

IMOBILIZAÇÃO DE PEROXIDASE DE RAIZ FORTE EM CASCA DE NOZ-PECÃ: INFLUÊNCIA DO CARREGAMENTO ENZIMÁTICO

Data de aceite: 03/04/2023

Ani Caroline Weber

Universidade do Vale do Taquari
Lajeado - Rio Grande do Sul
<http://lattes.cnpq.br/8238624023188773>

Cristiano de Aguiar Pereira

Universidade do Vale do Taquari
Lajeado - Rio Grande do Sul
<http://lattes.cnpq.br/4370455437960177>

Bruno Eduardo da Silva

Universidade do Vale do Taquari
Lajeado - Rio Grande do Sul
<http://lattes.cnpq.br/9474409267081328>

Guilherme Schwingel Henn

Universidade do Vale do Taquari
Lajeado - Rio Grande do Sul
<http://lattes.cnpq.br/7398704920001376>

Sabrina Grando Cordeiro

Universidade do Vale do Taquari
Lajeado - Rio Grande do Sul
<http://lattes.cnpq.br/2337098282279202>

Bruna Costa

Universidade do Vale do Taquari
Lajeado - Rio Grande do Sul
<http://lattes.cnpq.br/2255574648252180>

Jéssica Samara Herek dos Santos

Universidade do Vale do Taquari
Lajeado - Rio Grande do Sul
<http://lattes.cnpq.br/8038392775385994>

Lucineia Cavalheiro Schneider

Universidade do Vale do Taquari
Lajeado - Rio Grande do Sul
<http://lattes.cnpq.br/7037056545540269>

Eduardo Miranda Ethur

Universidade do Vale do Taquari
Lajeado - Rio Grande do Sul
<http://lattes.cnpq.br/0536800052883688>

Lucélia Hoehne

Universidade do Vale do Taquari
Lajeado - Rio Grande do Sul
<http://lattes.cnpq.br/1088266827926373>

RESUMO: A noz-pecã, fruto da nogueira-pecã, é amplamente produzida e consumida. No entanto, o processamento industrial da noz-pecã possui elevada taxa de geração de resíduos, uma vez que a casca corresponde a cerca de 50% da massa total do fruto. Neste sentido, estudos visando o reaproveitamento da casca de noz-pecã, bem como a agregação de valor, vêm ganhando espaço. Dentre as possíveis

aplicações, está a utilização da casca de noz-pecã como suporte para a imobilização enzimática, como por exemplo, da peroxidase de raiz forte (HRP). A HRP é uma oxidoreductase com a capacidade de degradar moléculas aromáticas, principalmente fenóis. No entanto, estudos empregando-se a casca de noz-pecã como suporte para a imobilização de HRP ainda são escassos. Assim, este estudo tem por objetivo imobilizar a HRP em casca de noz-pecã tratada com NaOH, avaliando-se a influência do carregamento enzimático no rendimento e eficiência de imobilização, e posteriormente, na atividade enzimática recuperada. Para isto, a casca de noz-pecã foi moída e tratada quimicamente com NaOH, e posteriormente classificada granulometricamente, sendo a fração retida na peneira -80 +100 MESH utilizada para a imobilização. O carregamento enzimático foi avaliado adicionando diferentes quantidades de enzima (10-500 mg/g de suporte) para uma mesma massa de suporte, em meio orgânico (hexano). Para a faixa de carregamento empregada, a adição de 100 mg de proteína/g de suporte resultou na melhor condição, com um rendimento de 99%, eficiência de 188,6% e recuperação da atividade de 188,5%. Verificou-se que a imobilização da HRP na casca de noz-pecã contribuiu para uma maior atividade catalítica nos carregamentos de 50, 100 e 200 mg/g de suporte, resultando em eficiências superiores a 100%. Conclui-se que a casca de noz-pecã pode ser tratada e empregada na imobilização enzimática, agregando valor a este resíduo, bem como favorecendo a empregabilidade enzimática em processos industriais.

PALAVRAS-CHAVE: Horseradish peroxidase. Casca de noz-pecã. Rendimento. Eficiência.

