

USO DE SÍLICAS MODIFICADAS PARA IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES

Nayara B. Carvalho, Álvaro S. Lima e Cleide M. F. Soares*

Instituto de Tecnologia e Pesquisa, Universidade Tiradentes, 49032-490 Aracaju – SE, Brasil

Recebido em 26/05/2014; aceito em 30/09/2014; publicado na web em 13/11/2014

Revisão

USE OF MODIFIED SILICAS FOR LIPASE IMMOBILIZATION. Enzyme-support strategies are increasingly replacing conventional chemical methods in both laboratories and industries with attributes including efficiency, higher performance and multifarious use, where silica surfaces show potential due to the chemical bonds based on the presence of hydroxyl groups which can be modified with different additives. Surface-modified silica is a novel class of materials capable of improving enzyme stability and reusability that can be applied to support several immobilization techniques. This review describes the use of innovative modified supports to improve the state of enzyme immobilization and provide the industrial sector with new perspectives.

Keywords: silica; surface modification; lipase immobilization.

INTRODUÇÃO

Os suportes aplicados para imobilização de enzimas têm merecido atenção em vários estudos de biocatálise, destacando aqueles que tratam dos suportes de sílica e de suas modificações superficiais. Os protocolos metodológicos baseiam-se na utilização de aditivos ou agentes bifuncionais e têm como intuito aprimorar os suportes para a obtenção de biocatalisadores imobilizados.¹⁻³

As modificações físicas, químicas e morfológicas dos suportes, pela aplicação de aditivos, podem produzir biocatalisadores imobilizados com maior eficiência catalítica devido à minimização dos efeitos difusionais de substratos e produtos durante a reação, além da melhoria da estabilidade operacional em processos contínuos e descontínuos, e por esta razão desperta também o interesse industrial para estes biocatalisadores.^{4,5}

Em suportes de sílica, as modificações superficiais podem ocorrer com introdução de vários grupos funcionais tais como: alquila, amino, carboxila, tiosila, dentre outros, e tem como objetivo tornar o suporte mais eficiente ao processo de imobilização de enzimas e catálise.⁶⁻⁸ Estes grupos funcionais podem ser adicionados ao suporte antes da imobilização com a utilização de diferentes aditivos como polietileno-glicol - PEG, álcool polivinílico - PVA, caseína, gelatina, albumina de ovo ou bovina, líquidos hidrofóbicos e líquidos iônicos.^{2,9-12} Pode-se utilizar também como modificadores os agentes silanizadores e bifuncionais, tais como 3-aminopropiltrimetoxissilano, 3-aminopropiltrióxissilano, 3-cloropropiltrimetoxissilano, epicloridrina, glutaraldeído, glicoxal, formaldeído, glicidol, carbonildiimidazol, dentre outros.¹³⁻¹⁶

Os suportes naturais e sintéticos podem ser classificados como orgânico, inorgânico ou híbridos, não poroso, microporoso, mesoporoso ou macroporoso.^{13,17} Do ponto de vista geral, o método de classificação do suporte não altera o sistema imobilizado obtido, uma vez que as técnicas de imobilização envolvem uma combinação de métodos básicos de ligação física e química.^{4,18,19}

A enzima lipolítica, quando imobilizada, é especialmente atraente em processos biotecnológicos com o intuito de atender as exigências para aplicação industrial, como por exemplo, reações de biotransformação. A melhoria da eficiência catalítica ocasiona o aumento do valor agregado frente aos princípios da química verde e sustentabilidade.²⁰ Portanto, este artigo de revisão destina-se à apresentação

de estudos em desenvolvimento quanto à modificação superficial de suportes para imobilização de lipases.

LIPASES E MÉTODOS DE IMOBILIZAÇÃO

Estudos recentes descrevem o amplo espectro catalítico que promove sua versatilidade nas diversas reações. Segundo Kapoor e Gupta,²⁰ a versatilidade das lipases, relatado em seu manuscrito como promiscuidade, é a capacidade das enzimas catalisarem diferentes reações na sua fisiológica natural, podendo ocorrer em diferentes áreas: versatilidade da condição enzimática (catálise em condições não naturais, como meio anidro, diferentes temperatura ou pH); versatilidade da enzima e substrato (catalisam grande intervalo de substratos devido a sua ampla especificidade) e, por fim, a versatilidade catalítica (capacidade do sítio ativo em catalisar transformações quimicamente distintas).

Do ponto de vista industrial as lipases são consideradas muito importantes devido às suas propriedades catalíticas e fácil produção em escala ampliada.²¹⁻²⁷ As lipases podem ser produzidas por diversos micro-organismos, como *Bacillus* sp., *Candida rugosa*, *Candida antarctica*, *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas alcaligenes*, *Aspergillus* sp., *Rhizopus* sp., *Penicillium* sp., *Mucor*, *Geotrichum* sp., *Tulopsis* sp. e *Candida* sp..^{2,9,25,28-33}

As lipases são aplicadas em diversas indústrias devido à sua capacidade de hidrolisar triglicerídeos na interface óleo-água que, sob condições fisiológicas, catalisam a hidrólise das ligações de éster nas moléculas de triglicerídeos liberando gratuitamente ácidos graxos, diglicerídeos, monoglicerídeos e glicerol. Além da hidrólise, as lipases também catalisam reações como: esterificação, transesterificação (interesterificação, alcoólises e acidólises), aminólise (síntese de amidas) e lactonização, sendo que a atividade de água do meio reacional é um dos fatores determinantes para cada classe de reação.³⁴⁻³⁸

As lipases produzidas pelo gênero *Pseudomonas* (renomeada também como *Burkholderia cepacia*) possuem características de biocatálise especiais, como termoestabilidade e enantiosseletividade. Por exemplo, cepas de *Burkholderia cepacia* possuem em seu sítio ativo a presença de tríade catalítica formada por resíduos de aminoácidos da serina, histidina e aspartato e destacam-se por serem utilizadas na produção industrial de lipases empregadas em síntese de compostos quirais e ésteres.³⁹⁻⁴⁵

De acordo com a crescente aplicação de lipases e o interesse na melhoria catalítica os estudos são desenvolvidos e, ao longo do

*e-mail: cleide.soares@pq.cnpq.br

tempo, resulta em uma evolução expressiva na publicação de artigos e patentes na área de biocatálise, contribuindo para a competitividade em termos de pesquisa científica, desenvolvimento tecnológico e aplicações industriais.^{20,27,46,47}

Apesar de muitas vantagens, as enzimas apresentam desvantagens quanto à estabilidade operacional e de armazenamento, pois são moléculas complexas, altamente sensíveis e com estruturas tridimensionais únicas que são essenciais para suas atividades. Sua exposição a determinadas condições (específicas para cada tipo de enzima) tais como temperaturas extremas ou solventes orgânicos, pode conduzir à desnaturação (desdobramentos) e à perda concomitante de atividade e impossibilidade de recuperação e reutilização deste biocatalisador. Portanto, apesar da nova expressão utilizada para lipase, denominada “enzima versátil”, o uso desta enzima exerce um potencial de aplicação para expandir no que diz respeito aos processos de química verde e sustentável, promovendo assim o aumento da sua estabilidade e possibilidade de reutilização ou utilização em processos contínuos.⁴⁸⁻⁵¹

Os fenômenos físico-químicos, tais como partição, solvatação e difusão, afetam significativamente a eficácia do biocatalisador em cada sistema específico na reação.⁵² Conforme Liese e Hilterhaus,⁵³ a maior estabilização é obtida por meio da imobilização da enzima em suportes heterogêneos, os quais estão diretamente relacionados à sua atividade, fenômenos de transporte de massa e limitações para aplicações industriais. Para uma avaliação criteriosa do processo a ser escolhido deve-se levar em consideração a escolha do suporte, o efeito limitante difusional, rendimento de imobilização e análise superficial dos biocatalisadores imobilizados.

Desde da década de 70 existem relatos na literatura sobre a imobilização de enzimas e, em 1971, essa técnica foi definida pela Primeira Conferência sobre Engenharia Enzimática como “enzimas ou sistemas enzimáticos fisicamente confinadas ou localizadas em uma região definida do espaço com retenção de suas atividades catalíticas, e que podem ser usadas repetida e continuamente”. É possível destacar três etapas no desenvolvimento de biocatalisadores imobilizados (Tabela 1).^{31,52,53}

Tabela 1. Breve histórico no desenvolvimento de enzimas imobilizadas⁵⁴

Epatas	Data	Utilização
1 ^a	1815	Empírica utilização em processos tais como produção de vinagre e o tratamento de águas residuais.
2 ^a	1960	Imobilização de enzimas para a produção de L aminoácidos e isomerização de glicose.
3 ^a	1985–1995	Imobilização de múltiplas enzimas, incluindo o co-fator de regeneração e imobilização de células; produção de L-aminoácidos em reatores de membrana.

A enzima pode ser ligada ao suporte sólido ou fisicamente confinada no interior de uma matriz e a classificação do método de imobilização pode ser considerada quanto ao tipo de interação responsável pela ligação da enzima no suporte, como meios químicos ou físicos, ou a natureza do suporte: poroso ou não-poroso.⁵⁵⁻⁵⁷

Segundo Sheldon e Pelt,⁴ os métodos para a imobilização são divididos em três categorias: adsorção num suporte, ligação covalente em um suporte e encapsulamento. Estas são combinações de métodos químicos que envolvem a formação de, no mínimo, uma ligação covalente entre os resíduos terminais de uma enzima e um grupo funcional do suporte, ou entre duas ou mais moléculas de enzima; métodos físicos que envolvem as forças físicas como adsorção, interações eletrostáticas; métodos de encapsulação ou microencapsulação em matrizes poliméricas.^{17,58-60}

A adsorção física (ADS) é um dos métodos mais simples para

imobilizar enzimas e não altera facilmente o seu sítio ativo. As forças físicas envolvem apenas as interações fracas, tais como ligações de hidrogênio, hidrofóbicas e ligação de van der Waals. Na adsorção iônica a imobilização baseia-se na atração da enzima pelo suporte sólido que contém íons residuais, resultando no potencial zeta do sistema (medida da carga eletronegativa que circundam as micropartículas). Segundo a literatura, as cargas presentes nas paredes porosas do suporte e cargas da enzima podem ser variadas para fornecer condição ideal de imobilização.⁶¹

A interação por adsorção física (Figura 1a) é fraca e pode ocasionar a lixiviação da enzima nos meios reacionais, por isso se faz necessário estudos quanto à influencia da porosidade do suporte neste método.^{1,48} A facilidade de dessorção leva a uma fácil perda enzimática, mas isso pode ser também visto como uma vantagem, pois permite a recuperação do suporte após desnaturação da enzima e nova imobilização. Este método apresenta-se como o mais empregado no setor industrial, que utiliza lipases imobilizadas em suportes hidrofóbicos.⁶²⁻⁶⁵

Kharrat *et al.*⁶⁶ imobilizaram a lipase de *Rhizopus oryzae* por adsorção física em aerogéis de sílica (secagem em meios pressurizados) e observaram que as propriedades funcionais da lipase imobilizada foram estáveis em temperaturas e valores de pH extremos e solventes apolares, apresentando também a manutenção da atividade após 4 meses de armazenamento à 4 °C. Este biocatalisador imobilizado foi aplicado na esterificação de ácido oleico com n-butanol, usando hexano como solvente orgânico. O melhor rendimento de conversão do éster de oleato de butila foi obtido com a lipase imobilizada (80% versus 35% com a lipase livre) e 12 ciclos de reutilização sem perda significativa da sua atividade catalítica.

