

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta Tese será disponibilizada somente a partir de 24/04/2021.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS,
ARARAQUARA

PALOMA ANDRADE MARTINS NASCIMENTO

**Sistemas de Duas Fases Aquosas: uma ferramenta biocompatível
para extração de lipase de interesse biotecnológico**

Araraquara – SP

2019



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS,
ARARAQUARA

PALOMA ANDRADE MARTINS NASCIMENTO

**SISTEMAS DE DUAS FASES AQUOSAS: UMA FERRAMENTA
BIOCOMPATÍVEL PARA EXTRAÇÃO DE LIPASE DE INTERESSE
BIOTECNOLÓGICO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para a obtenção do título de Doutora em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia.

Orientadora Prof^ª. Dr^ª. Valéria de Carvalho Santos Ebinuma
Coorientador Prof. Dr. Jorge Fernando Brandão Pereira

Araraquara – SP
2019

N244s Nascimento, Paloma Andrade Martins.
Sistemas de duas fases aquosas: uma ferramenta biocompatível para extração de lipase de interesse biotecnológico / Paloma Andrade Martins Nascimento. – Araraquara, 2019.
169 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista.
Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós-graduação Em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia. Área Biotecnologia Diagnóstica, Bioprodutos e Biofármacos.

Orientadora: Valéria de Carvalho Santos Ebinuma.
Coorientador: Jorge Fernando Brandão Pereira.

1. Lipase. 2. Líquidos Iônicos. 3. Estabilidade. 4. Sistema de Duas Fases Aquosas. 5. Extração. I. Ebinuma, Valéria de Carvalho Santos, orient. II. Pereira, Jorge Fernando Brandão, coorient. III. Título.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araraquara



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: Sistemas de Duas Fases Aquosas: uma ferramenta biocompatível para extração de lipase de interesse biotecnológico

AUTORA: PALOMA ANDRADE MARTINS NASCIMENTO

ORIENTADORA: VALÉRIA DE CARVALHO SANTOS EBINUMA

COORIENTADOR: JORGE FERNANDO BRANDÃO PEREIRA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA APLICADAS À FARMÁCIA, área: Análises Clínicas pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. JORGE FERNANDO BRANDÃO PEREIRA
Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara

Prof. Dr. LUIS HENRIQUE SOUZA GUIMARÃES
Departamento de Biologia / Faculdade de Filosofia Ciências e Letras - USP - Ribeirão Preto

Prof. Dr. ELIAS DE SOUZA MONTEIRO FILHO
Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Profa. Dra. ARIELA VELOSO DE PAULA
Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia / FCFAR - UNESP - Araraquara

Prof. Dr. ALVARO DE BAPTISTA NETO
Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara

Araraquara, 24 de abril de 2019

Dedico a Cristo, autor e consumidor da vida, único que me ama incondicionalmente, não olha os meus defeitos e nem me acusa, aquele que por mim morreu e morreria outra vez, se necessário fosse. Porque d'Ele e por Ele, e para Ele são todas as coisas. À Ele toda honra, glória e louvor.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Jesus, o meu Deus, por cumprir com sua promessa de estar comigo todos os dias até a consumação dos séculos, por sua fidelidade e amor que me susteve até aqui. Obrigada Pai!!

Agradeço ao meu esposo Matias por encarar esse desafio comigo, por me apoiar e cuidar dos nossos filhos e da nossa casa. Obrigada por suportar meu mau humor e meus momentos de fúria.

Daniel, meu menino e companheiro. Obrigada por ser forte e ousado. Te amo!

Lídia, minha pequena... você é linda! Te amo!! Obrigada por ser minha filha, por ter esperado a mamãe pelos longos seis meses e por muitos outros dias em que estive ausente.

Agradeço ao meu Pastor Araujo, pelas orações, pelo apoio e pela presença. Obrigada!!

Professora Valéria, minha orientadora, sou imensamente grata pela oportunidade. O aluno só é capaz de voar se houver mestres dispostos a se doar... doar tempo, dedicação, ensinamento, paciência... Muito Obrigada!!

Professor Jorge, meu coorientador, que me auxiliou muitíssimo, estando sempre disponível. Não fazia diferenças entre orientadas e coorientadas. Obrigadíssimo!!

Professora Ariela, que me proporcionou a oportunidade do estágio docente, além de todo auxílio na área enzimática. Obrigada!!

Professor João Coutinho, Sônia Ventura e todo o grupo Path, que abriram as portas de seu laboratório e receberam uma aluna estrangeira, me integrando ao grupo em todos os aspectos. Obrigada por toda atenção e instrução. Obrigadíssimo!!

Agradeço a todos os técnicos do laboratório do Departamento de Bioprocessos, Ana, Adriana, Flávio e Mateus. Sempre solícitos e atenciosos. Por mais pessoas assim. Muito Obrigada!!

Agradeço a todos os funcionários da Pós-Graduação, Caludinha, Dani, Aniele. Muito Obrigada!!

Agradeço a todos os funcionários da Biblioteca FCFAR, Ana, Livia, Moacir, Max e Irani, pela atenção, zelo e todos os serviços prestados. Muito Obrigada!!

Agradeço a todos que direta ou indiretamente me auxiliaram, meu Muito Obrigada!

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo importante auxílio financeiro que contribuiu para a realização do doutorado sanduíche pelo programa PDSE nº. 88881.133279/2016-01.

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro para que o trabalho fosse executado (Processo nº. 140331-2016-6).

*“Ninguém é tão sábio que não tenha algo pra aprender e
nem tão tolo que não tenha algo pra ensinar”.*

Blaise Pascal

RESUMO

As lipases são biocatalisadores que têm como função natural a hidrólise de triglicerídeos na interface lipídeo-água, e apresentam também a capacidade de síntese de ésteres. Quando estas enzimas são produzidas de microrganismos, dependendo da sua aplicação final, existe a necessidade de extrair e purificar a enzima do meio fermentado. Desta maneira, o objetivo deste trabalho foi estudar a estabilidade da lipase comercial de *Aspergillus niger* frente aos agentes formadores de Sistemas de Duas Fases Aquosas (SDFA) e a capacidade de diferentes SDFA como plataforma de extração da lipase comercial de *Aspergillus niger* e posterior da lipase de *Aspergillus* sp. produzida em meio fermentado. Primeiramente foi realizado o estudo de atividade e estabilidade da enzima comercial frente aos agentes formadores dos SDFA, empregando tensoativo, polímeros, Líquidos Iônicos (LIs) e carboidratos. Os resultados mostraram que a lipase comercial é estável em solução aquosa de Triton X- 114, PEG 600 e PPG 400, enquanto, que com PPG 425 a atividade foi mantida em tampão McIlvaine pH 5,5. Os polímeros PPG 725 e NaPA 8.000 inibiram a atividade enzimática tanto em solução aquosa quanto em tampão pH 5,5. Na presença dos LIs, o aumento da cadeia alquílica catiônica, para os cloretos de imidazólios ($[C_n\text{mim}]\text{Cl}$), e aniônica, para a família das colinas ($[\text{Ch}]\text{X}$), acarretaram em perda de atividade comprometendo o comportamento catalítico da enzima. Na presença dos carboidratos a lipase manteve sua estabilidade. Na última etapa do trabalho, foi avaliada a capacidade de extração das lipases utilizando os Sistemas Micelares de Duas Fases Aquosas com LIs como adjuvantes (SMDFA-LIs) e Sistemas Poliméricos de Duas Fases Aquosas (SPDFA) com carboidrato. Os SMDFA-LIs apresentaram pequena influência no particionamento das lipases, *i.e.*, a adição de LIs como adjuvantes não aumentou significativamente os coeficientes de partição da enzima. Para a lipase de *Aspergillus* sp., o melhor resultado foi com 11% (m/m) de Triton + 0,05 M $[\text{Ch}][\text{Prop}]$, o qual apresentou uma eficiência de extração (*EE*) de 64% e fator de purificação de 8,33. Os SPDFA com carboidrato foram mais promissores, apresentando uma *EE* de 100%. Embora os estudos de estabilidade tenham sido realizados com a lipase comercial, o trabalho permitiu elucidar as interações entre a lipase e os diferentes agentes formadores do SDFA. Os SDFA empregados neste trabalho propõem diferentes aplicações, uma vez que os SMDFA-LIs são propícios para purificação de lipases, enquanto os SPDFA com carboidrato se mostram efetivos para extração em uma única etapa do processo *downstream* (*i.e.* menos tempo e energia), o que os tornam viáveis economicamente, além de serem ambientalmente mais benignos e biocompatíveis com lipases.

Palavras- chave: Lipase; Líquidos Iônicos; Estabilidade; Sistema de Duas Fases Aquosas; Extração.

ABSTRACT

Lipases are natural biocatalysts for the hydrolysis of triglycerides at the lipid-water interface and with the ability to synthesize esters. When these enzymes are produced by microorganisms, depending on its final application, it is needed to extract and purify them. Therefore, the aim of this work was to study the stability of the *Aspergillus niger* commercial lipase in the presence of different aqueous two-phase systems (ATPS) forming agents, and to evaluate the ability of different ATPS as extractive platforms of the *Aspergillus niger* commercial lipase and after *Aspergillus* sp. lipase produced in fermented medium. Initially, the activity and stability of the commercial lipase in the presence of ATPS forming agents were studied, namely: surfactant, polypropylene glycol, ionic liquids (ILs) and carbohydrates. The results showed that commercial lipase is stable in the presence of Triton X-114, PEG 600 and PPG 400 aqueous solutions, whereas with PPG 425 aqueous solutions the enzyme maintained its activity at McIlvaine buffer pH 5.5. Both PPG 725 and NaPA 8,000 aqueous solutions (water and buffered at pH 5.5) inhibited the catalytic activity. In the presence of ILs, the increase of the cationic alkyl chain, using of the imidazolium-based chlorides family ($[C_n\text{mim}]\text{Cl}$), and anionic, for the cholinium family ($[\text{Ch}]\text{X}$), resulted in a loss of enzymatic activity, compromising the catalytic behavior of the lipase. On the other hand, lipase remained stable in the presence of all carbohydrates aqueous solutions. In the last part, the lipases' extraction capability of Aqueous Two-Phase Micellar Systems using ILs as adjuvants (ATPMS-ILs) and Aqueous Two-Phase Polymeric Systems (ATPPS) with carbohydrates was evaluated. ATPMS-ILs did not influence the partitioning of lipases, *i.e.* the addition of ILs as adjuvants did not increase the partition coefficients of the enzyme. For the *Aspergillus* sp., the best result was obtained with the system composed of 11% (w/w) of Triton and 0.05 M of $[\text{Ch}][\text{Prop}]$, which showed an extraction efficiency (*EE* %) of 64% and a purification factor of 8.33. The ATPPS with carbohydrates were more promising, showing in general *EE* of 100%. Although stability studies have been performed with commercial lipase, the work has elucidated the interactions between lipase and different ATPS forming agents. The ATPS used in this work propose different applications, since the ATPMS-ILs are suitable for lipase purification, whereas the ATPPS with carbohydrates are effective for extraction in a single step of the downstream process (*i.e.* less time and energy), make them economically viable, as well as being environmentally benign and biocompatible with lipases.

Keywords: Lipase; Ionic liquids; Stability; Aqueous Two-Phase System; Extraction.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES, FIGURAS

Figura 1. Modelo estrutural da lipase em sua conformação inativa (conformação fechada) e sua conformação ativa (conformação aberta) ⁵³	9
Figura 2. Mecanismo de hidrólise de ésteres catalisada pela lipase ⁵⁷	10
Figura 3. Reações de catálise da lipase ⁶	11
Figura 4. Representação esquemática de um diagrama de curva binodal.....	16
Figura 5. Representação esquemática da separação de fases de uma solução micelar.....	18
Figura 6. Representação do processo de síntese de LIs, precisamente [Ch][Prop].....	32
Figura 7. Representação do processo de síntese do [Ch][Tetrad].....	33
Figura 8. Imagem do gel de eletroforese SDS-PAGE realizada com a lipase comercial de <i>A. niger</i>	44
Figura 9. Estudo do pH ótimo da lipase comercial de <i>A. niger</i> a 25°C [A], estudo da temperatura ótima no pH 5,5 [B].....	46
Figura 10. Estabilidade da lipase comercial de <i>A. niger</i> durante 24 h frente a diferentes valores de pH: [2,5 (Δ), 3,5 (●), 4,5 (■), 5,5 (▲), 6,5 (x), pH 7,5 (□) e pH 8,5 (○)] a 25°C.....	47
Figura 11. Estabilidade da lipase comercial de <i>A. niger</i> durante 24 h em diferentes temperaturas [20°C (○), 30°C (Δ), 40°C (●) e 50°C (▲)] em pH 5,5.....	48
Figura 12. Estabilidade da lipase comercial de <i>A. niger</i> na presença de soluções aquosas do tensoativo Triton X-114 em diferentes concentrações (% m/v): {1 [■], 3 [▲], 5 [●], 7 [◆], 9 [-], 11 [□], 13 [Δ], 15 [○] e 20 [◇]} a 35°C durante 24 h.....	49
Figura 13. Estabilidade da lipase comercial de <i>A. niger</i> na presença de soluções aquosas de PEG 600 nas concentrações (% m/v) de 20 [●], 30 [■], 40 [◇] e 50 [○] a 25°C durante 24 h.....	51
Figura 14. Estabilidade da lipase comercial de <i>A. niger</i> na presença das soluções aquosas de PPG 725 nas concentrações (% m/v) de 20 [●], 30 [■], 40 [○] e 50 [□], a 25°C durante 24 h.....	53
Figura 15. Atividade da lipase comercial de <i>A. niger</i> após 15 min de incubação, em diferentes concentrações de PPG 725 a 25°C.....	53
Figura 16. Estabilidade da lipase comercial de <i>A. niger</i> em tampão McIlvaine pH 5,5, na presença das soluções aquosas de PPG 425 nas concentrações (% m/v) de 20 [●], 30 [■], 40 [○] e 50 [□], a 25°C durante 24 h.....	55
Figura 17. Atividade da lipase comercial de <i>A. niger</i> na presença de soluções aquosas dos polímeros de PPG 425 g.mol ⁻¹ e PPG 725 g.mol ⁻¹ em tampão McIlvaine pH 5,5 a 25°C após 15 min de incubação.....	56

