estruturais das argilas, aumentando a área específica, obtendo sólidos com alta porosidade, juntamente com a eliminação de diversas impurezas minerais e a dissolução parcial das camadas externas, além de boa estabilidade térmica. A mudança da área específica e da estrutura porosa das argilas devido ao tratamento com ácido, depende da argila, da composição química, do tipo de cátions entre as camadas, do tipo de ácido, da temperatura e tempo do processo e outros fatores ambientais (Bhattacharyya; Gupta, 2008; Hussin *et al.*, 2011; Oliveira *et al.*, 2013).

Alguns dos ácidos utilizados para o tratamento incluem ácidos inorgânicos, como o ácido clorídrico, sulfúrico e nítrico, e orgânicos, como acético, cítrico, oxálico e láctico. Entre todos esses, o ácido clorídrico (HCl) e o ácido sulfúrico (H_2SO_4) são os mais amplamente utilizados na ativação ácida, porque mostram uma forte afinidade pelos parâmetros de processos, acompanhados de bons resultados e capacidade de adsorção (Hussin *et al.*, 2011).

Alguns grupos de pesquisa obtiveram resultados relevantes no tratamento de argilas com ácidos fortes. Oliveira *et al.* (2013) estudaram a ativação de paligorsquita (atapulgita) de Guadalupe-Piauí, por meio de tratamento com ácido sulfúrico usando um projeto fatorial de dois níveis. Os parâmetros estudados foram molaridade da solução, temperatura e tempo, tendo como variável resposta a área específica BET. Todas as condições (1 mol/L, 3 mol/L e 5 mol/L) utilizadas resultaram em aumento da área específica da argila, sendo o mais efetivo a solução de H_2SO_4 a 5 mol/L durante 1 hora a 70 °C, com 282 m²/g, enquanto na argila natural era de 84 m²/g. As amostras não tiveram alterações consideráveis na estrutura e morfologia. A temperatura, molaridade e a interação destes parâmetros foram os fatores significativos na ativação.

O tratamento mais severo com a solução a 5 mol/L a 70 °C lixiviou a argila. Os autores ainda citam que de acordo com Frini-Srasra e Srasra (2008), a ativação ácida pode diminuir a cristalinidade da argila devido à remoção de cátions octaédricos (Mg, Fe e Al). O processo começa lentamente porque os canais ainda estão fechados, com o tempo os H^+ conseguem acessar os canais e os prótons não apenas removem as impurezas dentro dos canais, mas também começam a lixiviar os cátions octaédricos.

No trabalho de Barrios *et al.* (1995) a argila foi decantada e em seguida foi tratada em soluções ácidas com diferentes concentrações de 1 mol/L, 3 mol/L, 5 mol/L e 7 mol/L de HCl por 1h, em temperatura ambiente. A argila tratada em 7 mol/L de HCl foi lixiviada. O melhor resultado foi para a solução de 5 mol/L, pois foi mantida a estrutura cristalina da

argila e teve aumento de área específica (280 m²/g). Diferente do estudo feito por Pereira Neto *et al.* (1993), que avaliaram a ativação ácida em soluções entre 1 mol/L e 7 mol/L de HCl, a 70 °C, em diferentes períodos de tempo (30 min a 7 h) e obtiveram o melhor resultado para as argilas tratadas na solução de 7 mol/L HCl por 7 h. Segundo os autores não houve alterações estruturais.

Zhang *et al.* (2010) avaliaram três tipos de ácidos diferentes para a ativação da Atapulgita/paligorskita em variadas concentrações: HCl (1, 2, 4, 6, 8 e 12 mol/L), H₂SO₄ (0,1, 0,2, 0,5, 1,6, 2,3, e 3 mol/L) e H₃PO₄ (0,2, 0,5, 1,6, 2,3, 3 e 3,6 mol/L). Os autores ativaram a argila imergindo nas soluções de 100 mL de ácido nas variadas concentrações com agitação a 80 °C, durante 1h. Após a ativação as amostras foram lavadas com água destilada até atingir pH 6,0 e secas a 105 °C por 8 h. O objetivo foi analisar a influência do tipo de ácido e da concentração na composição química, isoterma de adsorção-dessorção a 77 K, distribuição de tamanho de poro, área específica e volume de poros foram obtidas. A maioria dos componentes (Al, Fe, Mg, K, Ca, Cu, Mn, Cr etc.) da argila foram corroídos e dissolvidos nas soluções ácidas, exceto para Si e Ti, principalmente, com o uso do HCl em concentrações molares mais fortes. Os resultados mostraram que a solução de HCl mesmo em pequenas concentrações, como a de 2 mol/L foi suficiente para se obter os melhores resultados, uma vez que, um maior aumento das concentrações não teve influência significativa.

