



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
Co- Orientador 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 Araújo, 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 Iraní, 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 Mcllvaine 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 Mcllvaine 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 Mcllvaine 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-Fructose, 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 SMDFA.	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 (<i>EE%</i>), razão volumétrica (<i>R_v</i>) dos SMDFA-LIs formados com Triton X-114/ 0,1% (m/m) de [C ₈ mim]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 _n mim]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
<i>g</i>	-	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 (g.mol^{-1})
m/v	-	massa/ volume
mA	-	mili amper
μL	-	microlitro
mL	-	mililitro
mg	-	miligrama
mg.mL^{-1}	-	miligrama/ mililitro
mmol.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	-	Polietilenoglicol
<i>p</i> -NPB	<i>p</i> - Nitrophenyl butyrate – C ₄	<i>p</i> - Nitrofenil butirato
<i>p</i> -NPD	<i>p</i> - Nitrophenyl decanoate - C ₁₀	<i>p</i> - Nitrofenil decanoato
<i>p</i> -NPD	<i>p</i> - Nitrophenyl dodecanoate - C ₁₂	<i>p</i> - Nitrofenil dodecanoato
<i>p</i> -NPO	<i>p</i> - Nitrophenyl octanoate - C ₈	<i>p</i> - Nitrofenil octanoato
<i>p</i> NPP	<i>p</i> -Nitrophenyl palmitate – C ₁₆	<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>	<i>4</i>
2.1 <i>Enzimas.....</i>	<i>4</i>
2.1.2 <i>Lipases.....</i>	<i>6</i>
2.2 <i>Métodos para purificação de lipases microbianas.....</i>	<i>13</i>
2.2.1 <i>Métodos tradicionais.....</i>	<i>13</i>
2.2.2 <i>Sistemas de Duas Fases Aquosas.....</i>	<i>15</i>
2.2.2.1 <i>Sistemas Micelares de Duas Fases Aquosas.....</i>	<i>17</i>
2.2.2.2 <i>Sistemas Poliméricos de Duas Fases Aquosas.....</i>	<i>18</i>
2.2.2.3 <i>Sistemas de Duas Fases Aquosas baseados em Líquidos Iônicos.....</i>	<i>19</i>
2.2.2.4 <i>Sistemas de Duas Fases Aquosas formados com carboidratos.....</i>	<i>21</i>
2.3 <i>Justificativa.....</i>	<i>21</i>
3. OBJETIVOS.....	22
3.1 <i>Objetivo geral.....</i>	<i>22</i>
3.2 <i>Objetivos específicos.....</i>	<i>22</i>
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	23
4.1 <i>Material</i>	<i>23</i>
4.2 <i>Fluxograma.....</i>	<i>30</i>
4.3 <i>Métodos analíticos.....</i>	<i>31</i>
4.3.1 <i>Dosagem de Atividade Hidrolítica.....</i>	<i>31</i>
4.3.2 <i>Síntese de Líquidos Iônicos.....</i>	<i>31</i>
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>	<i>33</i>
4.4.2 <i>Determinação do Potencial Zeta da lipase (Carga).....</i>	<i>35</i>
4.4.3 <i>Influência do pH e da temperatura.....</i>	<i>35</i>
4.5 Fase 2: Avaliação da atividade e estabilidade da lipase comercial de <i>A. niger</i>	36

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

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

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.

2. Revisão da Literatura

2.1 Enzimas

As enzimas são moléculas orgânicas³⁰, compostas de polímeros de aminoácidos unidas por ligações polipeptídicas, variando de kilodalton a megadálton em massa molecular³¹. Sua função é aumentar a velocidade das reações químicas retornando ao seu estado original sem sofrer alterações³⁰, consideradas como catalisadores biológicos³². Adicionalmente elas não modificam o equilíbrio químico das reações que participam³³ e, em organismos vivos são cruciais para a manutenção da vida, pois sem elas as reações não ocorreriam em tempo adequado³².

Algumas enzimas, para apresentar atividade catalítica, requerem a participação de um componente químico adicional denominado cofator ou coenzima³⁴. Os cofatores podem ser um ou mais íons inorgânicos como Fe^{2+} ou Fe^{3+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} ou K^+ , enquanto que a coenzima corresponde a molécula orgânica ou metalorgânica complexa³⁵. A coenzima é derivada de vitaminas e nutrientes orgânicos e atua como carreadores transitórios de grupos funcionais específicos³⁵.

O diferencial dos biocatalisadores enzimáticos quando comparado aos biocatalisadores químicos é a sua especificidade ao substrato³⁴, e em particular a régio-estereoseletividade, a qual permite a formação de produtos enantiomericamente puros³³, além de realizar as reações de catálise em condições mais suaves de temperatura e pressão³¹. Catalisadores químicos e reagentes sintéticos apresentam inúmeras desvantagens, pois requerem o uso de equipamentos de proteção individual (EPIs) devido à sua toxicidade, além de gerar produtos secundários indesejáveis³².

A especificidade das enzimas refere-se a uma região particular denominada sítio de ligação do substrato, geralmente contido na região hidrofóbica³¹, a qual contém grupos químicos particulares que se ligam ao substrato. O sítio ativo pode estar integrado no sítio de ligação, porém em alguns casos, o sítio ativo pode estar adjacente a ele na sua sequência primária de modo que ocorre o dobramento da estrutura terciária³⁰. O sítio ativo também possui grupos químicos particulares que estão envolvidos na catálise da reação, estes grupos químicos são frequentemente partes de cadeias laterais dos aminoácidos³⁰. Os substratos são os reagentes que participam das reações catalisadas pelas enzimas sendo convertidos num determinado produto, de modo que, a especificidade enzimática está relacionada não só ao substrato que atuam, bem como ao tipo de reação que catalisam³³.

Revisão da Literatura

A nomenclatura e classificação oficial das enzimas é designada pela Comissão para Enzimas (*Enzyme Commission – EC*) da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (NC-IUBMB)³⁶. Desde agosto de 2018, as enzimas estão divididas em sete classes como descrito na Tabela 1.

Tabela 1. Descrição da classificação internacional de enzimas^{35,36}.

Nº Classe	Nome da Classe	Tipo de reação
EC 1	Oxidoredutases	Transferência de elétrons
EC 2	Transferases	Transferência de grupos
EC 3	Hidrolases	Reações de hidrólise
EC 4	Liasas	Adição de grupos a duplas ligações ou remoção de grupos, deixando dupla ligação
EC 5	Isomerases	Transferência de grupos dentro de uma mesma molécula produzindo formas isoméricas
EC 6	Ligases	Condensação de duas moléculas, associada ao consumo de ATP ou cofatores similares
EC 7	Translocases	Catalisa a translocação de hidrogênios, cátions inorgânicos, ânions e seus quelatos, aminoácidos e peptídeos, carboidratos e seus derivados dentre outros compostos

Cada enzima possui um número de código com quatro elementos, precedidos das letras EC. O primeiro dígito indica a classe a que a enzima pertence, os dígitos seguintes referem-se respectivamente à subclasse, subsubclasse e finalmente a ordem das enzimas dentro de cada categoria. De acordo com a classificação internacional, a lipase é precedida pelo código EC 3.1.1.3³⁶ da classe das hidrolases.

Os aspectos legais para o uso de enzimas depende de sua aplicação e segue as normas de acordo com a legislação vigente de cada país. A regulamentação da utilização de enzimas no Brasil deve estar de acordo com as Resoluções apresentadas a seguir:

- i. Resolução RDC Nº 53 de 7/10/2014 que dispõe sobre a lista de enzimas, aditivos alimentares e veículos autorizados em preparações enzimáticas para uso na produção de alimentos em geral;
- ii. Resolução RDC Nº 54 de 7/10/2014 que dispõe sobre o regulamento técnico sobre as enzimas e preparações enzimáticas para uso na produção de alimentos em geral;

- iii. Resolução RDC n° 55 de 14/11/2012 que dispõe sobre os detergentes enzimáticos de uso restrito em estabelecimentos de assistência à saúde com indicação para limpeza de dispositivos médicos e dá outras providências;
- iv. Resolução RDC n° 40 de 05/06/2008 que aprova o regulamento técnico para produtos de limpeza e afins harmonizado no âmbito do Mercosul através da Resolução GMC n° 47/07.

De acordo com os dados do Ministério da Economia, Indústria, Comércio Exterior e Serviços (Mdic)³⁷, o Brasil apenas importa enzimas e preparações catalíticas, as quais esse denominam “enzimas preparadas”. Por exemplo, no ano de 2018, o Brasil importou um total de 18.600 mil toneladas de enzimas, correspondente a um custo de \$ 161,47 milhões de dólares³⁷.

As enzimas são utilizadas no fabrico de mais de 500 produtos com aplicações em mais de 150 processos industriais³⁸. Segundo o *British Broadcasting Corporation* (BBC) Research, o mercado global de enzimas industriais deve alcançar \$ 7,0 bilhões até 2023, de \$ 5,5 bilhões em 2018, a uma taxa de crescimento anual composta de 4,9% para o período compreendido entre 2018-2023³⁹. Esse crescimento está relacionado à demanda por produtos mais sustentáveis, como os biocombustíveis produzidos por hidrólise enzimática, bem como a demanda por alimentos funcionais com propriedades biológicas a partir de processos catalíticos³⁸.

As lipases correspondem a uma grande parte do crescimento do mercado de enzimas devido à sua ampla aplicação biotecnológica nos setores acima reportados^{38,40}. A expectativa de crescimento para o mercado das lipases é extremamente promissora, a qual deve gerar cerca de 600 milhões de dólares por ano até 2020³⁸.

2.1.2 Lipases

As lipases (EC 3.1.1.3)³⁶ pertencem a família estrutural das enzimas α/β -hidrolases^{15,41}, classificadas como glicerol éster hidrolases. Estas enzimas são estáveis em solventes orgânicos, não necessitam de cofatores e possuem elevado grau de enantio-regiosseletividade^{1,4}. Têm como função natural a hidrólise de triglicerídeos em uma interface lipídeo-água e podem ser classificadas como não regiosseletiva, originando após a hidrólise, ácidos graxos livres na posição 1, 2 e 3 e glicerol, ou como sn-1,3 regiosseletiva quando hidrolisam apenas ésteres de ácidos graxos na posição 1 e 3³. Na Tabela 2 estão descritas diferentes fontes de lipases, a seletividade ao substrato e sua regiosseletividade⁴².

Tabela 2. Seletividade e regiosseletividade de diferentes fontes de lipases⁴².

Fontes de Lipase	Seletividade ao substrato	Regiosseletividade
<i>Aspergillus niger</i>	C, M, L	1, 3 >> 2
<i>Candida lipolytica</i>	C, M, L	1, 3 > 2
<i>Humicola lanuginosa</i>	C, M, L	1, 3 >> 2
<i>Mucor javanicus</i>	M, L >> L	1, 3 > 2
<i>Rhizomucor miehei</i>	C > M, L	1 > 3 >> 2
<i>Pancreática</i>	C > M, L	1,3
<i>Pré-gástrica</i>	C, M >>L	1,3
<i>Penicillium roqueforti</i>	C, M >> L	1, 3
<i>Rhizopus delemar</i>	M, L >> C	1, 3 >> 2
<i>Rhizopus javanicus</i>	M, L > C	1, 3 > 2
<i>Rhizopus niveus</i>	M, L > C	1, 3 > 2
<i>Rhizopus oryzae</i>	M, L > C	1, 3 >>> 2
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	M, L > C	1, 3 > 2
<i>Pseudomonas sp.</i>	C, M, L	1, 3 > 2
<i>Rhizopus arrhizus</i>	C, M > L	1, 3

Ácidos graxos; C- cadeia curta; M- cadeia média; L- cadeia longa.

Em relação a sua origem, as lipases podem ser produzidas por vegetais, animais (tecidos gástrico, pancreático e hepático)¹⁴ e microrganismos (bactérias e fungos)^{15,16,17}. As lipases vegetais podem ser encontradas em cereais (nozes, arroz, feijão, tremoço, dentre outros)¹⁴, sementes oleoginosas (de aveia, de girassol, de canola, de linhaça, de amêndoa, de trigo, etc)¹⁴ e, em algumas espécies vegetais produtoras de látex^{14,43}.

Dentre as fontes citadas, as lipases microbianas quando comparadas às demais apresentam maior estabilidade, especificidade ao substrato e não apresentam flutuações sazonais⁸, o que favorece um fornecimento regular destas enzimas correspondente a sua produção de modo mais conveniente e seguro com um custo de produção inferior^{17,18}. Além

disso, sua obtenção por processos fermentativos é viável¹⁹ devido altos rendimentos e facilidade de manipulação genética.

Atualmente, existem uma série de microrganismos capazes de produzir lipases, com particular destaque para os fungos filamentosos, os quais se apresentam como bons produtores devido à sua produção extracelular, facilitando os processos de extração a partir de meios fermentados¹⁷. Adicionalmente, uma alta gama de substratos são metabolizáveis por esses microrganismos já que esses podem ser encontrados em diversos habitats como, resíduos de óleos vegetais, sementes oleaginosas, produtos lácteos e em decomposição, inclusive em solos contaminados por óleos^{20,44}.

Segundo a literatura, *Aspergillus niger* (*A. niger*) é uma das espécies mais importantes na produção de lipases para fins biotecnológicos, por serem reconhecidas pela *Food and Drug Administration* (FDA) como *Generally Recognized as Safe* (GRAS)^{17,18}. Em adição, as lipases produzidas por espécies de *Aspergillus* geralmente são sn-1,3 específicas, ou seja, liberam ácidos graxos nas posições 1 e 3², apresentando potencial para serem aplicadas, como exemplo, na síntese de lipídeos estruturados, especificamente, os triglicerídeos de cadeia média (TCM).

Os lipídeos estruturados⁴⁵ podem ser definidos como quaisquer lipídeos reestruturados por métodos químicos ou enzimáticos pela modificação da composição de seu ácido graxo e/ou pela sua posição estereoquímica na molécula de glicerol. Esses podem ser obtidos pelas reações de transesterificação empregando a lipase⁴⁵, a qual prove efeitos metabólicos específicos para fins nutritivos ou terapêuticos. Dentro desta classe, pode se destacar os triglicerídeos de cadeia média que apresentam baixo teor calórico e podem ser considerados como alimentos funcionais⁴⁶ devido auxiliarem na redução ao risco de doenças crônico-degenerativas, além de suas funções nutricionais básicas. Os TCM são constituídos de ácidos graxos de cadeia média (AGCM) nas posições sn-1 e sn-3 e ácidos graxos de cadeia longa (AGCL) na posição sn-2³, assim, os triacilgliceróis ricos em AGCM são absorvidos no duodeno mais rapidamente do que os AGCL, sendo similar a glicose. Isto ocorre, pois, os AGCM são transportados diretamente para o fígado pela circulação portal ligados à albumina, cuja ligação é mais fraca do que os AGCL, que são incorporados em lipoproteínas (quilomícrons e VLDL)⁴⁷. Desta forma, esses são rapidamente degradados pelo processo de oxidação nas mitocôndrias^{48,49}, sem a necessidade do sistema de transporte da carnitina para a entrada na matriz mitocondrial^{50,51,52}.

Dependendo da fonte de origem, a massa molecular (MM) das lipases pode variar entre 20 a 75 kDa², apresentar estabilidade em relação ao pH na faixa de 4 a 9⁴³ e em temperaturas entre 25 e 70°C². Deve-se destacar que estas enzimas possuem a capacidade única de atuar

apenas na interface lipídeo/água²⁰ o que justificaria algumas lipases apresentarem caráter hidrofóbico na área em torno do sítio catalítico.

O sítio ativo da lipase é constituído pelos resíduos de aminoácidos serina (Ser), histidina (His), glutamato (Glut) ou aspartato (Asp). A maioria das lipases tem uma tampa “*lid*” em sua superfície, que após o contato com uma superfície hidrofóbica ou na interface lipídeo/água permite a exposição do sítio ativo da enzima através da abertura da tampa (Figura 1), a qual favorece o complexo enzima-substrato, fenômeno conhecido como ativação interfacial⁵³, formando um intermédio acil-enzima^{54,55}.

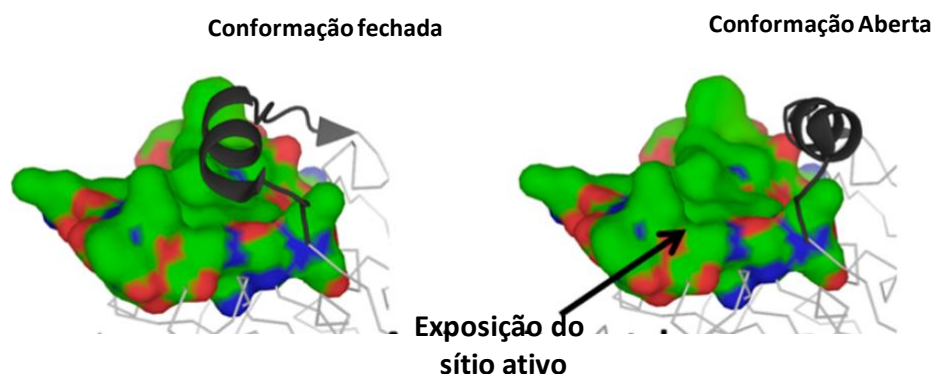


Figura 1. Modelo estrutural da lipase em sua conformação inativa (conformação fechada) e sua conformação ativa (conformação aberta)⁵³.