- Figura 18.** Estabilidade da lipase comercial de *A. niger* na presença de soluções aquosas de NaPA 8.000 (pH 8 \approx 9) nas concentrações (% m/m) de 5 [■], 10 [◆] e 15 [●] e, de soluções de NaPA 8.000 em tampão McIlvaine pH 5,5 nas concentrações (% m/v) de {5 [□], 10 [◇] e 15 [○]}.57
- Figura 19.** Viscosidade (mPa.s) a 25°C da solução aquosa do polímero PEG 600 e, dos polímeros PPG 425 e PPG 725 em tampão McIlvaine a pH 5,5 nas seguintes concentrações (m/v): 20; 30; 40; 50% [A]. Viscosidade (mPa.s) a 25°C do polímero NaPA 8.000 em tampão McIlvaine a pH 5,5 nas seguintes concentrações (m/v): 5; 10; 15% [B]..... 58
- Figura 20.** Estabilidade da lipase comercial de *A. niger* em soluções aquosas de PPG 400 nas concentrações (% m/v) de 30 [●], 40 [○], 50 [■] e 60 [□], a 25°C durante 24 h..... 60
- Figura 21.** Estabilidade da lipase comercial de *A. niger* durante 3 h a 25°C na presença das soluções aquosas de: D-Xilose, D-Sacarose, D-Manose e D-Frutose, nas seguintes concentrações (m/v): 20% [A] e 50% [B].. 61
- Figura 22.** Estabilidade da lipase comercial de *A. niger* durante 24 h a 35°C na presença de diferentes concentrações de soluções aquosas de [C_nmim]Cl (% v/v) de 0,1 (A), 0,3 (B) e 0,5 (C)..... 64
- Figura 23.** Atividade da lipase comercial de *A. niger* na presença de soluções aquosas de [C₄mim]Cl, [C₆mim]Cl, [C₈mim]Cl, [C₁₀mim]Cl e [C₁₂mim]Cl, nas seguintes concentrações (% v/v): 0,025, 0,05, 0,1, 0,15, 0,3 e 0,5 após 15 min de incubação a 35°C..... 66
- Figura 24.** Condutividade (mS/cm) das soluções aquosas de [C₄mim]Cl, [C₆mim]Cl, [C₈mim]Cl, [C₁₀mim]Cl e [C₁₂mim]Cl nas seguintes concentrações (% v/v): 0,1; 0,3; 0,5.68
- Figura 25.** Espectros de emissão de fluorescência da lipase comercial de *A. niger* em solução aquosa de [C₄mim]Cl; [C₆mim]Cl; [C₈mim]Cl; [C₁₀mim]Cl e [C₁₂mim]Cl nas seguintes concentrações (% v/v) de 0,1 (A), 0,3 (B) e 0,5 (C) após 9 h de incubação a 35°C. 72
- Figura 26.** Espectros de emissão de fluorescência da lipase comercial de *A. niger* em solução aquosa de [C₈mim]Cl; [C₁₀mim]Cl e [C₁₂mim]Cl nas seguintes concentrações (% v/v) de 0,025 (A), 0,05 (B) e 0,15 (C) após 15 min de incubação a 35°C. 75
- Figura 27.** Espectros de dicroísmo circular da lipase comercial de *A. niger* em solução aquosa de [C₄mim]Cl; [C₆mim]Cl; [C₈mim]Cl; [C₁₀mim]Cl e [C₁₂mim]Cl nas concentrações (% v/v) de 0,1 (A) e 0,3 (B) após 15 min de incubação a 35°C. 77
- Figura 28.** Estabilidade da lipase comercial de *A. niger* em solução aquosa de [Ch]Cl nas seguintes concentrações (M): {0,05 [◇], 0,10 [□], 0,50 [Δ] e 1,00 [○]}. 79
- Figura 29.** Estabilidade da lipase comercial de *A. niger* na presença das soluções aquosas dos LIs: [A] [Ch][Ac], [B] [Ch][Prop], [C] [Ch][But], [D] [Ch][Pent] e [E] [Ch][Hex]. As soluções aquosas foram preparadas nas seguintes concentrações (M), {0,05 [◇], 0,10 [□], 0,50 [Δ] e 1,00 [○]} 80

- Figura 30.** Influência da concentração de [Ch]X na atividade da lipase comercial de *A. niger* na presença das soluções aquosas de: {[Ch]Cl, [Ch][Ac], [Ch][Prop], [Ch][But], [Ch][Pent] e [Ch][Hex]} nas seguintes concentrações (M), [0,05, 0,10, 0,50 e 1,00] após 9 h de incubação a 35°C..... 83
- Figura 31.** Potencial zeta da lipase comercial de *A. niger* em diferentes valores de pH (tampão McIlvaine pH 1,0-8,0 e tampão Sörensen pH 9,0). 85
- Figura 32.** Estudo de atividade da lipase comercial de *A. niger* na presença de diferentes LIs {[C₁₄Im-6-ImC₁₄]Br₂, [N_{1,1,1,16}]Br, [N_{1,1,1,14}]Br, [C₁₆py]Cl, [C₁₆mim]Cl, [C₁₄mim]Cl e [Ch][Tetrad]}, considerando as concentrações nX (números de vezes) acima da CMC. 90
- Figura 33.** Curvas binodais para SMDFA compostos por Triton X-114 e os LIs, [Ch]Cl, [Ch][Ac], [Ch][Prop] e [Ch][But], em diferentes concentrações (M): 0,05; 0,1; 0,5..... 93
- Figura 34.** Coeficiente de partição (K_E) da lipase comercial de *A. niger* nos SMDFA compostos por Triton X-114 [3 a 13 % (m/m)] e **A)** [Ch]Cl; **B)** [Ch][Ac]; **C)** [Ch][Prop]; **D)** [Ch][But], nas seguintes concentrações (M): 0,00; 0,05; 0,10; 0,50 98
- Figura 35.** Coeficiente de partição dos SMDFA-LIs composto por concentrações de 5 a 11 % (m/m) de Triton X- 114 e 0,1% (m/m) de [C₈mim]Cl..... 105
- Figura 36.** Eficiência de extração ($EE\%$) dos SPDFA baseados em PPG 400 (40% m/m) com carboidrato (20% m/m)..... 106
- Figura 37.** (A) Cromatograma da lipase microbiana de *A. niger* e das fases do SPDA + carboidrato. (B) Cromatogramas das proteínas (10 mg.mL⁻¹): Lipase, BSA, GFP e L-Asparaginase..... 108
- Figura 38.** Os gráficos apresentam a intersecção das retas de modo a determinar a CMC do LI [C₁₆mim]Cl 140
- Figura 39.** Os gráficos apresentam a intersecção das retas de modo a determinar a CMC do LI [Ch][Tetrad]..... 140
- Figura 40.** Espectro de RMN da amostra sintetizada de [Ch][Ac]..... 141
- Figura 41.** Espectro de RMN da amostra sintetizada de [Ch][Prop]..... 141
- Figura 42.** Espectro de RMN da amostra sintetizada de [Ch][But]..... 142
- Figura 43.** Espectro de RMN da amostra sintetizada de [Ch][Pent]. 142
- Figura 44.** Espectro de RMN da amostra sintetizada de [Ch][Dec]..... 143
- Figura 45.** Espectro de RMN da amostra sintetizada de [Ch][Tetrad]. 143
- Figura 46.** Varredura espectral referente ao *p*-Nitrofenol, realizada em leitor de placas espectrofotômetro modelo Multimode Plate Reader (Perkim Elmer, EUA.)..... 144

Figura 47. Varredura espectral na faixa entre 300 a 460 nm do <i>p</i> -Nitrofenol.....	144
Figura 48. Curva analítica do <i>p</i> - Nitrofenol.	145
Figura 49. Curva analítica da proteína padrão BSA.....	145

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Descrição da classificação internacional de enzimas ^{35,36}	5
Tabela 2. Seletividade e regiosseletividade de diferentes fontes de lipases ⁴²	7
Tabela 3. Diferentes aplicações e tipos de reações catalisadas pela lipase de <i>Aspergillus niger</i>	12
Tabela 4. Combinação dos métodos empregados para purificação de distintas lipases microbianas.....	14
Tabela 5. Família, nome, abreviatura, estrutura química e pureza dos LIs estudados.	25
Tabela 6. Nome, abreviatura, estrutura química e pureza de tensoativos e polímeros estudados.	28
Tabela 7 . Nome, abreviatura, estrutura química e pureza dos carboidratos estudados.	29
Tabela 8. Composição dos géis de separação e empilhamento utilizados para a eletroforese SDS-PAGE.....	34
Tabela 9. Parâmetros utilizados na atividade e estabilidade da lipase de <i>A. niger</i> frente aos diferentes agentes formadores de SDFa.	37
Tabela 10. Concentrações das soluções aquosas de LIs em mM.	63
Tabela 11. Valores de pH das soluções aquosas de [C _n mim]Cl.....	71
Tabela 12. Concentrações dos LIs utilizados no estudo de atividade da lipase comercial de <i>A. niger</i> realizados de acordo com a concentração micelar crítica*.	88
Tabela 13. Valores de pH das soluções aquosas dos LIs preparados em tampão McIlvaine pH 5,5 para o estudo de superatividade da lipase comercial de <i>A. niger</i>	92
Tabela 14. Temperatura de partição adotada para a formação dos SMDFA-LIs formados com Triton X-114/ [Ch]X/ H ₂ O.	96
Tabela 15. Valores obtidos para a Razão Volumétrica (R _v) das fases dos SMDFA-LIs baseados em Triton X-114/ [Ch]X/ H ₂ O.	97
Tabela 16. Eficiência de Extração (<i>EE</i> %) da lipase comercial <i>A. niger</i> utilizando SMDFA baseados em Triton X-114/ [Ch]X/ H ₂ O.	100
Tabela 17. Rendimento final (η) da lipase comercial <i>A. niger</i> utilizando SMDFA baseados em Triton X-114/ [Ch]X/ H ₂ O.	101
Tabela 18. Resultados experimentais da lipase de <i>Aspergillus</i> sp. produzida em meio fermentado usando SMDFA baseado em Triton X-114/[Ch]X/H ₂ O.	102

Tabela 19. Valores obtidos para a eficiência de extração ($EE\%$), razão volumétrica (R_V) dos SMDFA-LIs formados com Triton X-114/ 0,1% (m/m) de $[C_8mim]Cl$ / tampão McIlvaine pH 6,5 e as respectivas temperaturas de partição.	105
Tabela 20. Atividade absoluta da lipase comercial de <i>A. niger</i> em diferentes condições de pH e temperatura.	132
Tabela 21. Atividade absoluta da lipase comercial de <i>A. niger</i> na presença das soluções aquosas do tensoativo Triton X-114 ao longo do tempo.	133
Tabela 22. Atividade absoluta da lipase comercial de <i>A. niger</i> na presença das soluções aquosas dos polímeros PEG 600 e PPG 725 e do polímero PPG 425 em tampão McIlvaine pH 5,5 ao longo do tempo.	134
Tabela 23. Atividade absoluta da lipase comercial de <i>A. niger</i> na presença do polímero NaPA 8.000 em tampão McIlvaine pH 5,5 e solução aquosa ao longo do tempo.	135
Tabela 24. Atividade absoluta da lipase comercial de <i>A. niger</i> na presença das soluções aquosas do polímero PPG 400 ao longo do tempo.	135
Tabela 25. Atividade absoluta da lipase comercial de <i>A. niger</i> na presença das soluções aquosas dos carboidratos ao longo do tempo.	136
Tabela 26. Atividade absoluta da lipase comercial de <i>A. niger</i> na presença das soluções aquosas de $[C_nmim]Cl$ ao longo do tempo.	137
Tabela 27. Atividade absoluta da lipase comercial de <i>A. niger</i> na presença das soluções aquosas das $[Ch]X$ ao longo do tempo.	138
Tabela 28. Valores de pH das soluções aquosas de $[Ch]X$	139

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abreviatura/ Sigla	Nome em inglês	Descrição/ Tradução
Asp	-	Astartato
AGCL	-	Ácidos graxos de cadeia longa
AGCM	-	Ácidos graxos de cadeia média
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>	Albumina sérica bovina
CLAE	-	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CMC	<i>Critical micellar concentration</i>	Concentração micelar crítica
[C _n mim]Cl	<i>1-alkyl-n-methylimidazolium chloride- based ILs</i>	Líquidos iônicos da família dos cloretos de imidazólio
[C ₄ mim]Cl	<i>1-Butyl-3-methylimidazolium chloride</i>	Cloreto- 1- Butil- 3- Metilimidazólio
[C ₆ mim]Cl	<i>1-Hexyl-3-methylimidazolium chloride</i>	Cloreto- 1- Hexil- 3- Metilimidazólio
[C ₈ mim]Cl	<i>1-Octyl-3-methylimidazolium chloride</i>	Cloreto- 1- Octil- 3- Metilimidazólio
[C ₁₀ mim]Cl	<i>1-Decyl-3-methylimidazolium chloride</i>	Cloreto- 1- Decil- 3- Metilimidazólio
[C ₁₂ mim]Cl	<i>1-Dodecyl-3-methylimidazolium chloride</i>	Cloreto- 1- Dodecil- 3- Metilimidazólio
[C ₁₄ mim- 6mim- C ₁₄ mim]Br ₂	<i>3-(1-tetradecyl-3-hexylimidazolium)-1-tetradecylimidazolium dibromide</i>	Dibrometo de 3-(1-tetradecil-3-hexylimidazólio)-1-tetradecilimidazólio
[C ₁₆ py]Cl	<i>Hexadecylpyridinium chloride</i>	Cloreto- 1-hexadecilpiridínio
[Ch]X	<i>Cholinium based-ionic liquids</i>	Líquidos iônicos da família das colinas
[Ch][Ac]	<i>Cholinium acetate</i>	Acetato de colina
[Ch][But]	<i>Cholinium butanoate</i>	Butanoato de colina
[Ch]Cl	<i>Cholinium chloride</i>	Cloreto de colina

[Ch][Dec]	<i>Cholinium decanoate</i>	Decanoato de colina
[Ch][Hex]	<i>Cholinium hexanoate</i>	Hexanoato de colina
[Ch][Pent]	<i>Cholinium pentanoate</i>	Pentanoato de colina
[Ch][Prop]	<i>Cholinium propanoate</i>	Propanoato de colina
[Ch][Tetrad]	<i>Cholinium tetradecanoate</i>	Tetradecanoato de colina
DEX	-	Dextrana
DLS	<i>Dynamic Light Scattering</i>	Dispersão de luz dinâmica
EC	<i>Enzyme Commission</i>	Comissão para enzimas
EE (%)	-	Eficiência de extração
ELL	-	Extração líquido-líquido
Eq.	-	Equação
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>	-
g	-	gramas
g	-	Força G
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>	Proteína verde fluorescente
GRAS	<i>Generally Recognized as Safe</i>	-
Glut	-	Glutamato
h	-	Horas
HSA	<i>Human Serum Albumin</i>	Albumina sérica humana
His	-	Histidina
K_E	-	Coeficiente de partição da enzima
K_M	-	Constante de Michaelis Menten
kDa	-	kilodaltons
LI	-	Líquido iônico
MM	-	Massa molar ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$)
m/v	-	massa/ volume
mA	-	mili amper
μL	-	microlitro
mL	-	mililitro
mg	-	miligrama
$\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$	-	miligrama/ mililitro
$\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	-	miliMol/ litro
MLM	-	Média-longa-média

NaPA	-	Poliacrilato de sódio
nm	-	nanômetro
[N _{1,1,1,14}]Br	<i>Tetradecyltrimethylammonium bromide</i>	Brometo- Tetradecil-trimetil-amônio
[N _{1,1,1,16}]Br	<i>Cetyltrimethylammonium bromide</i>	Brometo- Cetil-trimetil-amônio
PEG	-	Poli(etil)enoglicol
<i>p-NPB</i>	<i>p- Nitrophenyl butyrate – C₄</i>	<i>p-</i> Nitrofenil butirato
<i>p-NPD</i>	<i>p- Nitrophenyl decanoate - C₁₀</i>	<i>p-</i> Nitrofenil decanoato
<i>p-NPD</i>	<i>p- Nitrophenyl dodecanoate - C₁₂</i>	<i>p-</i> Nitrofenil dodecanoato
<i>p-NPO</i>	<i>p- Nitrophenyl octanoate - C₈</i>	<i>p-</i> Nitrofenil octanoato
<i>pNPP</i>	<i>p -Nitrophenyl palmitate – C₁₆</i>	<i>p-</i> Nitrofenil palmitato
PPG	-	Polipropilenoglicol
RMN	-	Ressonância magnética nuclear
SDFA	-	Sistemas de Duas Fases Aquosas
SDFA-LIs	-	Sistemas de Duas Fases Aquosas baseados em Líquidos Iônicos
SDS	-	Dodecilsulfato de sódio
Ser	-	Serina
t	-	Tempo
Triton X-114	-	(1,1,3,3,- tetrametil-butil) polietileno glicol fenil
TAG	-	Triacilglicerol
TCM	-	Triglicerídeos de cadeia média
T _{CP}	<i>Cloud Point</i>	Temperatura de <i>Cloud Point</i> (ponto de névoa)
U	-	Unidade
V	-	Volts
v/v	-	volume/volume
V _{max}	-	Velocidade máxima da reação