Devido à facilidade de imobilização pelo método de adsorção física e grande utilização destes biocatalisadores imobilizados, é possível adquiri-los comercialmente imobilizados em suportes, como, por exemplo, a lipase de *Candida antarctica* tipo B imobilizada em resina poliacrílica, (Novozym[®] 435) manufaturada pela Novozymes.^{67,68} Outra lipase imobilizada também bastante utilizada em biotransformação é a lipase de *Rhizomucor miehei* (Lipozyme RM IM), comercializada pela Novozymes.^{29,69}

A ligação covalente (LC), ilustrada na Figura 1b, é uma técnica de imobilização de enzimas que envolve a modificação na superfície do suporte com agentes bifuncionais para imobilização eficiente e irreversível da enzima. Portanto, é considerada uma alternativa à fraca ligação proporcionada pelos métodos de adsorção física, no entanto, por envolver tratamento químico do suporte, pode ocorrer modificação no sítio ativo da enzima.^{1,18,70,71}

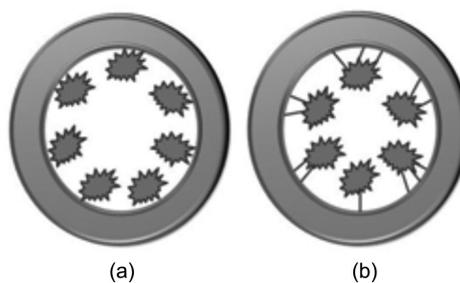


Figura 1. Ilustração da técnica de adsorção física (a) e ligação covalente (b) para a imobilização de enzimas

No caso específico das lipases uma interface água-solvente é exigida para sua total atividade catalítica, o uso de agentes macromoleculares mostram efeitos estabilizantes significativos na atividade da enzima por meio do revestimento da interface, impedindo a alteração da estrutura proteica.³⁸ Partindo do pressuposto de que uma das

principais vantagens da imobilização de enzimas é a reutilização do biocatalisador, a lixiviação deve ser evitada e, atualmente, estudos são realizados para evitar perda das enzimas imobilizadas principalmente em materiais mesoporosos (MSP).

A reticulação de moléculas de enzima dentro dos nanocanais com agentes bifuncionais também é realizada com o objetivo de fechamento parcial das aberturas dos poros com enzimas pré-carregadas e deposição de camadas de polieletrólitos para cobrir as aberturas dos poros. Nestes processos descritos por Lee *et al.*,⁶¹ observou-se a reticulação de moléculas de enzima dentro dos nanocanais com glutaraldeído, a redução parcial das aberturas dos poros sobre a superfície externa por sinalização das enzimas pré-carregadas e a deposição de polieletrólitos na superfície do lado de fora do poro para cobrir os canais de abertura.

Um tipo especial de imobilização por ligação covalente é a imobilização por ligações cruzadas. Nesse método as enzimas são fortemente ligadas entre si, com a utilização de um agente multifuncional. É primordial nesta técnica de imobilização a seleção de um reagente que promova a ligação entre grupos não envolvidos na catálise e que esteja em concentração suficiente para a completa imobilização e manutenção da atividade enzimática.^{51,52,59} De acordo com Sheldon⁵⁰ os biocatalisadores imobilizados por esta técnica apresentam geralmente uma melhor estabilidade de armazenamento e operacional, protegendo da desnaturação pelo calor, por solventes orgânicos, e lixiviação durante a reação. Além disso, eles têm elevada produtividade (produto kg por quilograma biocatalisador), facilidade de recuperação e reciclo. Ainda pode-se salientar a possibilidade de co-imobilizar dois ou mais tipos de enzimas formando o agregado enzimático por ligações cruzadas, definido na literatura por CLEA (cross-linked enzyme aggregates, em inglês), que são capazes de catalisar múltiplas biotransformações, em passo único ou em sequência de uma série de processos catalíticos.

Na encapsulação o método baseia-se em envolver a enzima em meio semipermeável reticulado ou microcápsula. Os meios poliméricos reticulados devem ter poros pequenos o suficiente para não permitir a passagem das enzimas, mas oferecendo passagem livre aos substratos e produtos. Isso permite que as enzimas permaneçam na solução, mas que fiquem protegidas de efeitos externos. Apesar da vantagem de não ocorrência de alteração estrutural da enzima, esse método pode não ser aplicável em alguns casos, por exemplo, se o substrato da enzima for grande e não passar pelos poros do suporte.^{10,12,52}

A encapsulação de enzimas pela técnica sol-gel é resultante de dois processos simultâneos: condensação dos precursores de sílica para formação da rede porosa de sílica e a encapsulação aleatória da enzima (Figura 2).^{11,33,72,73}

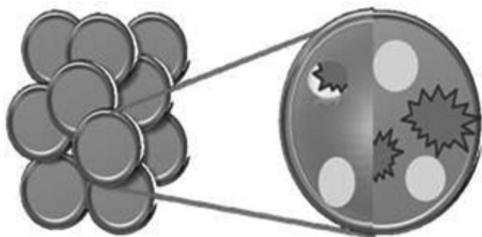


Figura 2. Sílica com a presença da lipase no interior da rede porosa

O processo sol-gel envolve diversas variáveis, como tempo e temperatura da reação, natureza do catalisador, concentração de reagentes, entre outros. Estas variáveis determinam as características finais do sistema, incluindo a porcentagem de hidrólise e condensação de grupos reativos, densidade de reticulação e homogeneidade do

produto. Além disso, aditivos podem ser usados para melhorar o processo e obter materiais com melhores propriedades, o que possibilita modificações nas propriedades mecânicas, controle de porosidade e ajuste no balanço hidrofílico/hidrofóbico. Recentemente matrizes híbridas foram testadas com sucesso para imobilização de diferentes lipases: lipase de *Candida rugosa*, lipase de *Burkholderia cepacia*, lipase de pâncreas suíno e lipase de *Bacillus* sp.^{9,10,11,33,74}

Pinheiro *et al.*³³ estudaram diferentes tempos de gelificação (4, 18, 24 e 48 horas) da matriz produzida pela técnica sol-gel utilizando tetraetoxissilano como precursor para encapsulação da lipase de *Candida rugosa*. Este estudo mostra que o tempo de gelificação está ligado diretamente com a formação química do biocatalisador imobilizado e, conseqüentemente, afeta o volume total de poros. O tempo de 24 h na etapa de gelificação e evaporação da estrutura monolítica da matriz foi selecionado devido a melhor combinação da estabilidade térmica e percentagem de hidrólise (99,5%).

O método sol-gel também foi utilizado para encapsulação da lipase de *Rhizomucor miehei* por Macario *et al.*⁷⁵ Para a formação da matriz mesoporosa foi utilizado um processo que envolve a hidrólise/policondensação de um precursor de sílica a um pH neutro e temperatura ambiente. O biocatalisador encapsulado foi utilizado na reação de transesterificação de trioleína com metanol na ausência de solvente, alcançando maior rendimento de 77% de ésteres após 96 h a 40 °C. Constatou-se que a produtividade total da enzima imobilizada foi quase seis vezes maior do que a obtida usando lipase livre. Os resultados indicaram claramente que o processo de imobilização da lipase preserva a mobilidade da enzima e permite aumentar a sua estabilidade.

No estudo realizado por Carvalho *et al.*,¹⁰ a lipase de *Bacillus* sp. ITP-001 encapsulada pela técnica sol-gel, utilizando o tetraetilortossilicato como precursor, foi caracterizada bioquimicamente na reação de hidrólise do azeite de oliva e foi possível verificar a melhoria dos parâmetros cinéticos quando comparada com a enzima na sua forma livre. Souza *et al.*⁹ adicionaram diferentes líquidos iônicos durante o encapsulamento pela mesma técnica sol gel, utilizada por Carvalho *et al.*,¹⁰ para a imobilização da lipase de *Burkholderia cepacia*. Os resultados foram comparados ao biocatalisador imobilizado na ausência do aditivo líquido iônico e, quando na presença do aditivo, houve aumento de área de superfície (143 a 245 m²/g) e diâmetro dos poros (19 a 38 Å). Observou-se também maior rendimento de imobilização, possivelmente devido à proteção promovida pelo líquido iônico durante a encapsulação, impedindo a inativação da lipase ocasionada pelo álcool e encolhimento de gel durante o processo sol-gel.