IMMOBILIZATION OF HORSERADISH PEROXIDASE IN PECAN SHELL: INFLUENCE OF ENZYME LOADING

ABSTRACT: Pecan, the fruit of the pecan tree, is widely produced and consumed. However, the industrial processing of pecans has a high rate of waste generation, since the shell corresponds to about 50% of the total mass of the fruit. In this sense, studies aimed at the reuse of pecan nut shells, as well as adding value, have been gaining ground. Among the possible applications is the use of pecan nut shell as a support for enzymatic immobilization, such as horseradish peroxidase (HRP). HRP is an oxidoreductase with the ability to degrade aromatic molecules, mainly phenols. However, studies using pecan nut shell as a support for HRP immobilization are still scarce. Thus, this study aims to immobilize HRP in NaOH-treated pecan nut shells, evaluating the influence of enzymatic loading on immobilization yield and efficiency, and subsequently, on recovered enzymatic activity. For this, the pecan nut shell was ground and chemically treated with NaOH, and later classified according to size, and the fraction retained in the -80 +100 MESH sieve was used for immobilization. Enzyme loading was evaluated by adding different amounts of protein (10-500 mg/g of support) to the same support mass in organic medium (hexane). For the loading range employed, the addition of 100 mg of protein/g of support resulted in the best condition, with a yield of 99%, efficiency of 188.6% and recovery of activity of 188.5%. It was verified that the immobilization of HRP in the pecan nut shell contributed to a greater catalytic activity in the loadings of 50, 100 and 200 mg/g of support, resulting in efficiencies above 100%. It is concluded that the pecan nut shell can be treated and used in enzymatic immobilization, adding value to this residue, as well as favoring enzymatic employability in industrial processes.

KEYWORDS: Horseradish peroxidase. Pecan Efficiency.shell. Yield.

1 | INTRODUÇÃO

A noqueira-pecã, de nome científico *Carya illinoensis*, é uma árvore frutífera de grande porte (CROSA *et al.*, 2020; MACIEL *et al.*, 2020). Atualmente, o Rio Grande do Sul é o maior produtor nacional de noz-pecã, fruto da noqueira-pecã (FRONZA *et al.*, 2018; ROVANI; WOLLMANN, 2018). A noz-pecã é rica em óleo, minerais e antioxidantes (WOJDYŁO *et al.*, 2022), podendo ser consumida de diferentes formas (RIBEIRO; BOTH; WAGNER, 2020; TONG *et al.*, 2022). Entretanto, aproximadamente 50% da massa do fruto é formada pela sua casca, a qual é descartada na maioria das vezes em aterros, devido ao seu baixo valor agregado (MARTÍNEZ-CASILLAS *et al.*, 2019). Contudo, pesquisas vêm sendo realizadas visando agregar valor a casca de noz-pecã (CNP), como por exemplo, o emprego na fabricação de embalagens para alimentos, carvão ativado, bioadsorvente para o tratamento de água, biocombustível, ou ainda como suporte na imobilização enzimática (RAMÍREZ-MONTOYA *et al.*, 2015; ENGEL *et al.*, 2020; ANDRADE; PIAZZA; POLETTI, 2021).

As enzimas são proteínas catalíticas utilizadas em bioprocessos, que possuem como principais vantagens a alta especificidade e seletividade e um menor impacto ambiental. No entanto, condições desfavoráveis de pH, temperatura ou solventes do meio podem provocar a desnaturação enzimática, e a consequente perda da atividade catalítica (BERNAL; RODRÍGUEZ; MARTÍNEZ, 2018; BILAL; IQBAL, 2019a). Neste sentido, a imobilização enzimática pode contribuir para minimizar essas desvantagens, empregando-se suportes inertes como, por exemplo, biopolímeros (BILAL; IQBAL, 2019a) e resíduos lignocelulósicos (GIRELLI; ASTOLFI; SCUTO, 2020). Para a utilização dos resíduos lignocelulósicos, comumente faz-se necessário um pré-tratamento químico, a fim de causar a deslignificação, hidrólise incompleta da hemicelulose, descristalização e diminuição da polimerização da celulose, aumentando a superfície de contato e a porosidade (THAKUR *et al.*, 2020).