A tampa fica posicionada de modo que o lado hidrofílico esteja voltado para o solvente e o local hidrofóbico fique disposto em direção ao bolso do catalisador^{43,56}. Assim, a atividade hidrolítica das lipases é controlada pelo domínio da tampa⁴³. Em ambientes não aquosos, a camada hidrofóbica aciona a abertura da tampa permitindo que o substrato entre no sítio ativo^{43,56}. Contrariamente, em meios aquosos puros, as lipases apresentam-se inativas, pois as tampas estão na posição fechada e o sítio ativo encontra-se inacessível ao substrato do meio^{43,56}. É importante destacar que as lipases contém uma ou mais tampas na forma hélice⁴³ e que nem todas as lipases sofrem ativação interfacial.

No mecanismo de hidrólise de um éster catalisada pela lipase, detalhado na Figura 2, primeiramente a Ser é ativada por desprotonação com o auxílio dos resíduos de His e Asp, em seguida, o resíduo de Ser ativada ataca o grupo carbonila no substrato, formando o intermediário acil. Finalmente, um nucleófilo, que pode ser uma molécula de água ou um monoglicerídeo, ataca o intermediário acil-enzima, levando a liberação do produto e a regeneração do sítio catalítico^{54,57,58}.

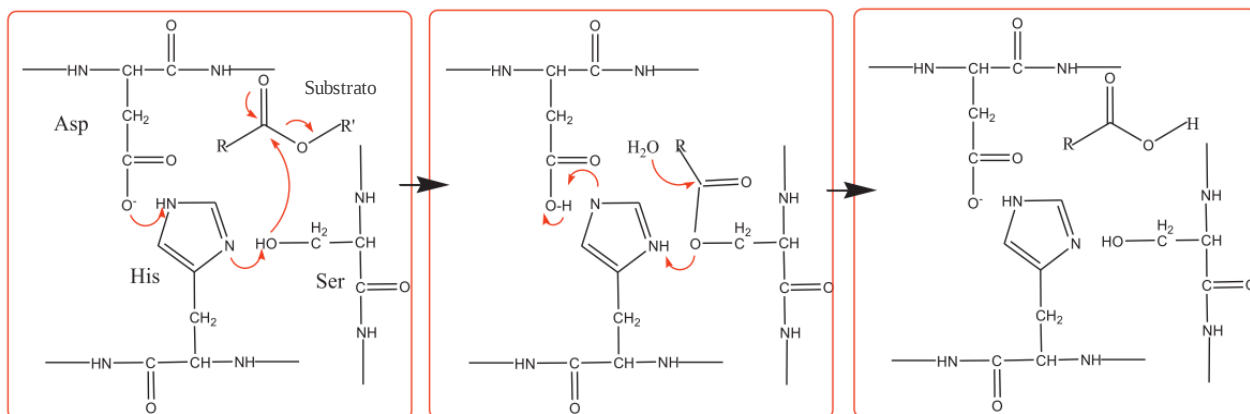


Figura 2. Mecanismo de hidrólise de ésteres catalisada pela lipase⁵⁷.

Deve-se salientar, que as lipases não só hidrolisam triglicerídeos em meio aquoso, mas possuem a capacidade de catálise reversa quando em baixas concentrações de água^{4,5}. Visto que ocorre uma reorganização dos triacilglicerídeos graças a reações de esterificação, transesterificação (interesterificação, alcóolises e acidólises) e aminólise (síntese de amidas), sendo a água substituída por um álcool, um ácido ou uma amida respectivamente (Figura 3)⁶.

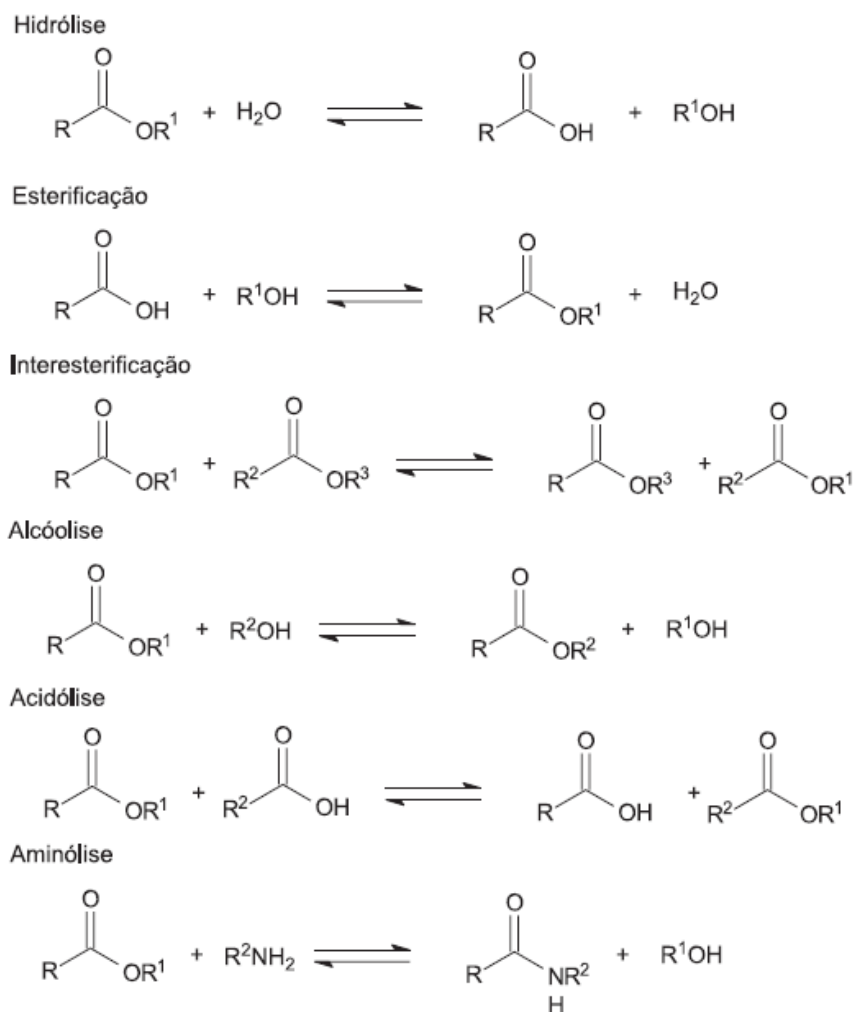


Figura 3. Reações de catálise da lipase⁶.

Devido suas características e distintas funções as lipases são empregadas em diversas áreas industriais, constituindo um dos mais importantes grupos de biocatalises com aplicações biotecnológicas⁷. Uma das mais importantes aplicações das lipases é na indústria de detergente^{8,11} com a finalidade de remoção de manchas de óleos e gorduras⁴², seguida da indústria alimentícia visando a hidrólise de óleos naturais e no excesso de lipídeos presentes nas carnes e peixes, proporcionando o flavor em bebidas e produtos de panificação^{8,10}, na fabricação de produtos lácteos como manteiga e seus derivados⁷, dentre outros.

Na indústria farmacêutica sua aplicação é destinada para a resolução de misturas racêmicas de modo a obter ingredientes ativos enantiomericamente puros^{8,9}. Na indústria de cosméticos para a produção de várias espécies de ésteres, compostos aromáticos e agentes ativos⁵⁹⁻⁶¹. Na síntese orgânica²² suas aplicações se assemelham às da indústria farmacêutica, atuando em misturas racêmicas e síntese de estruturas quirais^{8,62}.

O uso das lipases para a produção de biodiesel^{12,13} é considerada uma alternativa renovável visando um combustível ecologicamente viável⁷. As lipases são empregadas ainda, na degradação biológica e remoção de carga lipolítica de efluentes industriais^{8,63,64}, auxiliando na limpeza da tubulação. Estas enzimas também estão envolvidas em diversas etapas do metabolismo lipídico e lipoprotéico em organismos eucariotos, como: digestão da gordura, absorção e reconstituição^{20,65}.

No entanto, a área de aplicação que tem ganho destaque é a síntese de lipídeos estruturados⁶⁶⁻⁶⁸, devido aos efeitos benéficos no metabolismo, os quais apresentam propriedades medicinais e funcionais³. Na Tabela 3 estão destacadas algumas das aplicações e os tipos de reações bioquímicas catalisadas especificamente pela lipase de *Aspergillus niger*.

Tabela 3. Diferentes aplicações e tipos de reações catalisadas pela lipase de *Aspergillus niger*.

Aplicação Biotecnológica	Reação	Referências
Síntese de Enantiômeros	Esterificação	69
Tratamento de efluentes	Hidrólise	70
Lipídeos estruturados	Acidólise	71-73
Lipídeos estruturados	Glicerólise	74
Biodiesel	Transesterificação	75-78
Alimentícia	Interesterificação	79
Alimentícia	Hidrólise	80
Farmacêutica	Acilação	81
Síntese orgânica	Síntese	82,83

O custo comercial das lipases é muito variável, sendo a lipase pancreática suína de menor valor agregado em torno de US\$ 0,87/100 unidades (U) de atividade enquanto que para lipase de *Candida antártica* o valor chega à 5.000,00/100 U, ambas da empresa Sigma-Aldrich^{®38}. A diferença no custo é resultado não apenas das características da enzima, mas principalmente, pelo processo de obtenção, extração, rendimento e necessidade de purificação pertinentes às distintas aplicações³⁸. Por exemplo, as aplicações nas áreas de química fina e cosméticos requerem extratos mais puros de alta atividade enzimática, restringindo o número

de lipases passíveis de serem utilizadas, além de ter um alto custo devido as inúmeras etapas de purificação³⁸. Por outro lado, aplicações mais simples que requerem apenas a modificação de azeite emulsificado, *i.e.*, não necessitam de extratos tão concentrados, necessitando assim de menor grau de pureza³⁸.

Diante do exposto, há um mercado para aplicação de lipases e um incremento em sua produção pode estimular a procura por métodos de extração mais sustentáveis e biocompatíveis. Considerando a produção de enzimas hidrolíticas, quando estas são oriundas de processo fermentativo, o meio fermentado apresenta uma série de compostos contaminantes para a enzima de interesse, tais como outras proteínas. Logo, é imprescindível o emprego de métodos que propicie a integração das etapas de extração e purificação de lipases do meio fermentado de modo a assegurar altos rendimentos sem perdas de enzimas durante os processos de extração e concentração, viabilizando ainda, uma possível purificação.

2.2 Métodos para purificação de lipases microbianas

2.2.1 Métodos tradicionais

Não existem protocolos definidos que garantam a purificação da lipase a partir de meio fermentado. Geralmente, esses processos consistem em múltiplas etapas afim de remover a biomassa e os compostos insolúveis para a seguir, extrair, concentrar e finalmente, purificar a molécula de interesse^{20,5}. Esses processos geralmente iniciam com uma filtração^{84,85} e/ou centrifugação⁸⁵⁻⁸⁷ para remoção da biomassa seguida por precipitação utilizando sulfato de amônio^{9,87-89} ou ainda usando sistemas micelares reversos com solventes orgânicos^{90,91}. Assim, a lipase é concentrada e, ao mesmo tempo, parcialmente purificada. Contudo, a precipitação usando sulfato de amônio ou outros solventes orgânicos podem afetar a atividade das lipases⁹². Essas técnicas apresentam baixa resolução resultando em baixo grau de pureza.

Para obter uma enzima com maior grau de pureza é necessário uma combinação de técnicas cromatográficas, as quais podem ser por cromatografia de troca iônica^{93,94}, cromatografia de interação hidrofóbica⁹⁵, cromatografia de afinidade⁹⁶ e cromatografia por exclusão molecular^{9,94,97}, obrigando a um maior investimento de capital devido ao alto custo destas técnicas. Na Tabela 4 estão descritos os métodos combinados para obter maior grau de pureza e o rendimento alcançado para distintas lipases microbianas.

Revisão da Literatura

Tabela 4. Combinação dos métodos empregados para purificação de distintas lipases microbianas.

Microorganismo	Métodos de Purificação	Fator de Purificação	Rendimento (%)	Referências
<i>Acinetobacter baylyi</i>	Precipitação com sulfato de amônio; Sephadex G-75	21,89	14	88
<i>Aneurinibacillus thermoaerophilus</i> HZ	Q-sepharose; Sephadex G-75	15,6	20	94
<i>Bacillus pumilus</i> HF544325	Precipitação com sulfato de amônio; Sephacryl S-200; Mono S Sepharose	210	_*	87
<i>Bacillus subtilis</i> NS 8	Ultrafiltração; DESE-Toyopearl 650M; Sephadex G-75	500,0	16	84
<i>Bacillus stearothermophilus</i> MC 7	Ultrafiltração; Sephadex G-200; DEAE- Sepharose	19,25	10	98
<i>Bacillus</i> sp.	Precipitação com sulfato de amônio; Sepharose CL-4B	5,1	11	93
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ultrafiltração; DEAE - Sephadex A50	25,5	46	86
<i>Ralstonia</i> sp. CS274	Precipitação com sulfato de amônio; Fenil Sepharose CL-4B	20,8	4	85
<i>Staphylococcus aureus</i>	Ultrafiltração; Fenil-Sepharose; Superose 12	6,76	20	99
<i>Staphylococcus</i> sp.	Precipitação com sulfato de amônio; Sephacryl S-200	24,0	-	89
<i>Aureobasidium pullulans</i> HN2.3	Precipitação com sulfato de amônio; Sephadex G-75; DEAE- Sephafore	3,4	5	100
<i>Aspergillus terreus</i> NCFT 4269.10	Precipitação com sulfato de amônio; Sephadex G-100	2,56	8	9
<i>Geotrichum candidum</i>	Precipitação com sulfato de amônio; DEAE- Sephadex G-200; Sephadex G-100	7,76	18	101
<i>Mortierella alliacea</i> YN-15	Precipitação com acetona DEAE- Sephafore; Superdex 200	6,2	4	102
<i>Rhizopus oryzae</i>	Precipitação com sulfato de amônio; Sulfopropil-Sepharose; Sephadex G-75; Sulfopropil Sephafore	1260,0	22	103
<i>Schizophyllum commune</i> ISTL04	Precipitação com sulfato de amônio; Superdex 200	35,76	37	44
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Precipitação com acetona; Sepharose Q; Butil Sepharose	26,5	23	104

<i>Pichia lynferdii</i> Y-7723	Sephacryl S-200; DEAE-Sephadex	33,10	0,3	105
--------------------------------	--------------------------------	-------	-----	-----

*valor de Rendimento (%) não citado no artigo

Como alternativa às técnicas acima reportadas, os processos de extração líquido-líquido (ELL) têm sido desenvolvidos e avaliados na recuperação primária e purificação parcial de uma ampla variedade de bioprodutos, dentre eles, proteínas^{28,106,107}, enzimas^{108–110}, colorantes naturais^{111–113}, antioxidantes^{114,115}, vírus^{116,117}, além de células^{118,119} e anticorpos monoclonais^{120,121}.

A ELL é baseada no processo de transferência de um soluto de uma fase líquida para uma segunda fase líquida e parcialmente miscível^{28,122–124}. A eficiência desse tipo de extração depende de vários fatores²⁸ como: i) da afinidade do soluto pelo solvente extrator; ii) da razão das fases; iii) do número de etapas de extração; iv) do comprimento da linha de amarração²⁷; v) do pH¹²⁵; vi) da temperatura¹²⁶; vii) da adição de moléculas neutras e/ou carregadas que podem ser usadas para modificar o caráter de particionamento da biomolécula²⁴.

A técnica de ELL empregando solventes orgânicos é uma das mais utilizadas em escala industrial, porém o uso de solventes orgânicos apresenta algumas limitações para aplicação em larga escala, tanto na biocompatibilidade com uma grande variedade de biomoléculas, bem como, em problemas ambientais relacionados com a eliminação de resíduos e contaminação atmosférica¹²⁷. Considerando essas preocupações ambientais e a estabilidade de biomoléculas frente aos solventes orgânicos, técnicas alternativas como a ELL utilizando sistemas de duas fases aquosas (SDFA) tem sido largamente estudada para extrair/purificar moléculas biológicas^{23–27}.

2.2.2 Sistemas de Duas Fases Aquosas

Os SDFA são sistemas de ELL formados em solução aquosa, e por isso se apresentam como mais biocompatíveis e ambientalmente mais favoráveis do que outras técnicas^{28,29}, pois não necessitam do uso de solventes orgânicos para promover uma região de imiscibilidade, e são ainda relativamente mais simples e de baixo custo, quando comparado as técnicas cromatográficas, por exemplo^{128,129}. Comparativamente, os SDFA se mostram superiores aos sistemas tradicionais de ELL formados por solventes orgânicos, pois vários agentes formadores de SDFA como, tensoativos e LIs¹³⁰, podem favorecer a exposição do sítio ativo de lipases contribuindo para um aumento da atividade hidrolítica.

O SDFA pode ser selecionado 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 iônicas e hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e/ou outras interações não covalentes²⁷. Por exemplo, se o objetivo é particionar moléculas apolares de polares, pode-se selecionar um componente para o sistema com características mais apolares, fazendo com que ocorra forte interação entre a biomolécula-alvo e o agente formador da fase.

O SDFA é representado por um diagrama de fases cuja curva binodal, também denominada como curva de equilíbrio, discrimina a concentração que separa as regiões monofásica e bifásica¹³¹. Assim, composições nas regiões bifásicas devem ser selecionadas para formar um SDFA²⁷. Em geral, no diagrama de fases, o eixo das ordenadas representa o constituinte rico na fase superior, enquanto o eixo das abcissas representa o constituinte rico na fase inferior^{27,131} (Figura 4). A linha de amarração permite determinar a composição da fase coexistente devido à diferença entre a razão volumétrica ou mássica das fases²⁷. Inicialmente, a linha de amarração é a mesma para ambas as fases, superior e inferior, mas a composição global do sistema pode alterar a relação de volume²⁷.