Embora cada método de imobilização apresente vantagens e desvantagens, a escolha da estratégia e de modificação do suporte deverá considerar as relações entre suporte, enzima e substrato, parâmetros físicos (por exemplo, temperatura e pressão), solvente (solvente orgânico, o líquido iônico, fluido supercrítico, etc), água para a manutenção das propriedades catalíticas e da estrutura tridimensional das lipases e o tipo de reator (reator de tanque agitado, reator de membrana, reator de leito fixo, reator de coluna de bolhas).^{17,57,76}

SUPORTES PARA IMOBILIZAÇÃO

O recente interesse em nanotecnologia tem proporcionado uma diversidade de materiais que podem suportar enzimas imobilizadas devido às suas potenciais aplicações em biotecnologia. Contudo, além do desenvolvimento de novas técnicas, faz-se necessário desenvolvimento adequado de técnicas de aprimoramento de materiais que combinem desempenho tecnológico com renovação e sustentabilidade econômica.¹⁷ A maior contribuição para o bom desempenho da enzima imobilizada em um suporte irá depender da não solubilidade do suporte, superfície de contato, porosidade e fixação irreversível,

sem afetar a atividade enzimática e sem interferir na reação na qual esteja sendo aplicada. Portanto, a interação entre o suporte e a enzima irá fornecer ao biocatalisador imobilizado as suas propriedades bioquímicas, mecânicas e cinéticas (Figura 3).^{1,77,78}

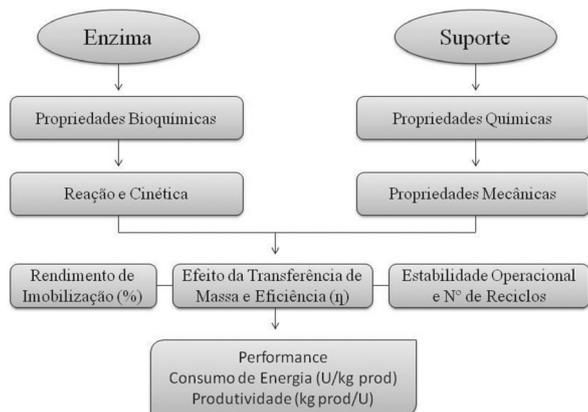


Figura 3. Fatores que afetam o desempenho de enzimas imobilizadas em suportes sólidos

Neste intuito, é necessário o aprimoramento de suportes, por exemplo, por meio de modificações de sua morfologia com aditivos e/ou estabilizantes para aplicação destes na imobilização de enzimas, assegurando a estabilidade e reutilização da enzima e, conseqüentemente, melhorando a relação custo-benefício do processo. Portanto, se o suporte for criteriosamente selecionado pode-se também aumentar o tempo de meia-vida, isto é, a estabilidade operacional. Contudo, caso essa estratégia seja feita de forma inadequada poderá afetar adversamente a estabilidade e o desempenho global do sistema imobilizado.^{66,79,80}

De acordo com Cantone *et al.*,⁵² a seleção de um suporte para imobilização de enzimas deve analisar as características físicas, químicas e morfológicas, bem como a possibilidade de regeneração do material e sua influência quanto à enzima imobilizada. Estas características irão determinar o a aplicabilidade do biocatalisador. Bon *et al.*³¹ relataram que as principais características a serem observadas na seleção de um suporte que, possivelmente, afetam o desempenho do biocatalisador imobilizado são:

- Características químicas: as quais são baseadas na composição química, grupos funcionais, estabilidade química, composição da superfície do suporte e micros efeitos (pH, carga da superfície, natureza hidrofóbica e hidrofílica, efeito redutor e a presença de íons metálicos);
- Características mecânicas: referem-se ao comportamento de compressão, tamanho da partícula, diâmetro do poro, área superficial, volume acessível da matriz, resistência à compactação em operações com altas vazões para reatores de leito fixo, abrasão para reatores agitados e velocidade de sedimentação para leitos fluidizados;
- Características morfológicas: associadas à porosidade do suporte, podendo ser não porosos (baixa área superficial), porosos (grande área superficial) ou estrutura em gel.

Dentre as características citadas acima, a estabilidade mecânica do suporte também é um parâmetro crucial para muitas aplicações de enzimas imobilizadas. A estabilidade mecânica pode limitar o biocatalisador imobilizado ao longo da aplicação, causando o efeito de stress mecânico e desintegração do catalisador durante o processo, influenciando a atividade catalítica, estabilidade de armazenamento, operacional e térmica.⁵³

De acordo com Talbert e Goddard *et al.*,¹⁸ o material utilizado como suporte para a imobilização de enzimas pode modificar a

quantidade de água total nas proximidades da enzima e a partição dos reagentes e/ou produtos na mistura reacional. Portanto, o balanço hidrofílico/hidrofóbico da superfície do suporte é fundamental, pois na etapa de preparação de suportes hidrofóbicos a água pode ficar retida nos interstícios porosos e, conseqüentemente, ao redor da enzima imobilizada. A presença da quantidade mínima de moléculas de água no microambiente é necessária para preservação da estrutura conformacional da enzima. Todavia, o uso de suportes hidrofílicos no processo de imobilização promove a competição da água entre o suporte e a enzima durante a reação, influenciando no equilíbrio termodinâmico do sistema.⁵²

A natureza física do suporte, por exemplo, morfologia, tamanho e distribuição dos poros, influencia também diretamente no rendimento de imobilização e em efeitos difusionais causados pela transferência de massa entre o meio líquido e os biocatalisadores imobilizados. Essas limitações podem ser resumidas em duas fases: transferência de massa externa, que envolve a transferência de reagentes/substratos do meio reacional até a superfície do suporte de imobilização, e a transferência de massa interna, que descreve a transferência de reagentes/substratos no suporte de imobilização até o sítio ativo da enzima. Qualquer etapa da difusão pode limitar a atividade global da enzima imobilizada.^{5,53,70,81}

Ainda se deve considerar o custo-benefício da escolha do suporte de imobilização, pois de acordo com Scherer *et al.*,⁷⁹ o preço do suporte utilizado na imobilização de enzimas é um fator a ser analisado, devendo ser comparadas as vantagens e desvantagens da aplicação dos biocatalisadores nos diferentes processos.

Conforme a classificação dos suportes quanto à composição, os materiais mais utilizados são os orgânicos, notadamente os polímeros, os quais podem ser naturais ou sintéticos. Os suportes sintéticos exibem variedades de formas físicas e estruturas químicas, podendo ser combinadas para formar um suporte ideal. Os naturais apresentam algumas vantagens quando comparados aos sintéticos, como baixo custo e facilidade de degradação, sem causar danos ao meio ambiente.^{31,62}

Contudo, os suportes inorgânicos, naturais ou sintéticos, são mais apropriados para uso industrial por apresentarem elevada resistência mecânica, estabilidade em ampla faixa de pressões, temperaturas e valores de pH, rigidez, resistência a solventes orgânicos e ao ataque microbiano.^{1,5,31} Na Tabela 2 são apresentados diferentes suportes para imobilização de lipases e sua classificação.

Independente da natureza do suporte, a classificação pode ser realizada levando em consideração também a sua morfologia e porosidade, apresentando-se como fator importante devido à possibilidade de imobilização da enzima na sua superfície e/ou no seu interior, sem afetar a estabilidade estrutural da enzima.^{18,78,92}

Segundo a IUPAC (Internacional Union of Pure and Applied Chemistry), os materiais porosos são classificados em função do diâmetro como microporoso, mesoporoso ou macroporoso. Suportes microporosos (diâmetro menor que 2 nm) apresentam como vantagem a eliminação da resistência à transferência de massa interna, e podem ser úteis no processo de imobilização de enzimas devido à formação de uma rede ou agregados. Na Figura 4 é possível verificar partículas microporosas isoladas e combinadas.

As partículas isoladas, quando ligadas por ligações de hidrogênio, originam aglomerados estáveis que podem ter centenas de nanômetros de tamanho e, deste modo, formar uma rede tridimensional.^{93,94} A eficiência da imobilização da lipase de *Thermomyces lanuginosus* em suporte microporoso hidrofóbico, poli(estireno-divinilbenzeno), relatada por Dizge *et al.*,⁹⁵ mostrou que o biocatalisador imobilizado aplicado na reação de transesterificação possui 85% de rendimento de imobilização e estabilidade operacional durante 15 ciclos.

Grandes áreas superficiais são características de suportes mesoporosos (diâmetros que variam de 2 a 50 nm), tornando-se uma

Tabela 2. Tipos e classificação de suportes utilizados para imobilização de enzimas

Natureza	Classificação do suporte	Suporte	Lipase	Referência
Natural	Orgânico	Bagaço da cana-de-açúcar	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Mendes <i>et al.</i> ¹³
		Quitosana	<i>Talaromyces thermophilus</i>	Romdhane <i>et al.</i> ⁸²
		Fibra de coco	<i>Candida antarctica B</i>	Brígida <i>et al.</i> ⁸³
	Inorgânico	Nanofibra	<i>Candida rugosa</i>	Zhu e Sun ¹⁹
		Argila	Pâncreas suíno	Scherer <i>et al.</i> ⁷⁹
Sintético	Orgânico	Sílica	<i>Rhizopus oryzae</i>	Kharrat <i>et al.</i> ⁸⁶
		Poliuretano	<i>Rhizopus oryzae</i>	Grosso <i>et al.</i> ⁸⁴
		Poliestireno	Pâncreas suíno	Hou <i>et al.</i> ⁸⁵
		PHBV	<i>Bacillus sp. ITP-001</i>	Cabrera-Padilla <i>et al.</i> ⁸⁶
	Inorgânicos e Orgânicos	Polipropileno	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Salis <i>et al.</i> ⁸⁷
		Eupergit C	<i>Rhizopus oryzae</i>	Nunes <i>et al.</i> ⁸⁸
		POS-PVA	<i>Rhizopus oryzae</i>	Paula <i>et al.</i> ⁸⁹
		Sílica	<i>Bacillus sp. ITP-001</i>	Carvalho <i>et al.</i> ¹⁰
		Nanopartícula de Fe ₃ O ₄	<i>Pseudomonas cepacia</i>	Andrade <i>et al.</i> ⁹⁰
		Alumina	<i>Bacillus sp.</i>	Kumar <i>et al.</i> ⁹¹

PHBV = Poli(hidroxi-butirato-co-hidroxi-valerato); POS-PVA = Tetra-etilortossilicato-álcool polivinílico.