You *et al.* (2013) modificaram a atapulgita com HCl diluído a 80 °C por 12h. Para estudar a ativação ácida das argilas do tipo bentonita Rozic *et al.* (2010) utilizaram um planejamento de delineamento central de composto rotacional (DCCR) para o projeto experimental e análise dos resultados da ativação ácida da bentonita. As condições ideais para a ativação ácida da bentonita foram obtidas quando empregaram 4,5 mol/L de HCl a 90 °C em 450 rpm, por 3 horas, com uma proporção de argila para ácido de 1:4,5.

O comportamento das argilas frente às modificações estruturais pelos tratamentos de lixiviação ou ativação ácida, intercalação e pilarização não é simples e dificilmente podem ser feitas generalizações de tratamentos. De modo geral, as respostas aos tratamentos dependem das quantidades e natureza dos argilominerais, assim como do lote de material específico a ser analisado, com pouca generalização (Morales-Carrera *et al.*, 2009).

Estudos com Enzimas Imobilizadas em Argilas

You *et al.* (2013) imobilizaram lipase de *Burkholderia cepacia* em atapulgita modificada por reação de reticulação para produção de biodiesel com óleo de *Jatropha* (Pinhão Manso) como matéria-prima. O método desenvolvido para preparação do suporte foi com HCl diluído (os autores não apresentaram a concentração empregada), a 80 °C por 12 h. O excesso de ácido foi removido por lavagens repetidas com água deionizada. A argila tratada com ácido foi seca à temperatura de 50 °C e posteriormente levada para a etapa de modificação a fim de realizar o procedimento de ligação covalente com a enzima. A argila tratada com ácido foi então funcionalizada com APTS e ativada com glutaraldeído. Os autores utilizaram 0,2 g de enzima/ 10 mL tampão (0,01 Mol/L, pH 6,0) para 1 g de suporte, por 24 h a 25 °C e 15 rpm. O biocatalisador obtido foi utilizado na produção de ésteres de etila do óleo de pinhão manso. O rendimento em ésteres foi de 94 % e a lipase imobilizada manteve 95 % de sua atividade relativa por 10 ciclos de uso. Os mesmos autores, em outro artigo (YOU *et al.* 2011), também utilizaram este método para modificação da atapulgita para purificação, imobilização e caracterização da ácido linoleico isomerase (enzima que isomeriza o ácido linoleico, preferencialmente para as formas *cis*-9 e *trans*-11).

Yagiz *et al.* (2007) estudaram a imobilização de lipase de *Thermomyces lanuginosus* em argila hidrotalcita sintética, por método de adsorção avaliando os efeitos do pH, temperatura e tempo de contato. A quantidade de proteína imobilizada na hidrotalcita nas condições ótimas foi de 13 mg/g, em pH 8,5 e a 4 °C, após 5 horas. Nos testes de reuso, a lipase imobilizada reteve 36 % da atividade inicial a 45 °C até o sétimo ciclo. Secundo *et al.* (2008) imobilizaram lipase de *Candida antarctica* B (CALB) e de *Burkholderia cepacia* (LBC) em argila beidelita sintética. Os autores observaram que a imobilização da lipase por adsorção nas argilas foi influenciada pelo grau de substituição do alumínio pelo silício. A imobilização percentual foi significativamente maior para CALB, em comparação com a LBC, para uma mesma amostra de argila.

Dong *et al.* (2012) imobilizaram a lipase de pâncreas suíno (0,05 g de pó de lipase em 5 mL de solução tampão de variados valores de pH de 4 a 8) em organobentonita preparada com sal quaternário. A lipase mostrou atividade de 347,8 U/g, apresentando melhor resistência ao pH e à inativação por aquecimento em comparação com a lipase livre. Após armazenamento de oito dias reteve 80,7 % da atividade inicial e manteve 82,5 % da atividade inicial após seis ciclos de uso, mostrando a excelente estabilidade da lipase imobilizada por adsorção.

