Imobilização de lipase de *Thermomyces lanuginosus* em Siral 40 e sua aplicação em reações de transesterificação, de hidrólise e de esterificação

Kelly Cristina N. R. Pedro1, Gabrielle A. R. da Silva1, Mônica A. P. da Silva2, Cristiane A. Henriques1, Marta A. P. Langone1,3\*

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

*2Departamento de Engenharia Química, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Centro de Tecnologia, Cidade Universitária, Ilha do Fundão, 22630-010, Rio de Janeiro – RJ, Brasil.*

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

*\**marta.langone@gmail.com

Resumo/Abstract

RESUMO – A lipase de *Themomyces lanuginosus* (TLL) se destaca entre as lipases por ser termoestável e ter elevada atividade catalítica. O objetivo deste trabalho foi imobilizar a TLL em Siral 40 e empregar o derivado imobilizado em reações de transesterificação, de hidrólise e de esterificação. A imobilização foi feita por adsorção física com eficiência de 99% para as concentrações enzimáticas acima de 0,4 mg/mL. A capacidade máxima de adsorção determinada pelo modelo de Langmuir foi igual a 169,5 mgproteína/gsuporte, e o coeficiente de determinação foi de 0,99. A conversão de óleo de soja na reação de transesterificação empregando o derivado imobilizado (TLL-S40) foi baixa (< 2%). Já a atividade hidrolítica do TLL-S40 na reação de hidrólise do óleo de oliva e do laurato de p-nitrofenila foi de 22,6 U/g e 111,8 U/g, respectivamente. O biocatalisador TLL-S40 foi mais ativo na reação de síntese de oleato de etila a partir da esterificação de ácido oleico com etanol. A conversão de ácido oleico foi de 54,4%, enquanto a enzima livre (TLL) converteu 35,2%. A TLL imobilizada em Siral 40 apresentou potencial como biocatalisador para reações de esterificação.

*Palavras-chave: Lipolase, sílica-alumina, Siral 40, esterificação.*

ABSTRACT- Lipase from *Themomyces lanuginosus* (TLL) stands out among lipases because it is thermostable and has excellent catalytic activity. This work aimed to immobilize TLL on Siral 40 and to use the immobilized derivative in transesterification, hydrolyses, and esterification reactions. Immobilization was performed by physical adsorption with 99% efficiency for enzyme concentrations above 0.4 mg/mL. The maximum adsorption capacity determined by the Langmuir model was equal to 169.5 mgprotein/gsupport, and the determination coefficient was 0.99. Soybean oil conversion in the transesterification reaction using the derivative immobilized (TLL-S40) was low (< 2%). The hydrolytic activity of TLL-S40 in the hydrolysis reactions of olive oil and p-nitrophenol laurate was 22.6 U/g and 111.8 U/g, respectively. The biocatalyst TLL-S40 was more active in the ethyl oleate synthesis from the oleic acid and ethanol esterification reaction. The oleic acid conversion was 54.4%, while the free enzyme (TLL) converted at 35.2%. TLL immobilized on Siral 40 showed the potential as a biocatalyst for esterification reactions.

*Keywords: Lipolase, silica-alumina, Siral 40, esterification.*

Introdução

As lipases (triacilglicerol acilhidrolases, E.C. 3.1.1.3) estão entre as enzimas mais utilizadas em tecnologia enzimática, pois apresentam seletividade para um amplo número de substratos, sendo capazes de catalisar reações de hidrólise de óleos e gorduras, transesterificação e esterificação (1,2). Para atuar como eficientes biocatalisadores e poderem ser reutilizadas, a imobilização de lipases é uma estratégia fundamental (3).

Diferentes materiais são usados como suporte para a imobilização de lipases, tais como polímeros, zeólitas, materiais baseados em sílica, derivados de carbono, nanopartículas magnéticas, entre outros (3). A Siral 40 é uma sílica-alumina comercial com razão molar Al2O3:SiO2 de 60:40, que possui uma elevada área específica (451 m2/g) (4) e tamanho médio de poros de 79 Å (5). Graças às suas propriedades texturais e ácidas, como a presença de mesoporos e possuir sítios ácidos de Brønsted e Lewis, a Siral 40 é geralmente usada como catalisador, adsorvente e suporte para catalisadores (6).