SUMÁRIO

RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	viii
LISTA DE ILUSTRAÇÕES, FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABELAS.....	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	xv
CAPÍTULO I.....	1
1. INTRODUÇÃO.....	2
2. <i>Revisão da Literatura.....</i>	4
2.1 <i>Enzimas.....</i>	4
2.1.2 <i>Lipases.....</i>	6
2.2 <i>Métodos para purificação de lipases microbianas.....</i>	13
2.2.1 <i>Métodos tradicionais.....</i>	13
2.2.2 <i>Sistemas de Duas Fases Aquosas.....</i>	15
2.2.2.1 <i>Sistemas Micelares de Duas Fases Aquosas.....</i>	17
2.2.2.2 <i>Sistemas Poliméricos de Duas Fases Aquosas.....</i>	18
2.2.2.3 <i>Sistemas de Duas Fases Aquosas baseados em Líquidos Iônicos.....</i>	19
2.2.2.4 <i>Sistemas de Duas Fases Aquosas formados com carboidratos.....</i>	21
2.3 <i>Justificativa.....</i>	21
3. OBJETIVOS.....	22
3.1 <i>Objetivo geral.....</i>	22
3.2 <i>Objetivos específicos.....</i>	22
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	23
4.1 <i>Material.....</i>	23
4.2 <i>Fluxograma.....</i>	30
4.3 <i>Métodos analíticos.....</i>	31
4.3.1 <i>Dosagem de Atividade Hidrolítica.....</i>	31
4.3.2 <i>Síntese de Líquidos Iônicos.....</i>	31
4.4 Fase 1: Caracterização da lipase comercial de <i>A. niger</i>.....	33
4.4.1 <i>Determinação da massa molecular da lipase comercial de <i>A. niger</i> pelo método de Eletroforese SDS-PAGE.....</i>	33
4.4.2 <i>Determinação do Potencial Zeta da lipase (Carga).....</i>	35
4.4.3 <i>Influência do pH e da temperatura.....</i>	35
4.5 Fase 2: Avaliação da atividade e estabilidade da lipase comercial de <i>A. niger</i>.....	36

4.5.1 <i>Influência dos distintos agentes formadores de S DFA na atividade e estabilidade da lipase comercial de A. niger</i>	36
4.5.2.1 <i>Determinação da viscosidade dos polímeros</i>	38
4.5.2.2 <i>Determinação dos espectros de fluorescência</i>	38
4.5.2.3 <i>Determinação dos espectros de Dicroísmo Circular (DC)</i>	38
4.6 Fase 3: Separação e Extração da Lipase	39
4.6.1 <i>Construção de Curvas Binodais dos SMDFA-LIs baseados em Colinas</i>	39
4.6.2 <i>Extração da lipase comercial de A. niger em S DFA na presença de LIs como adjuvantes</i>	39
4.6.3 <i>Extração da lipase comercial de A. niger em SPFA</i>	40
4.6.4 <i>Determinação dos parâmetros de extração</i>	40
4.6.5 <i>Determinação da concentração de Proteínas totais</i>	42
4.6.6 <i>Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)</i>	42
4.7 <i>Determinação da Concentração Micelar Crítica e o estudo de atividade da lipase comercial de A. niger para diferentes LIs</i>	42
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
5.1 Fase 1: Caracterização da lipase comercial de A. niger	44
5.1.1 <i>Determinação da massa molecular da lipase comercial A. niger pelo método de Eletroforese SDS-PAGE</i>	44
5.1.2 <i>Avaliação da Influência do pH e da temperatura</i>	45
5.2 Fase 2: Avaliação da atividade e estabilidade da lipase comercial de A. niger	49
<i>Influência dos distintos agentes formadores de S DFA na atividade e estabilidade da lipase comercial de A. niger</i>	49
5.2.1 <i>Efeito do Triton X-114</i>	49
5.2.2 <i>Efeito de diferentes Polímeros</i>	51
5.2.3 <i>Efeito de diferentes Carboidratos</i>	60
5.2.4 <i>Efeito de diferentes Líquidos Iônicos na atividade da lipase comercial de A. niger</i>	62
A. <i>Efeito dos LIs baseados em Imidazólios ([Cnmim]Cl)</i>	62
B. <i>Efeito dos LIs baseados nas Colinas ([Ch]X)</i>	78
C. <i>Estudo de atividade da lipase comercial de A. niger em diferentes LIs</i>	86
5.3 Fase 3: Extração de lipases empregando S DFA	93
5.3.1 <i>Extração da lipase comercial de A. niger e Aspergillus sp. produzida em meio fermentado empregando SMDFA</i>	93
A. <i>SMDFA - Triton X-114 com [Ch]X como adjuvantes</i>	93

<i>B. SMDFA - Triton X-114 com [C_nmim]Cl como adjuvantes.....</i>	104
5.3.2 <i>Extração da lipase comercial de A. niger em SPDFA com carboidratos.....</i>	106
6. CONCLUSÕES.....	109
SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	110
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	111
APÊNDICE I.....	132
<i>Tabelas com os valores de atividade absoluta da lipase comercial de A. niger....</i>	132
APÊNDICE II.....	140
<i>Gráficos representando a determinação da CMC</i>	140
APÊNDICE III.....	141
<i>Espectros de RMN das amostras de LIs sintetizadas.....</i>	141
APÊNDICE IV.....	144
<i>Varredura do substrato p-Nitrofenol.....</i>	144
<i>Curva analítica do substrato p-Nitrofenol.....</i>	145
<i>Curva analítica da proteína padrão BSA.....</i>	145
CAPÍTULO II.....	146
<i>Artigo publicado.....</i>	147
<i>Insights into the effect of imidazolium-based ionic liquids on chemical structure and hydrolytic activity of microbial lipase.....</i>	147
<i>Artigo aceito para publicação.....</i>	148
<i>Cholinium-based ionic liquids effects on Aspergillus niger lipase: stabilizers or inhibitors..</i>	148

CAPÍTULO 1

1. Introdução

Dentre os biocatalisadores enzimáticos disponíveis, as lipases são enzimas que não requerem cofatores, são regioespecíficas¹ e atuam em ampla faixa de pH². Estas enzimas catalisam a hidrólise total ou parcial de triglicerídeos, atuando sobre as ligações ésteres presentes na molécula, promovendo a liberação de ácidos graxos e glicerol³. As lipases também catalisam reações reversas de síntese de ésteres de ácidos graxos quando expostas em baixas concentrações de água^{4,5}.

Elas podem modificar a composição dos ácidos graxos, uma vez que a troca de radicais acil entre os compostos resulta em diferentes glicerídeos. Assim, o nome da reação muda de acordo com a substância utilizada. Quando a água é substituída por um álcool, um ácido ou uma amida, por exemplo, o nome das reações de esterificação são alcóolises, acidólises e aminólises, respectivamente⁶. Assim, estas enzimas podem ser aplicadas em diferentes segmentos industriais⁷ tais como farmacêutico^{8,9}, alimentício^{8,10}, indústria de detergente^{8,11}, produção de biodiesel^{12,13}, entre outros.

As lipases podem ser produzidas por vegetais, animais¹⁴ e microrganismos (bactérias e fungos)^{15,16,17}. No entanto, lipases microbianas quando comparadas às demais apresentam maior estabilidade, especificidade ao substrato e um custo de produção inferior^{17,18}. A obtenção por processos fermentativos é viável¹⁹, principalmente devido aos altos rendimentos de produção e ausência de flutuações sazonais, em comparação com as lipases de origem vegetal e animal⁸.

Considerando a importância comercial das lipases, e a produção destas enzimas por microrganismos é auspicioso²⁰, pois esses conseguem altas produções sobre condições controladas. Quando as lipases são oriundas de processo fermentativo, o meio fermentado apresenta uma série de compostos contaminantes para a enzima de interesse, tais como outras proteínas, lipídeos, ácidos nucleicos, dentre outros. Logo, é imprescindível o emprego de técnicas de extração/purificação para recuperar as lipases do meio fermentado antes de sua aplicação, já que muitos destes contaminantes podem atuar como inibidores enzimáticos^{21,22} ou ser contaminantes para o processo de aplicação da lipase.

Não existem protocolos definidos que garantam a purificação de lipases a partir de diferentes culturas celulares. Geralmente, esses processos consistem em múltiplas etapas afim de remover a biomassa e os compostos insolúveis para assim, poder concentrar e finalmente purificar a molécula de interesse^{5,20}. Desta maneira, o processo de extração líquido-líquido

Introdução

utilizando sistemas de duas fases aquosas (SDFA) vem sendo empregado como etapa de recuperação e purificação de baixa resolução de uma ampla variedade de biomoléculas²³⁻²⁷.

As principais vantagens dos SDFA são a sua biocompatibilidade, simplicidade e baixo custo^{28,29} quando comparado a outras técnicas de extração. Esses podem ser selecionados de acordo com as principais características da molécula a ser extraída de forma a alcançar altos rendimentos de extração e/ou purificação, uma vez que cada sistema pode ser projetado para ter uma maior interação com a biomolécula através de interações eletrostáticas e hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e/ou outras interações não covalentes²⁷.

Dentre os SDFA destacam-se os Sistemas Micelares formados por tensoativos; Sistemas Poliméricos formados por polímero-polímero, polímero-sal e polímero-carboidrato; e Sistemas baseados em Líquidos Iônicos (LIs) formados por tensoativo/Líquido Iônico e/ou polímero/Líquido Iônico.

Desta forma, a proposta do trabalho foi estudar a capacidade de diferentes SDFA na recuperação e purificação da lipase microbiana comercial de *Aspergillus niger*, a fim de empregar o melhor sistema para extração da lipase de *Aspergillus* sp. presente em meio fermentado.

6. CONCLUSÕES

Embora os SDFA seja um método de extração e purificação relativamente simples, compreender as interações que podem influenciar no comportamento catalítico de qualquer enzima se torna complexo se o estudo de atividade e estabilidade não forem previamente realizados, uma vez que a enzima pode ser inativada, manter ou mesmo apresentar um incremento em sua atividade catalítica frente aos diferentes compostos.

Os estudos de atividade e estabilidade frente aos diferentes compostos formadores dos SDFA empregados com a lipase microbiana comercial de *A. niger* elucidou as diferentes interações entre essa enzima e os compostos. De maneira geral a hidrofobicidade nos sistemas não favorece o comportamento catalítico da lipase e isso foi observado tanto para polímeros, como para os LIs de cadeia alquílica longa catiônica ou aniônica. Ademais, foi demonstrado através dos ensaios com os LIs baseados nos cloretos de imidazólios que essa propriedade pode acarretar o desenovelamento da estrutura secundária da lipase com perda de sua função.

O trabalho mostra que é possível a escolha do SDFA de acordo com a proposta de emprego da lipase, visando maior rendimento ou pureza. Os SMDFA empregando [Ch]X como adjuvantes permitiu a integração das técnicas de extração e purificação, a qual se destaca pelo fator de purificação obtido para a lipase microbiana de *Aspergillus* sp. produzida em meio fermentado. Enquanto os SPDFA com carboidratos foram promissores para a extração da lipase microbiana comercial de *A. niger* com uma *EE* de 100% em uma única etapa do processo *downstream*.

Considerando que as lipases são utilizadas em diferentes segmentos industriais que não requerem enzimas com alto grau de pureza, como indústria de detergentes, síntese de biodiesel, degradação biológica de efluentes industriais, os SPDFA com carboidratos se mostram promissores do ponto de vista econômico industrial, uma vez que minimiza o tempo investido nas diferentes etapas de extração e concentração dessas enzimas e, adicionalmente não apresentam perdas durante o processo, pois a extração ocorre em uma única etapa.

Os SDFA são um método de baixa resolução, e esses podem ser empregues na extração e purificação de lipases com êxito, sendo um método ambientalmente mais benigno, seguro e relativamente econômico.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Explorar métodos espectrofotométricos usando a fluorescência e o dicroísmo circular, de modo a verificar a influencia das soluções aquosas dos polímeros PPG 725 e NaPA 8.000 e dos líquidos iônicos baseados nas colinas, precisamente [Ch][Pent] e [Ch][Hex], na estrutura secundária da lipase comercial de *A. niger*, uma vez que esses podem ser de interesse para uso como inibidores;

Investigar a nível molecular o local onde ocorrem as interações favoráveis ou não entre a lipase e os diferentes compostos empregando o método de ancoragem molecular;

Otimizar os SMDFA com [Ch]X como adjuvantes os quais poderiam incrementar os resultados obtidos neste trabalho. Como exemplo, pode-se fazer uso de sais inorgânicos ou variar a temperatura modificando a razão volumétrica das fases e conseqüentemente a extração;

Explorar métodos para remoção dos carboidratos ou a reextração da lipase dos SPDFA com carboidrato, a qual permitiria a quantificação de proteínas totais e conseqüentemente a determinação do fator de purificação. Desta forma, poderia verificar se os SPDFA com carboidrato também podem ser aplicados nos seguimentos alimentícios, cosméticos e farmacêuticos;

Aplicar as lipases extraídas pelos SDFA em setores industriais que não requerem pureza como na indústria de detergentes, na degradação biológica e remoção da carga lipolítica de efluentes industriais ou na produção de biodiesel poderia consolidar a viabilidade do método que tem sido tema de investigação no âmbito acadêmico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. DEIVE, F.J.; RODRÍGUEZ, A.; PEREIRO, A.B.; ARAÚJO, J.M.M.; LONGO, M.A.; COELHO, M.A.Z.; CANONGIA LOPES, J.N.; ESPERANÇA, J.M.S.S.; REBELO, L.P.N., MARRUCHO, I.M. Ionic liquid- based aqueous biphasic system for lipase extraction. **Green Chemistry**, v.13, p.390-396, 2011.
2. CASTRO, H.F., MENDES, A.A. SANTOS, J.C. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. **Química Nova**, v.27, p.146-156, 2004.
3. FERREIRA-DIAS, S.; SANDOVAL, G.; PLOU, F.; VALERO, F. The potential use of lipases in the production of fatty acid derivatives for the food and nutraceutical industries. **Electronic Journal of Biotechnology**, v.16, n.3, p.1-38, 2013.
4. DOBREV, G.; ZHEKOVA, B.; DOBREVA, V.; STRINSKA, H.; DOYKINA, P.; KRASTANOV, A. Lipase biosynthesis by *Aspergillus carbonarius* in a nutrient medium containing products and byproducts from the oleochemical industry. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v.4, p.77-82, 2014.
5. LEE, S.Y.; KHOIROH, I.; LING, T.C.; SHOW, P.L. Enhanced recovery of lipase derived from *Burkholderia cepacia* from fermentation broth using recyclable ionic liquid/polymer- based aqueous two- phase systems. **Separation and Purification Technology**, v.179, p.152-160, 2017.
6. PAQUES, F.W.; MACEDO, G.A. Lipases de látex vegetais: propriedades e aplicações industriais. **Química Nova**, v.29, n.1, p.93-99, 2006.
7. DAIHA, K. de G.; ANGELI, R.; DE OLIVEIRA S.D.; ALMEIDA R.V. Are lipases still important biocatalysts? A study of scientific publications and patents for technological forecasting. **PLoS One**, v.10, n.6, e0131624, 2015.
8. HASAN, F.; SHAH, A.A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme Microbiology Technology**, v.39, n.2, p.235-251, 2006.
9. SETHI, B.K.; NANDA, P.K.; SAHOO, S. Characterization of biotechnologically relevant extracellular lipase produced by *Aspergillus terreus* NCF 4269.10. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.47, p.143-149, 2016.
10. BUBALO, M.C.; JURINJAK, A.T.; VINKOVIL, M.; RADOSEVIL, K.; SRLEK, V.G.; REDOVNIKOVIL, I.R. Cholinium-based deep eutectic solvents and ionic liquids for lipase-catalyzed synthesis of butyl acetate. **Journal of Molecular Catalysis B Enzymatic**, v.122, p.188-198, 2015.
11. SAHAY, S.; CHOUHAN, D. Study on the potential of cold-active lipases from psychrotrophic fungi for detergent formulation. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, p.0-6, 2018.
12. NIELSEN, P.M.; BRASK, J.; FJERBAEK, L. Enzymatic biodiesel production: Technical and economical considerations. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v.110, p.692-700, 2008.
13. COLÍN-LUNA, J.A.; ZAMORA-RODEA, E.G.; GONZÁLEZ-BRAMBILA, M.M. et al. Biodiesel production using immobilized lipase supported on a zirconium-pillared clay. Effect of the immobilization method. **International Journal of Chemical Reactor Engineering**, p.1-10, 2018. Disponível em: doi:10.1515/ijcre-2017-0260. Acesso em: 29 mar.2019.