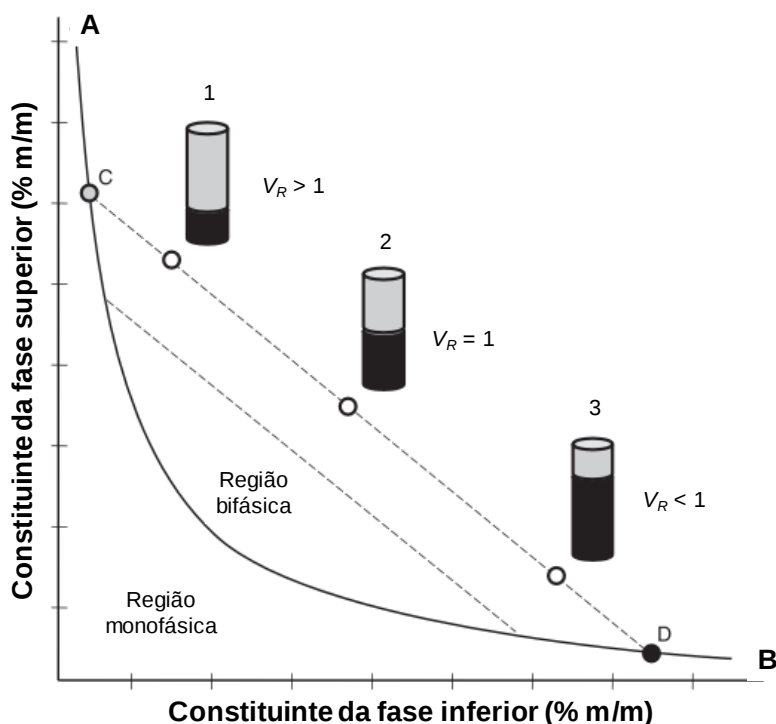


Figura 4. Representação esquemática de um diagrama de curva binodal. Concentrações acima da curva binodal (linha A-B) reproduzem Sistema de Duas Fases Aquosas que são caracterizados pelos parâmetros como o comprimento da linha de amarração (linha C-D) e a razão volumétrica (V_R)²⁷.

Dentre os SDFA pode-se citar: Sistemas Micelares de Duas Fases Aquosas (SMDFA) formados por tensoativos; Sistemas Poliméricos de Duas Fases Aquosas (SPDFA) formados por dois polímeros ou um polímero e um sal; e os SDFA baseados em Líquidos Iônicos (SDFA-LIs). Além desses, importa destacar os sistemas que utilizam os LIs como adjuvantes ou co-tensoativos em SPDFA e SMDFA.

2.2.2.1 Sistemas Micelares de Duas Fases Aquosas

O SMDFA é formado por tensoativos (também designados como surfactantes). Os tensoativos são moléculas anfifílicas, que possuem uma parte hidrofóbica referente à cauda e uma parte hidrofílica referente à cabeça. Essas moléculas podem ser classificadas como aniônicas, catiônicas, não iônicas ou zwitteriônicas (com cargas positivas e negativas)¹³² de acordo com as suas características estruturais¹³³.

Os tensoativos podem apresentar comportamentos distintos em solução aquosa em função de sua concentração. Em concentrações acima da concentração micelar crítica (CMC) formam agregados conhecidos como micelas, na qual as caudas hidrofóbicas migram para o interior enquanto que as cabeças hidrofílicas permanecem na superfície exterior, de modo a minimizar e maximizar o seu contato com a água, respectivamente^{134,135}.

O processo de separação de fases em SMDFA é altamente dependente da temperatura, por isso, a construção das curvas binodais é geralmente realizada em função da temperatura. Assim, o fenômeno de separação é induzido pelo aumento da temperatura em determinada concentração de surfactante, de modo que uma solução micelar aquosa homogênea se separa em duas fases parcialmente imiscíveis^{133,136}, onde uma das fases apresentará uma maior concentração de micelas do que a outra^{28,134}, como ilustrado na Figura 5.

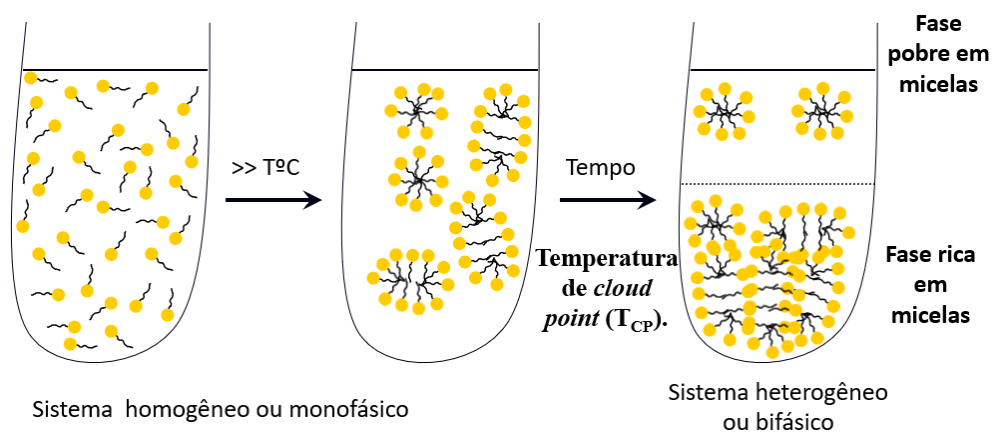


Figura 5. Representação esquemática da separação de fases de uma solução micelar. Uma solução micelar homogênea pode separar-se em duas fases parcialmente imiscíveis com o aumento da temperatura. Ambas as fases contêm micelas, porém na fase rica em micelas (fase inferior), estas são maiores e em maior número comparada a fase pobre em micelas (fase superior). A temperatura na qual ocorre a separação de fases é denominada temperatura de *cloud point* (T_{CP}). Adaptado de Liu et al. (1998)²⁸.

A temperatura na qual ocorre a separação de fases é denominada como ponto de nuvem, também conhecida como temperatura de *Cloud Point* (T_{CP})¹³³. Todo o processo é dependente da concentração e estrutura do agente tensoativo, da presença de aditivos, da força iônica e pH, parâmetros que podem influenciar no tamanho e na forma do agregado micelar^{28,133}. O comportamento de separação de fases resulta da competição entre os efeitos entálpicos que promovem a separação das micelas da água e os efeitos entrópicos, que promovem a miscibilidade das micelas na água^{134,136}. A diferença entre os ambientes físico-químicos nas fases micelares formam a base para uma separação efetiva e torna o SMDFA um método conveniente e potencialmente útil para a separação, concentração e purificação de biomoléculas¹²⁶.

Esse tipo de sistema tem sido utilizado com êxito na separação de biomoléculas, devido à sua capacidade de manter inalteradas as suas atividades biológicas e/ou conformações nativas²⁸. Ademais, os SMDFA auxiliam também na solubilização de moléculas hidrofóbicas, minimizando a sua degradação e aumentando a biodisponibilidade destas¹²⁴.

2.2.2.2 Sistemas Poliméricos de Duas Fases Aquosas

Os SP DFA são formados por dois polímeros quimicamente diferentes como exemplo, dextrana (DEX), polipropilenoglicol (PPG), polietilenoglicol (PEG), poliacrilato de sódio (NaPA), ou um polímero e um sal (fosfato, sulfato e citrato). Nestes sistemas, as combinações de polímeros e/ou polímero-sal são preparadas acima de concentrações críticas visando a

formação de duas fases imiscíveis, cujo principal componente é a água distribuída entre ambas as fases de equilíbrio. Como em outros SDFA, a alta concentração de água em ambas as fases, permite o aumento da estabilidade de várias biomoléculas durante o processo de migração de soluto¹²⁴. Os SPDFA são na sua maioria seguros, atóxicos, não-inflamáveis e biocompatíveis¹³⁷. Dentre os polímeros mais utilizados, o PEG é largamente o mais aplicado^{129,124,138,24}, visto que este é um polímero aprovado para consumo pelo FDA¹³⁹, e apresenta um carácter inerte e biodegradável¹²⁹.

Uma das principais diferenças entre os sistemas polímero-polímero e polímero-sal se refere a força iônica. No sistema utilizando dois polímeros a força iônica é menor, logo esses sistemas são preferencialmente empregados para a separação, recuperação e purificação de solutos extremamente sensíveis a ambientes iônicos, bem como células viáveis e organelas sensíveis ao choque osmótico. Esses sistemas apresentam maior viscosidade, maior tempo para separação de fases¹⁴⁰, além disso, são mais caros o que pode ser um fator limitante para seu uso em escala industrial²⁶. O sistema polímero-sal apresenta a força iônica elevada na fase rica em sal, sendo este amplamente utilizado para proteínas²⁷, especificamente proteínas ativas biologicamente¹⁴¹ e enzimas^{142,143}.

2.2.2.3 Sistemas de Duas Fases Aquosas baseados em Líquidos Iônicos

Embora largamente estudados nas últimas décadas, SMDFA e SPDFA apresentam algumas limitações relativa à gama de polaridade e de hidrofobicidade das fases e de sua incapacidade de separar seletivamente solutos similares. Para ultrapassar algumas dessas limitações, em 2003, Rogers e seus colaboradores desenvolveram um novo tipo de SDFA baseados em LIs^{144,111}.

Os LIs são sais orgânicos com características únicas como, elevada estabilidade térmica e química, elevada força de solvatação e baixo ponto de fusão^{145,146}. O ponto de fusão¹⁴⁷ está relacionado a simetria dos íons, interações de van der Waals e ligações de hidrogênio. O tamanho dos íons também influencia no ponto de fusão, assim, quanto maior o cátion e/ou ânion menor será o ponto de fusão¹⁴⁸ dos LIs. Desta forma, a troca de um cátion inorgânico pequeno por um cátion orgânico volumoso, *i.e.*, confere ao LI um baixo ponto de fusão¹⁴⁸. Os LIs apresentam ainda, características como não inflamáveis e volatilidade insignificante quando comparado aos solventes orgânicos voláteis^{149,150}.

Dentre as famílias mais estudadas, se destaca a família das colinas, a qual inclui LIs derivados dos sais de quaternários de amônio, e que são geralmente consideradas como ‘solventes ambientalmente mais benignos’. Alguns destes LIs, como o cloreto de colina, são

utilizados como precursores para a síntese de vitaminas e enzimas que participam do metabolismo de carboidratos¹⁵¹.

Uma das principais vantagens da aplicação de LIs para a formação de SDFA é a possibilidade de ajuste de suas propriedades físico-químicas pela combinação do par cátion/ânion mais adequado^{146,152}. Ademais, os LIs podem ainda permitir uma separação de fases mais rápida¹⁴⁹ e uma alta eficiência de extração, obtida pela seleção adequada dos íons que compõem um dado sal ou LI^{146,152}. Assim, ao alterar as combinações cátions e ânions pode-se modificar não somente a polaridade das fases, mas também a solubilidade de substratos¹⁵², possibilitando maior seletividade, atividade e estabilidade enzimática^{152,130}.

Os LIs podem ser totalmente miscíveis ou imiscíveis em solução aquosa dependendo do cátion/ânion utilizado¹³⁰, visto que isto influencia no efeito da hidrofobicidade do sistema. Desta forma, é possível condicionar o sistema visando um melhor particionamento da molécula alvo. Além de formar os SDFA-LIs, os LIs podem ser ainda empregados como adjuvantes ou co-tensoativos em SMDFA¹⁴⁵, ou adjuvantes em SPDFA^{115,114,153}.

Os LIs de cadeia alquílica longa (superior a 8 carbonos) são considerados moléculas anfifílicas possuindo um caráter de autoagregação^{130,154} semelhantes a tensoativos. Esse comportamento já foi descrito para três famílias distintas, a saber, os imidazólios, os fosfônios e os quaternários de amônio¹⁴⁵. Assim, a presença de LIs como aditivo em SMDFA pode favorecer a formação de agregados micelares em soluções aquosas e contribuir para a alteração das propriedades físico-químicas das micelas¹⁵⁵. A adição de LIs juntamente com um tensoativo pode diminuir ou aumentar a CMC e afetar o número de agregados, visto que pode ocorrer a formação de micelas mistas^{154,156}. Esse fenômeno depende das características estruturais dos LIs empregados, tais como cadeias laterais alquílicas, cátion/ânion e também o grupo da cabeça do tensoativo^{145,154}. A formação de autoagregados de LIs com cadeias longas pode alterar a aptidão de formação de SDFA, mostrando um forte impacto na partição de biomoléculas e em sua purificação²².

Por outro lado, nos SPDFA, a presença de LIs pode alterar as polaridades das fases coexistentes por meio do ajuste adequado de sua estrutura química. Nesses sistemas, o comprimento da cadeia alquílica dos LIs pode acarretar em alterações nos valores do coeficiente de partição devido ao ajuste da polaridade da fase rica em polímero, aprimorando a eficiência de extração^{115,153}.

2.2.2.4 Sistemas de Duas Fases Aquosas formados com carboidratos

Em 2008, os SDFA formados com carboidratos surgiram como plataformas de extração de biomoléculas por apresentarem características de *sugaring-out*¹⁵⁷, tornando assim, os carboidratos potenciais substitutos de sais inorgânicos¹⁵⁸ em SDFA, precisamente, em SDFA-LIs^{159–161}. *Sugaring-out* refere-se à capacidade de formar ligações de hidrogênio com a água, devido possuir vários grupos hidroxila com um caráter duplo de aceptor/doador, efeito semelhante causado pelo *salting-out* que ocorre em altas concentrações de sais, porém com ambiente mais favorável para as biomoléculas¹⁵⁸.

Adicionalmente, os carboidratos possuem vantagens por serem uma matéria-prima renovável, biodegradáveis, não carregados e não tóxicos¹⁶⁰. Na literatura encontram-se alguns diagramas de fases^{162–164} disponíveis para aplicação de SDFA com carboidratos, porém, ainda são poucos os estudos que exploram esse tipo de extração^{158,160,161,165}.

Os carboidratos também denominados como hidratos de carbono ou glicídeos são polihidroxialdeídos ou poliidroxicetonas^{113,166}, pois apresentam em sua estrutura química os grupos funcionais aldeídos ou cetonas, respectivamente, unidos por ligações hemiacetálicas ou glicosídicas. Considerados como moléculas altamente polares devido apresentarem os grupos hidroxilas em sua estrutura, são capazes de fazer interações por ligações de hidrogênio, formando o complexo carboidrato-proteína¹⁶⁷. Assim, os carboidratos podem apresentar rotas mais biocompatíveis para a extração de lipases tornando-se um sistema inovador.

2.3 Justificativa

Visto a importância da aplicação das lipases em distintas áreas biotecnológicas, e a necessidade de empregar mais de uma etapa para extrair, concentrar e por fim purificar as lipases, é de suma importância estudar uma plataforma para extração de lipases de meio fermentado, a qual permita maior eficiência de extração e consequentemente altos rendimentos. Desta forma, a proposta do trabalho foi avaliar a capacidade de diferentes SDFA na extração e purificação da lipase microbiana comercial de *Aspergillus niger* e posterior da lipase presente em meio fermentado de *Aspergillus* sp.

3.OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O objetivo do trabalho foi avaliar a extração de lipase microbiana comercial empregando extração líquido-líquido por sistemas de duas fases aquosas.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a atividade e estabilidade da lipase microbiana comercial frente aos diferentes agentes formadores dos SDFA;
- Avaliar a extração e separação da lipase microbiana comercial empregando os diferentes SDFA, especificamente, SMDFA empregando LIs como adjuvantes e SPDA empregando carboidrato;
- Avaliar a extração da lipase de *Aspergillus* sp. produzida em meio fermentado utilizando o SDFA com melhor capacidade de recuperação de lipase comercial.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

A lipase de *Aspergillus* sp. foi produzida em meio fermentado e caracterizada pelo nosso grupo de pesquisa¹⁶⁸ e gentilmente cedido para a contribuição do estudo.

A lipase microbiana comercial de *A. niger* (lote: SLBL 2143V), o substrato *p*-Nitrofenil Palmitato (pNPP) (lote: SLBK6286V), o tensoativo não-iônico (1,1,3,3,- tetrametil-butil) polietilenoglicol fenil (Triton X-114), os polímeros Polietilenoglicol (PEG), Polipropilenoglicol (PPG) e Poliacrilato de sódio (NaPA), o carboidrato D-Xilose, o cloreto de colina ([Ch]Cl) e os LIs da família dos amônios, nomeadamente brometo-tetradecil-trimetil-amônio ([N_{1,1,1,14}]Br) e brometo-cetil-trimetil-amônio ([N_{1,1,1,16}]Br), e os LIs da família dos piridínios, cloreto-1-hexadecil-piridínio ([C₁₆py]Cl) foram adquiridos da Sigma Aldrich™.

Os LIs da família das colinas, acetato de colina ([Ch][Ac]), propanoato de colina ([Ch][Prop]), butanoato de colina ([Ch][But]), pentanoato de colina ([Ch][Pent]) e hexanoato de colina ([Ch][Hex]), líquidos a temperatura ambiente, foram sintetizados no laboratório do Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP, Araraquara/ SP. Os LIs decanoato de colina ([Ch][Dec]), tetradecanoato de colina ([Ch][Tetrad]) e dibrometo 3-(1-tetradecil-3-hexilimidazólio)-1-tetradecil-imidazólio ([C₁₄Im-6-C₁₄Im]Br₂), sólidos a temperatura ambiente, foram sintetizados na Universidade de Aveiro em Aveiro, Portugal.