Diversas metodologias físicas e químicas podem ser empregadas para a imobilização de enzimas, sendo uma das mais utilizadas a ligação covalente, que consiste na ligação química entre o suporte e a cadeia de aminoácidos lateral da enzima (LIU; CHEN; SHI, 2018). Ainda, agentes como o glutaraldeído, que possui propriedades bifuncionais, podem ser empregados para a imobilização enzimática por ligação covalente (ANDRADES *et al.*, 2019).

Dentre as enzimas mais empregadas atualmente e que vem sendo estudada quanto à sua imobilização e potencial na biodegradação de poluentes, está a peroxidase de raiz forte (*HRP - Horseradish peroxidase*), uma enzima pertencente à classe das oxidorrredutases (EL-NAGGAR *et al.*, 2021) e que geralmente utiliza peróxido de hidrogênio ou outro peróxido orgânico como acceptor de elétrons para catalisar as reações oxidativas (HAAS; VAZ; KEMPKA, 2018). A HRP se destaca dentre as diversas enzimas com potencial

no tratamento de águas e efluentes, devido ao baixo custo em relação à outras enzimas, ampla disponibilidade, alto grau de especificidade e estabilidade (ALMULAIKY *et al.*, 2019; BILAL *et al.*, 2019).

Desta forma, tendo em vista o potencial da HRP e a importância da otimização de parâmetros de imobilização, o presente estudo tem como objetivo verificar a influência do carregamento enzimático de HRP empregando-se a CNP como suporte.

2 | MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Materiais

Para a realização deste trabalho, a enzima peroxidase de raiz forte (HRP) (CAS 9003-99-0, 77332, pó liofilizado, 40 kDa, 173 U/mg) e albumina sérica bovina (CAS 9048-46-8, A2153, pó liofilizado, 66 kDa, $\geq 96\%$) foram adquiridas da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Outros reagentes, como o fosfato de sódio dibásico anidro P.A. (Na_2HPO_4) foi adquirido da Vetec Química (RJ, Brasil), o ácido orto-fosfórico (H_3PO_4) 85% P.A. da Nuclear (SP, Brasil), o hidróxido de sódio (NaOH) P.A. da Êxodo Científica (SP, Brasil), o guaiacol ($\text{C}_7\text{H}_8\text{O}_2$) da Neon (SP, Brasil), o peróxido de hidrogênio 30% (H_2O_2) da Química Moderna (SP, Brasil) e o corante de Bradford da Bio-Rad (CA, EUA). A casca de noz-pecã foi gentilmente cedida pela empresa Nozes Pitol Ltda, localizada em Anta Gorda, Rio Grande do Sul, Brasil.

2.2 Pré-tratamento do suporte orgânico

A casca de noz-pecã foi coletada junto à empresa cedente, transportada em temperatura ambiente (22 ± 2 °C), triturada em liquidificador industrial, lavada com água deionizada e seca a 60 °C até verificar-se massa constante por três avaliações consecutivas. Em seguida, a casca foi tratada quimicamente conforme metodologia adaptada de Borsoi *et al.* (2019). Para isto, adicionou-se para cada 20 g de casca seca, 400 mL de NaOH 10%, e aqueceu-se a 50 °C em chapa magnética com agitação mecânica, por 90 minutos. Após, lavou-se as cascas até a neutralização do pH, secou-se em estufa a 60 °C por 24 horas e fez-se a classificação granulométrica das partículas, coletando-se as frações retidas nas peneiras -80 +100 MESH.

2.3 Quantificação de proteínas

Para a quantificação de proteínas utilizou-se o método de Bradford (1976), empregando-se albumina sérica bovina (BSA) como padrão proteico e o corante de Bradford (azul brilhante de Coomassie R250). Inicialmente, procedeu-se com a construção da curva de calibração, preparando-se concentrações de BSA equivalentes a 0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0 mg/mL. Em cada poço de uma placa de 96 poços, adicionou-se 4 μL de solução de BSA (ou de amostra) e 200 μL do corante de Bradford. Incubou-se a placa por

10 minutos e realizou-se a leitura da absorbância ($\lambda=540$ nm) em leitor de microplacas Spectramax (Spectramax i3, Molecular Devices, CA, EUA). A partir da construção da curva de calibração e das absorbâncias obtidas para as amostras, calculou-se a concentração de proteínas.