Referências bibliográficas

14. BARROS, M.; FLEURI, L.F.; MACEDO, G.A. Seed lipases: sources, applications and properties - a review. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.27, n.1, p.15-29, 2010.
15. JAEGER, K-E; DIJKSTRA, B.W.; REETZ, M.T. Bacterial biocatalysts: molecular biology three-dimensional structures and biotechnological applications. **Rev. Microbiology**, v.53, p.315-351, 1999.
16. SAXENA, R.K.; DAVIDSON, W.S.; SHEORAN, A.; GIRI, B. Purification and characterization of an alkaline thermostable lipase from *Aspergillus carneus*. **Process Biochemistry**, v.39, p. 239-247, 2003.
17. LIU, G.; HU, S.; LI, L.; HOU, Y. Purification and characterization of a lipase with high thermostability and polar organic solvent- tolerance from *Aspergillus niger*. **Lipids**, v.50, p.1155-1163, 2015.
18. CONTESINI, F. J.; LOPES, D.B.; MACEDO, G.A.; NASCIMENTO, G.N.; CARVALHO P.O. *Aspergillus* sp. lipase: Potential biocatalyst for industrial use. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.67, p.163-171, 2010.
19. PADILHA, G.S.; FERREIRA, J.F.; CASTIGLIONI G.L.; ALEGRE, R.M.; TAMBOURGI E.B. Avaliação da lipase extracelular de *Pseudomonas cepacia* para purificação em sistema bifásico aquoso. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.31, n.1, p.16-22, 2011.
20. SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U.C. Production, purification, characterization and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, v.19, p.627-662, 2001.
21. SOUZA, R.L.; LIMA, R.A.; COUTINHO, J.A.P.; SOARES, C.M.F.; LIMA, Á.S. Novel aqueous two-phase systems based on tetrahydrofuran and potassium phosphate buffer for purification of lipase. **Process Biochem**, v.50, n.9, p.1459-1467, 2015.
22. VENTURA, S.P.M.; SOUSA, S.G.; FREIRE, M.G.; SERAFIM, L.S.; LIMA, Á.S.; COUTINHO, J.A.P. Design of ionic liquids for lipase purification. **Journal of Chromatography B**, v.879, n.26, p.2679-2687, 2011.
23. ALBERTSSON, P.A. **Partition of cell particles and macromolecules**. New York: Wiley-Interscience, 1986. 346 p. v.3.
24. ROGERS, R.D.; BOND, A.H.; BAUER, C.B.; ZHANG, J.; GRIFFIN, S.T. Metal ion separations in polyethylene glycol-based aqueous biphasic systems: Correlation of partitioning behavior with available thermodynamic hydration data. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v.680, n.1-2, p.221-229, 1996.
25. JOHANSSON, H-O.; MAGALDI, F.M.; FEITOSA, E.; PESSOA JÚNIOR, A. Protein partitioning in poly (ethylene glycol)/ sodium polyacrylate aqueous two-phase systems. **Journal of Chromatography A**, v.1178, p.145-153, 2008.
26. RAMAKRISHNAN, V.; GOVEAS, L.C.; SURALIKERIMATH, N.; JAMPANI, C.; HALAMI, P.M.; NARAYAN, B. Extraction and purification of lipase from *Enterococcus faecium* MTCC5695 by PEG/phosphate aqueous-two phase system (ATPS) and its biochemical characterization. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v.6, p.19-27, 2016.
27. BENAVIDES, J.; RITO- PALOMARES, M.; ASENJO, J.A. Aqueous two-phase systems. **Downstream Process and Product Recovery**, p.697- 713, 2011.

Referências bibliográficas

28. LIU, C-L.; KAMEI, D.T.; KING, J.A.; WANG, D.I.C.; BLANKSCHTEIN, D. Separation of proteins and viruses using two-phase aqueous micellar systems. **Journal of Chromatography B**, v.711, p.127-138, 1998.
29. LI, N.; WANG, Y.; XU, K.; HUANG, Y.; WEN, Q.; DING, X. Development of green betaine-based deep eutectic solvent aqueous two-phase system for the extraction of protein. **Talanta**, v.152, p.23-32, 2016.
30. SAID, S.; PIETRO, R. Enzimas de interesse industrial biotecnológico. Ribeirão Preto, 2010. 159 p.
31. SINGH, R.; KUMAR, M.; MITTAL, A.; MEHTA, P.K. Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. **3 Biotech**, v.6, n.2, p.1-15, 2016.
32. PORTER, J.L.; RUSLI, R.A.; OLLIS, D.L. Directed evolution of enzymes for industrial biocatalysis. **ChemBioChem**, v.17, n.3, p.197-203. 2016.
33. CABRAL, J.M.S.; AIRES-BARROS, M.R.; GAMA, M. **Engenharia enzimática**. Lisboa- Porto. Ed. Lidel, 2003. 250 p.
34. COELHO, M.A.Z.; SALGADO, A.M., RIBEIRO, B.D. **Tecnologia Enzimática**. Rio de Janeiro: EPUB, 2008. 288 p.
35. NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6.ed. Porto Alegre, RS. Artmed, 2014. 1298 p.
36. NOMENCLATURE COMMITTEE OF THE INTERNATIONAL UNION OF BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY -(NC-IUBMB). **Enzyme nomenclature**: recommendations of the nomenclature committee of the international union of biochemistry and molecular biology on the nomenclature and classification of enzymes by the reactions they catalyze. Available: <http://www.sbcs.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>. Access: October 18, 2018.
37. MINISTÉRIO DA ECONOMIA, INDÚSTRIA, COMÉRCIO EXTERIOR E SERVIÇOS (MDIC). Disponível em: <http://www.mdic.gov.br/comercio-exterior/estatisticas-de-comercio-exterior/comex-vis/frame-ppi?ppi=3161>. Acesso: Março 24, 2019.
38. OKINO-DELGADO, C.H.; PRADO, D.Z.; FLEURI, L.F. Brazilian fruit processing, wastes as a source of lipase and other biotechnological products: a review. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.90, n.3, p.2927-2943, 2018.
39. BBC RESEARCH. Global Markets for ENZYMES IN INDUSTRIAL APPLICATIONS. Available: <https://www.bccresearch.com/market-research/biotechnology/global-markets-for-enzymes-in-industrial-applications-bio030k.html>. Access: October 21, 2018.
40. KUMAR, D.; PARSHAD, R.; GUPTA V.K. Application of a statistically enhanced, novel, organic solvent stable lipase from *Bacillus safensis* DVL-43. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.66, p.97-107, 2016.
41. LAZNIIEWSKI, M.; STECZKIEWICZ, K.; KNIZEWSKI, L.; WAWER, I.; GINALSKI, K. Novel transmembrane lipases of alpha/beta hydrolase fold. **FEBS Lett**, v.585, n.6, p.870-874, 2011.
42. XU, X. Production of specific-structured triacylglycerols by lipase-catalyzed reactions: a review. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v.102, n.4, p.287-303, 2000.

Referências bibliográficas

43. LAI, O.-M.; LEE, Y.-Y.; PHUAH, E.-T.; AKOH, C.C. Lipase/Esterase: properties and industrial applications. **Encyclopedia of Food Chemistry**, p.158-167, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.21640-5>. Acesso em: 26 mar. 2019.
44. SINGH, A.K.; MUKHOPADHYAY, M. Overview of fungal lipase: a review. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.166, p.486-520, 2012.
45. LEE, K.T.; AKOH, C.C. Characterization of enzymatically synthesized structured lipids containing eicosapentaenoic, docosahexaenoic, and caprylic acids. **Journal of American Oil Chemists Society**. v.75, n.4, p.495-499, 1998. doi:10.1007/s11746-998-0253-y.
46. RODRIGUES, J.N.; GIOIELLI, L.A.; ANTON, C. Propriedades físicas de lipídios estruturados obtidos de misturas de gordura do leite e óleo de milho. **Ciência e Tecnol Alimentos**. v.23, n.2, p.226-233, 2006. doi:10.1590/s0101-20612003000200022.
47. KONDREDDY, V.K.R.; ANIKISETTY, M.; NAIDU K.A. Medium-chain triglycerides and monounsaturated fatty acids potentiate the beneficial effects of fish oil on selected cardiovascular risk factors in rats. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v.28, p.91-102, 2016.
48. CURI, R.; POMPÉIA, C.; MIYASSAKA, C.K.; PROCOPIO, J. **Entendendo a gordura**. São Paulo: Manole, 2002.
49. AOYAMA, T.; KOJIMA, K.; TAKEUCHI, H.; SEKINE, S. The application of medium-chain fatty acids: Edible oil with a suppressing effect on body fat accumulation. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, v.17, p.320-323, 2008.
50. NAGAO, K.; YANAGITA, T. Medium-chain fatty acids: functional lipids for the prevention and treatment of the metabolic syndrome. **Pharmacological Research**, v.61, p.208-212, 2010.
51. ALABDULKARIM, B.; BAKEET, Z.A.N.; ARZOO, S. Role of some functional lipids in preventing diseases and promoting health. **Journal of King Saud University – Science**, v.24, p.319-329, 2012.
52. SCHÖNFELD, P.; WOJTCZAK, L. Short- and medium-chain fatty acids in energy metabolism: the cellular perspective. **Journal of Lipid Research**, v.57, n.6, p.943-954, 2016.
53. SKJOLD-JØRGENSEN, J.; VIND, J.; SVENDSEN, A.; BJERRUM, M.J. Lipases that activate at high solvent polarities. **Biochemistry**, v.55, n.1, p.146-156, 2016.
54. REIS, P.; HOLMBERG, K.; WATZKE, H.; LESER, M.E.; MILLER, R. Lipases at interfaces: a review. **Advances in Colloid and Interface Science**, v.148, p.237-250, 2009.
55. YAO, P.; YU, X.; HUANG, X. Effect of the physicochemical properties of binary ionic liquids on lipase activity and stability. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.77, p.243-249, 2015.
56. KHAN, F.I.; LAN, D.; DURRANI, R.; HUAN, W.; ZHAO, Z.; WANG, Y. The Lid Domain in Lipases: structural and functional determinant of enzymatic properties. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v.5, p.1-13, 2017. Disponível em: doi:10.3389/fbioe.2017.00016. Acesso em: 29 mar. 2019.
57. XUE, L.; ZHAO, Y.; YU, L.; SUN, Y.; YAN, K., LI Y., HUANG, X.; QU, K. Choline acetate enhanced the catalytic performance of *Candida rugosa* lipase in AOT reverse micelles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.105, p.81-86, 2013.

Referências bibliográficas

58. LAI, J.Q.; LI, Z.; LÜ, Y-H.; YANG, Z. Specific ion effects of ionic liquids on enzyme activity and stability. **Green Chemistry**, v.13, p.1860-1868, 2011.
59. ANSORGE-SCHUMACHER, M.B.; THUM, O. Immobilised lipases in the cosmetics industry. **Chemical Society Reviews**, v.42, n.15, p.6475-6490, 2013.
60. YVERGNAUX, F. Lipases: particularly effective biocatalysts for cosmetic active ingredients. **Oilseeds & Fats Crops and Lipids**, v.24, n.4, p.1-4, 2017.
61. MOUAD, A.M.; TAUPIN, D.; LEHR, L.; YVERGNAUX, F.; PORTO, A.L.M. Aminolysis of linoleic and salicylic acid derivatives with *Candida antarctica* lipase B: A solvent-free process to obtain amphiphilic amides for cosmetic application. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.126, p.64-68, 2016.
62. ROMMELMANN, P.; NACHTIGALL, B.; GUNTELMANN, T.; GRÖGER, H.; KUCK, D. Stereoselective synthesis of enantiomerically pure bowl-shaped hydroxytribenzotriquinacenes. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v.16, n.31, p.5635-5642, 2018
63. GANDHI, N.N. Applications of Lipase. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.74, n.6, p.621-634, 1997.
64. RASIT, N.; IDRIS, A.; HARUN, R.; WAN, W.A; GHANI, K. Effects of lipid inhibition on biogas production of anaerobic digestion from oily effluents and sludges: an overview. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.45, p.351-358, 2015.
65. BOM, E.P.S.; FERRARA, M.A.; CORVO, M.L. **Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado**. Rio de Janeiro: Interciência, 2008.506 p.
66. AKANBI, T.O.; BARROW, C.J. Lipase-catalysed incorporation of EPA into emu oil: formation and characterisation of new structured lipids. **Journal of Functional Foods**, v.19, p.801-809, 2015.
67. ABED, S.M.; ZOU, X.; ALI, A.H.; JIN, Q.; WANG, X. Synthesis of 1,3-dioleoyl-2-arachidonoylglycerol-rich structured lipids by lipase-catalyzed acidolysis of microbial oil from *Mortierella alpina*. **Bioresource Technology**, v.243, p.448-456, 2017.
68. MOREIRA, D.K.T.; RACT, J.N.R.; RIBEIRO, A.P.B.; MACEDO, G.A. Production and characterization of structured lipids with antiobesity potential and as a source of essential fatty acids. **Food Research International**, v.99, p.713-719, 2017.
69. CARVALHO, P.D.O; CONTESINI, F.J.; BIZACO, R.; CALAFATTI, S.A.; MACEDO, G.A. Optimization of enantioselective resolution of racemic ibuprofen by native lipase from *Aspergillus niger*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.33, n.8, p.713-718, 2006. Disponível em: doi:10.1007/s10295-006-0138-8. Acesso em: 27 mar. 2019.
70. GOLUNSKI, S.M.; MULINARI, J.; CAMARGO, A.F.; VENTURIN, B.; BALDISSARELLI, D.P.; MARQUES, C.T.; VARGAS, G.D.L.P.; COLLA, L.M.; MOSSI, A.; TREICHEL, H. Ultrasound effects on the activity of *Aspergillus niger* lipases in their application in dairy wastewater treatment. **Environmental Quality Management**, v.27, n.1, p.95-101, 2017.
71. ZHOU, D.; XU, X.; MU, H.; HØY, C.E.; ADLER-NISSEN, J. Lipase-catalyzed production of structured lipids via acidolysis of fish oil with caprylic acid. **Journal of Food Lipids**, v.7, n.4, p.263-274, 2000.
72. HAMAM, F.; SHAHIDI, F. Structured lipids from high-laurate canola oil and long-chain omega-3 fatty acids. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.82, n.10, p.731-736, 2005.

