Imobilização de lipase B de *Candida antartica* em nanopartícula magnética e sua aplicação na síntese de oleato de etila

Thamires M. de L. O. da Silva1,2, Gabrielle A. R. da Silva1, João Paulo da S. Q. Menezes1, Elizabeth Cristina T. Veloso1, Rodrigo Brackmann3, Marta A. P. Langone1,2\*

*1Instituto de Química, Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), Rua São Francisco Xavier, 524, 20550-900, Rio de Janeiro – RJ, Brasil.*

*2 Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro, Rua Senador Furtado, 121, 20260-100 Rio de Janeiro – RJ, Brasil.*

*3 Universidade Tecnológica Federal do Paraná - Campus Pato Branco, Paraná, Brasil.*

*\**marta.langone@gmail.com

Resumo/Abstract

RESUMO – Lipases são enzimas que se destacam em processos biotecnológicos, pois são capazes de catalisar uma série de reações, porém são suscetíveis às condições reacionais necessárias para sua aplicação industrial e possuem dificuldade de recuperação e reuso. Uma excelente solução é a imobilização dessas enzimas em suportes sólidos. O objetivo deste trabalho foi imobilizar a lipase B de *Candida antartica* (CalB) em nanopartículas magnéticas de ferrita de níquel para síntese de oleato de etila. As imobilizações foram feitas por adsorção física (CalB-FeNi) e por ligação covalente através da modificação da ferrita com 3-(aminopropil)trietoxisilano (APTMS) e funcionalização com glutaraldeído (CalB-FeNi-APTMS-GLU). As eficiências de imobilização para a CalB-FeNi e CalB-FeNi-APTMS-GLU foram de 17% e 58%, respectivamente. Entretanto, considerando a quantidade de proteína no suporte, verificou-se que a atividade hidrolítica da CalB-FeNi (4,6 ± 0,99 U/g) foi 2,9 vezes maior do que a da CalB-FeNi-APTMS-GLU. Por outro lado, CalB-FeNi-APTMS-GLU obteve o melhor resultado na reação de esterificação, convertendo 40% de ácido oleico em oleato de etila. A nanopartícula de ferrita de níquel mostrou potencial como suporte para imobilização de lipases a serem aplicadas em reações de esterificação.

*Palavras-chave: CalB, ferrita de níquel, nanopartículas, esterificação.*

ABSTRACT- Lipases stand out in biotechnological processes because they can catalyze a series of reactions. Still, they are susceptible to the necessary reaction conditions in their industrial applications and have difficulty recovering and reusing. An excellent solution is the immobilization of these enzymes on solid supports. This work aimed to immobilize *Candida antartica* lipase B (CalB) on magnetic nickel ferrite nanoparticles and use it to synthesize ethyl oleate. Immobilizations were performed by physical adsorption (CalB-FeNi) and by covalent binding through modification of the ferrite with 3-(aminopropyl)triethoxysilane (APTMS) and functionalization with glutaraldehyde (CalB-FeNi-APTMS-GLU). The immobilization efficiencies for CalB-FeNi and CalB-FeNi-APTMS-GLU were 17% and 58%, respectively. However, considering the amount of protein on support, the hydrolytic activity of CalB-FeNi (4.6 ± 0.99 U/g) was 2.9 times higher than that of CalB-FeNi-APTMS-GLU. On the other hand, CalB-FeNi-APTMS-GLU obtained the best result in the esterification reaction, converting 40% of oleic acid into ethyl oleate. The nickel ferrite nanoparticle has the potential as a support for the immobilization of lipases for application in esterification reactions.

*Keywords: CalB, nickel ferrite, nanoparticle, esterification.*

Introdução

O avanço da biotecnologia e de técnicas mais verdes tem ampliado a aplicação de enzimas como biocatalisadores, graças às suas características como alta atividade, seletividade e especificidade atuando em condições reacionais brandas (1). Dentre as várias enzimas que atuam em bioprocessos industriais, as lipases (triacilglicerol acilhidrolases, E.C. 3.1.1.3) se destacam, pois, catalisam uma variedade de reações, como hidrólise de óleos e gorduras, transesterificação, esterificação e acidólise (2,3).

Quando estão em sua forma livre, as lipases apresentam desvantagens em sua aplicação industrial, como baixa estabilidade, difícil recuperação e reuso e alto custo. Nesse contexto, para uma eficiente biocatálise, a imobilização das lipases em suportes sólidos é uma estratégia essencial (4). As nanopartículas magnéticas têm recebido atenção especial como suporte para imobilização de enzimas, pois possuem grande área superficial, alta capacidade de transferência de massa, além de serem facilmente separadas do meio reacional com o uso de um campo magnético externo (5).