Tzialla *et al.* (2009) usaram três tipos diferentes de argila esmectita (Laponite, SWy-2 e Kunipia) tratadas com surfactante de octadeciltrimetil-amônio, para a imobilização da lipase de *Candida antarctica* B. Os autores confirmaram boa capacidade de adsorção da lipase nas três amostras de argila, com rendimentos de imobilização que variaram de 80 a 96 %. Reshmi, Sugunan (2013) utilizaram argila montmorilonita K-10 para imobilizar por adsorção e ligação covalente a lipase de *Candida rugosa*.

A aplicação da argila Spectrogel® como suporte na imobilização de lipases não foi encontrada na literatura. Foram encontrados apenas relatos para bentonitas de forma geral, como por exemplo, o estudo de Yeşiloğlu (2005), que imobilizou a lipase de *Candida rugosa* em bentonita ativada com ácido sulfúrico, por deposição direta da solução enzimática (5 miligramas de lipase em solução tampão) sobre bentonita suspensa num solvente orgânico. A atividade enzimática retida na lipase imobilizada foi de 30 %. Segundo o autor os resultados indicaram que a bentonita pode ser utilizada como suporte para lipase de *C. rugosa*. A imobilização da lipase de *Candida rugosa* por adsorção em bentonitas modificadas com surfactante, foi estudada por Ghiaci *et al.* (2009), os autores conseguiram uma imobilização de 61,2 %. Ramos *et al.* (2011) também estudaram a imobilização da lipase de *C. rugosa* por adsorção em bentonita modificada com surfactante catiônico e obtiveram 33,5 % de imobilização.

CONCLUSÃO

A crescente preocupação mundial com o esgotamento das fontes de energia não renováveis tem impulsionado novas pesquisas que permitam reduzir os custos e melhorar processos de produção de biodiesel. Em geral, a imobilização oferece uma série de vantagens e apesar da grande diversidade de métodos desenvolvidos e aplicados na imobilização de enzimas, não há um método e um suporte aplicável para todas as enzimas. Portanto, para cada aplicação de enzima imobilizada é necessário avaliar o procedimento mais adequado e que resulte num catalisador que apresente elevada atividade e alta estabilidade operacional.

A primeira etapa é conhecer as propriedades da superfície da enzima e do suporte a serem utilizados, para a escolha do método de imobilização. Existem os métodos físicos e químicos para imobilização de enzimas. Por meio do método físico não há interação entre a enzima e o suporte, como aprisionamento no interior de microcápsulas ou membranas de parede semipermeável. Para o método químico, as enzimas se ligam na superfície dos suportes por adsorção e ligação covalente, sendo estes últimos os mais encontrados na literatura.

O uso de enzimas como biocatalisadores na indústria requer o uso de biorreatores eficientes para a geração de produtos de interesse. Reatores operando em modo batelada ainda são muito utilizados no desenvolvimento de novos processos, inclusive enzimáticos.

O uso de biocatalisadores imobilizados aliados ao uso de matérias primas renováveis, como é o caso do óleo bruto da polpa de macaúba, que pode ser empregado como uma ferramenta para aumentar a eficiência de processos biotecnológicos e, consequentemente, reduzir custos de produção de ésteres.