Referências bibliográficas

73. ARAÚJO, M.E.M.B.; CAMPOS, P.R.B.; ALBERTO, T.G.; CONTESINI, F.J.; CARVALHO, P.O. Synthesis of structured triacylglycerols enriched in n-3 fatty acids by immobilized microbial lipase. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.47, n.4, p.1006-1013, 2013.
74. LI, C.; ZHANG, F.; GAO, Z.; HE, L.; ZENG, X.; ZHU, Q.; YU, L. Effects of organic solvent, water activity, and salt hydrate pair on the sn-1,3 selectivity and activity of whole-cell lipase from *Aspergillus niger* GZUF36. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.102, n.1p.225-235, 2018. Available: doi:10.1007/s00253-017-8597-6. Access: 27 mar. 2019.
75. COLIN, V.L.; BAIGORÍ, M.D.; PERA, L.M. Mycelium-bound lipase production from *Aspergillus niger* MYA 135, and its potential applications for the transesterification of ethanol. **Journal of Basic Microbiology**, v.51, n.3, p.236-242, 2011.
76. LI, Y.; DU, W.; LIU, D. Efficient biodiesel production from phospholipids-containing oil: Synchronous catalysis with phospholipase and lipase. **Biochemical Engineering Journal**, v.94, p.45-49, 2015.
77. GULDHE, A.; SINGH, P.; KUMARI, S.; RAWAT, I.; PERMAUL, K.; BUX, F. Biodiesel synthesis from microalgae using immobilized *Aspergillus niger* whole cell lipase biocatalyst. **Renewable Energy**, v.85, p.1002-1010, 2016
78. ALMYASHEVA, N.R.; SHUKTUEVA, M.I.; PETROVA, D.A.; KOPITSYN, D.S.; KOTELEV, M.S.; VINOKUROV, V.A.; NOVIKOV, A.A. Biodiesel fuel production by *Aspergillus niger* whole-cell biocatalyst in optimized medium. **Mycoscience**, v.59, n.2, p.99-104, 2018.
79. PRATAMA, L.; HELIANTI, I.; SURYANI, A.; WAHYUNTARI, B. Isolation, characterization, and production of lipase from indigenous fungal for enzymatic interesterification process. **Microbiol Indones**, v.11, n.2, p.35-45, 2017
80. YANG, S.; WU, Y.; YANG, J.; YANG, R.; BAO, Y.; WANG, K.; LIU, G.; WANG, W. Isolation and identification of an extracellular enzyme from *Aspergillus niger* with Deoxynivalenol biotransformation capability. **Emirates Journal of Food & Agriculture**, v.29, n.10, p.742-750, 2017.
81. DENG, X.; CAO, S.; LI, N.; WU, H.; SMITH, T.J.; ZONG, M.; LOU, W. A magnetic biocatalyst based on mussel-inspired polydopamine and its acylation of dihydromyricetin. **Chinese Journal of Catalysis**, v.37, n.4, p.584-595, 2016.
82. RAJAPRIYA, G.; MORYA, V.K.; MAI, N.L.; KOO, Y.M. *Aspergillus niger* whole-cell catalyzed synthesis of caffeic acid phenethyl ester in ionic liquids. **Enzyme Microbial Technology**, v.111, p.67-73, 2018.
83. TUDORACHE, M.; PROTESESCU, L.; COMAN, S.; PARVULESCU V.I. Efficient bio-conversion of glycerol to glycerol carbonate catalyzed by lipase extracted from *Aspergillus niger*. **Green Chemistry**, v.14, n.2, p.478-482, 2012.
84. OLUSESAN, A.T.; AZURA, L.K.; FORGHANI, B.; BAKAR, F.A.; MOHAMED, A.K.S.; RADU, S.; MANAP, M.Y.A.; SAARI, N. Purification, characterization and thermal inactivation kinetics of a non-regioselective thermostable lipase from a genotypically identified extremophilic *Bacillus subtilis* NS 8. **New Biotechnology**, v.28, n.6, p.738-745, 2011.
85. YOO, H.Y.; SIMKHADA, J.R.; CHO, S.S.; PARK, D.H.; KIM, S.W.; SEONG, C.N.; YOO J.C. A novel alkaline lipase from *Ralstonia* with potential application in biodiesel production. **Bioresource Technol**, v.102, n.10, p.6104-6111, 2011.

Referências bibliográficas

86. PENG, R.; LIN, J.; WEI, D. Purification and characterization of an organic solvent-tolerant lipase from *Pseudomonas aeruginosa* CS-2. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.162, n.3, p.733-743, 2010.
87. LAACHARI, F.; BERGADI, F.; SAYARI, A.; ELABED, S.; MOHAMMED, I.; HARCHALI, E. H.; IBNSOUDA, S.K. Bacillus pumilus suşundan elde edilen yeni termostabil lipazın biyokimyasal karakterizasyonu. **Turkish Journal of Biochemistry**, v.40, n.1, p.8-14, 2015.
88. UTTATREE, S.; WINAYANUWATTIKUN, P.; CHAROENPANICH, J. Isolation and characterization of a novel thermophilic-organic solvent stable lipase from *Acinetobacter baylyi*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.162, n.5, p.1362-1376, 2010. Available: doi:10.1007/s12010-010-8928-x. Access: 29 mar. 2019.
89. DAOUD, L.; KAMOUN, J.; ALI, M.B.; JALLOULI, R.; BRADAI, R.; MECHICHI, T., GARGOURI, Y.; ALI, Y.B.; ALOULOU, A. Purification and biochemical characterization of a halotolerant Staphylococcus sp. extracellular lipase. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.57, p.232-237, 2013.
90. NANDINI, K.E.; RASTOGI, N.K. Separation and purification of lipase using reverse micellar extraction: Optimization of conditions by response surface methodology. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v.15, n.2, p.349-358, 2010.
91. GAIKAIWARI, R.P.; WAGH, S.A.; KULKARNI, B.D. Efficient lipase purification using reverse micellar extraction. **Bioresource Technology**, v.108, p.224-230, 2012.
92. VENKATANAGARAJU, E.; DIVAKAR, G. Purification strategies for microbial pectinases. **Current Trends in Biotechnology and Pharmacy**, v.11n.2, p.144-159, 2017.
93. SIVARAMAKRISHNAN, R.; INCHAROENSAKDI, A. Purification and characterization of solvent tolerant lipase from *Bacillus* sp. for methyl ester production from algal oil. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.121, n.5, p.517-522, 2016.
94. MASOMIAN, M.; RAHMAN, R.N.Z.R.A.; SALLEH, A.B.; BASRI, M. A new thermostable and organic solvent-tolerant lipase from *Aneurinibacillus thermoaerophilus* strain HZ. **Process Biochemistry**, v.48, n.1, p.169-175, 2013.
95. AHMED, E.H.; RAGHAVENDRA, T.; MADAMWAR, D. An alkaline lipase from organic solvent tolerant *Acinetobacter* sp. EH28: Application for ethyl caprylate synthesis. **Bioresource Technology**, v.101, n.10, p.3628-3634, 2010.
96. ZHENG, X.; CHU, X.; ZHANG, W.; WU, N.; FAN, Y. A novel cold-adapted lipase from *Acinetobacter* sp. XMZ-26: Gene cloning and characterisation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.90, n.3, p.971-980, 2011. Disponível em: doi:10.1007/s00253-011-3154-1. Acesso em: 29 mar. 2019.
97. YANG, W.; HE, Y.; XU, L.; ZHANG, H.; YAN, Y. A new extracellular thermo-solvent-stable lipase from *Burkholderia ubonensis* SL-4: Identification, characterization and application for biodiesel production. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.126, p.76-89, 2016.
98. KAMBOUROVA, M.; KIRILOVA, N.; MANDEVA, R.; DEREKOVA, A. Purification and properties of thermostable lipase from a thermophilic *Bacillus stearothermophilus* MC 7. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.22, n.5-6, p.307-313, 2003.

Referências bibliográficas

99. SARKAR, P.; YAMASAKI, S.; BASAK, S.; BERA, A.; BAG, P.K. Purification and characterization of a new alkali-thermostable lipase from *Staphylococcus aureus* isolated from *Arachis hypogaea rhizosphere*. **Process Biochemistry**, v.47, n.5, p.858-866, 2012.
100. LIU, Z.; CHI, Z.; WANG, L.; LI, J. Production, purification and characterization of an extracellular lipase from *Aureobasidium pullulans* HN2.3 with potential application for the hydrolysis of edible oils. **Biochemical Engineering Journal**, v.40, n.3, p.445-451, 2008.
101. GOPINATH, S.C.B.; HILDA, A.; LAKSHMI PRIYA, T.; ANNADURAI, G.; ANBU, P. Purification of lipase from *Geotrichum candidum*: conditions optimized for enzyme production using Box-Behnken design. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.19, n.7, p.681-689, 2003.
102. JERMSUNTIEA, W.; AKI, T.; TOYOURA, R.; IWASHITA, K.; KAWAMOTO, S.; ONO, K. Purification and characterization of intracellular lipase from the polyunsaturated fatty acid-producing fungus *Mortierella alliacea*. **New Biotechnology**, v.28, n.2, p.158-164, 2011.
103. HIOL, A.; JONZO, M.; RUGANI N., DRUET D., SARDA, L.; COMEAU, L.C. Purification and characterization of an extracellular lipase from a thermophilic *Rhizopus oryzae* strain isolated from palm fruit. **Enzyme and Microbial Technology**, v.26, p.421- 430, 2000.
104. YU, M.; QIN, S.; TAN, T. Purification and characterization of the extracellular lipase Lip 2 from *Yarrowia lipolytica*. **Process Biochemistry**, v.42, p.384-391, 2007.
105. BAE, J.H.; KWON, M.H.; KIM, I.H.; HOU, C.T.; KIM, H.R. Purification and characterization of a cold-active lipase from *Pichia lynnferdii* Y-7723: pH-dependant activity deviation. **Biotechnology Bioengineering**, v.19, n.5, p.851-857, 2014.
106. PLATIS, D.; LABROU, N.E. Development of an aqueous two-phase partitioning system for fractionating therapeutic proteins from tobacco extract. **Journal of Chromatography A**, v.1128, n.1-2, p.114-124, 2006.
107. ALVAREZ-GUERRA, E.; IRABIEN, A. Ionic liquids in separation technology. In: PÉREZ DE LOS RÍOS, A.; HERNÁNDEZ FERNÁNDEZ, F.J. (Ed.). **Separation of proteins by ionic liquid-based three-phase partitioning**. Amsterdam: Elsevier, 2014. Available: doi:10.1016/B978-0-444-63257-9.00006-7. Access: 28 mar. 2019.
108. VICENTE, F.A.; LARIO, L.D.; PESSOA, A.; VENTURA, S.P.M. Recovery of bromelain from pineapple stem residues using aqueous micellar two-phase systems with ionic liquids as co-surfactants. **Process Biochemistry**, v.51, n.4, p.528-534, 2016.
109. RANGEL-YAGUI, C.O.; LAM, H.; KAMEI, D.T.; WANG, D.I.C.; PESSOA, A.; BLANKSCHTEIN, D. Glucose-6-phosphate dehydrogenase partitioning in two-phase aqueous mixed (nonionic/cationic) micellar systems. **Biotechnology and Bioengineering**, v.82, n.4, p.445-456, 2003.
110. BARROS, K.V.G.; SOUZA, P.M.; FREITAS, M.M.; FERREIRA FILHO, E.X.; PESSOA JUNIOR, A.; MAGALHÃES, P.O. PEG/NaPA aqueous two-phase systems for the purification of proteases expressed by *Penicillium restrictum* from Brazilian Savanna. **Process Biochemistry**, v.49, n.12, p.2305-2312, 2014.
111. VENTURA, S.P.M.; SANTOS-EBINUMA, V.C.; PEREIRA, J.F.B; TEIXEIRA, M.F.S.; PESSOA, A.; COUTINHO, J.A.P. Isolation of natural red colorants from fermented broth using ionic liquid-based aqueous two-phase systems. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnol**, v.40, p.507-516, 2013.

Referências bibliográficas

112. TORRES, F.A.E.; ALMEIDA, F.A.C.; PEREIRA, J.F.B.; SANTOS-EBINUMA, V.C. Imidazolium-based ionic liquids as co-surfactants in aqueous micellar two-phase systems composed of nonionic surfactants and their aptitude for recovery of natural colorants from fermented broth. **Separation and Purification Technology**, v.196, p.262-269, 2018.
113. SANTOS, J.H.P.M.; CAPELA, E.V.; BOAL-PALHEIROS, I.; COUTINHO, J.A.P.; FREIRE, M.G.; VENTURA, S.P.M. Aqueous biphasic systems in the separation of food colorants. **Biochemistry and Molecular Biology Education**, v.46, n.4, p.390-397, 2018.
114. ALMEIDA, M.R.; PASSOS, H.; PEREIRA, M.M.; LIMA, Á.S.; COUTINHO, J.A.P.; FREIRE, M.G. Ionic liquids as additives to enhance the extraction of antioxidants in aqueous two-phase systems. **Separation and Purification Technology**, v.128, p.1-10, 2014.
115. SANTOS, J.H.; SILVA, F.A.; VENTURA, S.P.M.; COUTINHO, J.A.P.; SOUZA, R.L., SOARES, C.M.; LIMA, A. Ionic liquid-based aqueous biphasic systems as a versatile tool for the recovery of antioxidant compounds. **Biotechnology Progress**, v.31, n.1, p.70-77, 2015.
116. JUE, E.; YAMANISHI, C.D.; CHIU, R.Y.T.; WU, B.M.; KAMEI, D.T. Using an aqueous two-phase polymer-salt system to rapidly concentrate viruses for improving the detection limit of the lateral-flow immunoassay. **Biotechnology and Bioengineering**, v.111, n.12, p.2499-2507, 2014.
117. LADD, EFFIO C.; WENGER, L.; ÖTES, O.; OELMEIER, S.A.; KNEUSEL R.; HUBBUCH, J. Downstream processing of virus-like particles: Single-stage and multi-stage aqueous two-phase extraction. **Journal of Chromatography A.**, v.1383, p.35-46, 2015.
118. GONZÁLEZ-GONZÁLEZ, M.; RITO-PALOMARES, M. Aqueous two-phase systems strategies to establish novel bioprocesses for stem cells recovery. **Critical Reviews in Biotechnology**, v.34, n.4, p.318-327, 2014.
119. CABRAL, J.M.S. Cell partitioning in aqueous two-phase polymer systems. In: KUMAR A.; ALAEV, I.V.; MATTIASSON, B. **Cell separation**. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, 2007. p.151-171.
120. PLATIS, D.; LABROU, N.E. Application of a PEG/salt aqueous two-phase partition system for the recovery of monoclonal antibodies from unclarified transgenic tobacco extract. **Biotechnology Journal**, v.4, n.9, p.1320-1327, 2009.
121. SILVA, M.F.F.; FERNANDES-PLATZGUMMER, A.; AIRES-BARROS, M.R., AZEVEDO A.M. Integrated purification of monoclonal antibodies directly from cell culture medium with aqueous two-phase systems. **Separation and Purification Technology**, v.132, p.330-335, 2014.
122. DEKKER, M.; VAN, T.; TRIET, K.; WEIJERS, S.R.; BALTUSSEN, J.W.A.; LAANE C.; BIJSTERBOSCH, B.H. Enzyme recovery by liquid-liquid extraction using reversed micelles. **The Chemical Engineering Journal**, v.33, n.2, p.27-33, 1986. Available: doi:10.1016/0300-9467(86)80050-8. Access: 29 mar. 2019.
123. SANTOS, V.C.; HASMMANN, F.A.; CONVERTI, A.; PESSOA JÚNIOR, A. Liquid-liquid extraction by mixed micellar systems: a new approach for clavulanic acid recovery from fermented broth. **Biochemical Engineering Journal**, v.56, p.75-83, 2011.
124. LOPES, A.M.; SANTOS-EBINUMA, V.C.; APOLINÁRIO, A.C.; MENDONÇA JÚNIOR., F.J.B.; DAMASCENO, B.P.G.L.; PESSOA JÚNIOR, A.P.; SILVA, J.A. 5CN05 partitioning in an aqueous two-phase system: a new approach to the solubilization of hydrophobic drugs. **Process Biochemistry**, v.49, p.1555-1561, 2014.