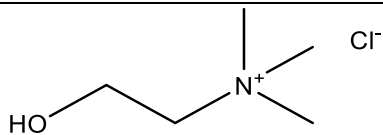
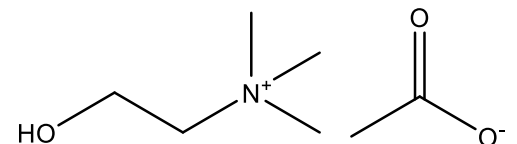
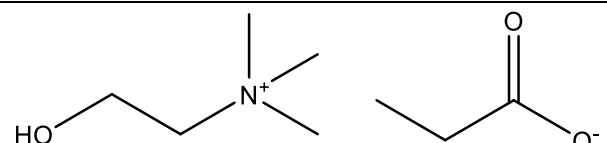
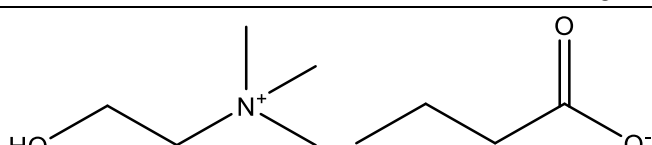
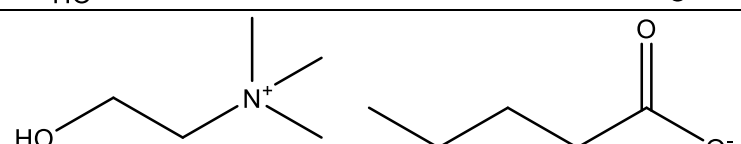
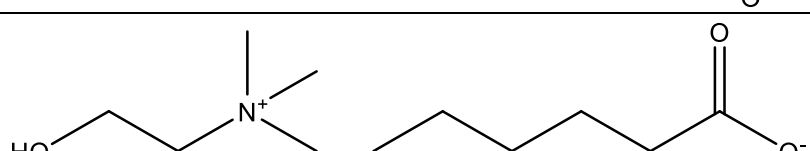
Os LIs da família dos imidazólios, cloreto-1- butil-3-metilimidazólio ([C₄mim]Cl), cloreto-1- hexil-3-metilimidazólio ([C₆mim]Cl), cloreto-1- octil-3-metilimidazólio ([C₈mim]Cl), cloreto-1-decil-3-metilimidazólio ([C₁₀mim]Cl) e cloreto-1- dodecil- 3-metilimidazólio ([C₁₂mim]Cl) foram adquiridos IOLITEC (Heilbronn, Alemanha). Os carboidratos D-Fructose e D-Sacarose foram adquiridos da LS Chemicals, enquanto, que o carboidrato D- Manose foi adquirido da Fisher BioReagents. A Tabela 5 mostra a pureza, estrutura química e abreviatura de cada um dos LIs empregados no presente trabalho. Na Tabela 6 é apresentada a pureza, estrutura química e abreviatura dos tensoativos e polímeros e na Tabela 7 apresentada a pureza e estrutura química dos carboidratos empregados neste trabalho.

Os tampões utilizados foram: tampão McIlvaine composto pelo ácido cítrico 0,1 M e fosfato dissódico (Na₂HPO₄) 0,2 M, o tampão Tris-HCl (50 mM) composto pelo tris-hidroximetil-aminometano 0,2 M e HCl 0,2 M e o tampão Sörensen composto pelo fosfato dissódico (Na₂HPO₄) 0,06 M e fosfato de potássio monobásico (KH₂PO₄) 0,06 M. A água

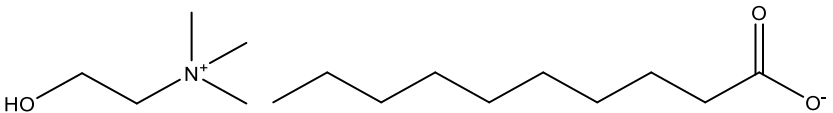
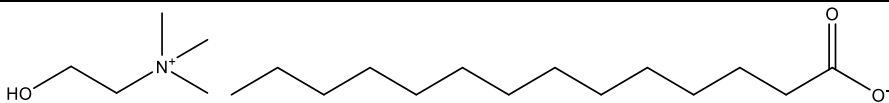
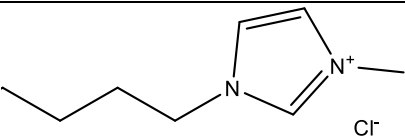
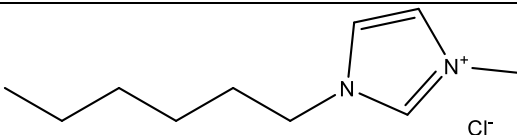
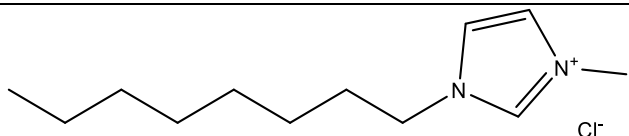
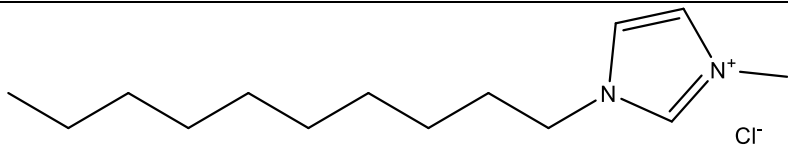
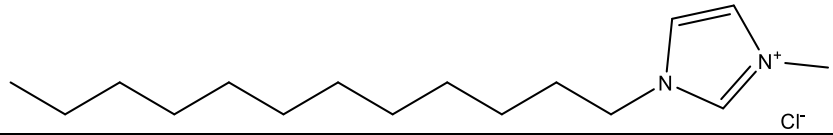
Material e Métodos

utilizada para o preparo das soluções foi água ultrapura Milipore e, os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

*Material e Métodos***Tabela 5.** Família, nome, abreviatura, estrutura química e pureza dos LIs estudados.

Família	Nome	Abreviatura	Estrutura química	Pureza (% m/m)
[Ch]X	Cloreto de colina	[Ch]Cl		≥98
	Acetato de colina	[Ch][Ac]		99
	Propanoato de colina	[Ch][Prop]		95
	Butanoato de colina	[Ch][But]		98
	Pentanoato de colina	[Ch][Pent]		96
	Hexanoato de colina	[Ch][Hex]		89

Material e Métodos

	Decanoato de colina	[Ch][Dec]		98
	Tetradecanoato de colina	[Ch][Tetradec]		98
[C _n mim]Cl	Cloreto 1- butil- 3- metilimidazólio	[C ₄ mim]Cl		≥98
	Cloreto 1- hexil- 3- metilimidazólio	[C ₆ mim]Cl		≥98
	Cloreto 1- octil- 3- metilimidazólio	[C ₈ mim]Cl		≥98
	Cloreto 1- decil- 3- metilimidazólio	[C ₁₀ mim]Cl		≥98
	Cloreto 1- dodecil- 3- metilimidazólio	[C ₁₂ mim]Cl		≥98

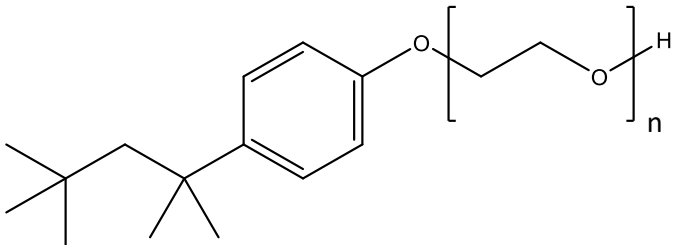
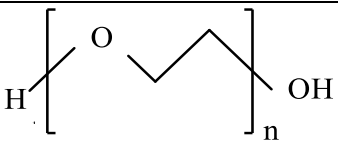
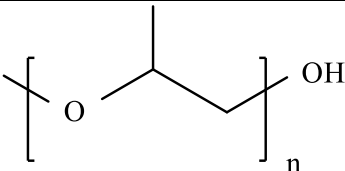
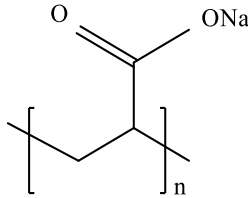
Material e Métodos

Imidazólio	Dibrometo 3-(1-tetradecil-3- hexilimidazolio)-1- tetradecilimidazólio	$[C_{14}Im-6-ImC_{14}]Br_2$		≥ 99
Amônios	Brometo tetradecil-trimetil amônio	$[N_{1,1,1,14}]Br$		≥ 99
	Brometo cetiltrimetil amônio	$[N_{1,1,1,16}]Br$		≥ 98
Piridínio	Cloreto hexadecil piridínio	$[C_{16}py]Cl$		≥ 99

*As estruturas químicas foram construídas utilizando o programa ChemDraw Professional.

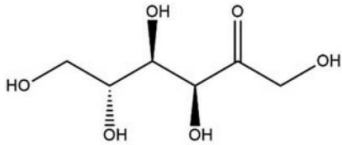
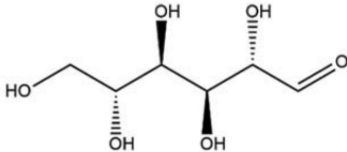
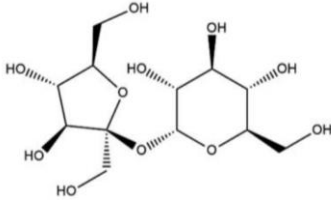
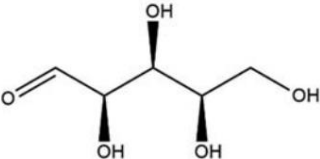
Material e Métodos

Tabela 6. Nome, abreviatura, estrutura química e pureza de tensoativos e polímeros estudados.

Nome	Abreviatura	Estrutura química	Pureza (% m/v)
(1,1,3,3,- Tetrametilbutil) polietileno glicol fenil	Triton X-114		100
Polietilenoglicol	PEG 600		100
Polipropilenoglicol	PPG 400 PPG 425 PPG 725		100
Poliacrilato de sódio	NaPA 8.000		45,0 % (m/v) em água

*As estruturas químicas foram construídas utilizando o programa ChemDraw Professional.

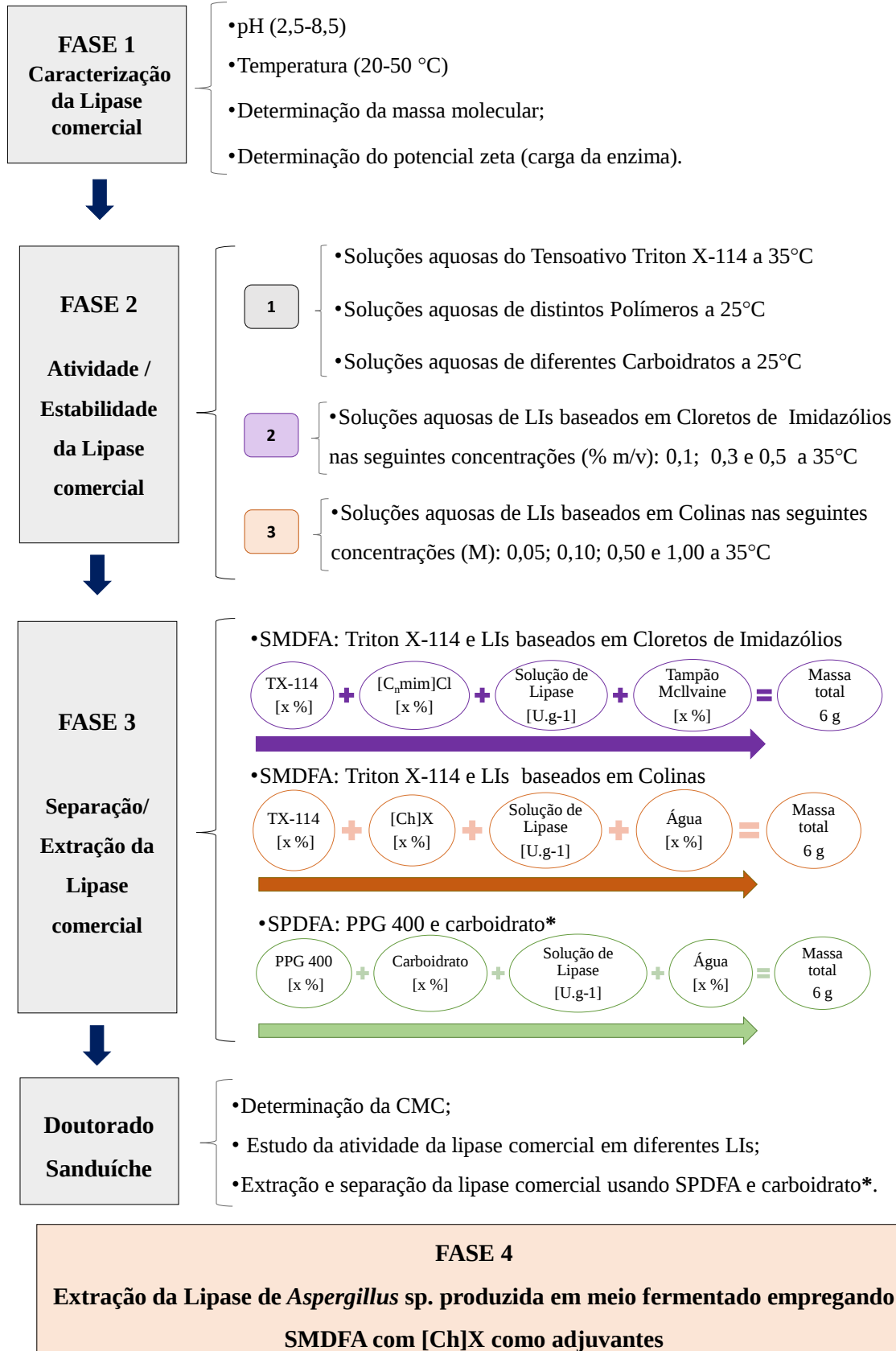
Tabela 7 . Nome, abreviatura, estrutura química e pureza dos carboidratos estudados.

Nome	Abreviatura	Estrutura química	Pureza (% m/v)
D- Frutose	Frutose		99
D- Manose	Manose		≥99
D- Sacarose	Sacarose		99
D- Xilose	Xilose		≥99

*As estruturas químicas foram adaptadas do artigo Santos et al. (2018)¹¹³

4.2 Fluxograma

Para facilitar a compreensão dos métodos empregados, a seguir é apresentado um fluxograma com todas as etapas detalhadas.



4.3 Métodos analíticos

4.3.1 Dosagem de Atividade Hidrolítica

A atividade enzimática da lipase foi determinada utilizando *p*-Nitrofenil-Palmitato (pNPP) como substrato. A mistura reacional consistiu em 205 µl de uma solução com a seguinte composição: 200 mg de Triton X-100, 50 mg de Goma Arábica em 50 mL de tampão Tris- HCl 50 mM em pH 6,5, 45 µl de substrato (15 mg de pNPP em 10 mL de isopropanol) e 250 µl de solução enzimática. A mistura foi incubada a 40°C durante 30 min e em seguida, foram adicionados 500 µl de Trizma base 2% (m/v). O produto da reação *p*-nitrofenol foi avaliado pela medida de absorbância a 398 nm em leitor de placas (espectrofotômetro Multimode Plate Reader, Perkin Elmer, EUA). Uma unidade (U) de atividade de lipase foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 µmol de *p*-nitrofenol/min¹⁶⁹, de acordo com a Eq. 1.

$$U = \mu\text{Mol} / \text{min. } g = \{[(A_{398\text{nm}} + b) / a] \times V\} / t \quad (\text{Eq. 1})$$

Em que *A* é a absorbância (no comprimento de onda de 398 nm), *b* é a constante, *a* é a absorvidade molar (obtida pela curva analítica do *p*-Nitrofenol), *V* é o volume da solução enzimática, *t* é o tempo da reação (30 min).

4.3.2 Síntese de Líquidos Iônicos

Para a síntese dos LIs [Ch][Ac], [Ch][Prop], [Ch][But], [Ch][Pent] e [Ch][Hex], neutralizou-se a base com o ácido apropriado em um ambiente saturado com nitrogênio, sendo que os primeiros minutos da reação ocorreram em uma temperatura inerte (aproximadamente 0 °C), precisamente em um recipiente com gelo (Figura 6). Como exemplo, o ácido propanóico foi adicionado gota a gota a uma solução aquosa de hidróxido de colina na proporção molar de 1:1. A mistura permaneceu em agitação durante 24 h a 21°C¹⁷⁰.



Figura 6. Representação do processo de síntese de LIs, precisamente [Ch][Prop].

Após 24 h, foram realizadas três lavagens da solução com acetato de etila (cerca de 1g.mL^{-1} , e a seguir a solução foi agitada vigorosamente, e então, colocada em rotaevaporador por cerca de 5 min e 30 min, nas duas primeiras e última lavagens, respectivamente, a fim de remover as impurezas. Após as lavagens, o metanol foi evaporado por aproximadamente 5 h. A secagem final foi realizada no equipamento *Speed vac* (SPD 131DDA, Thermo Scientific, EUA). Para verificar o sucesso da síntese e a pureza dos LIs realizou-se a espectroscopia de ressonância magnética nuclear de próton (^1H RMN), (Fourier 300, Bruker, EUA), apresentados no Apêndice III. O teor de água foi determinado por titulometria utilizando Karl Fisher (CH-9100, Metrohm, Suíça) a fim de inferir a teor de água de cada uma das amostras do LI.

Os LIs [Ch][Dec] e [Ch][Tetradec] foram sintetizados no Departamento de Química, na Universidade de Aveiro, Portugal no âmbito do projeto PDSE – Edital nº 19/2016 (Número do Processo: 88881.133279/2016-01). Estes LIs são sólidos a temperatura ambiente e diferem em alguns aspectos no processo de síntese realizado para os LIs líquidos à temperatura ambiente. As lavagens das soluções foram realizadas com *n*-hexano e mantidas sob agitação *overnight*. Posteriormente, as soluções foram centrifugadas a 400 *g* e posteriormente filtradas. Os produtos obtidos foram colocados na linha de vácuo por, aproximadamente, 21 dias. A Figura 7 representa o processo de síntese.