Por fim, a partir da revisão da literatura apresentada, pode-se observar que os materiais argilosos ainda são pouco empregados como suportes para a imobilização de lipases.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, M. R. M. P.; NOVAES, A. C.; GUARINO, A. W. S. Remoção de metais pesados de efluentes industriais por aluminossilicatos. **Química Nova**, v. 25, n. 6/B, p. 1145-1154, 2002.
- AL-ZUHAIR, S.; LING, F. W.; JUN, L. S. Proposed Kinetic Mechanism of the Production of Biodiesel from Palm Oil Using Lipase. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 951-960, 2007.
- ARAND, M.; CRONIN, A.; ADAMSKA, M.; OESCH, F. Epoxidehydrolases: structure, function, mechanism, and assay. **Methods in Enzymology**, v. 400, p. 569-588, 2005.
- AWADALLAK, J. A.; VOL, F.; RIBAS, M. C.; SILVA, C.; FILHO, L. C.; SILVA, E. A Enzymatic catalyzed palm oil hydrolysis under ultrasound irradiation: Diacylglycerol synthesis. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 20, p. 1002-1007, 2013.
- BABICZ, I.; LEITE, S. G.; DE SOUZA, R. O.; ANTUNES, O. A. C. Lipase catalyzed in acylglycerol production under sonochemical irradiation. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 17, n. 1, p. 4-6, 2010.
- BARBOSA, O.; ORTIZ, C.; TORRES, R.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Effect of the immobilization protocol on the properties of lipase b from *Candida antarctica* in organic media: enantiospecific production of atenolol acetate. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 71, n. 3, p. 124-132, 2011.
- BARBOSA, O.; TORRES, R.; ORTIZ, C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. The slow-down of the CALB immobilization rate permits to control the inter and intra molecular modification produced by glutaraldehyde. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 5, p. 766-774, 2012.
- BARBOSA, R.; ARAÚJO, E. M.; DE OLIVEIRA, A. D.; DE MELO, T. J. A. Efeito de sais quaternários de amônio na organofiliação de uma argila bentonita nacional. **Cerâmica**, v. 52, n. 324, p. 264-268, 2006.
- BARRIOS, M. S.; GONZALEZ, L.V. F.; RODRIGUEZ, M. A. V.; POZAS, J. M. M. Acid activation of a palygorskite with HCl: Development of physico-chemical, textural and surface properties. **Applied Clay Science**, v. 10 p. 247-258, 1995.
- BATISTA, A.; SABUQUILLO, P.; ARMISEN, P.; LAFUENTE, R.F.; HUGUET, J.; GUISÁN, J. A single step purification, immobilization, and hyperactivation of lipases via interfacial adsorption on strongly hydrophobic supports. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 58, n. 5, p. 486-493, 1998.
- BAYRAMOĞLU, G.; HAZER, B.; ALTINTAŞ, B.; ARICA, M. Y. Covalent immobilization of lipase onto amine functionalized polypropylene membrane and its application in green apple flavor (ethyl valerate) synthesis. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 1, p. 372-378, 2011.
- BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. **Biochemistry**. 7 ed., p.1029, 2012.
- BERTAGNOLLI, C.; KLEINÜBING, S. J.; SILVA, M. G. C. Preparation and characterization of a Brazilian bentonite clay for removal of copper in porous beds. **Applied Clay Science**, v. 53, n. 1, p. 73-79, 2011.
- BHATTACHARYYA, K. G.; GUPTA, S. S. Adsorption of a few heavy metals on natural and modified kaolinite and montmorillonite: a review. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 140, n. 2, p. 114-131, 2008.
- BORNSCHEUER, U. T. Microbial carboxylesterases: classification, properties and application in biocatalysis. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 26, p. 73-81, 2002.
- BRADY, D.; JORDAAN, J. Advances in enzyme immobilisation. **Biotechnology Letters**. v. 31, n. 11, p. 1639-1650, 2009.

COELHO, A. C. V.; SANTOS, P. S.; SANTOS, H. S. Argilas especiais: argilas quimicamente modificadas-uma revisão. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1282, 2007.

DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. G.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, v. 27, nº 4, p. 623-639, 2004.

DANTAS, J.R.A.; FREITAS, V.P. M. GOPINATH, T.; FEITOSA, R.N. Depósitos de bentonita da região de boa vista, estado da Paraíba, **Departamento Nacional de Produção Mineral**, 1984.

DARLEY, H.C.H.; GRAY, G.R., **Composition and Properties of Drilling and Completion Fluids**, Fifth Edition, Gulf Publishing Company, Houston, Texas, 1988.

DATTA, S.; CHRISTENA, L. R.; RAJARAM, Y. R. S. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. **3 Biotech**, v. 3, n. 1, p. 1–9, 2013.

DONG, H.; LI, J.; LI, Y.; HU, L.; LUO, D. Improvement of catalytic activity and stability of lipase by immobilization on organobentonite. **Chemical Engineering Journal**, v. 181, p. 590-596, 2012.

DONG, L.; GE, C.; QIN, P.; CHEN, Y.; XU, L. Q. Immobilization and catalytic properties of *Candida lipolytic* lipase on surface of organic intercalated and modified MgAl-LDHs. **Solid State Sciences**, v. 31, p. 8-15, 2014.