Referências bibliográficas

125. SHOW, P.L.; TAN, C.P.; ANUAR, M.S.; ARIFF, A.; YUSOF, Y.A.; CHEN, S.K.; LING, T.C. Primary recovery of lipase derived from *Burkholderia cenocepacia* strain ST8 and recycling of phase components in an aqueous two-phase system. **Biochemical Engineering Journal**, v.60, p.74-80, 2012.
126. DUARTE, A.W.F.; LOPES, A.M.; MOLINO, J.V.D.; PESSOA, A.; SETTE, L.D. Liquid-liquid extraction of lipase produced by psychrotrophic yeast *Leucosporidium scottii* L117 using two-phase systems. **Separation and Purification Technology**, v.156, p.215-225, 2015.
127. DERMIKI, M.; GORDON, M.H.; JAUREGI, P. Recovery of astaxanthin using colloidal gas aphrons (CGA): a mechanistic study. **Separation and Purification Technology**, v.65, p.54-64, 2009.
128. MAZZOLA, P.G.; LOPES, A.M.; HASMANN, F.A.; JOZALA, A.F.; PENNA, T.C.V., MAGALHAES, P.O.; RANGEL-YAGUI, C.O.; PESSOA JÚNIOR, A. Liquid-liquid extraction of biomolecules: an overview and update of the main techniques. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.83, n.2, p.143-157, 2008.
129. BARBOSA, J.M.P.; SOUZA, R.L.; FRICKS, A.T.; ZANIN, G.M.; SOARES, C.M.F.; LIMA, Á.S. Purification of lipase produced by a new source of *Bacillus* in submerged fermentation using an aqueous two-phase system. **Journal of Chromatography B**, v.879, n.32, p.3853-3858, 2011.
130. VENTURA, S.P.M.; SANTOS, L.D.F.; SARAIVA, J.A.; COUTINHO, J.A.P. Ionic liquids microemulsions: the key to *Candida antarctica* lipase B superactivity. **Green Chemistry**, v.14, p.1620-1626, 2012.
131. PESSOA-JÚNIOR, A.; KILIKIAN, B.V. **Purificação de produtos biotecnológicos**. São Paulo: Manole, 2005. 444 p.
132. GEROLA, A.P.; COSTA, P.F.A.; QUINA, F.H.; FIEDLER, H.D.; NOME, F. Zwitterionic surfactants in ion binding and catalysis. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v.32, p.39-47, 2017.
133. CORDISCO, E.; HAIDAR, C.N.; GOÑI, R.; NERLI, B.B.; MALPIEDI, L.P. Physicochemical characterization of aqueous micellar systems formed by environmentally friendly salts. **Fluid Phase Equilibria**, v.393, p.111-116, 2015.
134. RANGEL-YAGUI, C.O.; PESSOA-JÚNIOR, A.; BLANKSCHTEIN, D. Two-Phase aqueous micellar systems -an alternative method for protein purification. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.21, n.4, p.531-544, 2004.
135. SANTOS-EBINUMA, V.C.; LOPES, A.M.; CONVERTI, A., PESSOA JÚNIOR, A.; RANGEL-YAGUI, C.O. Behavior of Triton X-114 cloud point in the presence of inorganic electrolytes. **Fluid Phase Equilibria**, v.360, p.435- 438, 2013.
136. LIU, C.L.; NIKAS, Y.J.; BLANKSCHTEIN, D. Novel bioseparations using two-phase aqueous micellar systems. **Biotechnology and Bioengineering**, v.52, n.2, p.185-192, 1996.
137. SARAVANAN, S.; RAO, J.R.; NAIR, B.U.; RAMASAMI, T. Aqueous two-phase poly(ethylene glycol)- poly(acrylic acid) system for protein partitioning: Influence of molecular weight, pH and temperature. **Process Biochemistry**, v.43, p.905- 911, 2008.
138. PEREIRA, J.F.B.; KURNIA, K.A.; COJOCARU, O.A.; GURAU, G.; REBELO, L.P.N.; ROGERS, R.D.; FREIRE, M.; COUTINHO, J.A.P. Molecular interactions in aqueous biphasic systems composed of polyethylene glycol and crystalline vs. liquid cholinium-based salts. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v.16, n.12, p.5723-57731, 2014.

Referências bibliográficas

139. LIU, W.; LIU, J.P.; ZOU, L.Q.; ZHANG, Z-Q.; LIU, C-M.; LIANG, R-H.; XIE, M-Y.; WAN, J. Stability and conformational change of methoxypolyethylene glycol modification for native and unfolded trypsin. **Food Chemistry**, v.146, p.278-283, 2014.
140. ANTOV, M.G.; IVETIĆ, D.; KNEŽEVIĆ JUGOVIĆ, Z.D. Single step recovery of lipase from *Penicillium cyclopium* by aqueous two-phase extraction. **Separation Science Technology**, v. 51, n.4, p.622-628, 2016.
141. KHAYATI, G.; ALIZADEH, S. Extraction of lipase from *Rhodotorula glutinis* fermentation culture by aqueous two-phase partitioning. **Fluid Phase Equilibria**, v.353, p.132-134, 2013.
142. ARADHANA, D.; SREEJA, H.P.; SHARMILA, G.; MUTHUKUMARAN, C. Optimization of *Rhizopus niveus* Lipase Partitioning by an Aqueous Biphasic System. **Chemical Engineering Technology**. v.37, n.7, p.1191-1197, 2014. Available: doi:10.1002/ceat.201300652. Access: 29 mar.2019.
143. NANDINI K.E.; RASTOGI N.K. Liquid-Liquid Extraction of Lipase Using Aqueous Two-Phase System. **Food Bioprocess Technology**. v.4, n.2, p.295-303, 2011.
144. HUDDLESTON, J.G.J.G.; WILLAUER, H.D.; SWATLOSKI, R.P.; VISSER, A.E.; ROGERS, R.D.R.D. Room temperature ionic liquids as novel media for ‘clean’ liquid – liquid extraction. **Chemical Communications**, n.16, p.1765-1766, 1998.
145. VICENTE, F.A.; MALPIEDI, L.P.; SILVA, F.A.; PESSOA JÚNIOR, A.; COUTINHO J.A.P., VENTURA S.P.M. Design of novel aqueous micellar two-phase systems using ionic liquids as co-surfactants for the selective extraction of (bio)molecules. **Separation and Purification Technology**, v.135, p. 259- 267, 2014.
146. NEVES, C.M.S.S.; SILVA, A.M.S.; FERNANDES, A.M.; COUTINHO, J.A.P.; FREIRE M.G. Toward an understanding of the mechanisms behind the formation of liquid-liquid systems formed by two ionic liquids. **The Journal of Physical Chemistry Letters**, v.8, n.13, p.3015-3019, 2017.
147. MARSH, K.N.; BOXALL, J.A.; LICHTENTHALER, R. Room temperature ionic liquids and their mixtures - A review. **Fluid Phase Equilibria**. v.219, n.1, p.93-98, 2004. doi:10.1016/j.fluid.2004.02.003.
148. SILVA, T.B. **Líquidos iônicos - Alguns aspectos sobre as propriedades, preparação e aplicações**. Pelotas/ RS, 2004. Originalmente apresentada como Monografia de Graduação. Universidade Federal de Pelotas. Inst Química e Geociências. 2004.
149. FREIRE, M.G.; CLÁUDIO, A.F.M.; ARAÚJO, J.M.M.; COUTINHO, J.A.P.; MARRUCHO, I.M.; LOPES, J.N.C.; REBELO, L.P.N. Aqueous biphasic systems: a boost brought about by using ionic liquids. **Chemical Society Reviews**, v.41, p. 4966- 4995, 2012.
150. DE GONZALO, G.; LAVANDERA, I.; DURCHSCHEIN, K.; WURM, D.; FABER, K.; KROUTIL, W. Asymmetric biocatalytic reduction of ketones using hydroxy-functionalised water-miscible ionic liquids as solvents. **Tetrahedron Asymmetry**, v.18, n.21, p.2541-2546, 2007.
151. SOUZA, R.L.; LIMA, R.A.; COUTINHO, J.A.P.; SOARES, C.M.F.; LIMA, A.S. Aqueous two-phase systems based on cholinium salts and tetrahydrofuran and their use for lipase purification. **Separation and Purification Technology**, v.155, p.118-126, 2014.
152. BRENNECKE, J.F.; MAGINN, E.J. Ionic liquids: innovative fluids for chemical processing. **American Institute of Chemical Engineers Journal**, v.47, n.11, p.2384-2389, 2001.

Referências bibliográficas

153. SOUSA, R.C.S.; Pereira, M.M.; FREIRE, M.G.; COUTINHO, J.A.P. Evaluation of the effect of ionic liquids as adjuvants in polymer-based aqueous biphasic systems using biomolecules as molecular probes. **Separation and Purification Technology**, v.196, p.244-253, 2017.
154. MISKOLCZY, Z.; SEBÖK-NAGY, K.; BICZÓK, L.; GÖKTÜRK, S. Aggregation and micelle formation of ionic liquids in aqueous solution. **Chemical Physical Letters**, v.400, n.4-6, p.296-300, 2004
155. GAO, S.; SUN, T.; CHEN, Q.; SHEN, X. Improvement of the cloud point extraction of uranyl ions by the addition of ionic liquids. **Journal of Hazardous Materials**, v.263, p.562-568, 2013.
156. BLESIC, M.; MARQUES, M.H.; PLECHKOVA, N.V.; SEDDON, K.R.; REBELO L.P.N.; LOPES, A. Self-aggregation of ionic liquids: Micelle formation in aqueous solution. **Green Chemistry**, v.9, n.5, p.481-490, 2007.
157. WANG, B.; EZEJIAS, T.; FENG, H.; BLASCHEK, H. Sugaring-out: a novel phase separation and extraction system. **Chemical Engineering Science**, v.63, n.9, p.2595-2600, 2008.
158. CARDOSO, G.B.; MOURÃO T.; PEREIRA F.M.; FREIRE, M.F.; FRICKS, A.T.; SOARES, C.M.F.; LIMA, A.S. Aqueous two-phase systems based on acetonitrile and carbohydrates and their application to the extraction of vanillin. **Separation and Purification Technology**, v.104, p.106-113, 2013.
159. ZHANG, Y.; ZHANG, S.; CHEN, Y.; ZHANG, J. Aqueous biphasic systems composed of ionic liquid and fructose. **Fluid Phase Equilibria**, v.57, n.2, p.173-176, 2007.
160. FREIRE, M.G.; LOUROS, C.L.S.; REBELO, L.P.N.; COUTINHO, J.A.P. Aqueous biphasic systems composed of a water-stable ionic liquid + carbohydrates and their applications. **Green Chemistry**, v.13, n.6, p.1536-1545, 2011.
161. CHEN, Y.; WANG, Y.; CHENG, Q.; LIU, X.; ZHANG, S. Carbohydrates-tailored phase tunable systems composed of ionic liquids and water. **The Journal of Chemical Thermodynamics**, v.41, n.9, p.1056-1059, 2009.
162. WU, B.; ZHANG, Y.M.; WANG, H.P. Phase behavior for ternary systems composed of ionic liquid plus saccharides plus water. **The Journal of Physical Chemistry B**, v.112, v.20, p.6426-6429, 2008.
163. WU, B.; ZHANG, Y.M.; WANG, H.P. Aqueous biphasic systems of hydrophilic ionic liquids + sucrose for separation. **Journal of Chemical & Engineering Data**, v.53, n.4, p.983-985, 2008.
164. ZHANG, Y.M.; WU, B.; WANG, H.P.; YANG, L.L. Temperature dependence of phase behavior for ternary systems composed of ionic liquid plus sucrose plus water. **The Journal of Physical Chemistry B**, v.112, n.41, p.13163-13165, 2008.
165. SOUSA, K.M.; MACIEL, G.E.L.O.; MARQUES, M.N.; CAVALCANTI, E.B.; SOARES, C.M.F.; LIMA, A.S. Partição e concentração de diuron em sistemas aquosos bifásicos formados por tetrahydrofurano e carboidratos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUIMICA, 20., 2014, Florianópolis/SC. **Conferência...** Florianópolis/SC, 2014. Disponível em: doi: 10.5151/chemeg-cobeq 2014-1752-17729-172115. Acesso em: 29 mar. 2019.
166. MARZZOCO, A.; TORRES, B.B. **Bioquímica básica**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.386 p.