A lipase de *Thermomyces lanuginosus* (TLL) é uma enzima termoestável com aplicação em diversas áreas, como na indústria de alimentos, na produção de biodiesel e na indústria de química fina, principalmente em processos específicos que necessitam de enantiosseletividade e regiosseletividade (7).

Nesse contexto, o presente trabalho objetivou estudar a imobilização de lipase de *T. lanuginosus* (Lipolase® 100L) em Siral 40 e usar o biocatalisador produzido para a catálise de reações de transesterificação, de hidrólise e de esterificação. A reutilização do derivado imobilizado foi avaliada na reação que apresentou maior atividade catalítica.

Experimental

*Materiais*

As enzimas utilizadas neste trabalho foram a Lipolase® 100L (TLL) e a Lipozyme TL IM da Novozymes Latin America Ltda. A sílica-alumina (com razão molar de Al2O3:SiO2 60:40) foi gentilmente cedida por SASOL (Alemanha). Ácido oleico (C18:1) 90%, etanol (99%), e goma arábica foram obtidos da Vetec Química Fina Ltda. (Rio de Janeiro, Brasil). Óleo de soja refinado foi fornecido pela Sadia (Rio de Janeiro, Brasil) e o óleo de oliva (azeite Andorinha) obtido de mercado local.

*Imobilização da lipase de Thermomyces lanuginosus (TLL)*

A imobilização da TLL foi realizada adicionando 10 mL de uma solução enzimática, previamente diluída com tampão fosfato de sódio 5mM (pH 7), de forma a obter diferentes concentrações, a 1 g de Siral 40. A mistura foi mantida em agitação por 2 h em temperatura ambiente (25 °C±1), sob agitação. A imobilização foi acompanhada pela determinação da concentração de proteínas presente no sobrenadante obtido durante o processo, de acordo com a metodologia descrita por Bradford (1976) (8). Ao fim da imobilização, o derivado obtido foi lavado com 25 mL de tampão fosfato 5 mM, filtrado à vácuo e armazenado a 4°C.

*Efeitos da concentração de proteína no processo de imobilização*

Diferentes concentrações de proteína (0,1, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1,0, 2,6 mg/mL) foram avaliadas para verificar a influência no processo de imobilização e a capacidade do suporte em adsorver a proteína. Um grama de Siral 40 foi misturado com 10 mL de solução enzimática previamente diluída em tampão fosfato de sódio 5mM, pH 7. A imobilização ocorreu por 2 horas, em temperatura ambiente (25±1°C) e sob agitação. Os dados experimentais foram ajustados ao modelo de adsorção de Langmuir (Equação 1).

Eq. 1

*Qe*  é a quantidade de proteína adsorvida no equilíbrio por massa de suporte (mg/g), *K* é a constante de equilíbrio de adsorção (mL/mg), *Qm* é a máxima quantidade de proteína adsorvida no suporte (mg/g), e *Ce* é a concentração de proteína livre na solução no equilíbrio (mg/mL). As isotermas de equilíbrio foram determinadas usando o tempo de 2 h, garantindo a concentração de proteínas constante na solução (± 5%). Os parâmetros desse modelo não-linear foram estimados numericamente baseados no algoritmo de Levenberg-Marquardt usando o software Origin 9.0.

*Testes catalíticos usando o biocatalisador TLL-S40*

*Reação de transesterificação*

As reações de transesterificação foram realizadas em reator encamisado (15 mL), agitado mecanicamente, na temperatura de 30°C por 4 horas. O meio reacional foi composto por óleo de soja e etanol, com razão molar de 1:3 e adição de 20% (m/v) do derivado imobilizado (TLL-S40). Etanol foi adicionado de forma escalonada (T0 = 1/3, T30 = 2/3 e T60 = 3/3) (9). Amostras foram coletadas periodicamente e analisadas por cromatografia em fase gasosa de acordo com a metodologia descrita por Pedro (4).

*Hidrólise enzimática*

As atividades hidrolíticas da TLL livre, Lipozyme TL IM e do derivado imobilizado (TLL-S40) foram determinadas usando óleo de oliva como substrato de acordo com o método adaptado de Soares et al. (10). 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 com temperatura mantida a 30 °C, sob agitação magnética. A reação foi interrompida com adição de 30 mL de acetona:etanol (1:1) e os ácidos graxos quantificados por meio de volumetria de neutralização com 0,05 mol/L de NaOH, usando um titulador automático (Mettler Toledo – modelo T50).