FABER, Kurt. **Biotransformations in Organic Chemistry: A Textbook**. New York: Springer Science & Business Medi, 1997.

FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, M.; SANROMÁN, M. Á.; MOLDES, D. Recent development and applications of immobilized laccase. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 8, p. 1808-1825, 2013.

FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; ARMISÉN, P.; SABUQUILLO, P.; FERNÁNDEZ LORENTE, G.; GUISÁN, J. M. Immobilization of lipases by selective adsorption on hydrophobic supports. **Chemical and Physics of Lipids**, v. 93, n. 1, p. 185- 197, 1998.

FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; PALOMO, J. M.; CABRERA, Z.; GUISÁN, J. M.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Specificity enhancement towards hydrophobic substrates by immobilization of lipases by interfacial activation on hydrophobic supports. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 41, n. 5, p. 565-569, 2007.

FOLETTTO, E. L.; ALVES, C. C. A.; PORTO, L. M. Regeneração e reutilização de uma argila commercial utilizada na clarificação de óleo vegetal. **Cerâmica Industrial**, v. 8, n. 1, p. 43-45, 2003.

FORESTI, M. L.; FERREIRA, M. L. Chitosan-immobilized lipases for the catalysis of fatty acids esterifications. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 4, p. 769–777, 2007.

FRINI-SRASRA, N.; SRASRA, E. Determinação das propriedades ácido-base do palygorskite tratado por ácido HCl por titulação de potenciometria. **Surface Engineering and Applied Electrochemistry**, v. 44, n. 5, p. 401-409, 2008.

GULDHE A.; SINGH, B.; MUTANDA, T.; PERMAUL, K.; BUX, F. Advances in Synthesis of biodiesel via enzyme catalysis: Novel and sustainable Approaches. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 41, p. 1447-1464, 2015.

HANEFELD, U.; GARDOSSI, L.; MAGNER, E. Understanding enzyme immobilization. **Chemical Society Reviews**, v. 38, n. 2, p. 453-468, 2009.

HUSSIN, F.; AROUA, M. K.; DAUD, W. M. A. W. Textural characteristics, surface chemistry and activation of bleaching earth: A review. **Chemical Engineering Journal**, v. 170, n. 1, p. 90-106, 2011.