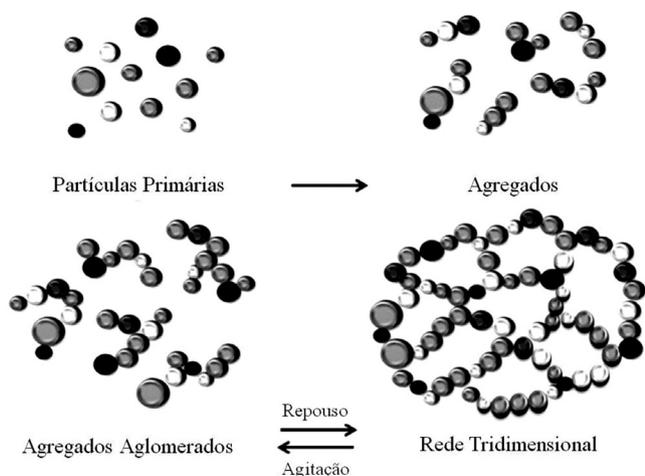


Figura 4. Esquema representativo de formação de ponte de hidrogênio entre o Aerosil® (a) e aglomeração para formação da rede tridimensional (b)

estratégia geralmente positiva devido à minimização das restrições difusionais e melhoria da acessibilidade do substrato ao sítio ativo da enzima.³¹ Nos últimos anos vários artigos indicam o progresso no uso de materiais mesoporosos e suas contribuições correspondentes ao processo de imobilização de enzima, bem como as aplicações na biocatálise: sílica amorfa, organosílica, carbono mesoporoso, zeólitas, dentre outros. Aditivos têm sido introduzidos com o objetivo de

melhorar a formação dos mesoporos durante a obtenção do suporte e diversos estudos apontam as tendências em potencial desenvolvimento deste campo.^{1,9,10,77}

As partículas que apresentam diâmetros maiores que 50 nm são denominadas suportes macroporosos e são formadas por densas camadas de grupos altamente hidrofóbicos. Alguns exemplos destes suportes são: copolímero de estireno-divinilbenzeno, polipropileno poroso Accurel, resina acrílica macroporosa e alumina, os quais também são empregados como suportes para imobilização de lipases.^{96,97} O uso de suportes macroporosos para imobilização de enzimas é pouco relatado na literatura e relacionado com a possibilidade de lixiviação da enzima do poro do suporte durante a utilização do biocatalisador imobilizado. Portanto, sugere-se o uso de suportes micro ou mesoporosos.^{5,77}

SÍLICA

A sílica (SiO₂) é um dos materiais multifuncionais descritos na literatura com elevado potencial de aplicação para imobilização, principalmente devido à possibilidade de modificação da superfície deste suporte, atendendo assim a classificação da IUPAC, estabilidade térmica, estabilidade mecânica e segurança toxicológica.^{11,28,98,99} As características físico-químicas e morfológicas da sílica podem ser descritas como natural ou sintética, micro, meso ou macroporosa, cristalina ou amorfa e com propriedades polares, as quais são consideradas sítios de adsorção eficientes para imobilização da enzima, promovendo estabilidade química e térmica ao biocatalisador imobilizado.^{99,100,101}

A sílica pode ser adquirida comercialmente ou também ser produzida por diferentes técnicas, sendo que dentre elas a mais utilizada para imobilização de enzimas é a sílica produzida pela técnica sol-gel.^{5,6,11,28}

O Aerosil® é uma sílica comercial pirogênica com elevada pureza, amorfa e de finíssima granulometria vendida pela Degussa.¹⁰² É produzida por um processo contínuo de hidrólise de clorosilanos. Durante esse processo, o SiCl₄ é convertido a gás e depois reagido espontaneamente com o vapor d'água formado em uma atmosfera contendo oxigênio e hidrogênio com perda considerável de calor. O único subproduto dessa reação é o ácido clorídrico (gasoso), que é separado da sílica. Vários grupos podem ser ligados quimicamente à superfície da sílica como, por exemplo, compostos organosilícios para alteração das características superficiais (hidrofilicidade e hidrofobicidade).

Existem diversos tipos de Aerosil®, com áreas superficiais que variam de 50 m²/g a 380 m²/g, tamanho médio de partícula entre 7 nm e 40 nm e podem ser aplicados na produção de tintas e revestimentos, resinas de poliéster insaturado, resinas de laminação e gel, borracha de silicone, adesivos e selantes, tintas de impressão, cosméticos, dentre outros.⁹³ Vale ressaltar que são raros os estudos que utilizam este tipo de sílica para a imobilização de lipase, porém, quando aplicada, tem como principal objetivo evitar as limitações de transferência de massa e, consequentemente, a melhoria do processo de difusão de substratos e produtos.^{103,104}

Novas rotas de obtenção de sílica ainda são descritas na literatura, como, por exemplo, o estudo realizado por Bernal *et al.*¹⁰⁵ Neste caso, a sílica foi produzida por meio da mistura de reagentes SiO₂; Na₂O: CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio): EtAc (acetato de etila): H₂O na seguinte proporção molar 1:0,3:0,24:7,2:193. A mistura foi mantida a 80 °C durante 48 h e o sólido obtido foi calcinado a 540 °C, durante 3 h. Após a derivatização hidrofílica e/ou hidrofóbica obteve-se a sílica octil (OS), glioxil (GS) e sílica octil-glioxil (OGS). Os suportes foram aplicados na imobilização de lipases de *Pseudomonas stutzeri* e *Alcaligenes sp.* para síntese de ésteres de açúcar.

Dentre os métodos de preparação de sílica, método sol-gel é sem dúvidas o mais utilizado. Este método envolve a hidrólise, policondensação e a gelação de solventes apropriados, em condições de síntese, permitindo a coexistência de espécies orgânicas e inorgânicas no mesmo sistema, seguido pela secagem convencional ou por meio pressurizado.^{78,105,3,20,77} Uma rede porosa de sílica é formada e denominada xerogel, caso a secagem seja à temperatura ambiente.^{10,74} E a sílica seca por meio pressurizado é denominada aerogel.^{66,80,106,107} Na superfície da sílica-gel observa-se a presença de grupos OH (hidroxilas) ligados quimicamente, os quais atuam como ponto de reação com os grupos funcionais de ativação do suporte ou diretamente com os grupamentos de ligação da enzima.^{32,61,108,109} As hidroxilas agem como centros de adsorção molecular ou centros de reação, formando ligações Si-O-X, durante a interação com os adsorventes capazes de formar uma ligação de hidrogênio com os grupos OH ou sofrer interações doador-receptor. Os grupos OH da superfície são divididos conforme a Figura 5, na forma livre – OH formando os poros na partícula de sílica (a), grupo siloxano $\equiv \text{Si} - \text{O} - \text{Si} \equiv$ (b), grupo silanol livre $\equiv \text{SiOH}$ (c), silanóis associados = $\text{Si}(\text{OH})_2$ (d) e silanóis vicinais ou germinal por meio de ligação de hidrogênio (e). Contudo, deve-se levar em conta que dentro do reticulado da sílica existe água no interstício da estrutura.^{3,99,110} O outro tipo de sílica utilizada para a imobilização de lipase é a mesoporosa comercial produzida também pela técnica sol-gel, denominada SBA-15, um dos novos suportes derivados de sílica amplamente estudados.^{2,6,115,118}

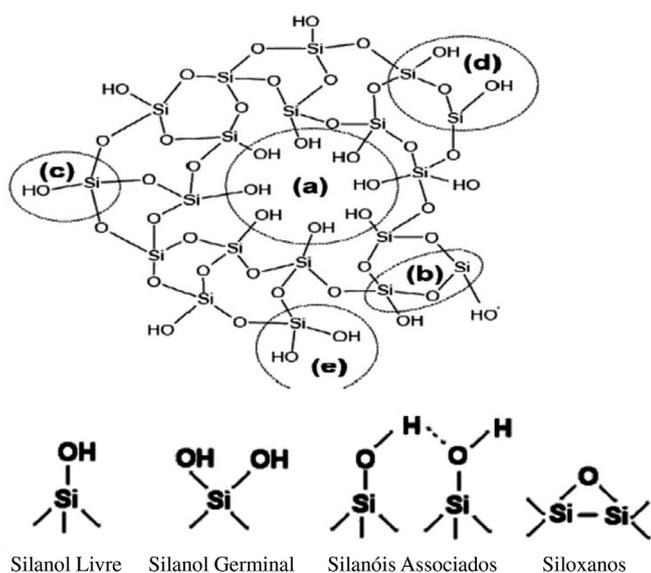


Figura 5. Estrutura da sílica e os grupamentos presentes

Porém, apesar da facilidade de obtenção da sílica (produzida ou comercial) e grande aplicação na imobilização de enzima, conforme Tabela 3, o aperfeiçoamento morfológico de suportes de sílica comercial ou produzida para a imobilização de biocatalisadores requer intenso estudo para que novas técnicas possam contribuir para a melhoria da estabilidade enzima aplicada aos processos biotecnológicos, como a aplicação de aditivos para modificação superficial do suporte.

MODIFICAÇÃO SUPERFICIAL DE SÍLICA

Inúmeros suportes são relatados na literatura e muitos estão em fase de desenvolvimento, porém, antes da obtenção de um novo suporte, é também necessário promover a melhoria da superfície daqueles já existentes. Esta modificação na superfície pode ser ocasionada por meio da utilização de um aditivo durante ou após a

Tabela 3. Sílica aplicadas na imobilização de lipases

Fonte de Lipase	Suporte	Técnica de Imobilização	Referencia
<i>Mucor miehei</i>	Sílica mesoporosa comercial	Adsorção física	Canilho et al. ¹¹¹
<i>Burkholderia sp.</i>	Nanopartículas de sílica	Ligação covalente	Tran et al. ¹¹²
<i>Rhizomucor miehei</i>	Nanopartículas de sílica	Encapsulação	Macario et al. ¹¹³
Pâncreas suíno	Sílica mesoporosa	Ligação covalente	Wang et al. ¹¹⁴
<i>Burkholderia cepacia</i>	Sílica gel	Encapsulação	Souza et al. ¹²
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	SBA-15	Adsorção física	Salis et al. ¹¹⁵
<i>Candida rugosa</i>	Sílica mesoporosa	Adsorção física e ligação covalente	Yu et al. ¹¹⁶
Pâncreas suíno	Sílica Mesoporosa Amorfa	Adsorção Física	Wang et al. ¹¹⁷
Pâncreas suíno	SBA-15 com líquido iônico	Adsorção Física	Zou et al. ¹¹⁸
<i>Burkholderia cepacia</i>	Sílica com líquido iônico	Encapsulação	Barbosa et al. ⁸⁰
<i>Cândida rugosa e Rhizopus oryzae</i>	Sílica gel	Ligação Covalente	Lee et al. ⁶¹
<i>Mucormiehei e Rhizopusoryzae</i>	Sílica Mesoporosa	Adsorção Física	Gustafsson et al. ¹¹⁹
<i>P. fluorescens</i>	Sílica com líquido iônico	Encapsulação	Zarcula et al. ⁷²
<i>Burkholderia cepacia</i>	SiO ₂ -PVA	Ligação Covalente	Da Rós et al. ¹²⁰

preparação do suporte, e desta forma influenciar na área superficial, porosidade, disponibilidade de grupamentos funcionais e, consequentemente, na estabilidade de enzimas quando imobilizadas. O sucesso do procedimento de imobilização depende da enzima a ser imobilizada e as propriedades da superfície da proteína devem ser consideradas a partir dos grupos funcionais, carga iônica e grupos hidrofóbicos.⁵³ Alguns aditivos atuam como agentes modificadores de sílica e são relatados na literatura como polietilenoglicol - PEG, álcool polivinílico - PVA, caseína, gelatina, albumina de ovo ou bovina, líquidos hidrofóbicos e líquidos iônicos - Lis.^{9,11,38,109,121}

O PEG é um polímero formado a partir do etileno glicol, que além de muito utilizado na indústria farmacêutica, pode ser utilizado também com aditivo macromolecular durante a produção da sílica pela técnica sol gel. Outro exemplo de polímero utilizado como aditivo é o PVA. De acordo com a literatura estes aditivos poliméricos são utilizados para imobilização de diferentes fontes de lipases e podem atuar na modificação das características físico-químicas dos materiais inorgânicos e orgânicos, na hidrofiliabilidade e hidrofobicidade, na condutividade elétrica, na carga iônica, na porosidade e nas propriedades mecânicas.^{11,32,89,121-123} No estudo realizado por Soares et al.,⁷⁴ estes dois aditivos foram utilizados para a encapsulação da lipase de *Candida rugosa* no interior de um suporte de sílica sol-gel quimicamente inerte preparado pela policondensação do precursor tetraetoxisilano (TEOS). As propriedades da sílica e de seus derivados imobilizados foram analisadas. Nos estudos realizados por Soares et al.⁷⁴ e Souza et al.¹² foi observado que o uso do aditivo PEG

proporcionou uma menor área superficial e maior volume e diâmetro dos poros da sílica obtida pela técnica sol-gel. A modificação superficial da sílica utilizando PVA apresentou efeito antagônico comparado ao PEG, isto é, ocorreu a diminuição no tamanho médio do poro da sílica na presença PVA. Tal modificação deve-se possivelmente à contração do gel na etapa de policondensação completa.