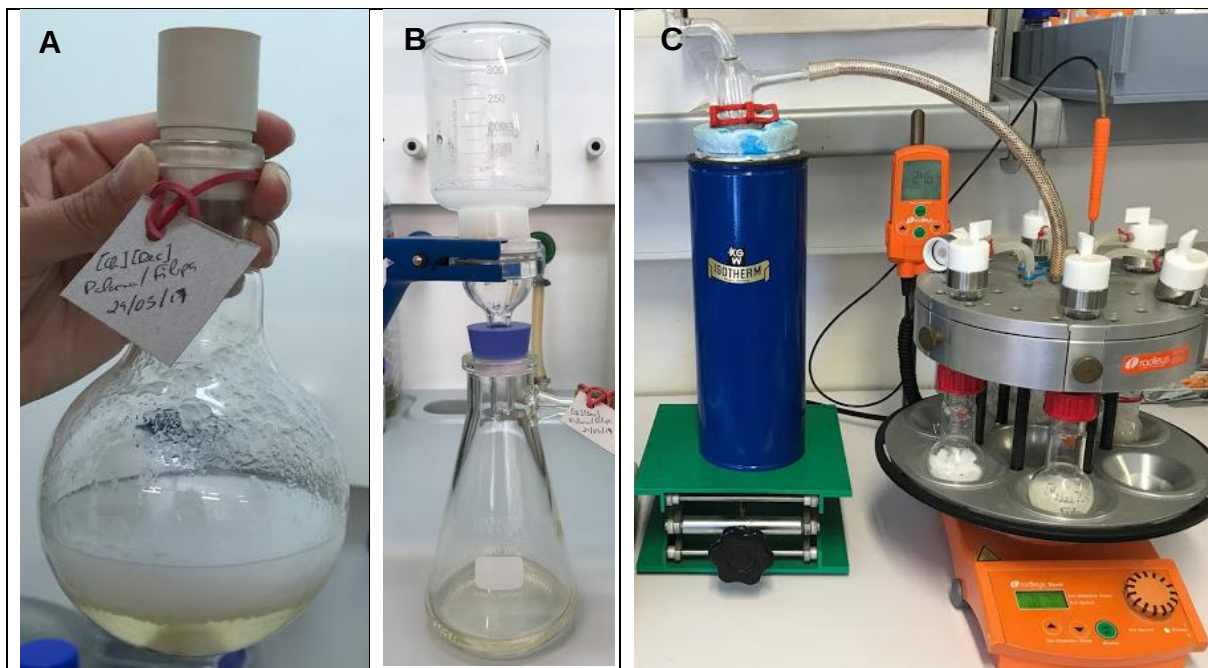


Figura 7. Representação do processo de síntese do [Ch][Tetrad]. Solução após a agitação *overnight* [A], solução sendo filtrada após a lavagem com n-hexano [B], Carrossel utilizado para os LIs colocados na linha de vácuo de nitrogênio líquido [C].

4.4 Fase 1: Caracterização da lipase comercial de *A. niger*

4.4.1 Determinação da massa molecular da lipase comercial de *A. niger* pelo método de Eletroforese SDS-PAGE

A eletroforese em gel de SDS-PAGE foi realizada de acordo com Laemmli (1970)¹⁷¹. O sistema empregado foi o de gel de poliacrilamida desnaturante na presença de dodecilsulfato de sódio (SDS) de forma descontínua e em uma dimensão (SDS-PAGE). O gel de poliacrilamida foi emoldurado em sistema comercial MiniVE Complete Hoefer com a proporção de 2/3 para separação e 1/3 para empilhamento (sistema descontínuo). As dimensões finais foram de 10 x 10 x 0,1 cm e total de 10 poços de volume nominal 50 μ L. As concentrações finais dos géis de empilhamento e separação, em relação aos monômeros, foram de 12,5 e 5,0 % (m/v), respectivamente. A composição dos géis segue descrito na Tabela 8.

Tabela 8. Composição dos géis de separação e empilhamento utilizados para a eletroforese SDS-PAGE.

Composição dos Géis		
Estoques	Volume (mL)	
	Gel separação	Gel empilhamento
Acrilamida 30% (m/v) +		
N,N'-metilbisacrilamida 3% (m/v)	4,2	1,5
Tampão Tris-HCl 1,0 mol.L ⁻¹ pH = 6,80	0	1,6
Tampão Tris-HCl 1,5 mol.L ⁻¹ pH = 6,80	2,5	0
Dodecil sulfato de sódio 10% (m/v)	1	1,3
Água ultrapura tipo Milliq Millipore®	3,3	8,2
N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina P.A.	0,01	0,013
Persulfato de amônio 10% (m/v)	0,05	0,063
Volume final	10	12

As amostras analisadas foram obtidas pela solubilização da lipase em água ultrapura, nas seguintes concentrações (mg.mL⁻¹): 5; 10; 12; 15; 17; 20. Anteriormente à aplicação nos poços do gel as amostras foram submetidas a um processo de desnaturação em banho-maria a 100°C por 10 min na presença de um tampão dissociante. A composição do tampão dissociante é formado pelo tampão Tris-HCl (1,0 mol.L⁻¹) pH $\approx$ 6,8; dodecil sulfato de sódio (SDS) 10% (m/v); glicerol P.A.; β -mercaptoetanol P.A. e água ultrapura.

O volume da amostra aplicado nos poços de gel foram de 30 μ L de forma a respeitar o volume máximo de 50 μ L. Após aplicação das amostras e do marcador de pesos moleculares (PageRuler, Thermo Scientific) preparado de acordo com o fabricante, o gel foi submetido a corrente elétrica em duas etapas, nomeadamente, 2 h a 80 V e 3 h a 100 V, ambos com corrente fixa em 20 mA, sob refrigeração. As cubas do sistema foram preenchidas com tampão Tris-Glicina (respectivamente 25 mmol.L⁻¹ e 192 mmol.L⁻¹) pH $\approx$ 8,3 e uma solução de azul de bromofenol a 0,05 % (m/v) foi utilizado como marcador da corrida na cuba superior.

Após o final da corrida, o gel foi desemoldurado e lavado com água destilada e submetido a um processo de fixação em solução de etanol: ácido acético: água [1:4:5 (v/v)] por 1 h, seguido de coloração numa solução do corante *Coomassie Brilliant Blue overnight*, sulfato de amônio 0,6 mol.L⁻¹, ácido fosfórico 0,16 mol.L⁻¹. *Coomassie Brilliant Blue* g-250 0,1 mmol.L⁻¹ no veículo metanol: água destilada [1:4 (v/v)] sob agitação. Após esse período, o mesmo foi revelado em água destilada com reposição periódica e um último banho para

remoção de corante com a solução de ácido acético: água destilada: metanol [1:4,5:4,5 (v/v)] por 15 min. Após a resolução das bandas o gel foi digitalizado e preservado em refrigeração em solução acética a 2% (v/v).

4.4.2 Determinação do Potencial Zeta da Lipase (Carga)

O potencial zeta (P_z) da lipase foi mensurado com a enzima diluída em solução tampão Mcllvaine (pH 1,0-8,0) e tampão Sörensen (pH 9,0) usando um Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments). A célula do eletrodo foi preenchida com a solução enzimática e a carga de cada solução tamponada com a enzima foi determinada a 25°C.

4.4.3 Influência do pH e da temperatura

O pH ótimo da enzima foi determinado pela quantificação da atividade hidrolítica da lipase entre os valores de pH de 2,5 a 8,5 em tampão Mcllvaine, os ensaios foram realizados a 25°C. No pH ótimo da enzima (pH 5,5) foi determinado a temperatura ótima na faixa de 20 a 70°C em banho termorregulado (521/5D, Ethiktechnology, Brasil). A concentração da lipase comercial de *A. niger* utilizadas nos ensaios foi de 1 mg.mL⁻¹ para os valores de pH 2,5 a 6,5. Para os ensaios nos valores de pH 7,5 e 8,5 a concentração utilizada foi de 2 mg.mL⁻¹, visto que não foi possível a quantificação utilizando menor concentração, devido a possível desnaturação. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e os respectivos desvios padrões e intervalos de confiança calculados.

Para os estudos de estabilidade em relação ao pH, foram preparadas soluções em tampão Mcllvaine nos valores de pH 2,5 - 8,5 com um volume total de 10 mL, pré-incubadas a 25°C e, alíquotas de 250 µl foram retiradas nos seguintes intervalos de tempo (h): 0; 1; 3; 6; 9; 24. Para o estudo da estabilidade da lipase em relação a temperatura, a lipase foi solubilizada em tampão Mcllvaine pH 5,5 na faixa de temperatura entre 20 a 50°C com um volume total de 10 mL, e alíquotas de 250 µl foram retiradas nos seguintes intervalos de tempo (h): 0; 1; 3; 6; 9; 24. A porcentagem de atividade relativa foi determinada de acordo com a Eq. 4. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e os respectivos desvios padrões e intervalos de confiança calculados.

$$A_R = \frac{A_t}{A_i} \times 100 \quad (\text{Eq. 4})$$

Onde A_R corresponde à atividade relativa, A_t é a atividade em determinado tempo e A_i é a atividade inicial no tempo zero (0 h).

Em ambos os estudos a atividade catalítica foi determinada de acordo com o método descrito no item 4.3.1.

4.5 Fase 2: Avaliação da atividade e estabilidade da lipase comercial de *A. niger*

*4.5.1 Influência dos distintos agentes formadores de S DFA na atividade e estabilidade da lipase comercial de *A. niger**

A concentração de lipase comercial de *A. niger* utilizada em todos os ensaios foi de 1 mg.mL⁻¹. As diferentes condições adotadas para os ensaios de atividade e estabilidade da lipase de *A. niger* frente aos distintos agentes formadores de S DFA estão descritos na Tabela 9.

Para os ensaios de estabilidade foram preparadas soluções aquosas com um volume total de 10 mL e alíquotas de 250 µl foram retiradas nos seguintes intervalos de tempo (h): 0; 1; 3; 6; 9; 24. A taxa de atividade catalítica relativa foi determinada de acordo com a Eq. 4 descrita no item 4.5.1. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e os respectivos desvios padrões e intervalos de confiança calculados.

Tabela 9. Parâmetros utilizados na atividade e estabilidade da lipase de *A. niger* frente aos diferentes agentes formadores de SDFA.

Agentes formadores de SDFA	Concentração	Temperatura	Solvente
Triton X-114	1,3,5,7,9,11,13,15 e 20 (% m/v)	35 °C	Água ultrapura
PEG 600	20, 30, 40 e 50 (% m/v)	25 °C	Água ultrapura
PPG 400	30, 40, 50 e 60 (% m/v)	25 °C	Água ultrapura
PPG 425	20, 30, 40 e 50 (% m/v)	25 °C	Tampão McIlvaine pH 5,5
PPG 725	20, 30, 40 e 50 (% m/v)	25 °C	Água ultrapura
PPG 725	20, 30, 40 e 50 (% m/v)	25 °C	Tampão McIlvaine pH 5,5
NaPA 8.000	5, 10 e 15 (% m/v)	25 °C	Água ultrapura
NaPA 8.000	5, 10 e 15 (% m/v)	25 °C	Tampão McIlvaine pH 5,5
Carboidratos	20 e 50 (% m/v)	25 °C	Água ultrapura
[C _n mim]Cl	0,025 0,05, 0,1, 0,15 0,3 e 0,5 (% m/v)	35 °C	Água ultrapura
[Ch]X	0,05, 0,1, 0,5 e 1 (M)	35 °C	Água ultrapura

4.5.2.1 Determinação da viscosidade dos polímeros

O viscosímetro SVM 3000 (Anton-Paar®, Austria) foi utilizado para medir a viscosidade a 25°C das soluções aquosas dos polímeros: PEG 600 e PPG 425 nas concentrações (m/v) de 20, 30, 40 e 50%; do PPG 725 em tampão McIlvaine pH 5,5, nas concentrações (m/v) de 20, 30, 40 e 50%; NaPA 8.000 em tampão McIlvaine pH 5,5 nas concentrações (m/v) de 5, 10 e 15%. As medições foram realizadas em triplicata e os respectivos desvios padrões calculados.

4.5.2.2 Determinação dos espectros de fluorescência

A espectroscopia de fluorescência foi utilizada para obter informações sobre o mecanismo quântico das interações entre LI-lipase e assim verificar a influência das soluções aquosas de LIs na atividade e estabilidade da lipase comercial *A. niger*. Os LIs [C₄mim]Cl, [C₆mim]Cl, [C₈mim]Cl, [C₁₀mim]Cl e [C₁₂mim]Cl foram preparados em solução aquosa nas seguintes concentrações (% m/v): 0,1; 0,3; 0,5. A concentração de lipase utilizada foi de 1 mg.mL⁻¹ para todas as medições. As medições de fluorescência na ausência e presença dos LIs foram realizadas em leitor de placas (Perkin Elmer®, EUA). O comprimento de onda de excitação foi 290 nm e a faixa de emissão foi ajustada para comprimentos de onda de 310 a 500 nm¹⁷².

4.5.2.3 Determinação dos espectros de Dicroísmo Circular (DC)

Os espectros de DC-UV foram registrados utilizando um espectropolarímetro J-815 (Jasco, Japão) com controlador de temperatura do tipo Jasco Peltier (CDF-426S/C016861183), com o objetivo de verificar a elipicidade da estrutura secundária da lipase na presença das soluções aquosas dos LIs. Todos os espectros foram registrados a 35°C em atmosfera de N₂. Utilizou-se um comprimento do percurso de célula de 0,1 nm para o intervalo espectral de 190 a 250 nm com resolução de 0,10 nm e uma velocidade de varredura de 100 nm.min⁻¹. Os espectros da lipase em solução aquosa na ausência e presença dos LIs: [C₄mim]Cl, [C₆mim]Cl, [C₈mim]Cl, [C₁₀mim]Cl e [C₁₂mim]Cl foram coletados em milésimos de graus (expressos em mdeg) nas concentrações (% v/v) de 0,1 e 0,3. Os espectros finais, após três digitalizações foram corrigidos subtraindo a linha base registrada para cada meio. A concentração de lipase utilizada foi de 1 mg.mL⁻¹ para todas as medições.

4.6 Fase 3: Separação e Extração da Lipase

4.6.1 Construção de Curvas Binodais dos SMDFA-LIs baseados em Colinas

Para a construção de curvas binodais, foram preparadas soluções aquosas com o tensoativo Triton X-114 variando sua concentração entre 1,0 e 20 % (m/m) na presença dos LIs, [Ch]Cl, [Ch][Ac], [Ch][Prop] e [Ch][But], nas concentrações (M) de 0,05; 0,10 e 0,50. Todos os componentes do sistema foram pesados em tubos graduados de 15 mL para uma massa final de 3 g e posteriormente, homogeneizados no agitador orbital (NH 2200, Norte Científica), a 8 rpm durante 30 min. A temperatura de *Cloud Point* (T_{CP}) foi determinada em banho termorregulado (521/5D, Ethiktechnology, Brasil), pelo método de turvação^{112,173}. Assim, o sistema foi mantido em gelo (sistema monofásico) e, posteriormente, transferido para o banho termorregulado a uma temperatura de 10°C. No banho, a temperatura foi incrementada de 1 em 1°C e a temperatura na qual o sistema turvou foi considerada a T_{CP} ^{134,174}. As curvas binodais experimentais foram obtidas através da representação gráfica da temperatura *versus* a concentração do tensoativo. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e os respectivos desvios padrões calculados.

4.6.2 Extração da lipase comercial de *A. niger* em S DFA na presença de LIs como adjuvantes

Os ensaios de partição utilizando SMDFA-LIs como adjuvantes foram preparados em tubos de vidro graduados de 15 mL pela adição do tensoativo Triton X-114, do [C₈mim]Cl, da solução contendo a enzima solubilizada em tampão McIlvaine pH 5,5 com atividade inicial de 900,00 U.g⁻¹, completado com tampão McIlvaine pH 6,5 de acordo com as curvas binodais descritas na literatura¹¹², resultando num sistema de massa total de 6 g. Similarmente, os ensaios de partição utilizando os [Ch]X foram preparados pela adição do tensoativo Triton X-114, dos LIs, da solução contendo a enzima solubilizada em água ultrapura com atividade inicial de 900,00 U.g⁻¹, completada com água, para se obter um sistema de massa total de 6 g.

Em ambos os sistemas, os componentes foram adicionados por gravimetria e o sistema foi homogeneizado em agitador orbital (NH 2200, Norte Científica) a 8 rpm durante 30 min. Em seguida, o sistema foi transferido para um banho termorregulado (521/5D, Ethiktechnology, Brasil) com temperatura previamente ajustada e mantido em repouso por 3 h para separação das fases. Após o repouso de 3 h, as amostras das fases superior e inferior foram coletadas cuidadosamente utilizando pipetas de vidro do tipo *Pasteur*. Cada experimento de partição foi feito em duplicata e os respectivos desvios padrões e intervalos de confiança calculados.

A temperatura e as condições de extração foram determinadas a partir de ensaios prévios de estabilidade e das curvas binodais previamente determinadas neste trabalho, ou obtidas da literatura¹¹². Após estudo prévio de outros tempos de separação (6 e 24 h), o período de 3 h foi selecionado para separação das fases (estudos não mostrados), uma vez que não houve diferenças com relação à atividade enzimática e a eficiência de extração.

4.6.3 Extração da lipase comercial de *A. niger* em SPDFA

Parte deste estudo foi realizado na Universidade de Aveiro, Portugal no âmbito do projeto PDSE – Edital n° 19/2016 (Número do Processo: 88881.133279/2016-01).