- IDRIS, A.; BUKHARI, A. Immobilized *Candida antarctica* lipase B: Hydration, stripping off and application in ring opening polyester synthesis. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 3, p. 550-563, 2012.
- JAEGER, K.E.; DIJKSTRA, B.W.; REETZ, M.T. Bacterial biocatalysts: molecular biology three-dimensional structures and biotechnological applications of lipases. **Annual Review of Microbiology**, v. 53, p. 315-35, 1999.
- JEGANNATHAN, K. R.; ENG-SENG, C.; RAVINDRA, P. Physical and stability characteristics of *Burkholderia cepacia* lipase encapsulated in κ -carrageenan. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 58, n. 1, p. 78-83, 2009.
- JUN, C.; JEON, B. W.; JOO, J. C.; LE, Q. A. T.; GU, S.; BYUNA, S.; CHOA, D. H.; KIMB, D.; SANGC, B.; KIMA, Y. H. Thermostabilization of *Candida antarctica* lipase B by double immobilization: Adsorption on a macroporous polyacrylate carrier and R1 silaffin-mediated biosilicification. **Process Biochemistry**, v. 48, n. 8, p. 1181-1187, 2013.
- JESUS, J. N.; CAVALCANTE, P. A. W.; ALMEIDA, C. M. S.; DE OLIVEIRA, T. S.; ARANDAS, V. S.; COELHO, D. F.; RODRIGUES, J. R. S.; DE SOUZA, R. R. Imobilização da celulase presente em caldo fermentado em um suporte a base de quitosana. **Scientia Plena**, v. 14, n. 6, p. 1-9, 2018.
- KAIEDA, M.; SAMUKAWA, T.; KONDO, A.; FUKUDA, H. Effect of methanol and water contents on production of biodiesel fuel from plant oil catalyzed by various lipases in a solvent-free system. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 91, n. 1, p. 12-15, 2001.
- KAMEL, G.; BORDI, F.; CHRONOPOULOU, L.; LUPI, S.; PALOCCI, C.; SENNATO, S.; VERDES, P. V. Adsorption of *Candida rugosa* lipase at water/polymer interface: The case of poly(DL) lactide. **Surface Science**, v. 605, n. 23, p. 2017-2024, 2011.
- KNEŽEVIĆ, Z. D.; ŠILER-MARINKOVIĆ, S. S.; MOJOVIĆ, L. V. Immobilized lipases as practical catalysts. **APTEFF**, v. 35, p. 151-164, 2004.
- LI, W.; LI, R.; LI, Q.; DU, W.; LIU, D. Acyl migration kinetics study of 1(3)positional specific lipase of *Rhizopus oryzae* - catalyzed methanolysis of triglyceride for biodiesel production. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 1888-1893, 2010.
- MAIA, G. S.; DE ANDRADE, J. R.; DA SILVA, M. G.; VIEIRA, M. G. Adsorption of diclofenac sodium on to commercial organoclay: Kinetic, equilibrium and thermodynamic study. **Powder Technology**, v. 345, p. 140-150, 2019.
- MARANGONI, A. G.; ROUSSEAU, D. Engineering triacylglycerols: The role of interesterification. **Trends Food Sci. Technol.**, v. 6, n. 10, p. 329-335, 1995.
- MARTIN, L. S.; CERÓN, A. A.; MOLINARI, D.; DE MORAES, F. F.; ARROYO, P. A.; DE CASTRO, H. F.; ZANIN, G. M. Enhancement of lipase transesterification activity by immobilization on β -cyclodextrin-based polymer. **Journal of Sol-Gel Science and Technology**, v. 91, n. 1, p. 92-100, 2019.
- MATOS, L. M.; LEAL, I. C.; SOUZA, R. O. Diacylglycerol synthesis by lipase-catalyzed partial hydrolysis of palm oil under microwave irradiation and continuous flow conditions. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 72, n. 1, p. 36-39, 2011.
- MATEO, C.; ABIAN, O.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUIBAN, J. Increase in conformational stability of enzymes immobilized on epoxy-activated supports by favoring additional multipoint covalent attachment. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, n. 7, p. 509-515, 2000.

- MATEO, C.; PALOMO, J. M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUISAN, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 6, p. 1451–1463, 2007.
- MENDES, A. A.; GIORDANO, R. C.; DE LC GIORDANO, R.; & DE CASTRO, H. F. Immobilization and stabilization of microbial lipases by multipoint covalente attachment on aldehyde-resin affinity: Application of the biocatalysts in biodiesel synthesis. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 68, n. 1, p. 109–115, 2011.
- MOHAMED, O.; BENSABEH, F.; BANO, H.; BEHI, S.; JARRAR, M.. Evaluating the role of the appropriate catalysts on the efficacy of biodiesel production from waste cooking oil. **Scholars Academic Journal of Biosciences**, v. 3, p. 468-47, 2015.
- MORALES-CARRERA, A. M.; VARAJÃO, A. F.; GONÇALVES, M. A.; STACCHINI, A. S. Argilas bentoníticas da península de Santa Elena, Equador: pilarização, ativação ácida e seu uso como descolorante de óleo de soja. **Química Nova**, v. 32, n. 9, p. 2287-2293, 2009.
- NASCIMENTO, E. S.; NETO, A.; SILVA, M. G. C.; ANDREO DOS SANTOS, O. A. Síntese e caracterização de argila organofílica utilizada na remoção de óleos combustíveis. **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, v. 1, n. 1, p. 251-254, 2014.
- NC-IUBMB - Comitê de Nomenclaturas da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular. Nomenclatura de Enzimas. Disponível em: <<http://www.sbcs.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>>. Acesso em: 02/08/2017.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Princípios de Bioquímica**. Ed. W. H. Freeman and Company. p. 955, 2002.
- NETTO, C.G.C.M.; TOMA, H.T.; ANDRADE, L.H. Superparamagnetic nanoparticles as versatile carriers and supporting materials for enzymes. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 85, p. 71– 92, 2013.
- NICKEL, E.H. Definition of a mineral. **Mineralogical Magazine**, v. 59, n. 397, p. 767-768, 1995.
- OLIVEIRA, R. N.; ACCHAR, W.; SOARES, G. D. A.; BARRETO, L. S. The increase of surface area of a Brazilian palygorskite clay activated with sulfuric acid solutions using a factorial design. **Materials Research**, v. 16, n. 4, p. 924-928, 2013.
- OLIVEIRA, T.; GUEGAN, R.; THIEBAULT, T.; MILBEAU, C.; MULLER, F.; TEIXEIRA, V.; GIOVANOLA, M.; BOUSSAFIR, M. Adsorption of diclofenac onto organoclays: Effects of surfactant and environmental (pH and temperature) conditions. **Journal of Hazardous Materials**, v. 323, p. 558–566, 2017.
- PADILHA, G. D. S.; SANTANA, J. C. C.; ALEGRE, R. M.; TAMBOURGI, E. B. Extraction of lipase from *Burkholderia cepacia* by PEG/Phosphate ATPS and its biochemical characterization. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 55, n. 1, p. 7-19, 2012
- PALLA, C. A.; PACHECO, C.; CARRÍN, M. E. Preparation and modification of chitosan particles for *Rhizomucor miehei* lipase immobilization. **Biochemical Engineering Journal**, v. 55, n. 3, p. 199–207. , 2011
- PATEL, R. N. Microbial/enzymatic synthesis of chiral intermediates for pharmaceuticals. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, n. 6, p. 804- 826, 2002
- PEREIRA NETO, J.; ALMEIDA, S.L.M.; CARVALHO, R.M. Atapulgita do Piauí para a Indústria Farmacêutica. **Série Tecnologia Mineral, CETEM**, v. 64, 1993.