Dentre as diferentes lipases, a lipase B de *Candida antartica* (CalB) se destaca devido à sua estabilidade, estereoseletividade e enantioseletividade, sendo bastante usada industrialmente (6). Uma reação amplamente catalisada pela CalB é a síntese de ésteres. Dentre eles, pode-se citar o oleato de etila, que possui importância como aditivo de alimentos e na indústria cosmética e farmacêutica (7).

O presente trabalho objetivou produzir um biocatalisador eficiente para a síntese de oleato de etila por meio da imobilização da lipase CalB em nanopartículas magnéticas de ferrita de níquel (NiFe2O4) via adsorção física e ligação covalente.

Experimental

*Materiais*

As enzimas utilizadas neste trabalho foram a CalB (lipase B de *Candida antarctica*) e a Novozym 435 (uma preparação comercial da lipase B de *Candida antarctica* imobilizada) da Novozymes Latin America Ltda. A nanopartícula magnética de ferrita de níquel (NiFe2O4) foi gentilmente cedida pelo Laboratório de Materiais da Universidade Tecnológica Federal do Paraná - Campus Pato Branco. A funcionalização da nanopartícula com o reagente 3-(aminopropil)trietoxisilano (APTMS) foi realizada no Laboratório de Nanotecnologia Biofuncional da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

*Caracterização da nanopartícula magnética de ferrita de níquel*

A área específica e o volume de poros da ferrita de níquel foram determinados pela técnica de fisissorção de nitrogênio. Para a determinação das áreas do suporte utilizou-se o método BET (Brunauer- Emmett- Teller) e o volume de poros foi determinado pelo método DH. As amostras foram pesadas e em seguida secas a 300 °C sob vácuo por 18 h. As análises foram realizadas em um equipamento ASAP 2020 Plus Version 1.03 da Micromeritics. Posteriormente, as amostras foram repesadas, analisadas a -196ºC e obtidas suas isotermas de adsorção e dessorção pelas pressões relativas de nitrogênio.

Para observar aspectos morfológicos das nanopartículas de ferrita de níquel livre e modificada com APTMS foi realizada a análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV) com microscópio Hitachi (modelo TM-3030). A voltagem de aceleração foi de 15 kV, utilizando elétrons secundários e retroespalhados.

*Imobilização da lipase B de Candida antartica (CalB)*

A lipase comercial CalB foi imobilizada na ferrita de níquel por adsorção física e por ligação covalente.

*- Imobilização por adsorção física*

A imobilização da CalB foi realizada adicionando 15 mL de uma solução previamente diluída com tampão fosfato de sódio 5mM (pH 7), com concentração proteica final de 0,1 mg/mL, a 0,15 g de suporte. A mistura foi mantida em agitação, utilizando um agitador de rolos, por 2 h em temperatura ambiente (25°C±1). A imobilização foi acompanhada pela determinação da concentração de proteína presente no sobrenadante obtido durante o processo. Ao fim da imobilização, o derivado obtido foi separado do sobrenadante usando um campo magnético externo (imã de neodímio). Posteriormente, o derivado obtido foi lavado com 10 mL de tampão fosfato 5mM e armazenado a 4°C.

*- Imobilização por ligação covalente*

A ferrita de níquel foi modificada com o reagente APTMS e funcionalizada com glutaraldeído (GLU). Para isso, 100 mL de etanol e 100 mL de água destilada foram adicionados a 0,1 g de ferrita de níquel, seguido de ultrasonicação por 5 min. Posteriormente, 10 mL de uma solução de APTMS foi adicionada à mistura que foi novamente submetida à ultrasonicação. A suspensão foi mantida em shaker (150 rpm) à 60°C até o dia seguinte. As nanopartículas de ferrita de níquel modificadas foram separadas aplicando um campo magnético externo e lavadas com água destilada e etanol. Para a funcionalização e imobilização da CalB, 2,5% v/v de GLU e 0,27 mL da CalB foram adicionados em tampão fosfato 5 mM, pH7 (volume final de 50 mL). Quinze mililitros da solução enzimática (0,1 mg/mL) foram adicionados à 0,15 g de ferrita de níquel funcionalizada com APTMS e mantida em agitação por 24 h, à 4°C. O derivado imobilizado foi separado aplicando um campo magnético externo, lavado com tampão fosfato de sódio 5mM e mantido em dessecador por 24h para a secagem.