O substrato laurato de p-nitrofenila (p-NFL) também foi utilizado para avaliar a atividade hidrolítica da TLL livre e do TLL-S40. Para a reação, 0,2 mL da TLL livre previamente diluída ou uma quantidade adequada do biocatalisador (TLL-S40) foram adicionados a 10 mL de tampão fosfato de sódio 25mM (pH 7) e 1 mL de solução de laurato de p-nitrofenila a 2,5 mM. A mistura foi agitada magneticamente por 7 minutos. Durante esse período amostras foram retiradas e lidas em espectrofotômetro a 412 nm.

Uma unidade de atividade de lipase (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 µmol de produto 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 e 15 mmol de ácido oleico (razão molar 1:1), além do biocatalisador (TLL e TLL-S40) a 30°C (10). A esterificação enzimática ocorreu em reator encamisado e agitado mecanicamente. Alíquotas de 50µL foram retiradas periodicamente e dissolvidas em 30 mL de acetona:etanol (1:1). O ácido oleico residual foi determinado por meio de volumetria de neutralização com 0,02 mol/L de NaOH usando um titulador automático (Mettler Toledo – modelo T50) (11).

*Reuso do biocatalisador*

A possibilidade de reutilização do derivado (TLL-S40), após as reações de esterificação entre o ácido oleico e o etanol, no reator batelada fechado foi avaliada. As reações foram conduzidas a 30 °C empregando 20 % m/v do TLL-S40. Após 30 minutos de reação, o derivado imobilizado foi retirado do reator, lavado com 5 mL de etanol e filtrado a vácuo. Em seguida, o TLL-S40 recuperado foi reutilizado em uma nova reação, na temperatura de 30°C. Alíquotas de 50 μL foram retiradas do meio reacional nos tempos 0, 5, 10, 15, 20 e 30 min de reação. O consumo de ácido oleico nas alíquotas foi determinado por titulometria de neutralização com 0,02 mol/L de NaOH usando um titulador automático (Mettler Toledo – modelo T50) (11).

Resultados e Discussão

*Imobilização da lipase de Themomyces lanuginosus*

A imobilização da Lipolase em Siral 40 foi bem-sucedida, alcançando 99% de eficiência em todas as concentrações a partir de 0,4 mg/mL. Silica-aluminas com maiores proporções de sílica, como a Siral 40 (40% m/m de sílica), apresentam maior área específica e maior volume de mesoporos. Essas características favorecem a adsorção enzimática (6). Além disso, a Siral 40 possui maior teor de SiO2 que outras da mesma família (Siral 10 e Siral 20, por exemplo) e apresenta um caráter mais hidrofóbico do que as demais (4). Por regra geral, quanto mais hidrofóbico for o suporte, maior será a quantidade de lipase adsorvida (3).

A imobilização das lipases em suportes hidrofóbicos ocorre por ativação interfacial, o que significa que as lipases que foram adsorvidas no suporte estão em sua forma monomérica e aberta. Assim, a hidrofobicidade do suporte permite que a lipase se estabilize em sua conformação aberta, pois a *lid*, cadeia polipeptídica que recobre o sítio catalítico, interage com a interface hidrofóbica se mantendo aberta e com isso o sítio ativo da enzima fica acessível ao substrato (3).

*Efeito da concentração de proteína no processo de imobilização*

O efeito da concentração de proteína no processo de imobilização foi avaliado usando o modelo de adsorção de Langmuir. A isoterma de Langmuir descreve a adsorção de uma monocamada do adsorvato em uma superfície uniforme do adsorvente que contém um número finito de sítios ativos, que são energeticamente equivalentes e têm igual afinidade pelo adsorvato.

Os resultados obtidos usando diferentes concentrações de proteína apresentaram bom ajuste ao modelo de adsorção de Langmuir (Figura 1) com alto coeficiente de determinação (Tabela 1). Além disso, como o modelo de Langmuir afirma que não há interação entre moléculas adsorvidas adjacentes, a adequação a este modelo obtida nesse trabalho sugere a adsorção em monocamada de TLL na superfície da Siral 40 sem interações entre as proteínas adsorvidas.