- POPPE, J. K.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; RODRIGUES, R. C.; AYUB, M. A. Z. Enzymatic reactors for biodiesel synthesis: Present status and future prospects. **Biotechnology Advances**, v. 33, p. 511-525, 2015.
- RAMOS, L. P.; SILVA, F. R.; MANGRICH, A. S.; CORDEIRO, C. S.. Tecnologias de produção de biodiesel. **Revista Virtual de Química**, v. 3, p. 385-405, 2011.
- REETZ, M. T. Lipases as practical biocatalysts. **Curr. Opin. Chem. Biol.**, v. 6, n. 2, p. 145– 50, 2002.
- REETZ, M.; JAEGER, K. E. Overexpression, immobilization and biotechnological application of *Pseudomonas* lipases. **Chemical and Physics of Lipids**, v. 93, n. 3, p. 3-14, 1997.
- ROSS, C.S.; SHANNON, E.V. The minerals of bentonite and related clays and their physical properties. **Journal of the American Ceramic Society**, v. 9, n. 2, p. 77-96, 1926.
- ROŽIĆ, Ljiljana; NOVAKOVIĆ, Tatjana; PETROVIĆ, Srđan. Modeling and optimization process parameters of acid activation of bentonite by response surface methodology. **Applied Clay Science**, v. 48, n. 1, p. 154-158, 2010.
- RUEDA, N.; DOS SANTOS, J. C. S.; TORRES, R.; ORTIZ, C.; BARBOSA, O.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Chapter four-immobilization of lipases on hetero functional octyl–glyoxyl agarose supports: improved stability and prevention of the enzyme desorption. **Methods in Enzymology**, v. 571, p. 73-85, 2016.
- SALIS, A.; BHATTACHARYYA, M. S.; MONDUZZI, M.; SOLINAS, V. Role of the support surface on the loading and the activity of *Pseudomonas fluorescens* lipase used for biodiesel synthesis. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 57, n. 1, p. 262–269, 2009.
- SANTIN, C.M.T.; SCHERER, R.P.; NYARI, N.L.D.; ROSA, C.D.; DALLAGO, R.M.; OLIVEIRA, D. de; OLIVEIRA, J.V. Batch esterification of fatty acids charges under ultrasound irradiation using *Candida antarctica* B immobilized in polyurethane foam. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 87, n. 3, p. 234- 240, 2014.
- SANTOS, P. S. **Ciência e Tecnologia de Argilas**. 2 ed. São Paulo: Ed. Edgardb Blucher, 1989.
- SECUNDO, F.; MIEHÉ-BRENDLÉ, J.; CHELARU, C.; FERRANDI, E. E.; DUMITRIU, E. Adsorption and activities of lipases on synthetic beidellite clays with variable composition. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 109, n. 1, p. 350-361, 2008.
- SCHMID, R. D.; VERGER, R. Lipases: Lipases: interfacial enzymes with attractive applications. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 37, n. 12, p. 1608-1633, 1998.
- SILVA, A. R. V.; FERREIRA, H. C. Argilas bentoníticas: conceitos, estruturas, propriedades, usos industriais, reservas, produção e produtores/fornecedores nacionais e internacionais. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 3, n. 2, p. 26-35, 2008.
- SINHA, S. DHAKATE, S. R.; KUMAR, P.; MATHUR, R. B.; TRIPATHI, P.; CHAND, S. Electrospun polyacrylonitrile nanofibrous membranes for chitosanase immobilization and its application in selective production of chitoooligosaccharides. **Bioresource Technology**, v. 115, p. 152–157, 2012.
- SOUZA, L. T.; VERÍSSIMO, L. A.; PESSELA, B. C.; SANTORO, R. R.; RESENDE, R. R.; MENDES, A. A. Imobilização enzimática: princípios fundamentais e tipos de suporte. **Biotecnologia Aplicada a Agro&Indústria**, 2017.
- TALBERT, J. N.; GODDART, J. M. Enzymes on material surfaces. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 93, p. 8-19, 2012.