2.4 Atividade enzimática

A atividade enzimática foi avaliada por meio da metodologia adaptada de Queiroz *et al.* (2018), empregando-se como substrato o guaiacol. Em uma cubeta, adicionou-se 2,7 mL de tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 6,0, 0,1 mL de H_2O_2 0,01 M, 0,1 mL de guaiacol 0,1 M e 0,1 mL de solução enzimática ou 0,05 g de derivado (suporte + enzima imobilizada). Após 1 min de reação, procedeu-se com a leitura em Espectrofotômetro de Absorção Molecular na região do Ultravioleta-Visível (UV-Vis) (Genesys 10S, Thermo Scientific, USA), a 470 nm. Para o branco, substituiu-se a solução enzimática por tampão. A atividade enzimática foi determinada por meio da Equação 1, onde uma unidade de atividade enzimática (U) corresponde a quantidade de enzima necessária para catalisar a transformação de 1 μ mol de guaiacol por minuto.

$$\text{Atividade enzimática (U/mL)} = \frac{(\text{Abs}(t) - \text{Abs}(0)) * V_{\text{total}} * 1000}{\epsilon * V_{\text{enzima}} * t} \quad (\text{Equação 1})$$

Onde $\text{Abs}(t)$ corresponde à absorbância verificada após 1 minuto, $\text{Abs}(0)$ a absorbância no tempo 0, V_{total} ao volume total de solução na cubeta (3 mL), ϵ corresponde ao coeficiente de absorvidade molar do guaiacol (26600 L/mol.cm⁻¹), V_{enzima} corresponde ao volume (mL) de solução enzimática adicionada à cubeta e t ao tempo (min) transcorrido.

2.5 Imobilização enzimática

Para a imobilização enzimática seguiu-se a metodologia adaptada de Ramírez-Montoya *et al.* (2015). Inicialmente, preparou-se uma solução enzimática em tampão fosfato 0,1 M pH 6,0, com atividade de 94,5 U/mL. Em seguida, adicionou-se em frascos individuais contendo 100 mg de suporte, 5 mL de hexano e agitou-se em chapa magnética por 15 minutos. Em seguida, volumes de solução enzimática adequados para se obter concentrações de 10, 30, 50, 100, 200 e 500 mg de proteína/g de suporte foram adicionados e completou-se o volume total até 10 mL com hexano. Deixou-se agitar por 3 horas à temperatura ambiente (22 ± 2 °C) e então, armazenou-se em condição estática por 24 horas a 4 °C. Ao final, filtrou-se o derivado e lavou-se com três alíquotas de 20 mL de hexano. Por fim, os derivados foram inseridos em um dessecador por 24 horas para remover o excesso de umidade e acondicionados em tubos eppendorf (a 4 °C) até a realização dos demais ensaios.

2.5.1 Rendimento e eficiência de imobilização

O rendimento e a eficiência de imobilização foram determinados conforme Sheldon

e Van Pelt (2013). O rendimento da imobilização enzimática descreve a porcentagem da atividade enzimática total da solução de enzima livre que está imobilizada, conforme a Equação 2.

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{\text{Atividade imobilizada}}{\text{Atividade inicial}} * 100 \quad (\text{Equação 2})$$

Onde a atividade imobilizada corresponde a atividade enzimática residual total que permanece na solução enzimática após a imobilização, ou ainda, aquela presente nas soluções remanescentes da imobilização (solução de imobilização e de lavagem), subtraída da atividade inicial total (SHELDON; VAN PELT, 2013).