**Gráfico, Gráfico de dispersão

Descrição gerada automaticamente**

**Figura 1**. Isoterma de adsorção de Langmuir para a imobilização de TLL em Siral 40 a 25 °C

A capacidade máxima de adsorção determinada pelo modelo de Langmuir foi igual a 169,5 mgproteína/ gsuporte. Alves e colaboradores (12) obtiveram valor semelhante ao obtido neste trabalho quando imobilizaram TLL em partículas de poli(estireno- divinilbenzeno), cuja capacidade de adsorção foi de 133,9 mg/g.

**Tabela 1**: Parâmetros da isoterma de adsorção de Langmuir da enzima TLL imobilizada em Siral 40 (TLL-S40). A imobilização ocorreu a temperatura ambiente (25°C ± 1) por 120 min usando 10 mL de solução enzimática (tampão fosfato de sódio 5 mM pH 7,0) e 1 g de suporte.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Qm  (mg proteina /g support) | K  (mL/mg proteína) | R2 |
| 169,5 ± 60,6 | 0,059 ± 0,024 | 0,9966 |

A quantidade de enzima adsorvida está diretamente ligada à capacidade de adsorção de um suporte que por sua vez está relacionado com sua área específica e tamanho dos poros (13,14). Tascias-Pascacio et al. (14) estudaram diferentes suportes comerciais para a imobilização da lipase A e B de *Candida antartica*, lipase de *Rhizomucor miehei*, lipase de *T. lanuginosus* e fosfolipase. Os autores observaram variação na capacidade de adsorção das lipases (1 mg/g a 80 mg/g) de acordo com os suportes. A máxima adsorção de TLL foi observada para o metacrilato de octadecila (17 mg/g), seguido do suporte metacrilato de divinilbenzeno que adsorveu 13 mg/g de proteína. O suporte com a menor capacidade de adsorção foi o octil agarose, retendo 5 mg/g de proteína.

*Testes catalíticos usando o biocatalisador TLL-S40*

A adsorção de lipases em suportes hidrofóbicos é um método simples e eficiente de imobilização, que pode aumentar a atividade e estabilidade dos derivados imobilizados. A forma aberta e ativa das moléculas de lipase pode ser estabilizada por uma forte adsorção na superfície do suporte (15).

Desta forma, após a imobilização da TLL no suporte Siral 40, o derivado imobilizado (TLL-S40) e a TLL livre foram testados em reações de hidrólise, de transesterificação e de esterificação. A comparação da performance entre o biocatalisador imobilizado e a enzima livre permite uma melhor avaliação da eficiência do processo de imobilização.

*Reação de transesterificação*

A quantidade de éster formado na reação de transesterificação do óleo de soja com o etanol (razão molar óleo de soja:etanol 1:3) por TLL-S40 e pela TLL livre foi de 1,8 % e 84,6 %, respectivamente. A quantidade de proteína presente no meio reacional usando TLL-S40 era 22 % maior do que na reação com a TLL livre. No entanto, a quantidade de biodiesel produzida foi 47 vezes menor. Quando a Lipozyme TL IM foi usada na reação de transesterificação, o teor em éster alcançou o valor de 50% m/m (11).

A menor atividade catalítica de biocatalisadores imobilizados pode ser atribuída ao tipo de suporte usado na imobilização e, também, à adsorção de glicerol (gerado durante a reação) ao suporte. Uma vez adsorvido ao suporte, o glicerol pode modificar o microambiente enzimático provocando uma diminuição da sua atividade enzimática (16,17).

*Hidrólise enzimática*

As atividades de hidrólise da TLL-S40, TLL livre e Lipozyme TL IM foram avaliadas usando dois substratos: óleo de oliva e laurato de p-nitrofenila (p-NFL) (Tabela 2). A atividade da lipase livre foi 1,5 vezes maior quando óleo de oliva foi utilizado como substrato em comparação à hidrólise de p-NFL. Com relação à atividade do derivado imobilizado (TLL-S40), esta foi aproximadamente 5 vezes maior na hidrólise de p-NFL do que na hidrólise do óleo de oliva. Já a Lipozyme TL IM apresentou uma atividade de 620 vezes maior que a do derivado imobilizado quando óleo de oliva foi usado como substrato.