*Determinação da concentração de proteínas*

A determinação da concentração de proteínas da solução enzimática da CalB foi realizada, de acordo com a metodologia descrita por Bradford (8).

*Hidrólise enzimática*

A atividade hidrolítica da CalB livre, Novozym 435 e dos derivados imobilizados foi determinada usando óleo de oliva como substrato de acordo com o método adaptado de Soares e colaboradores (9). Uma emulsão contendo goma arábica (7% m/v), água destilada e azeite de oliva (1:1) foi usada como substrato para a reação. Em seguida, 5 mL da emulsão, 4 mL de tampão citrato de sódio 1 mM, pH 6 e quantidade adequada de cada biocatalisador foram adicionados em um reator na temperatura de 30°C, sob agitação magnética. A reação foi interrompida com a adição de 20 mL de acetona:etanol (1:1) e os ácidos graxos no meio reacional foram quantificados por volumetria de neutralização, com 0,05 mol/L de NaOH usando um titulador automático (Mettler Toledo – modelo T50). Uma unidade de atividade de lipase (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1µmol de ácido graxo por minuto por grama ou mililitro da preparação enzimática.

*Reação de esterificação e síntese de oleato de etila*

 As reações de esterificação foram realizadas usando 15 mmol de etanol (99%) e 15 mmol de ácido oleico (80%) (razão molar 1:1), além do biocatalisador(10). A esterificação enzimática ocorreu em reator encamisado e agitado mecanicamente por 24 horas. Alíquotas de 50µL foram retiradas periodicamente e dissolvidas em 30 mL de acetona:etanol (1:1). O ácido oleico residual foi determinado por volumetria de neutralização com 0,02 mol/L de NaOH usando um titulador automático (Mettler Toledo – modelo T50) (10). O ensaio em branco (reagentes e somente o suporte) foi realizado nas mesmas condições reacionais. Não houve alteração da quantidade de ácido oleico durante o tempo estudado (24 horas) no ensaio conduzido na ausência de enzima. As atividades de esterificação da CalB livre e dos derivados imobilizados foram determinadas a 30°C utilizando a reação de síntese de oleato de etila. Uma unidade de esterificação (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de consumir 1µmol de ácido oleico por minuto por grama ou mililitro da preparação enzimática.

Resultados e Discussão

*Caracterização da nanopartícula magnética de ferrita de níquel*

O valor de área específica calculada pelo método BET e o volume e diâmetro médio de poros, calculados pelo método D-H utilizando a curva de dessorção da ferrita de níquel, estão apresentados na Tabela 1.

É possível observar que a ferrita de níquel não possui elevada área superficial, o que pode interferir negativamente na adsorção das enzimas. Com relação ao diâmetro médio dos poros pode-se dizer que o acesso da CalB ao interior dos mesmos é facilitado, pois a enzima possui tamanho médio de 39,2 Å, o que favorece a eficiência de imobilização (11).

**Tabela 1**: Análise textural do suporte ferrita de níquel e da enzima imobilizada comercial.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Material | Área BET (m2/g) | Vporo (cm3/g) | Dporo (Å) |
| Ferrita de níquel | 12,47 | 0,10 | 216,23 |

A isoterma de fisissorção de N2 para a ferrita de níquel está apresentada na Figura 1. A ferrita de níquel possui isoterma do tipo III, cuja interação entre as moléculas do adsorbato e do adsorvente são relativamente fracas, sendo característica de materiais não porosos ou macroporosos (12).



**Figura 1**. Isoterma de fisissorção de N2 da ferrita de níquel.

A microscopia obtida com a ferrita de níquel sem a presença de APTMS está apresentada na Figura 2A. Na Figura 2B está apresentada a imagem da ferrita após a funcionalização com APTMS. Não se observam mudanças expressivas na estrutura do material quando comparada à ferrita sem APTMS, o que demonstra que a presença do agente funcionalizante não interferiu na característica da nanopartícula.



**Figura 2**. Microscopia eletrônica de varredura da nanopartícula magnética de ferrita de níquel calcinada a 800°C e com ampliação de 2000X. A- Ferrita sem APTMS. B- Ferrita com o agente funcionalizante APTMS.

*Imobilização da lipase B de Candida antartica*

Os resultados da imobilização da CalB por adsorção e ligação covalente em nanopartícula magnética de ferrita de níquel estão apresentados na Tabela 2.