TERRASAN, C. R. F.; DE MORAIS JUNIOR, W. G.; CONTESINI, F. J. Enzyme Immobilization for oligosaccharide production. **Encyclopedia of Food Chemistry**, v. 2, n. 2017, p. 415–423, 2019.

TRODLER, P.; SCHIMID, R. D.; PLEISS, J.. Modeling of solvent-dependent conformational transitions in *Burkholderia cepacia* lipase. **BMC Structural Biology**, v. 9, p. 1-13, 2009

VAZQUEZ-ORTEGA, P. G.; ALCARAZ-FRUCTUOSO, M. T.; ROJAS-CONTRERAS, J. A.; LÓPEZ-MIRANDA, J.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Stabilization of dimeric β -glucosidase from *Aspergillus niger* via glutaraldehyde immobilization under different conditions. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 110, p. 38–45, 2018.

VILLENEUVE, P.; MUDERHWA, J. M.; GRAILLE, J.; & HAAS, M. J. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 9, n. 4, p. 113-148, 2000.

VOET, D.; VOET, J. G. **Bioquímica**. 4ª Ed. Porto Alegre: Ed. Artmed, 2013.

YAGIZ, F.; KAZAN, D.; AKIN, A. Nilgun. Biodiesel production from waste oils by using lipase immobilized on hydrotalcite and zeolites. **Chemical Engineering Journal**, v. 134, n. 1, p. 262-267, 2007.

YEŞİLOĞLU, Yeşim. Utilization of bentonite as a support material for immobilization of *Candida rugosa* lipase. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 6, p. 2155-2159, 2005.

YOU, Q.H.; YIN, X.L.; GU, X.; XU, H.; SANG, L. Purification, immobilization and characterization of linoleic acid isomerase on modified palygorskite. **Bioprocess Biosyst. Eng.**, v. 34, n. 6, p. 757-765, 2011.

YOU, Q.; YIN, X.; ZHAO, Y.; ZHANG, Y. Biodiesel production from *Jatropha* oil catalyzed by immobilized *Burkholderia cepacia* lipase on modified attapulgite. **Bioresource Technology**, v. 148, p. 202-207, 2013.

ZHANG, B.; WENG, Y.; XU, H.; MAO, Z. Enzyme immobilization for biodiesel production. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 93, p. 61-70, 2012.

ZHANG, J.; WANG, Q.; CHEN, H.; WANG, A. XRF and nitrogen adsorption studies of acid-activated palygorskite. **Clay Minerals**, v. 45, n. 2, p. 145-156, 2010.

ZHU, R.; ZHOU, Q.; ZHU, J.; XI, Y.; HE, H. Organo-clays as sorbents of hydrophobic organic contaminants: sorptive characteristics and approaches to enhancing sorption capacity. **Clays Clay Miner.**, v. 63, p. 199-221, 2015.

ZHU, R.; CHEN, Q.; ZHOU, Q.; XI, Y.; ZHU, J.; HE, H. Adsorbents based on montmorillonite for contaminant removal from water: A review. **Applied Clay Science**, v. 123, p. 239-258, 2016.