**Tabela 2** – Atividade hidrolítica da TLL-S40 e das enzimas comerciais Lipolase® 100L (TLL) e Lipozyme TL IM usando óleo de oliva e laurato de p-nitrofenila como substratos.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Atividade Hidrolítica (µmol/(g.min) ou µmol/(mL.min))** | | |
| **Substrato/**  **Atividade** | **Óleo de oliva** | **Laurato de p- nitrofenila** |
| TLL-S40 (U/g) | 22,6 ± 2,4 | 111,8 ± 10,1 |
| TLL- S40 (U/mg)a | 2,6 ± 0,25 | 11,8 ± 1,1 |
| TLL (U/mL) | (7,1 ±0,6) x104 | (4,6 ± 0,3) x 104 |
| TLL (U/mg)a | (3,8 ± 0,3) x103 | (2,5 ± 0,2) x 103 |
| Lipozyme TL IMb (U/g) | (1,4 ± 0,1) x104 | n.a |

aAtividade específica expressa em termos da atividade por massa de proteína. b A massa de proteína presente na Lipozyme TL IM não estava disponível nas informações técnicas da enzima. n.a: não avaliado

As quantidades de ácidos graxos liberadas durante a atividade hidrolítica da TLL-S40 e da TLL livre estão ilustradas na Figura 2. Considerando que na reação com a TLL livre a quantidade de proteína presente no meio foi de 0,05 mg e com a TLL-S40 uma quantidade 10 vezes maior de proteína foi empregada na reação (0,5 mg), a maior eficiência catalítica da TLL livre comparada à obtida pelo derivado TLL-S40 é evidente. A TLL livre hidrolisou cerca de 50 vezes mais ácidos graxos do que o derivado TLL-S40.

Gráfico, Gráfico de linhas

Descrição gerada automaticamente

**Figura 2**. Ácidos graxos liberados na hidrólise do óleo de oliva catalisada pela TLL livre e TLL-S40. O teor de proteína presente no meio reacional foi de 0,05 mg (para a TLL) e 0,5 mg (para a TLL-S40). A reação ocorreu a 30 °C por 45 minutos.

Os resultados obtidos na hidrólise do óleo de oliva diferem de outros trabalhos. Machado et al. (18) analisaram a eficiência da imobilização de TLL em três suportes: sílica não funcionalizada, sílica funcionalizada com trietoxi(octil)silano, e sílica funcionalizada com (3-aminopropil)trietoxisilano. Os derivados imobilizados apresentaram uma atividade de 79,7, 192,7, e 443,7 U/g na hidrólise do óleo de oliva, respectivamente. Considerando a imobilização por adsorção física (sílica não funcionalizada) a atividade obtida pelos autores foi 3,5 vezes maior do que a atividade apresentada neste trabalho. As condições de imobilização e o tipo de suporte influenciam a eficiência de imobilização e, também, a atividade enzimática.

*Reação de esterificação e síntese de oleato de etila*

O derivado imobilizado TLL-S40 foi utilizado em reação de esterificação para a síntese de oleato de etila. Na Figura 3 está apresentado o resultado da conversão de ácido oleico pela TLL-S40 e pela TLL livre.

A quantidade de proteína presente na TLL livre e na TLL- S40 oferecida ao meio reacional foi similar. Na reação com a TLL livre 32 mg de proteína foi fornecida. Já para o derivado imobilizado (TLL-S40) a quantidade de proteína presente foi de 28 mg. Mesmo com a diferença no teor proteico presente em cada reação, o derivado imobilizado foi mais eficiente em catalisar a esterificação do ácido oleico, com 54,4 % de conversão após 30 minutos de reação. Já a TLL livre converteu 35,2 % de ácido oleico, uma diferença 1,5 vezes menor do que a obtida com a TLL-S40.