Referências bibliográficas

167. HUNTER, K.N.H.C.A.; LEHN, M.J.K.J.; OLIVUCCI, S.V.L.M.; VENTURI, J.T.M.; YAMAMOTO, C.W.H.W.H. **Host-Guest Chemistry: mimetic approaches to study carbohydrate recognition**. Topics in Current Chemistry Topics in Current Chemistry, Germany, 2001. 251 p.
168. TACIN, M.V.; MASSI, F.P.; FUNGARO, M.H.P.; TEIXEIRA, M.F.S.; PAULA, A.V.; SANTOS-EBINUMA, V.C. Biotechnological valorization of oils from agro-industrial wastes to produce lipase using *Aspergillus* sp. from Amazon. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v.17, p.369-378, 2019.
169. MAYORDOMO, I.; RANDEZ-GIL, F.; PRIETO, J.A. Isolation, purification, and characterization of a cold-active Lipase from *Aspergillus nidulans*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.48, p.105-109, 2000.
170. MUHAMMAD, N.; HOSSAIN, M.I.; MAN, Z.; EL-HARBAWI, M.; BUSTAM M.A.; NOAMAN, Y.A.; ALITHEEN, N.B.M. NG M.K., HEFTER G., YIN C-Y. Synthesis and physical properties of choline carboxylate ionic liquids. **Journal of Chemical and Engineering**, v.57, p.2191-2196, 2012.
171. LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p.680-685, 1970.
172. FAN, Y.; DONG, X.; LI, X.; ZHONG, Y.; KONG, J.; HUA, S.; MIAO, J.; LI, Y. Spectroscopic studies on the inhibitory effects of ionic liquids on lipase activity. **Spectrochimica Acta - Part A: molecular and biomolecular spectroscopy**, v.159, p.128-133, 2016.
173. OOI, C.W.; TAN C.P., HII S.L.; ARIFF, A.; IBRAHIM, S.; LING, T.C. Primary recovery of lipase derived from *Burkholderia* sp. ST8 with aqueous micellar two-phase system. **Process Biochemistry**, v.46, p.1847-1852, 2011.
174. GU, T.; GALERA-GÓMEZ, P.A. Clouding of Triton X-114: The effect of added electrolytes on the cloud point of Triton X-114 in the presence of ionic surfactants. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v.104, n.2-3, p.307-312, 1995.
175. SMITH P.K.; KROHN R.E.; HERMANSON G.T.; MALLIA A.K.; GARTNER F.H.; PROVENZANO M.D.; FUJIMOTO E.K.; GOEKE B.J.O.; KLENK D.C. Measurement of Protein Using Bicinchoninic. **Analytical Biochemistry**. v.150, n.1, p.76-85, 1985.
176. ZAIA, D.A.M.; ZAIA, C.T.B.V.; LICHTIG, J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: Vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Química Nova**, v.21, n.6, p.787-793, 1998.
177. BANIK, S.P.; PAL, S.; GHORAI, S.; CHOWDHURY, S.; KHOWALA, S. Interference of sugars in the *Coomassie Blue* G dye binding assay of proteins. **Analytical Biochemistry**, v.386, n.1, p.113-115, 2009.
178. SILVA, R.J.; STEPHAN, M.P.; TEIXEIRA, K.R.S. Interferência na quantificação de proteínas em cultura de *Gluconacetobacter diazotrophicus* em meio semi-sólido contendo glicose. **Comunicado 121 Técnico**, p.1-5, 2009.
179. VICENTE, F.A.; CARDOSO, I.S.; SINTRA, T.E.; LEMUS, J.; MARQUES, E.F.; VENTURA, S.P.M.; COUTINHO, A.P. Impact of surface-active Ionic Liquids on the cloud points of nonionic surfactants and the formation of Aqueous Micellar Two-Phase Systems. **The Journal of Physical Chemistry B**, v.121, n.37, p.8742-8755, 2017.

Referências bibliográficas

180. COHEN, A.S.; KARGER, B.L. High-performance sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel capillary electrophoresis of peptides and proteins. **Journal of Chromatography A**, v.397, p.409-417, 1987. doi:10.1016/S0021-9673(01)85026-3.
181. NAMBOODIRI, V.M.; CHATTOPADHYAYA, R. Purification and biochemical characterization of a novel thermostable lipase from *Aspergillus niger*. **Lipids**, v.35, n.5, p.495-502, 2000.
182. FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; ORTIZ, C.; SEGURA, R.L.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GUISÁN, J.M.; PALOMO, J.M. Purification of different lipases from *Aspergillus niger* by using a highly selective adsorption on hydrophobic supports. **Biotechnology and Bioengineering**, v.92, n.6, p.773-779, 2005. Disponível em: doi:10.1002/bit.20656. Acesso em: 29 mar. 2019.
183. MHETRAS, N.C.; BASTAWDE, K.B.; GOKHALE, D.V. Purification and characterization of acidic lipase from *Aspergillus niger* NCIM 1207. **Bioresource Technology**, v.100, p.1486-1490, 2009.
184. ROMERO, C.M.; PERA, L.M.; LOTO, F.; VALLEJOS, C.; CASTRO, G.; BAIGORI, M.D. Purification of an organic solvent-tolerant lipase from *Aspergillus niger* MYA 135 and its application in ester synthesis. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v.1, n.1, p.25-31, 2012.
185. ZHANG, X.F.; AI, Y.H.; XU, Y.; YU, X.W. High-level expression of *Aspergillus niger* lipase in *Pichia pastoris*: Characterization and gastric digestion in vitro. **Food Chemistry**, v.274, p.305-313, 2019.
186. FALONY, G.; ARMAS, J.C.; MENDOZA, J.C.D.; HERNÁNDEZ, J.L.M. Production of extracellular lipase from *Aspergillus niger* by solid-state fermentation. **Food Technology and Biotechnology**, v.44, n.2, p.235-240, 2006.
187. CARVALHO, P.D.O.; CALAFATTI, S.A.; MARASSI, M.; SILVA, D.M.; CONTESINI, F.J.; BIZACO, R. Potencial de biocatálise enantiosseletiva de lipases microbianas. **Química Nova**, v.28, n.4, p.614-621, 2005.
188. FLEURI, L.F.; NOVELLI, P.K.; DELGADO, C.H.O.; PIVETTA, M.R.; PEREIRA, M.S.; ARCURI, M.L.C.; CAPOVILLE, B.L. Biochemical characterisation and application of lipases produced by *Aspergillus* sp. on solid-state fermentation using three substrates. **International Journal of Food Science Technology**, v.49, n.12, p.2585-2591, 2014.
189. MILLER, R.; FAINERMAN, V.B.; MAKIEVSKI, A.V.; KRÄGEL, J.; GRIGORIEV, D.O.; KAZAKOV, V.N.; SINYACHENKO, O.V. Dynamics of protein and mixed protein/ surfactants adsorption layers at the water/ fluid interface. **Advances in Colloid and Interface Science**, v.86, p.39-82, 2000.
190. DELORME, V.; DHOUIB, R.; CANAAN, S.; FOTIADU, F.; CARRIÈRE, F.; CAVALIER, J-F. Effects of surfactants on lipase structure, activity, and inhibition. **Pharmaceutical Research**, v.28, p.1831-1842, 2011.
191. ÁLVAREZ, M.S.; PATIÑO, F.; DEIVE, F.J.; SANROMÁN, M.A.; RODRÍGUEZ, A. Aqueous immiscibility of cholinium choride ionic liquid and triton surfactants. **Journal of Chemical Thermodynamics**, v.91, p.86-93, 2015.
192. DIAZ, J.C.M.; RODRIGUEZ, J.A.; ROUSSOS, S.; CORDOVA, J.; ABOUSALHAM, A.; CARRIERE, F.; BARATTI, J. Lipase from the thermotolerant fungus *Rhizopus homothallicus* is more thermostable when produced using solid state fermentation than liquid fermentation procedures. **Enzyme and Microbial Technology**, v.39, n.5, p.1042-1050, 2006.

Referências bibliográficas

193. PRAZERES, J.N.; CRUZ, J.A.B.; PASTORE, G.M. Characterization of alkaline lipase from *Fusarium oxysporum* and the effect of different surfactants and detergents on the enzyme activity. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.37, p.505-509, 2006.
194. GONZÁLEZ-NAVARRO, H.; BAÑÓ, M.C.; ABAD, C. The closed/open model for lipase activation. Addressing intermediate active forms of fungal enzymes by trapping of conformers in water-restricted environments. **Biochemistry**, v.40, p.3174-3183, 2001.
195. SZYMCYK, K.; ZDZIENNICKA, A.; KRAWCZYK, J.; JANCZUK, B. Behaviour of cetyltriethylammonium bromide, Triton X-100 and Triton X-114 in mixed monolayer at the (water-air) interface. **The Journal of Chemical Thermodynamics**, v.69, p.85-92, 2014.
196. QUILLES, J.C.J.; BRITO, R.R.; BORGES, J.P.; ARAGON, C.C.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; BOCCHINI-MARTINS, D.A.; GOMES, E.; SILVA, R.; GUIBAN, J.M. Modulation of the activity and selectivity of the immobilized lipases by surfactants and solvents. **Biochemical Engineering Journal**, v.93, p.274-280, 2015.
197. KREUTER, J. Nanoparticles and microparticles for drug and vaccine delivery. **Journal of Anatomy**, v.189, p.503-505, 1996.
198. SANTOS, J.H.P.M.; SILVA, F.A.; COUTINHO, J.A.P.; VENTURA, S.P.M.; PESSOA, A. Ionic liquids as a novel class of electrolytes in polymeric aqueous biphasic systems. **Process Biochemistry**, v.50, n.4, p.661-668, 2015
199. SADEGHI, R.; JAMEHBOZORG, B. The salting-out effect and phase separation in aqueous solutions of sodium phosphate salts and poly(propylene glycol). **Fluid Phase Equilibria**, v.280, n1-2, p.68-75, 2009
200. KUMAR, V.; SHARMA, V.K.; KALONIA, D.S. Effect of polyols on polyethylene glycol (PEG)-induced precipitation of proteins: Impact on solubility, stability and conformation. **International Journal of Pharmaceutics**, v.366, n.1-2, p.38-43, 2009.
201. MA, L.; SHA, F.; QIAO, X.; LI, Q.; ZHANG, J. Excess properties and spectroscopic studies for binary system polyethylene glycol 600 +dimethyl sulfoxide at T = (298.15, 303.15, 308.15, 313.15, and 318.15) K. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, v.25, n.9, p.1249-1255, 2017.
202. CHANPHAI, P.; BEKALE, L.; SANYAKAMDHORN, S.; AGUDELO, D.; TAJMIR-RIahi, H.A. Effect of synthetic polymers on polymer-protein interaction. **Polymer**, v.55, n.2, p.572-582, 2014.
203. BEKALE, L.; AGUDELO, D.; TAJMIR-RIahi, H.A. The role of polymer size and hydrophobic end-group in PEG-protein interaction. **Colloids Surfaces B Biointerfaces**, v.130, p.141-148, 2015.
204. BASSANI, G.; FUCIÑOS, P.; PICÓ, G.; FARRUGGIA, B. *Candida rugosa* lipase Lip1-polyethyleneglycol interaction and the relation with its partition in aqueous two-phase systems. **Colloids Surfaces B Biointerfaces**, v.75, n.2, p.532-537, 2010.
205. BASSANI G.; FARRUGGIA B.; NERLI B.; ROMANINI D.; PICÓ G. Porcine pancreatic lipase partition in potassium phosphate-polyethylene glycol aqueous two-phase systems. **Journal of Chromatography B**. v.859, n.2, p.222-228, 2007.
206. VENTURA, S.P.M.; SANTOS, L.D.F.; SARAIVA, J.A.; COUTINHO, J.A.P. Concentration effect of hydrophilic ionic liquids on the enzymatic activity of *Candida antarctica* lipase B. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.28, n.6, p.2303-2310, 2012. Disponível em: doi:10.1007/s11274-012-1037-y. Acesso em: 26 mar. 2019.

Referências bibliográficas

207. YLIKANTOLA, A.; LINNANTO, J.; KNUUTINEN, J.; ORAVILAHTI, A.; TOIVAKKA M. Molecular modeling studies of interactions between sodium polyacrylate polymer and calcite surface. **Applied Surface Science**, v.276, p.43-52, 2013.
208. OHENOJA, K.; SAARI, J.; ILLIKAINEN, M.; NIINIMÄKI, J. Effect of molecular weight of sodium polyacrylates on the particle size distribution and stability of a TiO₂ suspension in aqueous stirred media milling. **Powder Technology**, v.262, p.188-193, 2014.
209. MARINI, A.; IMELIO, N.; MARINI, S.; ROMANINI, D.; FARRUGGIA, B. Extraction of lipase from *Aspergillus niger* by insoluble complex formation with anionic and cationic polyelectrolytes. **Process Biochemistry**, v.47, n.12, p.2234-2239, 2012.
210. PERSSON, M.; BORNSCHEUER, U.T. Increased stability of an esterase from *Bacillus stearothermophilus* in ionic liquids as compared to organic solvents. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.22, n.1-2, p.21-27, 2003.
211. CHANG, R. **Físico química para ciências químicas e biológicas**. Porto Alegre: McGraw Hill, 2010. 447 p.
212. ANSEL, H.C.; POPOVICH, N.G.; ALLEN JÚNIOR, L.V. **Farmacotécnica: formas farmacêuticas & sistemas de liberação de fármacos**. 6.ed. São Paulo: Premier, 2000. 568 p.
213. FREITAS, A.A.; FRANCELIN, M.F.; HIRATA, G.F.; CLEMENTE, E.; SCHMIDT, F.L. Atividades das enzimas peroxidase (POD) e polifenoloxidase (PPO) nas uvas das cultivares benitaka e rubi e em seus sucos e geleias. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, v.28, n.,1, p.172-177, 2008.
214. RAMSDEN, C.A.; RILEY, P.A. Tyrosinase: the four oxidation states of the active site and their relevance to enzymatic activation, oxidation and inactivation. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.22, n.8, p.2388-2395, 2014.
215. TISS, A.; LENGSELD, H.; CARRIÈRE, F.; VERGER, R. Inhibition of human pancreatic lipase by tetrahydropipstatin: Further kinetic studies showing its reversibility. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.58, n.1-4, p.41-47, 2009.
216. KUMAR, A.; VENKATESU, P. Does the stability of proteins in ionic liquids obey the Hofmeister series? **International Journal of Biological Macromolecules**, v.63, p.244-253, 2014.
217. LIN, E.S.; KO, H.C. Glucose stimulates production of the alkaline-thermostable lipase of the edible Basidiomycete *Antrodia cinnamomea*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.37, n.2, p.261-265, 2005.
218. MAHADIK, N.D.; PUNTAMBEKAR, U.S.; BASTAWDE, K.B.; KHIRE, J.M.; GOKHALE, D.V. Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v.38, n.5, p.715-721, 2002.
219. GOODCHILD, I.; COLLIER, L.; MILLAR, S.L.; PROKES, I.; LORD, J.C.D.; BUTTS C.P.; BROWERS, J.; WEBSTER, J.R.P.; HEENAM, R.K. Structural studies of the phase, aggregation and surface behaviour of 1-alkyl-3-methylimidazolium halide + water mixtures. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.307, n.2, p.455-468, 2007.
220. ŁUCZAK, J.; JUNGnickel, C.; JOSKOWSKA, M.; THÖMING, J.; HUPKA, J. Thermodynamics of micellization of imidazolium ionic liquids in aqueous solutions. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.336, n.1, p.111-116, 2009.