**Tabela 2.** Eficiência de imobilização (%) e teor de proteína adsorvida (mg de proteína/g de suporte) após 2 h (CalB-FeNi) e 24 h (CalB-FeNi-APTMS-GLU) de imobilização, em temperatura ambiente (CalB-FeNi) e à 4°C (CalB-FeNi-APTMS-GLU).

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Enzima imobilizada | Eficiência de imobilização % | Proteína adsorvida (mg/g) |
| CalB-FeNi | 16,9 | 1,7 |
| CalB-FeNi-APTMS-GLU | 58,3 | 5,8 |

Observando as eficiências de imobilização dos derivados imobilizados obtidos, verifica-se que a funcionalização da nanopartícula magnética de ferrita de níquel permitiu uma maior fixação da CalB. Comparando a imobilização nos dois suportes, a modificação da ferrita com APTMS e funcionalização com GLU levou a um aumento de 3,4 vezes na eficiência do processo e na quantidade de enzima adsorvida. A ativação do suporte com glutaraldeído permite a interação dos grupos hidroxilas presentes na superfície de nanopartículas magnéticas, favorecendo as ligações com a enzima (13).

Monteiro e colaboradores (14) estudaram a imobilização das lipases A (CalA) e B (CalB) de *Candida antartica* em nanopartículas magnéticas funcionalizadas com APTMS e ativadas com glutaraldeído. A eficiência de imobilização obtida foi de 100% e 57,6% para a CalA e CalB, respectivamente. Na ausência do glutaraldeído, uma menor quantidade de enzima foi adsorvida ao suporte, resultando em eficiências de 80% (CalA) e 38,2% (CalB).



*Hidrólise enzimática*

A atividade hidrolítica, usando óleo de oliva como substrato, foi determinada para os derivados imobilizados obtidos (CalB-FeNi e CalB-FeNi-APTMS-GLU), para a CalB livre e para a CalB imobilizada comercial (Novozym 435) (Tabela 3).

Analisando a atividade hidrolítica por grama de suporte, observa-se que apesar da quantidade de enzima presente no derivado imobilizado CalB-FeNi ter sido menor, a atividade apresentada por este foi 2,9 vezes maior comparada àquela obtida com o derivado funcionalizado com APTMS e GLU (CalB-FeNi-APTMS-GLU).

Comparando a atividade da CalB-FeNi e da Novozym 435, a diferença entre elas foi de 3,4 vezes, sendo que era esperado uma diferença maior visto que a eficiência de imobilização foi baixa. A hidrólise de óleo de oliva catalisada pela lipase de *Thermomyces lanuginosus* imobilizada em nanopartículas magnéticas foi estudada por Sarno e colaboradores (15). Os autores obtiveram 77% de atividade recuperada, embora a eficiência de imobilização tenha sido somente de 23% (15).

**Tabela 3.** Atividade hidrolítica da CalB imobilizada em ferrita de níquel (CalB-FeNi) e ferrita de níquel modificada (CalB-FeNi-APTMS-GLU) à 30°C, por 20 h e da CalB livre e da Novozym 435 à 30°C por 20 min de reação.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Biocatalisador | Atividade enzimática (U/g ou U/mL) | Atividade por massa de proteína (U/mg)a |
| CalB-FeNi | 4,6 ± 0,99 | 2,71 ± 0,58 |
| CalB-FeNi-APTMS-GLU | 1,6 ± 0,3 | 0,3 ± 0,05 |
| CalB livre | 1.430 ± 46 | 210,3 ± 6,8 |
| Novozym 435 | 15,6 ± 0,2 | n.a |

aAtividade específica expressa em termos da atividade por massa de proteína

 n.a: não avaliado

A quantidade de ácido liberado (µmol) durante a hidrólise do óleo de oliva pelos derivados imobilizados está apresentada na Figura 3. A mesma massa de biocatalisador (0,01 g) foi usada nas duas reações, porém, considerando a eficiência de imobilização, a quantidade de proteína no derivado CalB-FeNi durante a hidrólise foi de 0,02 mg, enquanto a CalB-FeNi-APTMS-GLU continha 0,06 mg de proteína. Apesar da menor quantidade de proteína presente na reação, uma maior quantidade de ácido graxo foi liberado quando a CalB-FeNi foi usada como biocatalisador.