Gráfico, Gráfico de linhas, Gráfico de dispersão

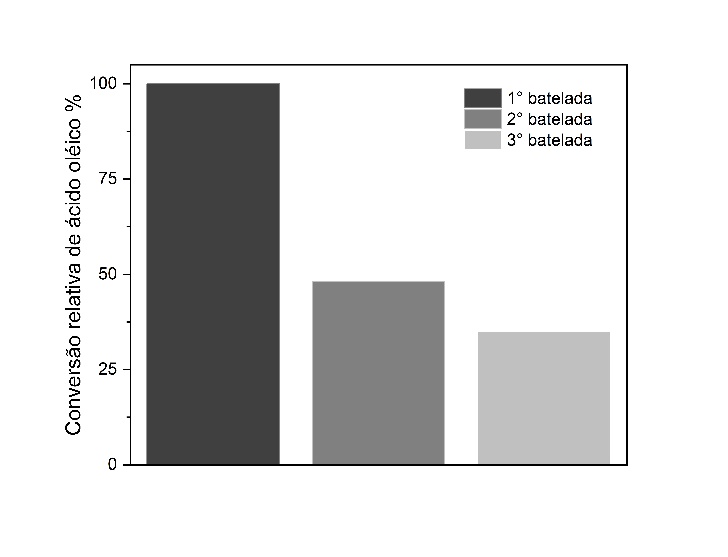
Descrição gerada automaticamente

**Figura 3**. Reação de esterificação catalisada pelo derivado imobilizado TLL-S40 e a enzima livre TLL. A reação ocorreu a 30 °C, usando 20 % m/m de TLL-S40 e 20 % m/v de TLL livre.

*Reuso do biocatalisador*

Uma das grandes vantagens da imobilização enzimática é sua fácil recuperação e reutilização. Essa vantagem é importante pois gera redução de custos, já que o biocatalisador é reutilizado em várias reações. O resultado da reutilização da TLL-S40 na reação de esterificação em 3 bateladas está apresentado na Figura 4. Considerando a atividade relativa, a conversão de ácido oleico na segunda e terceira batelada foram de 48 % e 35 %, respectivamente.

A explicação para a redução da atividade catalítica após a primeira batelada pode ser atribuída a diferentes fatores, como a desativação e dessorção enzimática, efeito negativo do solvente empregado na lavagem e perda de massa devido às consecutivas manipulações do biocatalisador (16,19). Além disso, os reagentes presentes no meio reacional podem afetar negativamente as lipases, causando sua inibição. Isso porque a ativação interfacial das lipases que pode ser ocasionada pela adsorção em um suporte hidrofóbico, como a Siral 40, permite que o sítio catalítico fique livre e permaneça em contato com o meio reacional (3).



**Figura 4**. Reutilização do biocatalisador TLL-S40 na reação de esterificação para a síntese de oleato de etila. A reação ocorreu a 30 °C, usando 20 % m/m de TLL-S40 por 30 minutos.

A formação de um *crosslinker* intermolecular entre a enzima e o suporte, promovido pela adição de um agente funcionalizante como glutaraldeído (GLU) e polietilaneimina (PEI) é relatada como forma de aumentar a estabilidade do biocatalisador, diminuindo a dessorção enzimática e favorecendo a retenção da atividade catalítica (20). A imobilização de TLL em um novo suporte hidrofóbico (Streamline phenyl™) usando PEI e GLU permitiu a retenção de 90% da atividade hidrolítica (39,1 U/g) considerando a atividade relativa do biocatalisador durante 5 bateladas. Já a imobilização da TLL sem a adição de PEI e GLU, levou à uma maior atividade hidrolítica (76,8 U/g), entretanto após 5 ciclos de reação a atividade relativa foi de apenas 20 % (21).

Conclusões

A lipase de *Termomyces lanuginosus* foi imobilizada eficientemente (99% de eficiência) em Siral 40, com capacidade máxima de adsorção de 169,5 mgproteína/gsuporte de acordo com o modelo de Langmuir. O derivado imobilizado apresentou diferenças catalíticas nas reações em que foi empregado, com baixa eficiência na transesterificação de óleo de soja (< 2% de conversão) e na hidrólise de óleo de oliva (22,6 U/g). Entretanto, a reação de esterificação do ácido oleico alcançou a conversão de 54,4 %, sendo 1,5 vezes maior do que a conversão obtida com a TLL livre. Além disso, foi possível reutilizar a lipase imobilizada com retenção de 35% da sua atividade inicial após o 3° ciclo de reação. A Siral 40 se mostrou um excelente e eficiente suporte para a imobilização de lipase de *T. lanuginosus* para a aplicação em reações de esterificação.