Para os ensaios de partição utilizando SPDFA com carboidrato, os sistemas foram preparados em tubos de vidro graduados de 15 mL, pela adição do polímero PPG 425 40% (m/m), do carboidrato 20% (m/m) e da solução contendo a enzima solubilizada em água ultrapura com atividade inicial de 900,00 U.g⁻¹, sendo o sistema completado com água ultrapura, resultando num sistema de massa total de 6 g. Os componentes dos sistemas foram adicionados por gravimetria e homogeneizados com auxílio de um agitador tipo vórtex. Posteriormente, o sistema foi centrifugado por 15 min a 479 *g* em centrífuga (modelo Universal 320R, Hettich Zentrifugen), e as amostras das fases superior e inferior coletadas cuidadosamente utilizando pipetas de vidro do tipo *Pasteur*. Cada experimento de partição foi realizado em duplicata e os respectivos desvios padrões e intervalos de confiança calculados.

4.6.4 Determinação dos parâmetros de extração

Os parâmetros de extração foram determinados para todos os sistemas estudados, nomeadamente, SMDFA, SMDFA-LIs como adjuvantes, SPDFA com carboidratos. O branco foi preparado nas mesmas condições, porém sem a adição da enzima, de forma a eliminar a influência de algum componente do sistema de extração na determinação da atividade hidrolítica. Assim, para determinar a atividade da enzima empregou-se o método descrito na seção 4.3.1 e tanto na fase superior quanto na fase inferior (rica em micelas ou rica em carboidratos), o valor do branco foi descontado. O coeficiente de partição da enzima (K_E) foi determinado de acordo com a razão entre a atividade da lipase nas fases inferior e superior, como mostra a Eq. 5.

$$K_E = \frac{A_I}{A_S} \quad (\text{Eq. 5})$$

Em que, A_I e A_S são, respectivamente, a atividade da enzima na fase inferior e superior. Com o objetivo de avaliar a eficiência da partição, foi calculada a eficiência de extração (EE (%)) da lipase na fase inferior (rica em micelas ou rica em carboidratos), de acordo com a Eq. 6.

$$EE (\%) = \frac{A_I V_I}{(A_I V_I) + (A_S V_S)} \times 100 \quad (\text{Eq. 6})$$

Em que, A_I e A_S são, respectivamente, a atividade da enzima na fase inferior e superior, e V_I e V_S são, respectivamente, o volume da fase inferior e o volume da fase superior.

De modo a verificar o rendimento final, foi avaliado o rendimento da enzima de acordo com a Eq. 7.

$$\eta = \frac{A_{Inferior} V_{Inferior}}{A_{inicial} V_{inicial}} \quad (\text{Eq. 7})$$

Em que, $A_{Inferior}$ e $A_{inicial}$ são, respectivamente, a atividade na fase inferior e inicial e $V_{Inferior}$ e $V_{inicial}$ são, respectivamente, o volume da fase inferior e o volume inicial.

A razão volumétrica (R_V) corresponde ao volume das fases após o particionamento foi determinado como mostra a Eq. 8.

$$R_V = \frac{V_I}{V_S} \quad (\text{Eq. 8})$$

Em que, V_I e V_S são, respectivamente, o volume da fase inferior e o volume da fase superior.

Para os SDFA as quais foram avaliadas a extração da lipase de *Aspergillus* sp. produzida em meio fermentado foi avaliado o fator de purificação de acordo com a Eq. 9.

$$FP = \frac{AE_{Inferior}}{AE_{inicial}} \quad (\text{Eq. 9})$$

Em que, $AE_{Inferior}$ e $AE_{inicial}$ são, respectivamente, a atividade específica da fase inferior e atividade específica inicial.

4.6.5 Determinação da concentração de Proteínas totais

A concentração de proteínas totais foi determinada pelo método do ácido bicinonínico (BCA 4,4,-dicarboxi-2-2-biquinolina)^{175,176} usando a albumina sérica bovina (BSA) como padrão, de acordo com as instruções do fabricante. A reação foi medida pela absorbância a 562 nm em leitor de placas (Multimode Plate Reader, Perkin Elmer, EUA). Previamente, foi determinada uma curva de calibração para a proteína BSA (Apêndice IV).

4.6.6 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Como alternativa aos métodos tradicionais, BCA¹⁷⁶, Bradford^{177,178} e Lowry¹⁷⁶, foi proposto investigar o uso da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) para determinar proteínas totais utilizando padrões conhecidos: BSA; Proteína verde fluorescente (GFP, do inglês *Green fluorescent protein*); L-Asparaginase. Foi utilizado o cromatógrafo da Shimadzu (Japão), Detector UV/Vis SPD-20A, comprimento de onda 280 nm; Bomba LC-20AT; Controladora CBM- 20A; Degaseificador DGU-20A; Injeção manual de 20 µl; Coluna Vydac 218TP54 (C18, 5 µm, 4.6mm i.d x 250 mm). A fase móvel foi constituída por uma mistura de acetonitrila:água, a qual foi eluída num gradiente de 2 a 15% (v/v) em 15 min e, 15 a 50% (v/v) em 10 min; fluxo de 1,0 mL.min⁻¹ em temperatura ambiente.

4.7 Determinação da Concentração Micelar Crítica (CMC) e o estudo de atividade da lipase comercial de *A. niger* para diferentes LIs

Esse estudo foi realizado na Universidade de Aveiro, Portugal no âmbito do projeto PDSE – Edital nº 19/2016 (Número do Processo: 88881.133279/2016-01).

A condutividade elétrica das soluções de cada um LIs, [C₁₆mim]Cl e [Ch][Tetrad], em água ultrapura para um volume final de 20 mL foi mensurada utilizando o condutivímetro SevenMultiTM (Mettler Toledo Instruments, Suíça) a 25°C dentro de uma incerteza de ±0,01 mS.cm⁻¹, conforme descrito por Vicente et al. (2017)¹⁷⁹. Em uma célula de vidro foi colocado aproximadamente 5 mL de água ultrapura, mantida sob agitação, para que posteriormente fosse adicionado gota a gota a solução de LI. A solução do LI foi adicionada à célula de vidro utilizando uma seringa com agulha comum e, a cada nova adição de LI, a seringa foi pesada para determinar a massa adicionada. As leituras de condutividade para cada ponto foram realizadas em duplicata. Assim, obtem-se duas retas com sua respectiva equação, onde o ponto de interseção destas retas na dependência linear infere o valor de CMC. Os pontos que compõem a primeira reta correspondem aos LIs se comportando apenas como moléculas livres e, após a interseção das retas, os LIs se comportam como moléculas agregadas devido a

formação de micelas a qual correspondem a segunda reta. Desta forma foi determinado o valor de CMC para os LIs [C₁₆mim]Cl e [Ch][Tetrad].

Após determinar a CMC foi realizado o estudo de atividade da lipase utilizando diferentes famílias de LIs, em diferentes concentrações, com o intuito de verificar a atividade da enzima¹³⁰. Como os LIs apresentam diferentes MM, as quais alteram o valor de CMC de cada solução, não foi possível realizar a comparação dos ensaios na mesma concentração. Desse modo, os resultados obtidos para os diferentes LIs, foram comparados pela determinação da atividade considerando número (n) vezes acima da concentração da CMC. Assim, embora cada LI apresente um valor de CMC diferente, é possível comparar quando se considera que a concentração pode ser multiplicada por algum número. Como exemplo, pode-se citar o [Ch][Tetrad], cuja CMC é 5,11 mM, tem n vezes acima da CMC, assim 2 vezes 5,11 corresponde à concentração de 10,22 mM; se for 4 vezes 5,11 será 20,44 mM; se for 6 vezes será 30,66 mM, e assim sucessivamente. As concentrações avaliadas foram correspondentes a 2, 4, 6, 10 e 20 (n vezes acima da CMC).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Fase 1: Caracterização da lipase comercial de *A. niger*

5.1.1 Determinação da massa molecular da lipase comercial de *A. niger* pelo método de Eletroforese SDS-PAGE

A eletroforese em gel de SDS-PAGE é um método de separação baseado no tamanho ou na MM de polipéptidos e proteínas através da matriz de gel de poliacrilamida¹⁸⁰. Neste procedimento as proteínas são desnaturadas e suas ligações de dissulfeto são clivadas pelo calor na presença do SDS e do agente redutor β -mercaptoetanol.

A Figura 8 mostra a imagem do gel de eletroforese SDS-PAGE da lipase comercial *A. niger* em diferentes concentrações. Nota-se que no gel de poliacrilamida, foram reveladas mais de uma banda relacionada a MM da enzima. Assim, pode-se definir que a enzima não está pura, contrário ao que se esperava, devido ser uma enzima comercial "pura" de acordo com o fabricante. A banda mais pronunciada em todas as concentrações foi a equivalente de 55 kDa, a qual corresponderá à suposta MM da lipase comercial de *A. niger*.

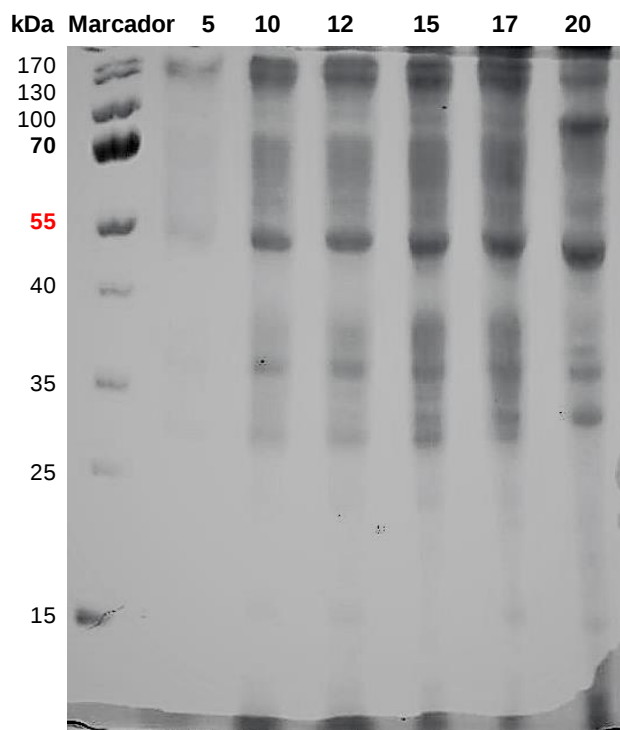


Figura 8. Imagem do gel de eletroforese SDS-PAGE realizada com a lipase comercial de *A. niger*. Da esquerda para a direita: o padrão e a enzima nas concentrações de (mg. mL^{-1}): 5, 10, 12, 15, 17 e 20.

Como descrito anteriormente, a MM das lipases pode variar entre 20 a 75 kDa². Dentro da mesma espécie também podem ocorrer variações da MM de lipases: *Aspergillus niger*, 35 kDa¹⁸¹; *Aspergillus niger*, 43 kDa¹⁸²; *Aspergillus niger*, 65 kDa¹⁸²; *Aspergillus niger* NCIM 1207, 32 kDa¹⁸³; *Aspergillus niger* MYA 135, 68 kDa¹⁸⁴; *Aspergillus niger*, 38 kDa¹⁸⁵. Embora as lipases sejam provenientes da mesma espécie, pequenas variações em sua estrutura, i.e., a quantidade total dos resíduos de aminoácidos que compõem sua estrutura primária, pode influenciar diretamente em sua massa molecular, justificando as diferenças obtidas. A MM de 55 kDa obtida neste trabalho para lipase comercial de *A. niger* se encontra dentro da faixa reportada na literatura.

5.1.2 Avaliação da Influência do pH e da Temperatura

As enzimas são constituídas de aminoácidos, e desse modo, a alteração do pH do seu ambiente envolvente pode resultar em alteração na carga e na estrutura da proteína³⁵. O pH ótimo da enzima é aquele em que a formação do complexo enzima-substrato é favorecida e o valor máximo de atividade enzimática é alcançado¹⁶⁶. A atividade enzimática também depende da concentração do substrato e da temperatura de reação³³.

A temperatura também apresenta um valor ótimo em que a taxa de reação enzimática pode ser favorecida pelo aumento da energia cinética das moléculas. No entanto, temperaturas mais altas podem causar a desnaturação proteica, uma vez que esta pode acarretar em modificações na estrutura terciária da enzima, bem como na estabilidade do complexo enzima-substrato³⁵.

O pH ótimo da lipase comercial *A. niger* determinado a 25°C foi de 5,5, conforme apresentado na Figura 9A. Para condições no pH ótimo (5,5), conforme apresentado na Figura 9B, a lipase apresentou atividades superiores a 60%, na faixa de temperatura de 20-50°C, exibindo uma temperatura ótima a 50°C. Contudo, é importante notar, que a lipase perdeu mais de 70% de atividade nas temperaturas acima de 50°C (provável desnaturação).

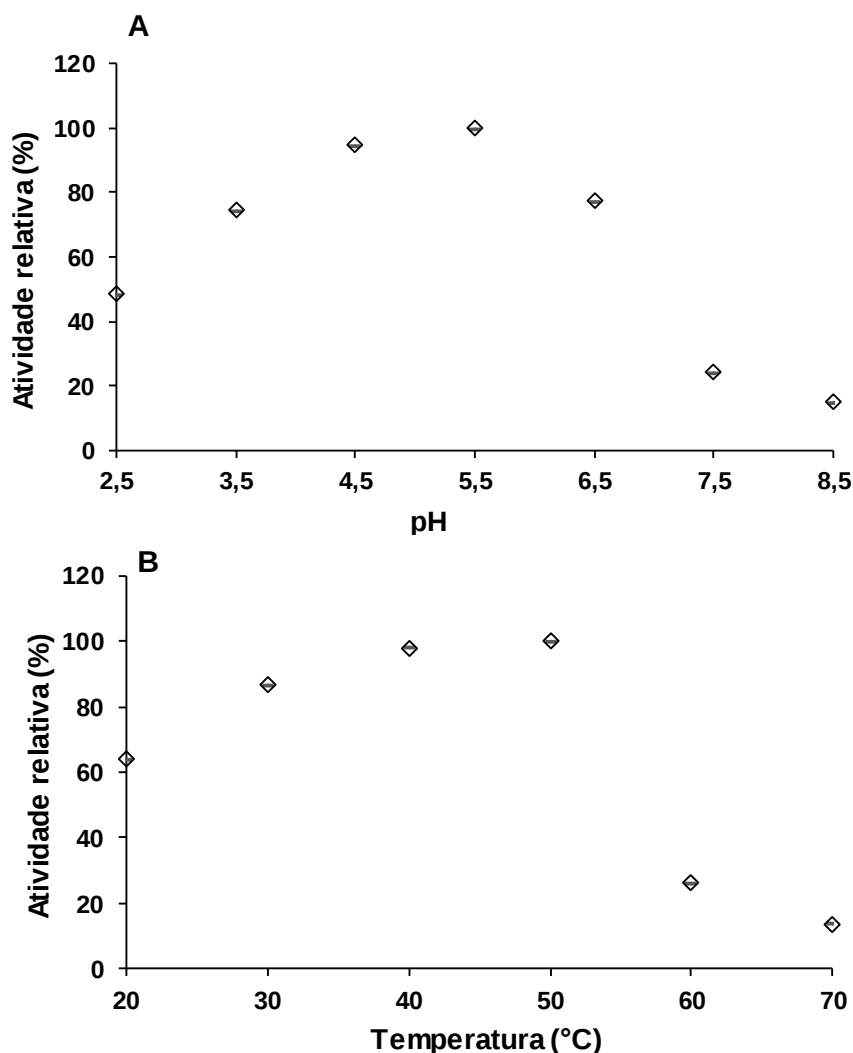


Figura 9. Estudo do pH ótimo da lipase comercial de *A. niger* a 25°C **[A]**, onde o valor de atividade da lipase 5.602,45 U.g⁻¹ no pH 5,5 foi considerado 100%. Estudo da temperatura ótima no pH 5,5 **[B]**, onde o valor de atividade da lipase 6.098,08 U.g⁻¹ a 40°C foi considerado 100%. As barras de erro (menores que os símbolos) representam 95% do intervalo de confiança para as medições.

Segundo a literatura, várias lipases produzidas por espécies de *Aspergillus* exibem um pH ótimo entre 5 e 6^{9,17,186,187,181,188}. No entanto existem algumas exceções, como por exemplo a lipase produzida por *A. carneus*, a qual apresentou um pH ótimo de 9, e alta estabilidade sob condições alcalinas (pH entre 8-10¹⁶). A maior atividade catalítica da lipase observada preferencialmente em pH ácidos é frequentemente associada pela similaridade na sequência de aminoácidos na estrutura primária e sua organização no sítio ativo da proteína³⁵.

A estabilidade de enzimas está relacionada com a tendência de manter a conformação nativa da proteína (estrutura secundária e/ou terciária). Vários estudos de estabilidade tem vindo a avaliar a atividade da enzima durante um determinado período a fim de verificar o tempo máximo³⁵ que a mesma mantém sua atividade catalítica. Além da determinação dos valores

Resultados e Discussão

ótimos, também é importante determinar se a lipase mantém suas atividades biocatalíticas após a exposição ao longo do tempo em diferentes valores de pH e temperaturas. Assim, foi então avaliada a estabilidade da lipase, monitorando suas atividades enzimáticas no período de 24 h de incubação em diferentes valores de pH (2,5-8,5) e temperaturas (20-50°C), apresentadas nas Figuras 10 e 11, respectivamente. Os valores de atividade absoluta nas diferentes condições de pH e temperatura estão detalhados na Tabela 20 do Apêndice I.