**Figura 3**. Ácido graxo liberado (µmol) na reação de hidrólise do óleo de oliva a 30 °C após 20 h de reação.

O derivado CalB-FeNi-APTMS-GLU apresentou uma menor atividade hidrolítica, mesmo contendo uma maior quantidade de proteína, possivelmente devido à formação de ligações cruzadas (*crosslinking*) inter- e intramolecular promovidas pelo glutaraldeído, podem alterar as propriedades da enzima, principalmente a atividade e a estabilidade (16).

*Reação de esterificação e síntese de oleato de etila*

Os biocatalisadsores CalB-FeNi e CalB-FeNi-APTMS-GLU foram utilizados em reação de esterificação para a síntese de oleato de etila. A atividade de esterificação dos derivados está apresentada na (Tabela 4).

Com relação à atividade por massa de proteína (U/mg), os derivados tiveram resultados similares, entretanto a atividade enzimática do derivado CalB-FeNi-APTMS-GLU foi 3,2 vezes maior do que a apresentada pela CalB-FeNi. A Novozym 435 apresentou uma atividade de esterificação bem elevada quando comparada aos demais biocatalisadores. Entretanto, a quantidade de proteína presente nesta preparação comercial não é informada.

.

**Tabela 4.** Atividade de esterificação da CalB imobilizada em ferrita de níquel (CalB-FeNi) e ferrita de níquel modificada (CalB-FeNi-APTMS-GLU) à 30°C, por 24 h e da CalB livre e da Novozym 435 aà 30°C por 10 min de reação.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Biocatalisador | Atividade enzimática (U/g ou U/mL) | Atividade por massa de proteína (U/mg) |
| CalB-FeNi | 22,6 U/g ± 0,8 | 13,3 ± 0,4 |
| CalB-FeNi-APTMS-GLU | 72,6 U/g ± 2,5 | 12,5 ± 0,4 |
| CalB livre | 550,9 ± 27,5 | 81,0 ± 4,0 |
| Novozym 435 | 2.840 ± 135,2 | - |

O resultado da conversão de ácido oleico em oleato de etila está apresentado na Figura 4.

Os dois derivados imobilizados foram capazes de sintetizar oleato de etila via esterificação, com maior produção após 24 horas de reação. Até 10 horas, o perfil apresentado pelos dois biocatalisadores foi semelhante, porém a CalB imobilizada covalentemente (CalB-FeNi-APTMS-GLU) obteve melhor resultado, com conversão de 40,1% de ácido oleico em oleato de etila. A CalB livre (resultados não mostrados) foi capaz de converter 50,4% de ácido oleico, o que perfaz uma diferença de apenas 10,3% comparada a CalB-FeNi-APTMS-GLU, embora o tempo de reação para a enzima livre tenha sido de 2 horas, enquanto para a CalB imobilizada na nanopartícula foi de 24 horas.



**Figura 4**. Reação de esterificação do ácido oleico e etanol (razão molar 1:1) usando 1% m/m de CalB-FeNi e CalB-FeNi-APTMS-GLU a 30°C.

Santos e colaboradores (17) imobilizaram a lipase CalB por ligação covalente em quitosana ativada com glicidol, etilenodiamina e glutaraldeído, alcançando a eficiência de imobilização de 94,7%. O derivado imobilizado foi, então, usado em uma reação de esterificação para a síntese de oleato de etila, cuja conversão foi de 46,9% após 6,5 h de reação. Chiaradia e colaboradores (18) estudaram a imobilização da CalB em nanopartículas magnéticas de poli(ureia-uretano) e empregaram-na na síntese de oleato de etila, oleato de geranila e propionato de geranila. Em todas as reações de esterificação, a produção de ésteres pelo biocatalisador foi maior do que 85%.

Analisando as atividades de hidrólise e de esterificação dos derivados imobilizados CalB-FeNi e CalB-FeNi-APTMS-GLU, é possível verificar uma diferença na seletividade catalítica dos mesmos. Enquanto CalB-FeNi foi melhor na hidrólise do óleo de oliva, a CalB-FeNi-APTMS-GLU foi superior na esterificação de ácido oleico.

Já foram relatadas melhores performances de lipases imobilizadas covalentemente em reações de esterificação do que em reações de hidrólise. Verma e colaboradores (13) verificaram uma melhor eficiência da lipase recombinante de *Bacillus subtilis* imobilizada covalentemente em nanopartículas magnéticas na reação de esterificação em relação à hidrólise de óleo de peixe.