A eficiência de imobilização descreve a porcentagem da enzima ligada que é observada no imobilizado, ou seja, o percentual de enzima que se manteve ativo e acessível (funcional) após a imobilização (SHELDON; VAN PELT, 2013), sendo determinada conforme a Equação 3.

$$\text{Eficiência (\%)} = \frac{\text{Atividade observada}}{\text{Atividade imobilizada}} * 100 \quad (\text{Equação 3})$$

2.5.2 Recuperação da atividade

Segundo Sheldon e Van Pelt (2013), a recuperação da atividade é o rendimento da imobilização multiplicado pela eficiência da imobilização, permitindo ter-se uma ideia do sucesso do processo de imobilização total, sendo calculada conforme a Equação 4.

$$\text{Recuperação da atividade (\%)} = \frac{\text{Rendimento (\%)} * \text{Eficiência (\%)}}{100} \quad (\text{Equação 4})$$

2.6 Análise estatística

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Tukey com $p < 0,05$, utilizando-se o *software* PAST versão 4.03 (HAMMER, 2020).

3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

A casca de noz-pecã foi tratada quimicamente com NaOH e utilizada para a imobilização da peroxidase de raiz forte. Os resultados para o rendimento e eficiência de imobilização, bem como a recuperação da atividade para as diferentes quantidades de proteína adicionadas estão expostos na Tabela 1.

Carregamento de proteína (mg/g de suporte)	Rendimento (%)	Eficiência (%)	Recuperação da atividade (%)
10	99,97 ± 0,04 ^a	39,60 ± 0,02 ^f	39,59 ± 0,01 ^f
30	99,97 ± 0,01 ^a	73,60 ± 0,01 ^d	73,58 ± 0,01 ^d
50	99,98 ± 0,01 ^a	178,56 ± 0,01 ^b	178,53 ± 0,01 ^b
100	99,99 ± 0,01 ^a	188,56 ± 0,01 ^a	188,53 ± 0,01 ^a
200	88,46 ± 0,06 ^c	133,82 ± 0,09 ^c	118,37 ± 0,01 ^c
500	94,10 ± 0,01 ^b	73,28 ± 0,01 ^e	69,68 ± 0,01 ^e

Média ± desvio padrão. Letras diferentes em uma mesma coluna indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre os diferentes carregamentos empregados.

Tabela 1 - Efeito do carregamento proteico na imobilização de HRP em casca de noz-pecã por ligação covalente

A partir dos resultados obtidos, faz-se possível notar que para os carregamentos iniciais, de 10 e 30 mg/g de proteína, obteve-se um rendimento de quase 100%, mas uma eficiência de 39,6% e 73,6%, respectivamente, impactando diretamente na recuperação da atividade. Este resultado se deve, possivelmente, a pouca quantidade de enzima adicionada para a quantidade de suporte, de modo que os sítios de ligação do suporte não tenham sido completamente preenchidos.

Quando o carregamento enzimático aumenta para 50 mg/g, observa-se a conservação do rendimento na faixa de 100%, além de um aumento significativo na eficiência e na recuperação da atividade, que se eleva ainda mais quando utilizado um carregamento de 100 mg/g, resultando em uma eficiência de 188,6%. Uma vez que todos os sítios de ligação do suporte estão preenchidos, a eficiência enzimática após a imobilização será diretamente influenciada pela dinâmica do sistema suporte-enzima, dependendo de parâmetros como manutenção da atividade após a imobilização, facilidade de movimentação durante a atividade catalítica e facilidade de acesso dos substratos e liberação do produto. Assim, se um ambiente enzimático favorável ao redor das moléculas de enzima for criado, a estabilidade pode aumentar, bem como a atividade enzimática (por meio de estados hiperativos congelados da enzima, ou evitando efeitos deletérios de um meio de reação drástico), além da especificidade ou seletividade (via alterações conformacionais) (FERNANDEZ-LOPEZ *et al.*, 2017).

Para os carregamentos de 200 e 500 mg/g, houve um decréscimo no rendimento de imobilização, bem como na eficiência e recuperação da atividade, que foram mais acentuados para o carregamento de 500 mg/g. Segundo Wang *et al.* (2008) e Queiroz *et al.* (2018) a redução da eficiência em concentrações elevadas de proteínas se deve a uma sobrecarga proteica, provocando aglomerados de moléculas enzimáticas fixadas na superfície do suporte, fenômeno este observado também em outros estudos, como os de Gennari *et al.* (2018), Barbosa *et al.* (2020) e Otari *et al.* (2020).