Portanto, o tipo de aditivo empregado está associado às mudanças nas características morfológicas do suporte e possivelmente do sistema imobilizado, como, por exemplo, aumento dos poros e, consequentemente, o aumento da difusão do substrato ao sítio ativo da enzima imobilizada ao suporte modificado por aditivos com efeitos positivos no processo de reticulação de obtenção da sílica.

Dentre os aditivos, a albumina foi testada em comparação com o PEG na imobilização da lipase de *Candida rugosa* por ligação covalente em sílica silanizada e ativada com γ -aminopropiltriétoxi silano (γ -APTS) e ativada com glutaraldeído, respectivamente. Os sistemas imobilizados foram aplicados na reação de esterificação para a síntese de butirato de butila e foi avaliado o rendimento da imobilização e o tempo de meia-vida dos biocatalisadores imobilizados. O maior rendimento de imobilização (59,6%) foi obtido quando na presença de PEG e o tempo de meia-vida quando na presença do aditivo passou de 64,5 h para 176 h, em comparação com o controle.¹²⁴

Souza *et al.*¹² utilizaram o líquido hidrofóbico Aliquat®, em diferentes concentrações (0,5 a 3,0 % m/v), na formação da sílica pela técnica sol-gel para encapsulamento da lipase de *Bacillus* sp. ITP – 001. Ao comparar a sílica pura com a sílica produzida com o aditivo, observou-se que o Aliquat® diminuiu a área superficial da sílica, contudo, ocorreu o aumento do volume e diâmetro dos poros. Este comportamento foi relacionado à adsorção parcial da enzima na superfície externa da sílica. Os maiores rendimentos de imobilização (71%) foram obtidos com a maior concentração de aditivo durante a formação da sílica (1,5 % m/v). Este comportamento foi atribuído ao microambiente hidrofóbico benéfico à enzima e ao maior tamanho dos poros proporcionado pelo aditivo. Portanto, a enzima foi imobilizada na superfície e no interior dos poros, sem comprometimento da acessibilidade do substrato ao sítio ativo da enzima e, consequentemente, resultou em maior rendimento de imobilização e maior eficiência da reação enzimática.

Os líquidos iônicos (LIs) são utilizados na biocatálise como solventes verdes e agentes de modificação superficial da sílica. Os LIs são compostos formados na sua maioria por um cátion orgânico e um ânion inorgânico ou orgânico e são baseados nos princípios da química verde, visando processos químicos ambientalmente mais limpos, sendo conhecidos principalmente como substituintes de solventes orgânicos voláteis em meios reacionais.¹²⁵⁻¹²⁷ De acordo com o avanço das pesquisas e patentes sobre líquidos iônicos observou-se o aumento em escala logarítmica desde a década de 80 e, especificamente nos últimos 10 anos, tem-se utilizado LIs como agentes na imobilização de catalisadores.^{9,125,127-130} Segundo Naushad *et al.*,¹²⁸ os LIs têm mostrado o seu potencial como solvente em reações enzimáticas, alterando a estrutura, a atividade, a enantioselectividade e a estabilidade das enzimas. Assim, é de extrema necessidade o conhecimento dos efeitos químicos de líquidos iônicos sobre a estrutura, estabilidade e atividade de enzimas, o que será útil para os pesquisadores em várias aplicações biocatalíticas.

Uma outra alternativa para aplicação dos líquidos iônicos é o seu uso como agentes de modificação superficial da sílica. Os líquidos iônicos (LIs) são classificados em apróticos e próticos. Os LIs apróticos (LIA) são aqueles considerados bons doadores de prótons e formam ligação de hidrogênio, constituídos principalmente dos cátions orgânicos a base do imidazólio, piridino, tetraalquilamônio e tetraalquilfosfônio, os quais ainda apresentam elevados custos de síntese, o que dificulta sua aplicação industrial.^{2,6,72} Líquidos iônicos

próticos (LIP) possuem um próton de alta mobilidade, são resultantes da combinação de um ácido e uma base de Bronsted e possuem vantagens como baixo custo, simplicidade de síntese e baixa toxicidade, favorecendo a biocompatibilidade com as lipases.^{130,131}

Recentemente o líquido iônico é aplicado como aditivo no protocolo de imobilização, durante o processo de imobilização da lipase por encapsulação ou no tratamento do suporte para imobilização por ligação covalente, exibindo aumento na eficiência operacional e estabilidade catalítica do biocatalisador imobilizado.^{9,61,66,72,132-134} De acordo com Karout e Pierre,¹³⁵ a presença de LIs como aditivos pode influenciar a estrutura da sílica gel, aumentando o tamanho do poro e protegendo a camada de hidratação ao redor da enzima, evitando a desnaturação da enzima pela presença de álcool.

Na literatura trabalhos são relatados com modificação da superfície do suporte de sílica comercial (SBA-15) com LI apróticos, tais como o estudo de Zou *et al.*,¹¹⁸ os quais utilizaram líquidos iônicos apróticos baseados em imidazol adicionados na superfície sílica mesoporosa, SBA-15. A caracterização físico-química e morfológica dos suportes e biocatalisadores mostraram que o tratamento com líquido iônico para modificação superficial não causa impedimento na ligação da enzima e suporte, demonstrando a indução de um número relativamente elevado de líquido iônico e enzima dentro dos canais mesoporosos do suporte e o aumento da eficiência catalítica.

O mais recente trabalho realizado por Zou *et al.*⁶ utilizou a sílica comercial mesoporosa de baixo custo obtida comercialmente da Makall Chemical Technology Co., Ltd. (Qingdao, China). A sílica foi modificada com diferentes agentes baseados em trimetoxipropil-silano ou líquido iônico como fonte de grupamento alcoxissilano, que reagem com grupamentos de hidroxila da SiO₂. Os resultados mostraram que o líquido iônico foi mais eficiente do que fontes convencionais de alcoxissilano, com rendimento de imobilização da lipase de pâncreas suíno de 97% e a atividade relativa superior a 62% após cinco ciclos.

Hu *et al.*² relataram que a imobilização da lipase de *Burkholderia cepacia* também em SBA-15 modificado com diferentes líquidos iônicos apróticos foi uma estratégia eficiente para melhoria da estrutura de poros, do fortalecimento das interações enzima superfície e das propriedades do sistema imobilizado (estabilidade térmica e operacional, capacidade de reutilização, estabilidade de armazenamento e estabilidade em solventes orgânicos). A eficiência da imobilização neste estudo, além da melhoria da estrutura do suporte, deve-se também ao microambiente formado pela amina e o LI, mantendo assim a conformação favorável da enzima.

No entanto, para o uso de líquido iônico próticos pode-se analisar o estudo realizado por Souza *et al.*⁹ para encapsulação da lipase de *Burkholderia cepacia* pela técnica sol-gel. Neste estudo foram utilizados líquidos iônicos próticos baseados em monoetanolamina com diferentes comprimentos de cadeia alquílica e em diferentes concentrações (0,5 - 3,0% m/v). Os rendimentos de imobilização das lipases resultaram em valores elevados quando comparados ao sistema imobilizado na ausência de LI, com aumento da eficiência catalítica em 35 vezes. O efeito positivo observado foi atribuído ao revestimento que o LI proporcionou aos poros e à superfície do suporte selecionado (sílica), além da proteção da estrutura da lipase durante a obtenção do biocatalisador imobilizado, atuando como um agente estabilizador da enzima e protetor contra a inativação pelo álcool durante a encapsulação.

A modificação superficial do suporte ocorre também por meio da adição de grupos funcionais específicos na superfície do suporte e é aplicada também como pré-requisito para a imobilização de uma enzima em uma superfície sólida. Quando tais grupos estão ausentes, o suporte é submetido a uma modificação química por meio de agentes sinalizantes e/ou bifuncionais.^{48,136-138} A modificação superficial

utilizando agentes silanizadores baseia-se na silanização com organossilanos, a qual ocorre por meio da reação entre grupos reativos do tipo alcoxi (metoxi, etoxi) presentes em alcossilanos mono, bi ou trifuncionais e os silanóis superficiais da matriz inorgânica. O material resultante contém cadeias orgânicas pendentes que podem ser covalentemente ligadas por meio de ligações do tipo Si-O-Si-R, sendo hidrolíticas e termicamente estáveis, em que R representa uma cadeia orgânica contendo um grupo funcional específico. Já os agentes bifuncionais promovem uma forte ligação entre o suporte (silanizados ou não) e os grupamentos presentes na enzima, como hidroxil, mercapto, ou amina, permitindo uma flexibilidade conformacional mais ampla.^{1,18,70,139} As reações na superfície do suporte podem ser por: diazotização, formação de ligação amida, alquilação e arilação, formação de base de Schiff, reação de Ugi, reações de amidinação, troca do dissulfeto-tiol, interações enzima-mercúrio e ligação induzida por radiação.^{31,59,60}

Dentre estes agentes, os mais utilizados são 3-aminopropiltrimetoxissilano, 3-aminopropiltrietoxissilano e 3-cloropropiltrimetoxissilano, epicloridrina, glutaraldeído, glioxal, formaldeído, 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil] carbodi-imida, etilenodiamina, glicidol, carbonildiimidazol e outros.^{14-16,62} Na Figura 6 é possível verificar ampla gama de grupos funcionais que podem ser adicionados após modificação na superfície da sílica para imobilização de lipases, de acordo com Hartmann e Kostrov.¹⁴⁰