Referências bibliográficas

221. PANJA, S.; MISRA, S.K.; TRIPATHI, S.C.; BINDU, M.; GANDHI, P.M. Fractionation of pure solvent components from degraded PUREX solvent using room temperature ionic liquids. **Separation and Purification Technology**, v.122, p.67-72, 2014.
222. ZHAO, H.; OLUBAJO, O.; SONG, Z.; SIMS, A.L.; PERSON, E.T.; LAWAL, R.A.; HOLLEY, L.A. Effect of kosmotropicity of ionic liquids on the enzyme stability in aqueous solutions. **Bioorganic Chemistry**, v.34, n.1, p.15-25, 2005
223. LI, N., DU, W.; HUANG, Z.; ZHAO, W.; WANG, S. Effect of imidazolium ionic liquids on the hydrolytic activity of lipase. **Chinese Journal of Catalysis**, v.34, n.4, p.769-780, 2013.
224. KLAHN, M.; GERALDINS, S.L.; SEDURAMAN, A.; WU, P. On the different roles of anions and cations in the solvation of enzymes in ionic liquids. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v.13, n.4, p.1649-1662, 2011.
225. PATEL, R.; KUMARI, M.; KHAN, A.B. Recent advances in the applications of ionic liquids in protein stability and activity: a review. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.172, n.8, p.3701-3720, 2014.
226. GAO, W.W.; ZHANG, F.X.; ZHANG, G.X.; ZHOU, C.H. Key factors affecting the activity and stability of enzymes in ionic liquids and novel applications in biocatalysis. **Biochemical Engineering Journal**, v.99, p.67-84, 2015.
227. KUMAR, A.; BISHT, M.; VENKATESU, P. Biocompatibility of ionic liquids towards protein stability: a comprehensive overview on the current understanding and their implications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.96, p.611-651, 2017.
228. AJLOO, D.; SANGIAN, M.; GHADAMGAHI, M.; EVINI, M.; SABOURY, A.A. Effect of two imidazolium derivatives of ionic liquids on the structure and activity of adenosine deaminase. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.55, p.47-61, 2013.
229. KUMAR, P.K.; JHA I.; VENKATESU, P.; BAHADUR, I.; EBENSO, E.E. A comparative study of the stability of stem bromelain based on the variation of anions of imidazolium-based ionic liquids. **Journal of Molecular Liquids**, v.246, p.178-186, 2017.
230. LANGE, C.; PATIL, G.; RUDOLPH, R. Ionic liquids as refolding additives: N'-alkyl and N'-(ω -hydroxyalkyl) N-methylimidazolium chlorides. **Protein Science**, v.14, n.10, p.2693-2701, 2005
231. GENG, F.; ZHENG, L.; YU, L.; LI, G.; TUNG, C. Interaction of bovine serum albumin and long-chain imidazolium ionic liquid measured by fluorescence spectra and surface tension. **Process Biochemistry**, v.45, n.3, p.306-311, 2010.
232. TAHA, M.; QUENTAL, M.V.; CORREIA, I.; FREIRE, M.G.; COUTINHO, J.A.P. Extraction and stability of bovine serum albumin (BSA) using cholinium-based Good's buffers ionic liquids. **Process Biochemistry**, v.50, n.7, p.1158-1166, 2015.
233. TOMÉ, L.I.N.; DOMÍNGUEZ-PÉREZ, M.; CLÁUDIO, A.F.M., FREIRE, M.G., MARRUCHO, I.M.; CABEZA, O.; COUTINHO, J.A.P. On the interactions between amino acids and ionic liquids in aqueous media. **The Journal of Physical Chemistry B**, v.113, n.42, p.13971-13979, 2009
234. RAWAT, K.; BOHIDAR, H.B. Universal charge quenching and stability of proteins in 1-Methyl-3-alkyl (Hexyl/Octyl) imidazolium chloride ionic liquid solutions. **The Journal of Physical Chemistry B**, v.116, n.36, p.11065-11074, 2012

Referências bibliográficas

235. SCHRODER, C. Ionic Liquids II. In: KIRCHNER B, PERLT E. Ionic Liquids II. Topics in Current Chemistry, v.30, Springer, Cham; 2017. Available: https://doi.org/10.1007/978-3-319-89794-3_5. Acesso: 26 mar.2019.
236. BANDRÉS, I.; MELER, S.; GINER, B.; CEA, P.; LAFUENTE, C. Aggregation behavior of Pyridinium-Based Ionic liquids in aqueous solution. **Journal of Solution Chemistry**, v.38, p.1622-1634, 2009.
237. KUMAR, A.; VENKATESU, P. A comparative study of myoglobin stability in the presence of Hofmeister anions of ionic liquids and ionic salts. **Process Biochemistry**, v.49, n.12, p.2158-2169, 2014.
238. RESLAN, M.; KAYSER, V. Ionic liquids as biocompatible stabilizers of proteins. **Biophysical Reviews**, v.10, n.3, p.781-793, 2018.
239. BLANKSCHTEIN, D.; THURSTON, G.M., BENEDEK, G.B. Phenomenological theory of equilibrium thermodynamic properties and phase separation of micellar solutions. **The Journal of Chemical Physics**, v.85, p.7268-7288, 1986.
240. MODARESSI, A.; SIFAOU, H.; MIELCARZ, M.; DOMAŃSKA, U.; ROGALSKI, M. Influence of the molecular structure on the aggregation of imidazolium ionic liquids in aqueous solutions. **Colloids and Surfaces A: physicochemical and engineering aspects**, v.302, n.1-3, p.181-185, 2007.
241. WANG, G.Y.; WANG, Y.Y.; WANG, X.H. Aggregation behaviors of mixed systems for imidazole based ionic liquid surfactant and Triton X-100. **Journal of Molecular Liquids**, v.232, p.55-61, 2017.
242. ŁUCZAK, J.; MARKIEWICZ, M.; THÖMING, J.; HUPKA, J.; JUNGnickel, C. Influence of the Hofmeister anions on self-organization of 1-decyl-3-methylimidazolium chloride in aqueous solutions. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.362, n.2, p.415-422, 2011.
243. ŠARAC, B.; MEDOŠ, Ž.; COGNIGNI, A.; BICA, K.; CHEN, L.J.; BEŠTER-ROGAČ, M. Thermodynamic study for micellization of imidazolium-based surface active ionic liquids in water: Effect of alkyl chain length and anions. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v.532, p.609-617, 2017.
244. NAUSHAD, M.; ALOTHMAN Z.A., KHAN A.B., ALI M. Effect of ionic liquid on activity, stability, and structure of enzymes: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.51, n.4, p.555-560, 2012.
245. HA, S.H; KOO, Y-M. Enzyme performance in ionic liquids. **Korean Journal Chemical Engineering**, v.28, n.1, p.2095-2101, 2011.
246. DUPLISSA, L.; ANDREESCU, S.; BALTUS R.; NJAGI, J. **10th Annual Summer Symposium on Undergraduate Research Experiences**, Clarkson University's, p.138-141, 2008.
247. LAU, R.M.; SORGEDRAGER, M.J.; CARREA, G.; RANTWIJK, F.; SECUNDO, F.; SHELDON, R.A. Dissolution of *Candida antarctica* B in ionic liquids: effects on structure and activity. **Green Chemistry**, v.9, p.483-487, 2004.
248. FREIRE, M.G.; NEVES, C.M.S.S.; MARRUCHO, I.M.; COUTINHO, J.A.P.; FERNANDES, A.M. Hydrolysis of tetrafluoroborate and hexafluorophosphate counter ions in imidazolium-based ionic liquids. **The Journal of Physical Chemistry A**, v.114, p.3744-3749, 2010.

Referências bibliográficas

249. HAGEN, R.; ROBERTS, J.D. Nuclear magnetic resonance spectroscopy. ¹³C Spectra of Aliphatic Carboxylic Acids and Carboxylate Anions. **Journal of the American Chemical Society**, v.91, n.16, p.4504-4506, 1969.
250. DONG, C.; CAMPELL, A.S.; ELDAWUD, R.; PERHINSCHI, G.; ROJANASAKUL, Y.; DINU, C.Z. Effects of acid treatment on structure, properties and biocompatibility of carbon nanotubes. **Applied Surface Science**, v.264, p.261-268, 2013.
251. SUN Y.; DING S.; HUANG H.; HU Y. Ionic liquid-based enzyme-assisted extraction of chlorogenic acid from *Flos Lonicera Japonicae*. **Bioresources Bioprocessing**. v.4, n.1, p.4-11, 2017.
252. SHEN W.; JIN Q.; LIU Y.; WANG X.; SHAN L.; LIU Y. The effect of ultrasound on lipase-catalyzed hydrolysis of soy oil in solvent-free system. **Ultrasonics Sonochemistry**. v.15, n.4, p.402-407, 2007.
253. ATTRI, P.; VENKATESU, P. Exploring the thermal stability of α -chymotrypsin in protic ionic liquids. **Process Biochemistry**, v.48, n.3, p.462-470, 2013.
254. MELGOSA, R.; SANZ, M.T.; SOLAESA, Á.G.; BUCIO, S.L.; BELTRÁN, S. Enzymatic activity and conformational and morphological studies of four commercial lipases treated with supercritical carbon dioxide. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 97, p.51-62, 2015.
255. DABIRMANESH, B.; DANESHJOU, S.; SEPAHI, A.A.; RANJBAR, B.; KHAVARI-NEJAD, R.A.; GILL, P.; HEYDARI, A.; KHAJEH, K. Effect of ionic liquids on the structure, stability and activity of two related α -amylases. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.48, n.1, p.93-97, 2011.
256. ABBYAD, P.; CHILDS, W., SHI, X.; BOXER, S.G. Dynamic Stokes shift in green fluorescent protein variants **Biophysics**, v.104, n.51, p.20189-20194, 2007.
257. FAN Y.; YAN J.; ZHANG S.; LI J.; CHEN D.; DUAN P. Fluorescence spectroscopic analysis of the interaction of papain with ionic liquids. **International Journal of Biological Macromolecules**. v.168, n.3, p.592-603, 2012.
258. YANG, J.T.; WU C.S.C., MARTINEZ H.M. Calculation of Protein Conformation from Circular Dichroism. **Methods Enzymology**, v.130, p.208-269, 1986.
259. ANDRADE, M.A.; CHACÓN, P.; MERELO, J.J.; MORÁN, F. Evaluation of secondary structure of proteins from UV circular dichroism spectra using an unsupervised learning neural network. **Protein Engineering, Design and Selection**, v.6, n.4, p.383-390, 1993.
260. ADAK, S.; DATTA, S., BHATTACHARYA, S.; BANERJEE, R. Imidazolium based ionic liquid type surfactant improves activity and thermal stability of lipase of *Rhizopus oryzae*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.119, p.12-17, 2015.
261. ZHANG, Q.; OLIVEIRA, VIGIER, K.; ROYER, S., JÉRÔME, F. Deep eutectic solvents: Syntheses, properties and applications. **Chemical Society Reviews**, v.41, n.21, p.7108-7146, 2014.
262. SCHRODER C. Proteins in Ionic Liquids: Current status of experiments and simulations. **Topics in Current Chemistry**. (Z) p.375, 2017. doi:10.1007/s41061-017-0110-2.
263. DURAND E.; LECOMTE J.; BARÉA B.; VILLENEUVE P. Towards a better understanding of how to improve lipase-catalyzed reactions using deep eutectic solvents based on choline chloride. **European Journal of Lipid Science and Technology**. v.116, n.1, p.16-23, 2014.

Referências bibliográficas

264. SCHRÖDER C.; RUDAS T.; NEUMAYR G.; BENKNER S.; STEINHAUSER O. On the collective network of ionic liquid/water mixtures. I. Orientational structure. **The Journal of Chemical Physics**. v.127, n.23, p.234503, 2007.
265. DEIVE, J.F.; RUIVO, D.; RODRIGUES, J.V.; GOMES, C.M.; SANROMÁN, M.A.; REBELO, L.P.N.; ESPERANÇA, J.M.S.S.; RODRÍGUEZ, A. On the hunt for truly biocompatible ionic liquids for lipase-catalyzed reactions. **RSC Advances**, v.5, p.3386-3389, 2015.
266. BALDWIN, R.L. How Hofmeister ion interactions affect protein stability. **Biophysical Journal**, v.71, n.4, p.2056-2063, 1996.
267. BISHT, M.; VENKATESU, P. Influence of cholinium-based ionic liquids on the structural stability and activity of α -chymotrypsin. **New Journal of Chemistry**, v.41, n.22, p.13902-13911, 2017.
268. Pereira JFB, Lima ÁS, Freire MG, Coutinho JAP. Ionic liquids as adjuvants for the tailored extraction of biomolecules in aqueous biphasic systems. *Green Chem.* 2010;12(9):1661-1669. doi:10.1039/c003578e.
269. Marcus Y. Effect of ions on the structure of water. *Pure Appl Chem.* 2010;82(10):1889-1899. doi:10.1351/pac-con-09-07-02.
270. GRABER, M.; IRAGUE, R.; ROSENFELD, E.; LAMARE, S.; FRANSON, L.; HULT K. Solvent as a competitive inhibitor for *Candida antarctica* lipase B. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, v.1774, n.8, p.1052-1057, 2007.
271. GRABER, M.; BOUSQUET-DUBOUCH, M.P.; LAMARE, S.; LEGOY, M.D. Alcoholysis catalyzed by *Candida antarctica* lipase B in a gas/solid system: Effects of water on kinetic parameters. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, v.1648, n.1-2, 24-32, 2003.
272. HARI KRISHNA, S.; KARANTH, N.G. Lipase-catalyzed synthesis of isoamyl butyrate: A kinetic study. **Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology**, v.1547, n.2, p.262-267, 2001.
273. NOMURA, D.K.; CASIDA, J.E. Lipases and their inhibitors in health and disease. **Chemico Biological Interactions**, v. 259, p.211-222, 2016.
274. BLANKMAN, J.L.; LONG, J.Z.; TRAUGER, S.A.; SIUZDAK, G.; CRAVATT, B.F. ABHD12 controls brain lysophosphatidylserine pathways that are deregulated in a murine model of the neurodegenerative disease. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America PNAS**, v.110, n.4, p.1-6, 2013.
275. GOTZ, F.; ROSENSTEIN, R. Staphylococcal lipases: Biochemical and molecular characterization. **Biochimie**, v.82, p.1005-1014, 2000.
276. GLISAN, S.L.; GROVE, K.A.; YENNAWAR, N.H.; LAMBERT, J.D. Inhibition of pancreatic lipase by black tea theaflavins: Comparative enzymology and in silico modeling studies. **Food Chemistry**, v.216, p.296-300, 2017.
277. BHATTACHARJEE S. DLS and zeta potential - What they are and what they are not? **Journal of Controlled Release**. v.235, n.10, p.337-351, 2016.
278. SUN, T.; GAO, S.; CHEN, Q.; SHEN, X. Investigation on the interactions between hydrophobic anions of ionic liquids and Triton X-114 micelles in aqueous solutions. **Colloids and Surfaces A: physicochemical and engineering aspects**, v.456, n.1, p.18-25, 2014.

Referências bibliográficas

279. PARMAR, A.; ASWAL, V.K.; BAHADUR, P. Interaction between the ionic liquids 1-alkyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate and Pluronic® P103 in aqueous solution: A DLS, SANS and NMR study. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v.97, p.137-143, 2012.
280. DALTIN, D. **Tensoativos**. São Paulo: Blucher, 2012. 327 p.
281. VENTURA P.M.; VENTURA P.M.; FREIRE M.G.; FREIRE M.G.; MARRUCHO I.M.; MARRUCHO I.M. Evaluation of anion Influence on the Formation and Extraction Capability of Ionic-Liquid-Based Aqueous Biphasic Systems. **The Journal of Physical Chemistry B**. v.113, n.27, p.9304-9310, 2009.
282. QUENTAL M.V.; CABAN M.; PEREIRA M.M.; STEPNOWSKI P.; COUTINHO J.A.P.; FREIRE M.G. Enhanced extraction of proteins using cholinium-based ionic liquids as phase-forming components of aqueous biphasic systems. **Biotechnology Journal**. v.10, n.9, p.1457-1466, 2015.
283. REKVIG, L.; KRANENBURG, M.; HAFSKJOLD, B.; SMIT, B. Effect of surfactant structure on interfacial properties. **Europhysics Letters**. v.63, n.6, p.902-907, 2003.
284. TANI, H.; SUZUKI, Y.; MATSUDA, A.; KAMIDATE, T. Enhancement of the excluded-volume effect in protein extraction using triblock copolymer-based aqueous micellar two-phase systems. **Analalytica Chimica Acta**. v.429, n.2, p.301-309, 2001. doi:10.1016/S0003-2670(00)01300-3.
285. HADZIR, M.H.; ABBASILIASI, S.; ARIFF, A.B.; YUSOFF, S-B.; SUAN NG, HUI; TAN, J.S. Partitioning behavior of recombinant lipase in: *Escherichia coli* by ionic liquid-based aqueous two-phase systems. **RSC Advances**, v.6, n.86, p.82571-82580, 2016.
286. DHAMOLE P.B.; MAHAJAN P.; FENG H. Sugaring out: A new method for removal of acetonitrile from preparative RP-HPLC eluent for protein purification. **Process Biochemistry**. v.45, n.10, p.1672-1676, 2010.