Dentre os carregamentos empregados, verifica-se que 100 mg de proteína por grama de suporte resultaram em uma maior eficiência e recuperação da atividade, além de um rendimento de 99,99%. Estes resultados são superiores aos obtidos por Queiroz *et al.* (2018), no qual verificou-se 35% de rendimento para a imobilização de HRP em bagaço de cana-de-açúcar por ligação covalente, por Barbosa *et al.* (2020), no qual obteve-se 89,99% de rendimento de imobilização da peroxidase de rabanete em suporte híbrido (sílica-15/albumina) por ligação covalente e por Bilal e Iqbal (2019b), que obtiveram 96,3% de rendimento na imobilização de lignina peroxidase em esferas de alginato de cálcio.

Assim, a imobilização da HRP em casca de noz-pecã demonstra-se promissora. No entanto, mais estudos são necessários, visando verificar o desempenho enzimático em diferentes pHs, temperaturas, meios, bem como posteriormente em aplicações como a degradação de micropoluentes.

4 | CONCLUSÃO

A partir do estudo realizado pode-se concluir que a casca de noz-pecã demonstra-se como um resíduo promissor para ser empregado em imobilizações enzimáticas e que tratando-se da imobilização de HRP, permite a obtenção de um carregamento enzimático de 100 mg/g, com 99,99% de rendimento de 188,56% de eficiência, ou seja, favorece a atividade catalítica enzimática.

REFERÊNCIAS

ALMULAIKY, Y. Q.; EL-SHISHTAWY, R. M.; ALDHAHRI, M.; MOHAMED, S. A.; AFIFI, M.; ABDULAAL, W. H.; MAHYOUB, J. A. **Amidrazone modified acrylic fabric activated with cyanuric chloride: a novel and efficient support for horseradish peroxidase immobilization and phenol removal.**

International Journal of Biological Macromolecules, v. 140, n. 1, p. 949-948, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.08.179>. Acesso em: 20 set. 2022.

ANDRADES, D.; GRAEBIN, N. G.; KADOWAKI, M. K.; AYUB, M. A. Z.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; RODRIGUEZ, R. C. **Immobilization and stabilization of different β -glucosidases using the glutaraldehyde chemistry: optimal protocol depends on the enzyme.**

International Journal of Biological Macromolecules, v. 129, p. 672-678, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.02.057>. Acesso em: 20 set. 2022.

ANDRADE, M. P.; PIAZZA, D.; POLETTI, M. **Pecan nutshell: morphological, chemical and thermal characterization.**

Journal of Material Research and Technology, v. 13, p. 2229-2238. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jmrt.2021.05.106>. Acesso em: 20 set. 2022.

BARBOSA, G. S. S.; OLIVEIRA, M. E. P. S.; SANTOS, A. B. S.; SÁNCHEZ, O. C.; SOARES, C. M. F.; FRICKS, A. T. **Immobilization of low-cost alternative vegetable peroxidase (*Raphanus sativus* L. peroxidase): choice of support/technique and characterization.**

Molecules, v. 25, n. 16, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390%2Fmolecules25163668>. Acesso em: 23 out. 2022.

BERNAL, C.; RODRÍGUEZ, K.; MARTÍNEZ, R. **Integrating enzyme immobilization and protein engineering: An alternative path for the development of novel and improved industrial biocatalysts.** *Biotechnology Advances*, v. 36, n. 5, p. 1470-1480, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.06.002>. Acesso em: 20 set. 2022.

BILAL, M.; IQBAL, H. M. N. **Naturally-derived biopolymers: potential platforms for enzyme immobilization.** *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 130, n. 1, p. 462-482, 2019a. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.02.152>. Acesso em: 20 set. 2022.

BILAL, M.; IQBAL, H. M. N. **Lignin peroxidase immobilization on Ca-alginate beads and its dye degradation performance in a packed bed reactor system.** *Biocatalysis and agricultural biotechnology*, v. 20, 2019b. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101205>. Acesso em: 23 out. 2022.

BILAL, M.; RASHEED, T.; ZHAO, Y.; IQBAL, H. N. M. **Agarose-chitosan hydrogel-immobilized horseradish peroxidase with sustainable bio-catalytic and dye degradation properties.** *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 124, p. 742-749, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.11.220>. Acesso em: 20 set. 2022.