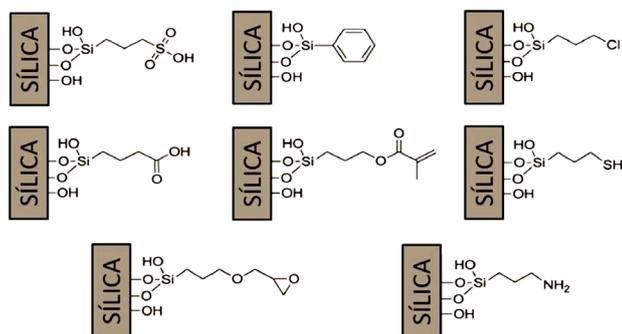


Figura 6. Ativação de suporte de sílica com diferentes grupos bifuncionais

Paula *et al.*¹⁴¹ imobilizaram pela técnica de adsorção física e ligação covalente a lipase de *Candida rugosa* em matriz híbrida constituída de polissiloxano-álcool polivinílico (POS-PVA). Na imobilização da lipase por adsorção física em POS-PVA previamente neutralizado com solução aquosa de NaOH foi verificado o rendimento de imobilização de 96,5%. Quando utilizado o suporte ativado com agente bifuncional glutaraldeído foi verificado um pequeno decréscimo na atividade e no rendimento quando comparado aos mesmos parâmetros referentes à imobilização por em POS-PVA puro, 81,5%. Esta diferença pode ter sido ocasionada pela modificação conformacional da enzima durante a etapa de fixação no suporte ativado com glutaraldeído, no qual altera a estrutura tridimensional do sítio ativo da enzima, tornando partes da molécula enzimática inacessíveis ao substrato palmitato de *p*-nitrofenila. Porém, vale ressaltar que apesar do pequeno decréscimo no rendimento de imobilização, o sistema obtido por adsorção física apresentou uma perda acentuada da atividade de esterificação na segunda batelada, com subsequente perda total na terceira batelada, o que correspondeu a um tempo de meia-vida de 39 h. Essa perda foi menos significativa quando comparada ao sistema obtido por ligação covalente utilizando o agente glutaraldeído, mantendo-se por seis bateladas e tempo de meia-vida de 81 h.

No estudo realizado por Yang *et al.*¹⁴² a lipase de *Arthrobacter* sp. foi imobilizada pelo método de ligação covalente convencional

e de ligação cruzada. O glutaraldeído foi utilizado na modificação da sílica obtida pela técnica sol-gel e utilizada como suporte. Após imobilização foi possível alcançar melhores propriedades catalíticas, permitindo a reutilização do biocatalisador imobilizado pelo método de ligação cruzada por 9 vezes. A maior eficiência no método de ligação cruzada deve-se a duas etapas durante a imobilização: na primeira etapa ocorre a ligação covalente da enzima ao suporte e na segunda etapa ocorre a agregação das enzimas por meio da adição do glutaraldeído, obtendo-se, assim, o reticulado do sistema imobilizado. Portanto, o aumento global da atividade catalítica do sistema reticulado em comparação com o biocatalisador imobilizado apenas por ligação covalente unipontual, deve-se possivelmente à maior carga de enzima alcançada nesta técnica de imobilização.^{56,106,143} Nos espectros de FTIR apresentados no trabalho, é possível verificar os picos presumivelmente da imina de base de Schiff produzida pela reação da amina com glutaraldeído.

Santos *et al.*³² produziram um suporte obtido pela técnica sol-gel utilizando os precursores tetraetoxissilano (TEOS) e álcool polivinílico (PVA) para imobilização da lipase de *Pseudomonas fluorescens* por ligação covalente utilizando o agente epicloridrina. Os resultados foram comparados com suporte tratado com o agente glutaraldeído, para os quais foram obtidos os maiores rendimentos de imobilização e eficiências de imobilização em sistemas utilizando sílica ativada com epicloridrina. A eficiência obtida se deve à maior presença de pontos de ligação covalente entre a enzima e o suporte, fenômeno confirmado por meio da determinação das propriedades morfológicas. O diferente comportamento durante a ativação do suporte indica que diferentes modificações químicas foram produzidas por cada agente de ativação. Durante a ativação com glutaraldeído ocorreu provavelmente uma reação entre o grupamento carbonila do aldeído e os grupos hidroxila do PVA, por meio do mecanismo acetal, deixando uma extremidade do glutaraldeído formada por um grupamento carboxila que poderá se ligar ao grupo NH₂ da enzima. Por outro lado, quando a epicloridrina é utilizada, grupos epoxi são formados na superfície do suporte e apenas um grupamento hidroxila é necessário para a ligação. Consequentemente, um maior número de sítios ativos da enzima estará disponível para imobilização devido à maior reatividade dos grupos epoxi. As suposições do tipo de reação foram confirmadas pelo espectro de FTIR, no qual após modificações químicas do suporte o pico correspondente ao grupo hidroxila foi menor para epicloridrina comparado ao glutaraldeído. E os picos intensos e estreitos foram encontrados nos difratogramas de raios-X, evidenciando assim a estrutura cristalina da lipase livre presentes nos derivados imobilizados em suporte modificado superficialmente com o agente epicloridrina.¹⁴⁴

A sílica obtida por Bernal *et al.*¹¹⁰ por meio da mistura de reagentes SiO₂: Na₂O: CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio): EtAc (acetato de etila): H₂O: H₂O passou por um processo de derivatização para sua modificação superficial, obtendo-se três tipos de suporte: suporte hidrofílico com a presença de grupos glioxila (SG), suporte hidrofóbico com grupos octila (SO) e suporte hidrofílico-hidrofóbico com ambos (SGO). As lipases de *Pseudomonas stutzeri* e *Alcaligenes* sp. foram imobilizadas por ligação covalente multipontual de acordo com cada suporte, com a finalidade de favorecer a formação de Bases de Schiff entre grupos aldeído do suporte e grupos de resíduos de lisina na superfície da proteína amino-. O suporte SGC foi o suporte mais eficiente para imobilização das lipases e aplicação na síntese de ésteres de açúcar, permitindo maior ativação interfacial e estabilização da enzima imobilizada covalente na sua superfície modificada. A nanopartícula de sílica coloidal, assim denominada por Cruz *et al.*¹⁰³ 2010, na presença de modificadores da estrutura: 2,2,2-trifluoroetanol (TFE) e ditiotreitol (DTT), foi aplicada para imobilização da lipase de *Candida antarctica* lipase B (CALB) e *Thermomyces lanuginosus* (TLL) por adsorção física. Os biocatalisadores imobilizados foram

aplicados em reações na presença de solventes orgânicos. Observou-se que foi possível o revestimento da superfície sólida do suporte modificado com a lipase com impedimento da limitação de transferência de massa. Baseando-se no perfil apresentado nesta revisão bibliográfica, pode-se afirmar que o uso de aditivos em estudos propostos por pesquisadores desde 2000 apresentaram resultados promissores na modificação de sílica. Nos primeiros estudos foram verificados efeitos positivos e negativos na modificação da superfície da sílica com uso de PEG, compostos de poli-hidroxil, albumina, gelatina, sorbitol, glicerol ou triacilgliceróis.¹⁴⁵ A partir destes resultados recentes descritos na literatura e discutidos nesta revisão podemos afirmar a necessidade da continuidade de estudos relacionados ao uso de diferentes aditivos na modificação da sílica e a aplicação na imobilização de enzimas.

CONCLUSÃO

O desafio do estudo da modificação das superfícies da sílica nos últimos anos tem apresentado o desenvolvimento de suportes para imobilização de enzimas que permitam a conversão catalítica por meio de processos ambientalmente corretos. A sílica utilizada na imobilização de enzimas é um suporte atrativo ao setor industrial devido à sua segurança toxicológica e promoção da estabilidade da enzima e a sua reutilização. Portanto, a modificação superficial da sílica supre a necessidade de desenvolvimento de novos suportes, pois a sílica pode ser modificada a fim de proporcionar maiores interações com a enzima quando utilizados para catalisar uma série de reações de grande valor agregado e os exemplos descritos nesta revisão mostram que a imobilização de enzimas em sílica é bastante promissora na preparação de biocatalisadores ativos e que há a necessidade de novas metodologias para melhoria da imobilização de enzimas que ainda poderão ser exploradas.

AGRADECIMENTOS

À UNIT, FAPITEC, CAPES e CNPq pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