## Agradecimentos

Os autores agradecem à UERJ, IFRJ e UFRJ e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro-FAPERJ (E- 26/211.889/2021) e (E- 26/211.578/2021) pelo financiamento da pesquisa. M. A. P. da Silva agradece ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq (307190/2022-6). K.C.N.R. Pedro agradece à CAPES pela bolsa de doutorado.

## Referências

1. G. Bayramoglu, O. Celikbicak, M. Kilic, M. Y. Arica; *Food Chem* **2022**, *366*, 130699.
2. N. S. A. Wafti, R. Yunus, H. L. N. Lau, T. C. S. Yaw, and S. A. Aziz; *Bioprocess Biosyst Eng.* **2021***, 4*, 2429-2444.
3. 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.
4. K. C. N. R. Pedro, Tese de Doutorado, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, **2018**.
5. M. Stekrova, R. Zdenkova, M. Vesely, E. Vyskocilova, L. Cerveny; *Materials*, **2014**, *7*, 2650-2668.
6. J. M. P. F. Silva, E. B. Silveira, A. L. H. Costa, C. O. Veloso, C. A. Henriques, F. M. Z. Zotin, M. L. L. Paredes, R. A. Reis, s. S. X. Chiaro; *Ind. Eng. Chem. Res.* **2014**, *53*, 16000-16014.
7. R. Fernandez-Lafuente; *J. Mol. Catal. B Enzym*. **2010**, *62*, 197-212.
8. M. M. Bradford, *Anal Biochem*. **1976**, *72*, 248-254.
9. O. L. Bernardes, J. V. Bevilaqua, M. C. M. R. Leal, D. M. G. Freire, M. A. P. Langone; *App. Biochem. Biotechol*. **2007**, *136*, 105-114.
10. C. M. F. Soares, H. F. De Castro, F. F. De Moraes, G. M. Zanin; *Appl. Biochem. Biotechnol.* **1999**, *77-79*, 745-757.
11. K. C. N. R. Pedro, I. E. P. Ferreira, C. A. Henriques, M. A. P. Langone; *Chem. Eng. Commu.* **2019**, *207*, 43–55.
12. M. D. Alves, F. M. Aracri, E. C. Cren, A. A. Mendes; *Chem. Eng. J*. **2017**, *311*, 1-12.
13. L. Bayne, R. V. Ulijn, P. J. Halling; *Chem. Soc. Rev*. **2013**, *42*, 9000-9010.
14. V. G. Tascias-Pascio, S. Peirce, B. Torrestiana-Sanchez, M. Yates, A. Rosales-Quintero, J. J. Virgen-Ortiz, R. Fernandez-Lafuente; *RSC Adv*. **2016**, *6*, 100281-100294.
15. J. M. Fernandez-Lorente, J. Rocha-Martín, J. M. Guisan in Immobilization of Enzymes and Cells, J. M. Guisan, J. M. Bolivar, F. López-Gallego, J. Rocha-Martín, Ed.; Humana Press, New York, **2020**; 143-158.
16. Y. Xu, W. Du, D. Liu; *J. Mol. Catal. B Enzym*. **2005**, *32*, 241–245.
17. E. C. G. Aguieiras, D. S. Ribeiro, P. P. Couteiro, C M. B. Bastos, D. S. de Queiroz, J. M. Parreira, M. A. P. Langone; *Appl Biochem Biotechnol* **2016**, *179*, 485-496.
18. N. B. Machado, J. P. Miguez, I. C. A. Bolina, A. B. Saviano, R. A. B. Gomes, O. L. Tavano, J. H. H. Luiz, P. W. Tardioli, E. C. Cren, A. A. Mendes; *Enzyme Microb. Technol*. **2019**, *128*, 9-21.
19. M. L. Foresti, M. L. Ferreira; *Enzyme Microb. Technol*. **2007**, *40*, 769-777.
20. H. Zaak, L. Fernandez-Lopez, C. Otero, M. Sassi, R. Fernandez-Lafuente; *Enz. Microb. Technol*. **2017,** *106*, 67-74.
21. 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.