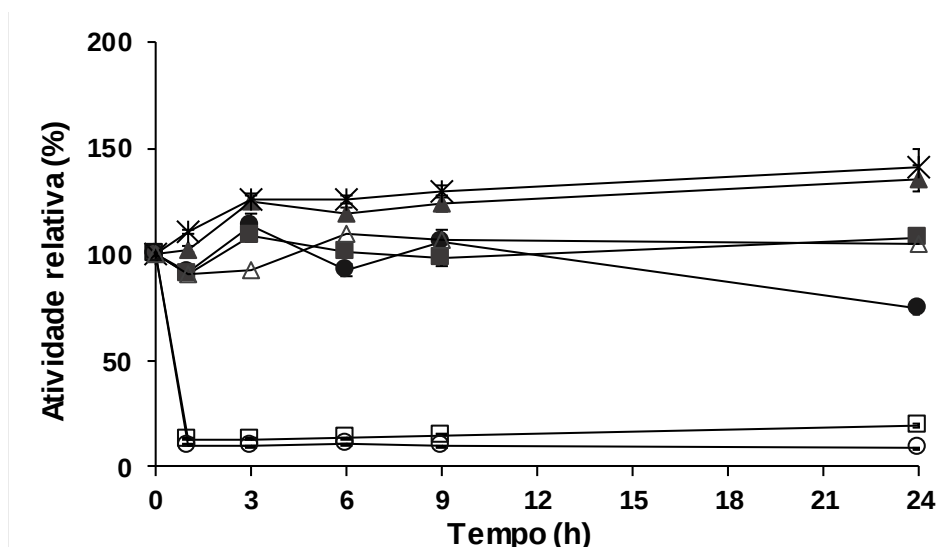


Figura 10. Estabilidade da lipase comercial de *A. niger* durante 24 h frente a diferentes valores de pH: [2,5 (Δ), 3,5 (●), 4,5 (■), 5,5 (▲), 6,5 (x), pH 7,5 (□) e pH 8,5 (○)] a 25°C. O valor de atividade da lipase 6.848,02 U.g⁻¹ no pH 5,5, no tempo zero (0 h) foi considerado 100% para todos os ensaios. As barras de erro representam 95% do intervalo de confiança para as medições.

Como pode ser observado na Figura 10, a enzima manteve-se estável em valores de pH ácidos (pH 6,5). Quando a lipase comercial foi exposta a condições alcalinas e próximos da neutralidade, especificamente, a um pH de 7,5 e 8,5, a atividade enzimática diminuiu aproximadamente 90% em comparação com sua atividade hidrolítica a pH 5,5. Por outro lado, sob condições ácidas (de 2,5 a 6,5), a enzima permaneceu estável durante todo o período de exposição (24 h), exibindo os maiores valores de atividade relativa em pH 5,5 e 6,5 (equivalente a 113% da atividade inicial). Considerando que o ambiente ácido promoveu uma reação favorável entre a enzima e o substrato, a lipase comercial de *A. niger* pode ser definida como uma enzima ácida.

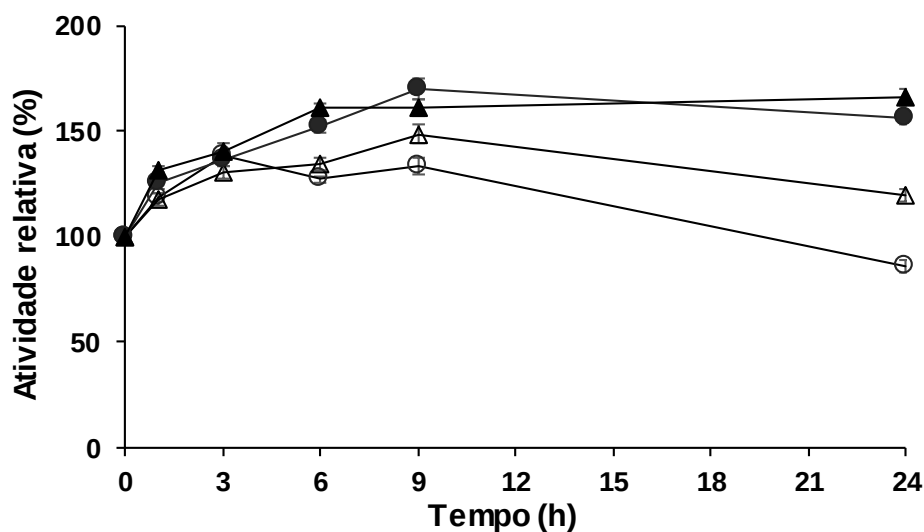


Figura 11. Estabilidade da lipase comercial de *A. niger* durante 24 h em diferentes temperaturas [20°C (○), 30°C (Δ), 40°C (●) e 50°C (▲)] em pH 5,5. O valor de atividade da lipase 4.840,87 U.g⁻¹ na temperatura de 40°C, no tempo zero (0 h) foi considerado 100% para todos os ensaios. As barras de erro representam 95% do intervalo de confiança para as medições.

Na Figura 11, nota-se que independente da temperatura avaliada (20, 30, 40 e 50°C), a lipase não apresentou diferenças nos valores de atividade enzimática nas primeiras 3 h. Esta evidência sugere que a enzima necessita de um tempo de adaptação ao meio envolvente, visto que apenas após 3 h, a lipase incubada nas temperaturas entre 40 e 50°C exibiu um aumento da atividade hidrolítica, apresentando uma atividade relativa acima de 150%. Nessas temperaturas, possivelmente, houve alguma mudança conformacional da lipase, a qual melhorou a exposição do sítio ativo, favorecendo o complexo enzima-substrato, e consequentemente, a atividade catalítica. No entanto, considerando que a estabilidade da lipase em função da temperatura foi determinada em uma faixa restrita, de 20 a 50°C, não foi possível obter evidências adicionais sob a desnaturação desta.

Em geral, os resultados obtidos aqui estão de acordo com os relatados anteriormente por Mhetras et al. (2009)¹⁸³, em que a lipase de *A. niger* apresentou a mesma temperatura ótima (50°C) e uma perda de atividade hidrolítica de 95% a 70°C¹⁸³. No entanto, considerando que a lipase estudada por Mhetras et al. (2009)¹⁸³ só manteve sua atividade a 40°C durante as primeiras 3 h de incubação, é evidente que a lipase do presente estudo é termicamente mais estável.

5.2 Fase 2: Avaliação da atividade e estabilidade da lipase comercial de *A. niger*

Influência dos distintos agentes formadores dos SDFA na atividade e estabilidade da lipase comercial de A. niger

5.2.1 Efeito do Triton X-114

Os tensoativos podem afetar o ambiente ao redor da enzima comprometendo tanto a atividade como a estabilidade catalítica¹⁷. Os tensoativos de caráter não iônico, apresentam principalmente, interações hidrofóbicas, enquanto que os tensoativos aniônicos, catiônicos e zwitteriônicos promovem, principalmente, interações eletrostáticas com as regiões carregadas na superfície da proteína¹⁸⁹. Independente dos tensoativos utilizados, sua interação com a enzima pode gerar modificações na estrutura da proteína e, conseqüentemente, na interação proteína-proteína e atividade biológica¹⁹⁰.

O estudo de atividade e estabilidade da lipase comercial de *A. niger* na presença do tensoativo não iônico¹⁹¹, Triton X-114, foi realizado em soluções aquosas (pH $\approx$ 5) com concentrações entre 1 e 20% (m/v), conforme apresentado na Figura 12. Os ensaios foram realizados a 35°C, utilizando como controle um ensaio na ausência do tensoativo. Todos os valores de atividade absoluta estão descritos na Tabela 21 do Apêndice I.

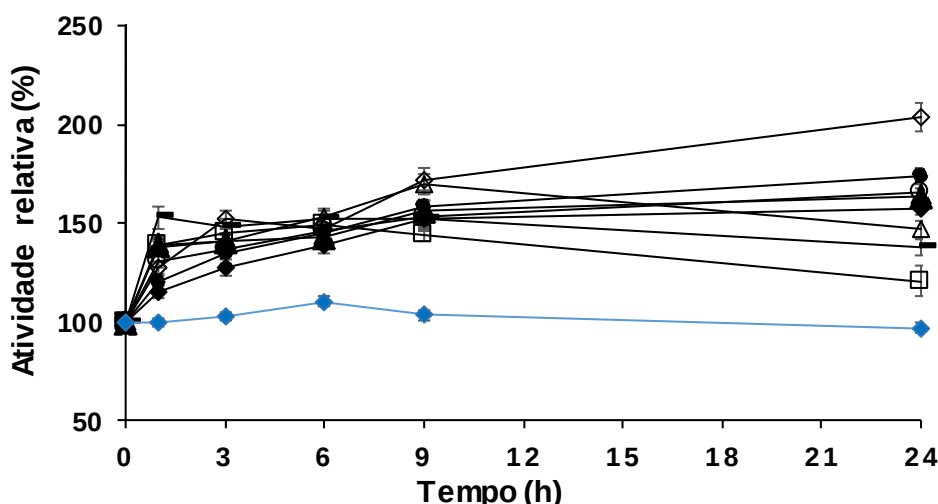


Figura 12. Estabilidade da lipase comercial de *A. niger* na presença de soluções aquosas do tensoativo Triton X-114 em diferentes concentrações (% m/v): {1 [■], 3 [▲], 5 [●], 7 [◆], 9 [-], 11 [□], 13 [Δ], 15 [○] e 20 [◇]} a 35°C durante 24 h. O ensaio controle considerado como 100% foi realizado na ausência de tensoativo [◆], cuja atividade enzimática foi de 7.317,24 U.g⁻¹. As barras de erro representam 95% do intervalo de confiança para as medições.

De maneira geral, na presença das soluções aquosas do tensoativo não iônico, a lipase se mostrou ativa e estável durante um período total de 24 h para todas as concentrações

estudadas (Figura 13). Destaca-se pela comparação do ensaio controle (apresentando em azul) com os ensaios com tensoativo (a preto), que logo após uma hora de exposição ocorre um incremento na atividade hidrolítica da lipase na presença do tensoativo, sendo esse aumento acentuado para maiores concentrações de Triton X-114. Após 6 h de incubação, com exceção da concentração de 1% (m/v), a qual a atividade enzimática relativa foi inferior a 140%, a lipase apresentou uma atividade relativa entre 145-170%, não revelando diferenças significativas nas demais concentrações estudadas, o que possivelmente indica que a concentração de tensoativo favoreceu a modificação espacial da enzima em sua conformação aberta.

O período correspondente a 24 h mostrou que com 20% (m/v) de tensoativo, a atividade relativa foi próxima a 200% demonstrando que o Triton X-114 teve um efeito positivo sobre a atividade da lipase. Esses resultados corroboram com a literatura, a qual relata que os tensoativos não iônicos promovem um aumento na atividade da lipase devido à exposição do sítio ativo após a abertura da tampa^{192,193}.

Os efeitos de agentes tensoativos sobre as lipases são altamente variáveis e, dependem fortemente da escolha de ambos¹⁹⁰. Em água, geralmente a enzima se encontra em sua conformação fechada, sendo necessário que a superfície hidrofóbica da enzima esteja ativa para que ocorra a interação com o substrato. A ativação enzimática pode ocorrer na interface lipídeo-água pelo próprio substrato, bem como por agentes tensoativos¹⁹⁴ que podem induzir a conformação aberta, expondo o sítio ativo da enzima.

Prazeres et al. (2006)¹⁹³ mostraram que ambos os tensoativos Triton X-100 e Triton X-114, na concentração de 10% (m/v) apresentam um efeito de ativação catalítica para a lipase produzida por *Fusarium oxysporum*. Os autores observaram ainda que o Triton X-114 apresentou uma atividade cerca de 30% superior ao Triton X-100. O Triton X-100 $[(C_{14}H_{21}(CH_2CH_2O)_{10}OH)]$ apresenta maior hidrofobicidade comparada ao Triton X-114 $[(C_{14}H_{21}(CH_2CH_2O)_8OH)]$, devido ao maior número de carbonos na sua cauda apolar¹⁹⁵.

No entanto, efeito oposto foi observado por Liu et al. (2015)¹⁷, pois o Triton X-100 suprimiu a atividade enzimática da lipase de *Aspergillus niger* AN0512. Tensoativos de cadeia alquílica muito longa, como o Triton X-100, podem interagir com o sítio ativo da lipase através de sua cauda hidrofóbica, e nesse caso, o comportamento do tensoativo passa a ser de um inibidor competitivo^{196,197}, o que não favorece a atividade enzimática. Pelo contrário, o Triton X-114 promoveu a abertura da tampa, além de auxiliar no direcionamento da enzima ao substrato¹⁹⁶.

As evidências supracitadas demonstram que dependendo da sua estrutura, os tensoativos podem apresentar efeitos positivos ou negativos sobre a atividade enzimática da lipase. No

entanto, de acordo com os resultados reportados neste trabalho, considera-se que o Triton X-114 pode ser empregado como agente formador de fase para SMDFA, pois ele não desestabilizou a enzima-alvo. Considerando um sistema integrado, a migração da enzima para a fase micelar pode acarretar em aumento de atividade, que seria de interesse para indústria caso não seja necessário remover esse tensoativo antes da aplicação da enzima.

5.2.2 Efeito de diferentes Polímeros

Para analisar a estabilidade da lipase comercial na presença de diferentes soluções poliméricas, a enzima foi exposta diante dos polímeros não-iônicos PEG 600, PPG 725 e PPG 425 nas concentrações de 20 a 50% (m/v) e do polímero iônico NaPA 8.000 nas concentrações de 5 a 15% (m/v). Estes polímeros foram selecionados uma vez que já foram utilizados na composição de diferentes SDFA e na extração eficiente de várias biomoléculas, tendo, inclusive, os respectivos diagramas de fases já reportados na literatura^{138,149,126,198,199}. Todos os ensaios foram realizados a 25°C, tendo sido comparados com um ensaio na ausência dos polímeros (controle). Os ensaios com PEG 600 foram realizados em solução aquosa, enquanto, que nos estudos com PPG 725 e NaPA 8.000 empregou-se tanto solução aquosa quanto tampão McIlvaine pH 5,5. Nos ensaios com PPG 425 foram preparadas solução somente em tampão McIlvaine pH 5,5.

Os valores referentes a atividade absoluta da lipase na presença das soluções aquosas do polímero PEG 600 estão descritos na Tabela 22 (Apêndice I). Na Figura 13 pode-se observar a estabilidade da lipase na presença das soluções aquosas do PEG 600.

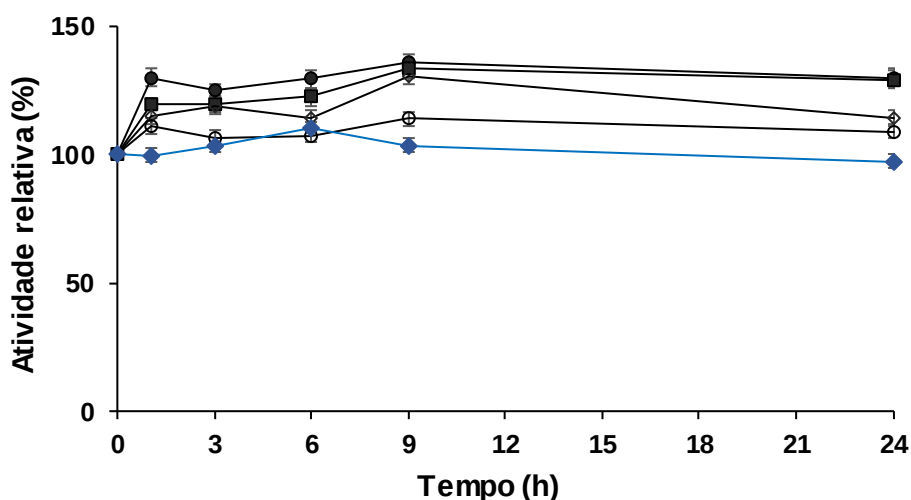


Figura 13. Estabilidade da lipase comercial de *A. niger* na presença de soluções aquosas de PEG 600 nas concentrações (% m/v) de 20 [●], 30 [■], 40 [◊] e 50 [○] a 25°C durante 24 h. O ensaio controle considerado como 100% foi realizado na ausência do polímero [♦], cuja atividade enzimática foi de 7.317,24 U.g⁻¹. As barras de erro representam 95% do intervalo de confiança para as medições.

O PEG é um polímero sintético²⁰⁰, não carregado¹¹⁰, de cadeia linear de unidades de oxietileno que apresenta alta solubilidade em água, baixa pressão de vapor, não é inflamável, não corrosivo e nem tóxico, além de ser aprovado pela FDA para uso em fármacos e alimentos^{139,201}.

Os resultados experimentais apresentados na Figura 13 indicam que a adição do PEG 600 em solução aquosa ($\text{pH } 5 \approx 6$) favoreceu a atividade e a estabilidade da lipase em comparação com a solução controle (enzima na ausência do polímero). A presença do PEG 600 propiciou um aumento da atividade enzimática em todas as concentrações estudadas.

No entanto, como previamente reportado²⁰², o PEG 600 pode modificar a conformação nativa, tornando a cadeia de peptídeos mais flexível e a tampa do sítio ativo na sua conformação aberta. Essa modificação da estrutura da proteína pode ser a justificativa para o aumento da atividade hidrolítica, uma vez que favoreceu a interação do complexo enzima-substrato na presença do polímero.

Dependendo da conformação e estrutura da proteína, o PEG pode interagir com as proteínas por interações hidrofóbicas ou por ligações de hidrogênio²⁰³. Bekale et al. (2015)²⁰³ estudaram como as proteínas albumina sérica humana (HSA) e BSA se comportavam na presença de PEG, e relataram que as modificações na estrutura da enzima estariam relacionadas a diminuição da exposição da α -hélice e um aumento na folha β .