- Zhou, Z.; Hartmann, M.; *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 3894.
- Hu, Y.; Tang, S.; Jiang, L.; Zou, B.; Yang, J.; Huang, H.; *Process Biochem.* **2012**, *47*, 2291.
- Zhuravlev, L. T.; *Colloids. Surf. A.* **2000**, *173*, 1.
- Sheldon, R. A.; Pelt, S. V.; *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 6223.
- Ispas, C.; Sokolov, I.; Andreescu, S.; *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, *393*, 543.
- Zou, B.; Song, C.; Xu, X.; Xia, J.; Huo, S.; Cui, F.; *Appl. Surf. Sci.* **2014**, *311*, 62.
- Yang, J.; Hu, Y.; Jiang, L.; Zou, B.; Jia, R.; Huang, H.; *Bioch. Eng J.* **2013**, *70*, 46.
- Xu, Y. Q.; Zhou, G. W.; Wu, C. C.; Li, T. D.; Song, H. B.; *Solid State Sci.* **2011**, *13*, 867.
- Souza, R. L.; Faria, E. L. P.; Figueiredo, R. T.; Freitas, L. S.; Iglesias, M.; Mattedi, S.; Zanin, G. M.; Santos, O. A. A.; Coutinho, J. A. P.; Lima, A. S.; Soares, C. M. F.; *Enzyme Microb. Technol.* **2013**, *52*, 141.
- Carvalho, N. B.; Barbosa, J. M. P.; Oliveira, M. V. S.; Fricks, A. T.; Lima, A. S.; Soares, C. M. F.; *Quim. Nova* **2013**, *36*, 52.
- Soares, C. M. F.; Santos, O. A.; Castro, H. F.; Moraes, F. F.; Zanin, G. M.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2006**, *39*, 69.
- Souza, R. L.; Resende, W. C.; Barao, C. E.; Zanin, G. M.; Castro, H. F.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2012**, *84*, 152.
- Mendes, A. A.; Castro, H. F.; Giordano, R. L. C.; *Quim. Nova* **2013**, *36*, 245.
- Oliveira, I. R. W. Z.; Fernandes, S. C.; Vieira, I. C.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2006**, *41*, 366.
- Gomes, F. M.; Paula, A. V.; Silva, G. S.; Castro, H. F.; *Quim. Nova* **2006**, *29*, 710.
- Li, N.; Bai, R.; *Ind. Eng. Chem. Res.* **2005**, *44*, 6692.
- Ansari, S. A.; Husain, Q.; *Biotechnol. Adv.* **2012**, *30*, 512.
- Talbert, J. N.; Goddard, J. M.; *Colloids Surf., B.* **2012**, *93*, 8.
- Zhu, J.; Sun, G.; *React. Funct. Polym.* **2012**, *72*, 839.
- Kapoor, M.; Gupta, M. N.; *Process Biochem.* **2012**, *47*, 555.
- Narwal, S. K.; Gupta, R.; *Biotechnol. Lett.* **2013**, *35*, 479.
- Zhang, B.; Weng, Y.; Xu, H.; Mao, Z.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2012**, *93*, 61.
- Barbosa, J. M. P.; Souza, R. L.; Melo, C. M.; Fricks, A. T.; Soares, C. M. F.; Lima, A. S.; *Quim. Nova* **2012**, *35*, 1173.
- Moura, C. V. R.; Nunes, A. S. L.; Moita Neto, J. M.; Neres, H. L. S.; Carvalho, L. M. G.; Moura, E. M.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2012**, *23*, 1226.
- Liu, W.; Chen, B.; Wang, F.; Tan, T.; Deng, L.; *Proc. Biochem.* **2011**, *46*, 1993.
- Akoh, C. C.; Chang, S.; Lee, G.; Shaw, J.; *J. Agric. Food. Chem.* **2007**, *55*, 8995.
- Hasan, F.; Shah, A. A.; Hame, E. A.; *Enzyme Microb. Technol.* **2006**, *39*, 235.
- Carvalho, N. B.; Oliveira, M. A. S.; Fricks, A. T.; Franceschini, E.; Dariva, C.; Zanin, G. M.; Lima, A. S.; Soares, C. M. F.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2014**, *99*, 130.
- Basri, M.; Kassim, M. A.; Mohamad, R.; Ariff, Q. B.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2013**, *85*, 214.
- Haigh, K. F.; Saha, B.; Vladislavjevic, G. T.; Reynolds, J. C.; *Procedia Eng.* **2012**, *42*, 1106.
- Bon, E. P. S.; Ferrara, M. A.; Corvo M. L. Em *Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado in Imobilização de Enzimas sua Estabilização*; Castro, H. F.; Zanin, G. M.; Moraes, F. F.; Sá-Pereira, .1ª ed., Inteciência: Rio de Janeiro, 2008, cap. 6.
- Santos, J. C.; Paula, A. V.; Nunes, G. F. M.; Castro, H. F.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2008**, *52*, 49.
- Pinheiro, R.; Soares, C.; Santos, O.; Castro, H.; Moraes, F.; Zanin, G.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2008**, *52*, 27.
- Gog, A.; Roman, M.; Tosa, M.; Paizs, C.; Irimie, F. D.; *Renewable Energy* **2012**, *39*, 10.
- Da Rós, P. C. M.; Freitas, L.; Perez, V. H.; Castro, H. F.; *Bioproc. Biosyst. Eng.* **2013**, *36*, 443.
- Paques, F. W.; Macedo, G. A.; *Quim. Nova* **2006**, *29*, 93.
- Castro, H. F.; Mendes, A. A.; Santos, J. C.; Aguiar, C. L.; *Quim. Nova* **2004**, *27*, 146.
- Reetz, M. T.; Zonta, A.; Simpelkamp, J.; *Biotechnol. Bioeng.* **1996**, *49*, 527.
- Baron, A. M.; Barouh, N.; Barea, B.; Villeneuve, P.; Mitchell, D. A.; Krieger, N.; *Fuel* **2014**, *117*, 458.
- Abdulla, R.; Ravindra, P.; *Biomass Bioenerg.* **2013**, *56*, 8.
- You, Q.; Yin, X.; Zhao, Y.; Zhang, Y.; *Bioresour. Technol.* **2013**, *148*, 202.
- Aryee, A. N. A.; Dutilleul, P.; Paszti, M.; Simpson, B. K.; *Fuel Process. Technol.* **2013**, *109*, 103.
- Da Rós, P. C. M.; Castro, H. F.; Carvalho, A. K. F.; Soares, C. M. F.; Moraes, F. F.; Zanin, G. M.; *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2012**, *39*, 529.
- Dalal, S.; Singh, P. K.; Raghava, S.; Rawat, S.; Gupta, M. N.; *Biotechnol. Appl. Biochem.* **2008**, *51*, 23.
- Schrag, J. D.; Li, Y.; Cygler, M.; Lang, D.; Burgdorf, T.; Hecht, H. J.; Schmid, R.; Schomburg, D.; Rydel, T. J.; Oliver, J. D.; Strickland, L. C.; Dunaway, C. M.; Larson, S. B.; Day, J.; Mcpherson, A.; *Structure* **1997**, *5*, 187.
- Quintella, C. M.; Teixeira, L. S. G.; Korn, M. G. A.; Neto, P. R. C.; Torres, E. A. C. M.; Jesus, C. A. C.; *Quim. Nova* **2009**, (ed. especial).

47. Hilterhaus, L.; Liese, A. Em *Biocatalysis for the pharmaceutical industry in Discovery, development, and manufacturing*, Tao, J.; Lin, G.-Q.; Liese, A., eds.; John Wiley & Sons: Singapore, 2009.
48. Jesionowski, T.; Zdzarta, J.; Krajewska, B.; *Adsorption* **2014**, *20*, 801.
49. Hanefeld, U.; Cao, L.; Magner, R.; *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 6211.
50. Sheldon, R. A.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, *92*, 467.
51. Sheldon, R. A.; *Adv. Synth. Catal.* **2007**, *349*, 1289.
52. Cantone, S.; Ferrario, V.; Corici, L.; Ebert, C.; Fattor, D.; Spizzo, P.; Gardossi, L.; *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 6262.
53. Liese, A.; Hilterhaus, L.; *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 6236.
54. Brena, B. M.; Batista-Viera, F.; *Methods in Biotechnology in Immobilization of Enzymes and Cells*, 4th ed., Guisan © Humana Press Inc.: Totowa, 2006.
55. Guncheva, M.; Zhiryakova, D.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2011**, *68*, 1.
56. Mateo, C.; Palomo, J. M.; Fernandez-Lorente, G.; Guisan, J. M.; Fernandez-Lafuente, R.; *Enzyme Microb. Technol.* **2007**, *40*, 1451.
57. Kim, J.; Grate, J. W.; Wang, P.; *Chem. Eng. Sci.* **2006**, *61*, 1017.
58. Hernandez, K.; Fernandez-Lafuente, R.; *Enzyme Microb. Technol.* **2011**, *48*, 107.
59. Fernandes, P.; Cabral, J. M. S. Em *Biotransformation in Basic Biotechnology*, v. 3; Ratledge, C.; Kristiansen, B., eds.; Cambridge University Press, 2006.
60. Zanin, G. M.; Moraes, F. F. Em *Enzimas como agentes biotecnológicos*; Said, S.; Pietro, R. C. L. R., eds.; Legis Summa: Ribeirão Preto, 2004, cap. 4.
61. Lee, C.; Lin, T.; Mou, C.; *Nano Today* **2009**, *4*, 165.
62. Mendes, A. A.; Oliveira, P. C.; Castro, H. F.; Giodano, R. L. C.; *Quim. Nova* **2011**, *34*, 831.
63. Secundo, F.; Miché-Brendlé, J.; Cheralu, C.; Ferrandi, E. E.; Dumitriu, E.; *Microporous Mesoporous Mater.* **2008**, *109*, 350.
64. Christensen, M. W.; Andersen, L.; Husum, T. L.; Kirk, O.; *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2003**, *105*, 318.
65. Bornscheuer, U. E.; Bessler, C.; Srinivas, R.; Hari Krishna, S.; *Trends Biotechnol.* **2002**, *20*, 433.
66. Kharat, N.; Ali, B. A.; Marzouk, S.; Gargouri, Y.; Karra-Châabouni, M.; *Process Biochem.* **2011**, *46*, 1083.
67. Torres, M. P. G.; Foresti, M. L.; Ferreira, M. L.; *Biochem. Eng. J.* **2014**, *90*, 36.
68. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/537322?lang=pt®ion=BR>, acessada em Setembro 2014.
69. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/62350?lang=pt®ion=BR>, acessada em Setembro 2014.
70. Orrego, C. E.; Salgado, N.; Valencia, J. S.; Giraldo, G. I.; Giraldo, O. H.; Cardona, C. A.; *Carbohydr. Polym.* **2010**, *79*, 9.
71. Mozhaev, V. V.; Melik-Nubarov, N. S.; Sergeeva, M. V.; Sikrnis, V.; Martinek, K.; *Biocatal. Biotransform.* **1990**, *3*, 179.
72. Zarcula, C.; Corici, L.; Croitoru, R.; Ursoiu, A.; Peter, F.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2010**, *65*, 79.
73. Reetz, M. T.; *Sci. Adv. Mater.* **1997**, *9*, 943.
74. Soares, C. M. F.; Santos O. A.; Castro, H. F.; Moraes, F. F.; Zanin, G. M.; *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2004**, *113*, 307.
75. Macário, Q.; Moliner, M.; Corma, A.; Giodano, G.; *Microporous Mesoporous Mater.* **2009**, *118*, 334.
76. Hilterhaus, L.; Thum O.; Liese, A.; *Org. Process Res. Dev.* **2008**, *12*, 618.
77. Gerardin, C.; Reboul, J.; Bonne, M.; Lebeau, B.; *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 4217.
78. Dalla-Vecchia, R.; Nascimento, M. G.; Soldi, V.; *Quim. Nova* **2004**, *27*, 623.
79. Scherer, R. P.; Dallago, R. L.; Penna, F. G.; Bertella, F.; Oliveira, D.; Oliveira, J. V.; Pergher, S. B. C.; *Biocatal. Agric. Biotechnol.* **2012**, *1*, 290.
80. Barbosa, A. S.; Silva, M. A. O.; Carvalho, N. B.; Mattedi, S.; Inglesias, M. A.; Fricks, A. T.; Lima, A. S.; Franceschi, E.; Soares, C. M. F.; *Quim. Nova* **2014**, *37*, 969.
81. Pilkington, P. H.; Margaritis, A.; Mensour, N. A.; *Crit. Rev. Biotechnol.* **1998**, *18*, 237.
82. Romdhane, I. B. B.; Romdhane, Z. B.; Gargouri, A.; Belghith, H.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2011**, *68*, 230.
83. Brígida, A. I. S.; Pinheiro, A. D. T.; Ferreira, A. L. O.; Pinto, G. A. S.; Gonçalves, L. R. B.; *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2007**, *136*, 67.
84. Grosso, C.; Ferreira-Dias, S.; Pires-Cabral, P.; *J. Food Eng.* **2013**, *115*, 475.
85. Hou, C.; Zhu, H.; Wu, D.; Li, Y.; Hou, K.; Jiang, Y.; Lim, Y.; *Process. Biochem.* **2014**, *49*, 244.
86. Cabrera-Padilla, R. Y.; Albuquerque, M.; Figueiredo, R. T.; Fricks, A. T.; Franceschi, E.; Lima, A. S.; Andreo, O. A. S.; Silva, D. P.; Soares, C. M. F.; *Bioprocess Biosyst. Eng.* **2013**, *1*, 2.
87. Salis, A.; Pinna, M.; Monduzzi, M.; Solinas, V.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2008**, *54*, 19.
88. Nunes, P. A.; Pires-Cabral P.; Guillén M.; Valero F.; Ferreira-Dias S.; *J. Am. Oil. Chem. Soc.* **2012**, *89*, 1287.
89. Paula, A. V.; Nunes, G. F. M.; Santos, J. C.; Castro, H. F.; *Int. J. Food. Sci. Technol.* **2011**, *46*, 2124.
90. Andrade, L. H.; Rebelo, L. P.; Netto, C. G. C. M.; Toma, H. R.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2010**, *66*, 55.
91. Kumar, D.; Nagar, S.; Bhushan, I.; Kumar, L.; Parshad, R.; Gupta, V. K.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2013**, *87*, 51.
92. Galarneau, A.; Mureseanu, M.; Atger, S.; Renard, G.; Fajula, F.; *New J. Chem.* **2006**, *30*, 562.
93. Degusa S/A. *Basic characteristics of AEROSIL®*. Technical Bulletins Fine Particles, **1993**.
94. Matte, C. R.; Nunes, M. R.; Benvenuti, E. V.; Schöffner, J. N.; Ayub, M. A. Z.; Hertz, P. F.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2012**, *78*, 51.
95. Dizge, N.; Keskinler, B.; Tanriseven, A.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2008**, *66*, 34.
96. Silva, G. S.; Inoune, D. Y.; Dors, G.; Fugiro, J. A.; Castro, H. F.; *Acta Sci.* **2011**, *33*, 197.
97. Almeida, R. V.; Branco, R. V.; Peixoto, B.; Lima, S. S.; Alqueres, S. M. C.; Martins, S. M. C.; Freire, D. M. G.; *Biochem. Eng. J.* **2008**, *39*, 531.
98. Vilar, R. B. C.; Jesus, A.; Benvenuti, E. V.; Silva, M. M.; *Quim. Nova* **2008**, *31*, 285.
99. Benvenuti, E. V.; Moro, C. C.; Costa, T. M. H.; *Quim. Nova* **2009**, *32*, 1926.
100. Airoidi, C.; *Quim. Nova* **2008**, *31*, 144.
101. Duran, N.; Mattoso, L. H. C.; Moraes, P. C.; *Nanotecnologia: Introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação*, 1^a ed., Artliber: São Paulo, 2006.
102. Parida, S. K.; Dash, S.; Patel, S.; Mishra.; *Adv. Colloid Interface Sci.* **2006**, *121*, 77.
103. Cruz, J. C.; Pfromm, P. H.; Tomich J. M.; Rezac, M. E.; *Colloids Surf., B.* **2010**, *79*, 97.
104. Kramer, M.; Cruz, J. C.; Pfromm, P. H.; Rezac, M. E.; Czermak, P.; *J. Biotechnol.* **2010**, *150*, 80.
105. Bernal, C.; Illanes, A.; Wilson, L.; *Langmuir* **2014**, *30*, 3557.
106. Gao, S.; Wang, Y.; Wang, W.; Luo, G.; Dai, Y.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2010**, *62*, 218.
107. Liu, G.; Yang, R.; Li, M.; *J. Non-Cryst. Solids* **2010**, *356*, 250.
108. Yang, G.; Wu, J.; Xu, G.; Yang, L.; *Colloids Surf., B.* **2010**, *78*, 351.
109. Hu, Z.; Hu, Y.; Xia, J.; Tang, S.; Liu, W.; Huang, H.; *Biochem. Eng. J.* **2010**, *53*, 150.
110. Soares, C. M. F.; Castro, H. F.; Moraes, F. F.; Zanin, G. M.; *Appl. Biochem. Biotechnol.* **1999**, *77*, 745.
111. Canilho, N.; Jacoby, J.; Pasc, A.; Carteret, C.; Dupire, F.; Steb, M. J.; Blin, J. L.; *Colloids Surf., B.* **2013**, *112*, 139.
112. Tran, D.; Chen, C.; Chang, J.; *J. Biotechnol.* **2012**, *158*, 112.