Conclusões

Neste trabalho foi possível avaliar as nanopartículas magnéticas de ferrita de níquel como suporte para a imobilização de lipase B de *Candida antartica*. Apesar do biocatalisador imobilizado por adsorção física ter apresentado maior atividade hidrolítica (4,6 ± 0,99 U/g), a eficiência de imobilização foi baixa (<17%). Em contrapartida, a CalB imobilizada covalentemente em ferrita de níquel apresentou 58% de eficiência de imobilização e foi capaz de converter 40% de ácido oleico em oleato de etila. A CalB-FeNi-APTMS-GLU demonstrou potencial para utilização em reações de esterificação para a síntese de oleato de etila, porém é necessário etapas de otimização das condições de catálise para que a eficiência do processo seja melhorada.

## Agradecimentos

Os autores agradecem à UERJ, IFRJ e UFRJ, pelo suporte e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro- FAPERJ (E-26/211.889/2021) pelo financiamento da pesquisa.

## Referências

1. F. L. C. Almeida, M. P. J. Castro, B. M. Travália, and M. B. S. Forte; *Process Biochemistry* **2021**, *110*, 37–51.
2. N. S. A. Wafti, R. Yunus, H. L. N. Lau, T. C. S. Yaw, and S. A. Aziz; *Bioprocess Biosyst Eng* **2021,** *4*(11), 2429–2444.
3. N. B. Machado, G. J. Sabi, D. B. Hirata, and A. A. Mendes; *Biotechnol Appl Biochem* **2022**, 1-10. doi:10.1002/bab.2439.
4. R. C. Rodrigues, J. J. Virgen-Órtiz, J. C. S. dos Santos, A. Berenguer-Murcia, A. R. Alcantara, O. Barbosa, C. Ortiz, R. Fernandez-Lafuente; *Biotechnol Adv*, **2019,** *37*, 746–770.
5. M. Bilal, Y. Zhao, T. Rasheed, H. M. N. Iqbal; *Int J Biol Macromol*. **2018** ,*120*, 2530–2544.
6. A. Kundys, E. Białecka-Florjańczyk, A. Fabiszewska, J. Małajowicz; *J Polym Environ* **2018.** *26*, 396–407.
7. J. S. Miranda, N. C. A. Silva, J. J. Bassi, M. C. C. Corradini, F. A. P. Lage, D. B. Hirata, A. A. Mendes; *Chemical Engineering Journal* **251**. 392–403 (2014).
8. M. M. Bradford, *Anal Biochem*. 1976, *72*, 248–254.
9. C. M. F. Soares, H. F. De Castro, F. F. De Moraes, G. M. Zanin; *Appl Biochem Biotechnol* **1999**, *77-79,* 745-757.
10. K. C. N. R. Pedro, I. E. P. Ferreira, C. A. Henriques, and M. A. P. Langone *Chem Eng Commun* **2020,** *207*, 43–55.
11. K. C. N. R. Pedro, Tese de Doutorado, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2018.
12. M. Thommes, K. Kaneko, A. V. Neimark, J. P. Olivier, F. Rodriguez-Reinoso, J. Rouquerol, K. S. W. Sing; *Pure and Applied Chemistry,* **2015***,* *87*, 1051–1069.
13. M. L. Verma, N. M. Rao, T. Tsuzuki, C. J. Barrow, M. Puri; *Catalysts* **2019***,* *9*, 1-15.
14. R. R. C. Monteiro, D. M. A. Neto, P. B. A. Fechine, A. A. S. Lopes, L. R. B. Gonçalves, J. C. S. dos Santos, M. C. M de Souza, R. Fernandez-Lafuente; *Int J Mol Sci,* **2019***,* *20*, 1-20.
15. M. Sarno, L. Paciello, C. Cirillo, P. Parascandola, P. Ciambelli; *Chem Eng Trans* **2016**, *49*, 121–126.
16. J. M. F. Silva, K. P. dos Santos, E. S. dos Santos, N. S. Rios, L. R. B. Gonçalves; Enzyme Microb Technol. **2023**, *163*, 110166.
17. J. C. S. dos Santos, H. L. Bonazza, L. J. B. L. de Matos, E. A. Carneiro, O. Barbosa, R. Fernandez-Lafuente, L. R. B. Gonçalves, H. B. de Sant’Ana, R. S. Santiago-Aguiar; *Biotechnology Reports* **2017**, *14*, 16–26.
18. V. Chiaradia, A. Valério, D. De Oliveira, P. H. H. Araújo, and C. Sayer, *J Mol Catal B Enzym* **2016**, *131*, 31–35.