BORSOI, C.; HANSEN, B.; GEMMER, R. E.; JÚNIOR, M. A. D.; FRANCISQUETTI, E. L.; ZATTERA, A. J.; SANTANA, R. M. C.; CATTO, A. L. **Effect of different surface treatments on polypropylene composites reinforced with yerba mate fibers: physical, mechanical, chemical, and morphological properties.** *Journal of Applied Polymer*, v. 138, n. 45, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/app.51350>. Acesso em: 23 out. 2022.

BRADFORD, M. M. **A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** *Analytical Biochemistry*, v. 81, p. 248-254, 1976. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3). Acesso em: 23 out. 2022.

CROSA, C. F. R.; MARCO, R.; SOUZA, R. S.; MARTINS, C. R. **Tecnologia de produção de noz-pecã no sul do Brasil.** *Revista Científica Rural*, v. 22, n. 2, p. 249-252, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.30945/rcr-v22i2.3170>. Acesso em: 16 set. 2022.

EL-NAGGAR, M. E.; ABDEL-ATY, A. M.; WASSEL, A. R.; ELARABY, N.; MOHAMED, S. A. **Immobilization of horseradish peroxidase on cationic microporous starch: physico-chemical characterization and removal of phenolic compounds.** *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 181, p. 734- 742, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.03.171>. Acesso em: 20 set. 2022.

ENGEL, J. B.; GINITY, M. M.; LUCHESE, C. L.; TESSARO, I. C.; SPADA, J. C. **Reuse of different agroindustrial wastes: pinhão and pecan nutshells incorporated into biocomposites using thermocompression.** *Journal of Polymers and the Environment*, v. 28, p. 1431- 1440, 2020. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10924-020-01696-w>. Acesso em: 20 set. 2022.

FERNANDEZ-LOPEZ, L.; PEDRERO, S. G.; LOPEZ-CARROBLES, N.; GORINES, B. C.; VIRGEN-ORTÍZ, J. J.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. **Effect of protein load on stability of immobilized enzymes.** *Enzyme and Microbial Technology*, v. 98, p. 18-25, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2016.12.002>. Acesso em: 23 out. 2022.

FRONZA, D.; HAMANN, J. J.; BOTH, V.; ANESE, R. O.; MEYER, E. A. **Pecan cultivation: general aspects.** *Ciência Rural*, v. 48, n. 2, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20170179>. Acesso em: 16 set. 2022.

GENNARI, A.; MOBAYED, F. H.; RAFAEL, R. S.; RODRIGUES, R. C.; SPEROTTO, R. A.; VOLPATO, G.; SOUZA, C. F. V. **Modification of Immobead 150 support for protein immobilization: effects on the properties of immobilized *Aspergillus oryzae* β -galactosidase.** *Biotechnology progress*, v. 34, n. 4, p. 934-943, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/btpr.2652>. Acesso em: 23 out. 2022.

GIRELLI, A. M.; ASTOLFI, M. L.; SCUTO, F. R. **Agro-industrial wastes as potential carriers for enzymes immobilization: a review.** *Chemosphere*, v. 244, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125368>. Acesso em: 20 set. 2022.

HAAS, A.; VAZ, C.; KEMPKA, A. P. **Extração e purificação de peroxidases de vegetais: uma revisão.** *Periódico Tchê Química*, v. 16, n. 31, p. 692-703, 2018. Disponível em: https://web.archive.org/web/20210830133815id_/http://www.deboni.he.com.br/arquivos_jornal/2019/31/702_Periodico31.pdf. Acesso em: 20 set. 2022.

HAMMER, O. **PAST: Paleontological statistics software package.** 2020.

LIU, M. D.; CHEN, J.; SHI, Y. P. **Advances on methods and easy separated support materials for enzymes immobilization.** *TrAC Trend in Analytical Chemistry*, v. 102, p. 332-342, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.03.011>. Acesso em: 20 set. 2022.