113. Macario, A.; Verri, F.; Diaz, U.; Corma, A.; Giordano, G.; *Catal. Today* **2013**, *204*, 148.
114. Wang, C.; Zhou, G.; Li, Y.; Lu, N.; Song, H.; Zhang, L.; *Colloids Surf., A* **2012**, *406*, 75.
115. Salis, A.; Casula, M. F.; Bhattacharyya, M. S.; Pinna, M.; Solinas, V.; Monduzzi, M.; *ChemCatChem* **2010**, *2*, 322.
116. Yu, W. H.; Fang, W.; Tong, D. S.; Shao, P.; Xu, T. N.; Zhou, C. H.; *Biochem. Eng J.* **2013**, *70*, 97.
117. Wang, X. Zhou, G.; Zhang, H.; Du, S.; Xu, Y.; Wang, C.; *J. Non-Cryst. Solids* **2011**, *15*, 3027.
118. Zou, B.; Hu, Y.; Yu, D.; Xia, J.; Tang, S.; Liu, W.; Huang, H.; *Biochem. Eng. J.* **2010**, *53*, 150.
119. Gustafsson, H.; Johansson, E. M.; Barrabino, A.; Oden, M.; Holmberg, K.; *Colloids Surf., B* **2012**, *100*, 22.
120. Da Rós, P. C. M.; Silva, G. A. M.; Mendes, A. A.; Santos, J. C.; Castro, H. F.; *Bioresour. Technol.* **2012**, *101*, 5508.
121. Freitas, L.; Paula, A. V.; Santos, J. C.; Zanin, G. M.; Castro, H. F.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2010**, *65*, 87.
122. Moreira, A. B. R.; Perez, V. H.; Zanin, G. M.; Castro, H. F.; *Energy Fuels* **2007**, *21*, 3689.
123. Bruno, L. M.; Coelho, J. S.; Melo, E. H. M.; Lima-Filho, J. L.; World J.; *J. Microbiol. Biotechnol.* **2005**, *21*, 189.
124. Soares, C. M. F.; Santana, M. H. A.; Zanin, G. M.; Castro, H. F.; *Quim. Nova* **2003**, *26*, 832.
125. Mai, N. L.; Ahh, K.; Koo, Y.; *Process Biochem.* **2014**, *49*, 872.
126. Kato, K.; Kawachi, Y.; Nakamura, H.; *J. Asian Ceram. Soc.* **2014**, *2*, 2014.
127. Mohammad, F. A.; Amin A. S.; *Renewable Sustainable Energy Rev.* **2012**, *16*, 5770.
128. Naushad, M.; Allothman, Z. A.; Khan, A. B.; Ali, M.; *Int. J. Biol. Macromol.* **2012**, *51*, 555.
129. Oliveira, M. V. S.; Da Rós, P. C. M.; Mattedi, S.; Castro, H. F.; Soares, C. M. F.; Lima, A. S.; *Acta Sci. Technol.*, in press.
130. Alvarez, V. H.; Mattedi, S.; Martin-Pastor, M.; Aznar, M.; Iglesias, M.; *Fluid Phase Equilib.* **2010**, *299*, 42.
131. Kato, R.; Gmehling, J.; *Fluid Phase Equilib.* **2004**, *226*, 37.
132. Hara, P.; Mikkola, J. P.; Murzin, D. Y.; Kanerva, L. T.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2010**, *67*, 129.
133. Hara, P.; Hanefeld, U.; Kanerva, L. T.; *Green Chem.* **2009**, *11*, 250.
134. Karout, A.; Pierre, A. C.; *J. Non-Cryst. Solids* **2007**, *353*, 2900.
135. Cho, E. J.; Jung, S.; Kim, H. J.; Lee, Y. G.; Nam, K.C.; Lee, H. J.; Bae, H. J.; *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 886.
136. Wu, C.; Zhou, G.; Jiang, X.; Ma, J.; Zhang, H.; Song, H.; *Proc. Biochem.* **2012**, *47*, 953.
137. Mendes, A. A.; Oliveira, P. C.; Velez, A. M.; Giordano, R. C.; Giordano, R. L. C.; Castro, H. F.; *Int. J. Biol. Macromol.* **2012**, *50*, 503.
138. Zaidan, U. H.; Rahman, M. B. A.; Othman, S. S.; Basr, M.; Abdulmalek, E.; Rahman, R. N. Z. R. A.; Salleh, A. B.; *Food. Chem.* **2012**, *131*, 199.
139. Zhang, Z.; He, F.; Zhuo, R. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2013**, *94*, 129.
140. Hartmann, M.; Kostrov, X.; *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 6277.
141. Paula, A. V.; Moreira, A. B. R.; Braga, L. P.; Castro, F.; Bruno, L. M.; *Quim. Nova* **2008**, *31*, 35.
142. Yang, G.; Wu, J.; Xu, G.; Yang, L.; *Colloids Surf., B.* **2010**, *78*, 351.
143. Cruz, J.; Barbosa, O.; Rodrigues, R. C.; Fernandez-Lafuente, R.; Torres, R.; Ortiz, C.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2012**, *80*, 7.
144. Araujo, A. M.; Neves Jr., M. T.; Azevedo, W. M.; Oliveira, G. G.; Ferreira Jr., D. L.; Coelho, R. A. L.; Figueiredo, E.A.P.; Carvalho Jr., L. B.; *Biotechnol. Tech.* **1997**, *11*, 67.
145. Villeneuve, P.; Muderhwa, J.; Graille, J.; Graille, J.; Hass, M. J.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2000**, *9*, 113.