MACIEL, L. G.; RIBEIRO, F. L.; TEIXEIRA, G. L.; MOLOGNONI, L.; SANTOS, J. N.; NUNES, I. L.; BLOCK, J. N. **The potential of the pecan nut cake as an ingredient for the food industry.** *Food Research International*, v. 27, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108718>. Acesso em: 16 set. 2022.

MARTÍNEZ-CASILLAS, D. C.; MASCORRO-GUTIÉRREZ, I.; ARREOLA-RAMOS, C. E.; VILLAFÁN-VIDALES, H. I.; ARANCIBIA-BULNES, C. A.; RAMOS-SÁNCHEZ, V. H.; CUENTAS-GALLEGOS, A. K. **A sustainable approach to produce activated carbons from pecan nutshell waste for environmentally friendly supercapacitors.** *Carbon*, v. 148, p. 403-412, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2019.04.017>. Acesso em: 20 set. 2022.

OTARI, S. V.; PATEL, S. K. S.; KALIA, V. C.; LEE, J. **One-step hydrothermal synthesis of magnetic rice straw for effective lipase immobilization and its application in esterification reaction.** *Bioresource Technology*, v. 302, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122887>. Acesso em: 23 out. 2022.

QUEIROZ, M. L. B.; CONCEIÇÃO, K. C.; MELO, M. N.; SÁNCHEZ, O. C.; ALVAREZ, H. M.; SOARES, C. M. F.; FRICKS, A. T. **Imobilização de peroxidase de raiz forte em bagaço de cana-de-açúcar.** *Química Nova*, v. 41, n. 9, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170279>. Acesso em: 23 out. 2022.

RAMÍREZ-MONTOYA, L. A.; HERNÁNDEZ-MONTOYA, V.; MONTES-MORÁN, M. A.; CERVANTES, F. J. **Correlation between mesopore volume of carbon supports and the immobilization of laccase from *Trametes versicolor* for the decolorization of Acid Orange 7.** *Journal of Environmental Management*, v. 162, p. 206-214, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2015.07.035>. Acesso em: 23 out. 2022.

RIBEIRO, S. R.; BOTH, V.; WAGNER, R. **Estratégia para o armazenamento e manutenção da qualidade da noz-pecã após a colheita.** *CIAGRO*, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.31692/ICIAGRO.2020.0229>. Acesso em 19 set. 2022.

ROVANI, F. F. M.; WOLLMANN, C. A. **Análise sazonal e anual dos requisitos climáticos do cultivo da noqueira pecã (*Carya illinoensis*) no Rio Grande do Sul.** Geosp- Espaço e Tempo, v. 22, n. 1, p. 191-209, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.11606/issn.2179-0892.geosp.2018.122043>. Acesso em: 16 set. 2022.

SHELDON, R. A.; VAN PELT, S. **Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how.** Chem. Soc. Rev., v. 42, n. 15, p. 6223-6235, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/c3cs60075k>. Acesso em: 23 out. 2022.

THAKUR, V.; SHARMA, E.; GULERIA, A.; SANGAR, S.; SINGH, K. **Modification and management of lignocellulosic waste as an ecofriendly biosorbent for the application of heavy metal ions sorption.** Materials Today: Proceedings, v. 32, p. 608–619, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.02.756>. Acesso em: 20 set. 2022.

TONG, X.; SZACILO, A.; CHEN, H.; TAN, L.; KONG, L. **Using rich media to promote knowledge on nutrition and health benefits of pecan among young consumers.** Journal of Agriculture and Food Research, v. 10, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jafr.2022.100387>. Acesso em: 19 set. 2022.

WANG, F.; GUO, C.; LIU, H-Z.; LIU, C-Z. **Immobilization of *Pycnoporus sanguineus* laccase by metal affinity adsorption on magnetic chelator particles.** Journal of Chemical Technology and Biotechnology, v. 83, n. 1, p. 97-104, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jctb.1793>. Acesso em: 23 out. 2022.

WOJDYŁO, A.; TURKIEWICZ, I. P.; TKACZ, K.; NOWICKA, P.; BOBAL, L. **Nuts as functional foods: nutritional and phytochemical profiles and their *in vitro* bioactive properties.** Food Chemistry: X, v. 15, n. 30, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2022.100418>. Acesso em: 20 set. 2022.