Similarmente, foram depois realizados estudos de estabilidade da lipase na presença de soluções aquosas com PPG, conforme apresentado nas Figuras 14 e 15.

Na Figura 14, pode-se observar que, independente de sua concentração, as soluções aquosas de PPG 725 ($\text{pH } 7 \approx 8$) não favoreceram a atividade da lipase e, consequentemente a estabilidade enzimática. Contrariamente aos resultados apresentados para o PEG, o PPG 725 teve um efeito negativo sobre a atividade hidrolítica da enzima. A atividade da lipase, imediatamente após a exposição às soluções aquosas de PPG, foi inferior a 15%, cerca de 1.800,00 U.g⁻¹, (Tabela 22, Apêndice I).

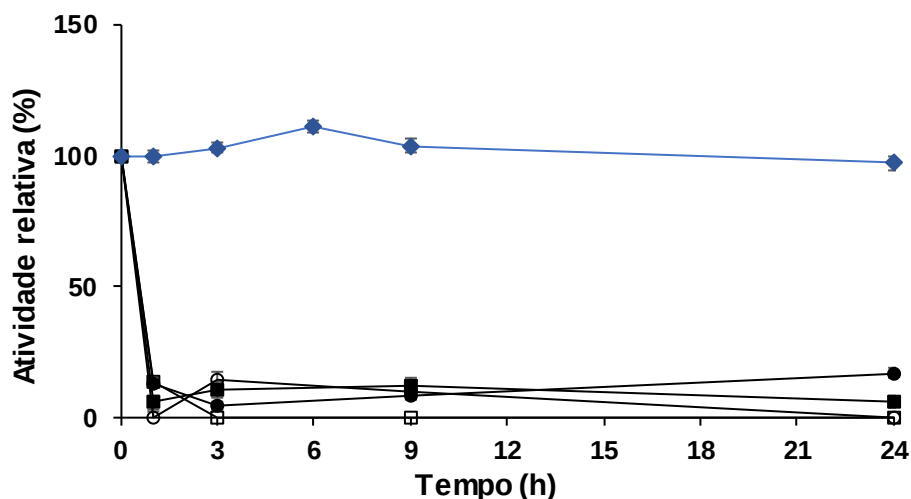


Figura 14. Estabilidade da lipase comercial de *A. niger* na presença das soluções aquosas de PPG 725 nas concentrações (% m/v) de 20 [●], 30 [■], 40 [○] e 50 [□], a 25°C durante 24 h. O ensaio controle considerado como 100% foi realizado na ausência do polímero [♦], cuja atividade enzimática foi de 7.317,24 U.g⁻¹. As barras de erro representam 95% do intervalo de confiança para as medições.

A fim de verificar a interferência do pH na atividade da lipase na presença das soluções aquosas de PPG 725, foi realizado um novo ensaio em tampão McIlvaine pH 5,5 (Figura 15), após 15 min de incubação nas mesmas concentrações descritas acima.

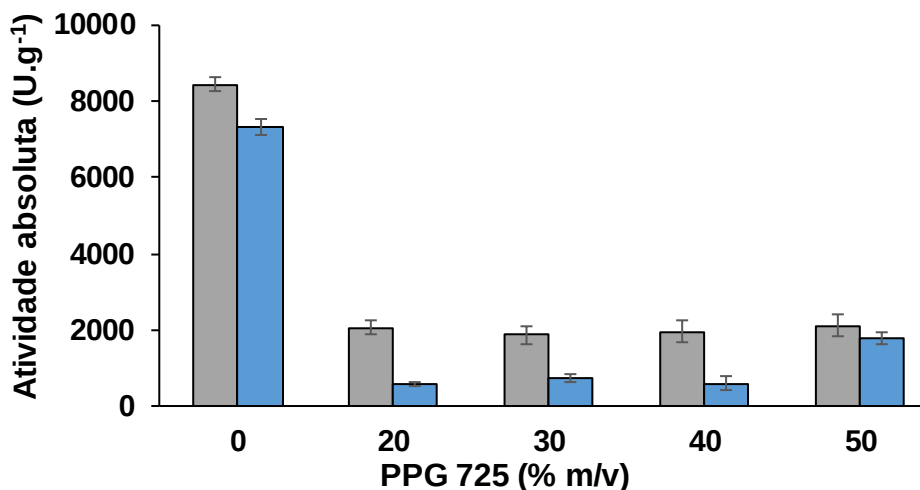


Figura 15. Atividade da lipase comercial de *A. niger* em solução aquosa [■] 7.317,24 U.g⁻¹ e, em tampão McIlvaine pH 5,5 [■] 8.444,00 U.g⁻¹, após 15 min de incubação, em diferentes concentrações de PPG 725 a 25°C. O ensaio na ausência de polímero, concentração [0% (m/v)] foi considerado o controle. As barras de erro representam 95% do intervalo de confiança para as medições.

Pode-se observar que a enzima apresenta uma atividade absoluta maior em pH 5,5 do que em solução aquosa. No entanto, é evidente que em ambos os casos, a presença do PPG

suprimiu a atividade de maneira significativa, próximo de 75%. A perda de atividade foi independente da concentração estudada e mais acentuada em solução aquosa do que em tampão.

Comparando os dois polímeros, PEG 600 e PPG 725, o PPG possui um grupo metil adicional por monômero e, portanto, exibe uma característica mais hidrofóbica. Bassani et al. (2010)²⁰⁴ avaliaram o efeito do polímero PEG de diferentes MM, tendo relatado que a interação entre a lipase é maior à medida que a MM do polímero diminui. Assim, pode-se inferir que a hidrofobicidade do PPG contribuiu para a diminuição da atividade da lipase reduzindo o contato entre o sítio ativo da enzima e o substrato.

O aumento da hidrofobicidade do polímero forma uma estrutura compacta estabilizada por interações hidrofóbicas intermoleculares²⁰⁵, e assim, interações entre as cadeias alquílicas do polímero e os domínios não polares da enzima, acarreta na formação de domínios alifáticos causando uma barreira ao redor do sítio ativo²⁰⁴, provocando uma obstrução total ou parcial do sítio ativo da lipase de modo a dificultar sua interação com o substrato.

Para avaliar se a MM do PPG, e sua respectiva hidrofobicidade apresenta uma influência de modo significativo na estabilidade da lipase, foram realizados uma série de novos experimentos de estabilidade em soluções aquosas de PPG com uma MM inferior, nomeadamente, 425 g.mol⁻¹. Uma vez que na presença de soluções aquosas de PPG 725 em tampão McIlvaine pH 5,5 a lipase apresentou atividades enzimáticas superiores às soluções poliméricas em água, os ensaios de atividade da lipase comercial de *A. niger* para as soluções aquosas de PPG 425 foram realizadas em tampão McIlvaine pH 5,5 nas mesmas condições descritas anteriormente. Os respectivos resultados estão apresentados na Figura 16, sendo os valores referentes a atividade absoluta das soluções aquosas do PPG 425 em Tampão McIlvaine pH 5,5 descritos na Tabela 22 do (Apêndice I).

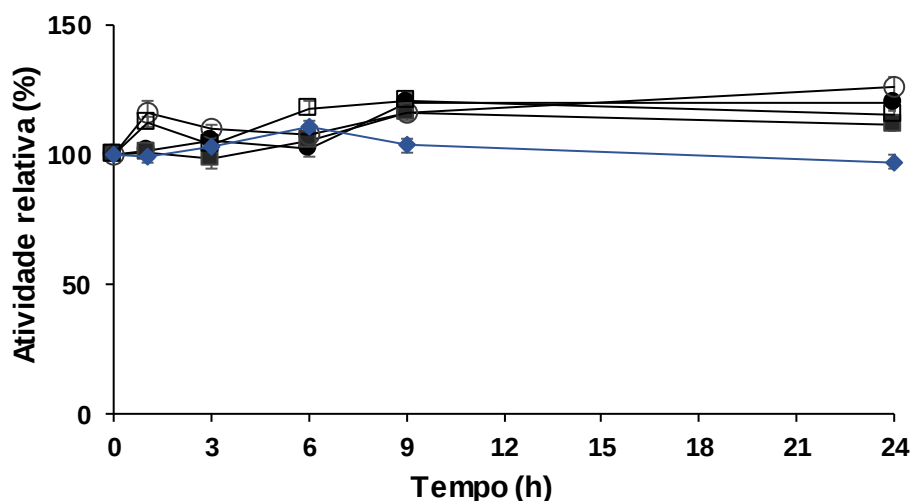


Figura 16. Estabilidade da lipase comercial de *A. niger* em tampão McIlvaine pH 5,5, na presença das soluções aquosas de PPG 425 nas concentrações (% m/v) de 20 [●], 30 [■], 40 [○] e 50 [□], a 25°C durante 24 h. O ensaio controle considerado como 100% foi realizado na ausência do polímero [♦], cuja atividade enzimática foi de 7.317,24 U.g⁻¹. As barras de erro representam 95% do intervalo de confiança para as medições.

Como apresentado na Figura 16, a atividade hidrolítica da lipase na presença das soluções aquosas de PPG 425 manteve-se estável e similar à condição controle (sem o polímero). Nota-se que não houve diferenças significativas quanto a atividade da lipase nas diferentes concentrações estudadas frente ao PPG 425. Os resultados de estabilidade da lipase frente ao polímero PPG 425 corroboram com a literatura^{204,206}, mostrando que a diminuição do tamanho do polímero, e consequente menor hidrofobicidade relativa, teve uma influência positiva na manutenção atividade catalítica da lipase. Assim, estes resultados confirmam que a perda de atividade da lipase está relacionada com a hidrofobicidade do PPG 725.

Com o objetivo de avaliar se o efeito do aumento da MM de PPG é predominante na atividade da lipase, na Figura 17 é apresentada a comparação da atividade absoluta após 15 min incubação na presença de PPG 425 e 725 em tampão McIlvaine pH 5,5 a 25°C.

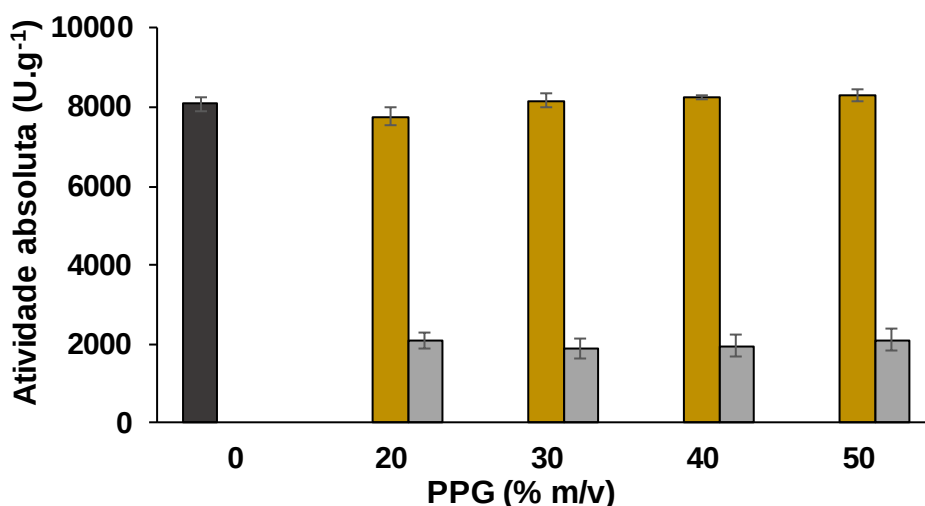


Figura 17. Atividade da lipase comercial de *A. niger* na presença de soluções aquosas dos polímeros de PPG 425 g.mol⁻¹ [■] e PPG 725 g.mol⁻¹ [■] em tampão Mcllvaine pH 5,5 a 25°C após 15 min de incubação. O ensaio na ausência dos polímeros [0% (m/v)] foi realizado em tampão Mcllvaine pH 5,5 [■], cuja atividade enzimática foi de 8.089,33 U.g⁻¹. As barras de erro representam 95% do intervalo de confiança para as medições.

Conforme apresentado na Figura 17, é evidente que PPG 725 se comporta como um inibidor enzimático da lipase, independente da concentração aplicada. Conforme reportado acima, o aumento da MM do PPG pode causar uma obstrução do sítio ativo da lipase devido interações hidrofóbicas, justificando a diminuição na atividade catalítica, uma vez que dificulta a formação do complexo enzima-substrato.

Após os estudos dos polímeros não iônicos, foi então avaliado qual seria o efeito da adição de um polímero iônico, muito utilizado na formação de SPDFA, na estabilidade da lipase, nomeadamente, o Poliacrilato de Sódio (NaPA) com MM de 8.000 g.mol⁻¹. O NaPA 8.000 é um polímero carregado negativamente¹¹⁰, possui uma longa cadeia, e sua carga superficial pode apresentar uma função importante na manutenção da estabilidade eletrostática. De acordo com a literatura, o NaPA 8.000 pode prevenir a aglomeração de partículas além de reduzir a viscosidade²⁰⁷. Este polímero tem sido estudado devido suas propriedades para suspensões²⁰⁸, como agente dispersante²⁰⁷, para a extração de lipases pela formação de complexos insolúveis²⁰⁹ e na partição de biomoléculas quando utilizado como componente de SDFA^{25,126}.

Os resultados de estabilidade da lipase em soluções aquosas com NaPA 8.000 a 25°C em função do tempo de exposição (h) estão apresentados na Figura 18. Os valores referentes a atividade absoluta da lipase na presença do polímero NaPA 8.000 em solução aquosa e em tampão Mcllvaine pH 5,5 estão descritos na Tabela 23, Apêndice I.

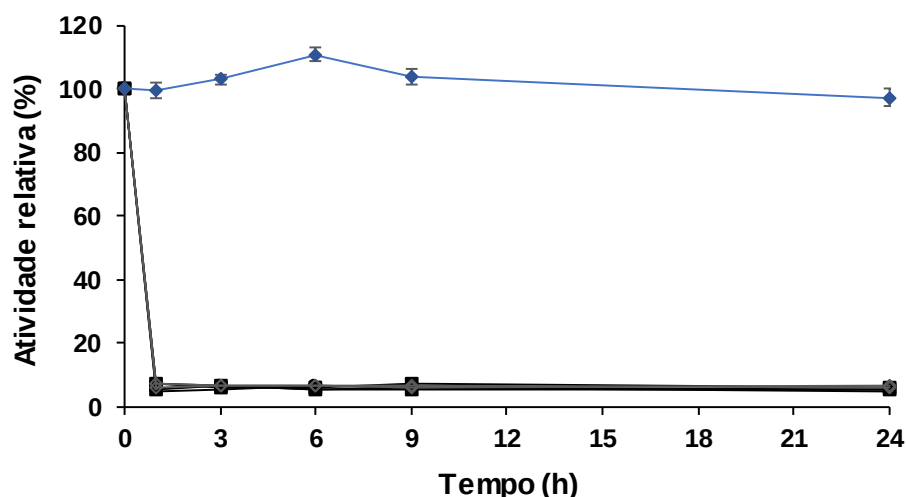


Figura 18. Estabilidade da lipase comercial de *A. niger* na presença de soluções aquosas de NaPA 8.000 (pH $8 \approx 9$) nas concentrações (% m/m) de 5 [■], 10 [◆] e 15 [●] e, de soluções de NaPA 8.000 em tampão Mcllvaine pH 5,5 nas concentrações (% m/v) de 5 [□], 10 [◇] e 15 [○]. O ensaio controle considerado como 100% foi realizado na ausência do polímero [♦], cuja atividade enzimática foi de $7.317,24 \text{ U.g}^{-1}$. As barras de erro representam 95% do intervalo de confiança para as medições.

Os resultados dos ensaios de estabilidade da lipase em soluções aquosas de NaPA, pH $8 \approx 9$, demonstraram que em todas as concentrações estudadas [5, 10 e 15% (m/v)], a adição do polímero causou uma diminuição significativa na atividade da enzima, independente do tempo de incubação. Em água, a atividade da lipase foi de $7.317,24 \text{ U.g}^{-1}$, enquanto, que na presença do NaPA 8.000, independente da concentração ou do tempo de exposição, a atividade enzimática não foi superior a 500 U.g^{-1} .

A fim de verificar se foi a variação do pH que influenciou de modo negativo a atividade enzimática, foi realizado um estudo de estabilidade em tampão Mcllvaine pH 5,5 nas mesmas condições. Porém, na presença do NaPA 8.000, o tampão Mcllvaine pH 5,5 não foi capaz de manter a faixa de tamponamento próximo a 5,5, e o pH ficou próximo a 8,0. Assim, infere-se que a perda de atividade foi relacionada com o pH do meio proporcionado pela presença do polímero NaPA.

Ademais, o ambiente iônico proporcionado pelo NaPA pode acarretar maior rigidez da enzima, devido a possíveis interações eletrostáticas, já que a enzima precisa romper essa barreira cinética para uma maior flexibilidade, de forma a modificar sua conformação estrutural quando comparada a um ambiente não iônico²¹⁰. Contudo, este efeito não fica evidente devido aos valores de pH alcalinos das soluções aquosas de NaPA.

A viscosidade das soluções aquosas dos polímeros PEG 600, PPG 425, PPG 725 e NaPA 8.000 foram determinadas a fim de verificar a influência desta propriedade na atividade

Resultados e Discussão

hidrolítica da lipase. A viscosidade está associada a resistência ao fluxo²¹¹, assim, a viscosidade de líquidos é caracterizada pela resistência de um fluido ao escoamento, ou pela força requerida para o deslocamento desse líquido contra um gradiente²¹². A Figura 19 mostra a viscosidade das soluções aquosas destes polímeros.

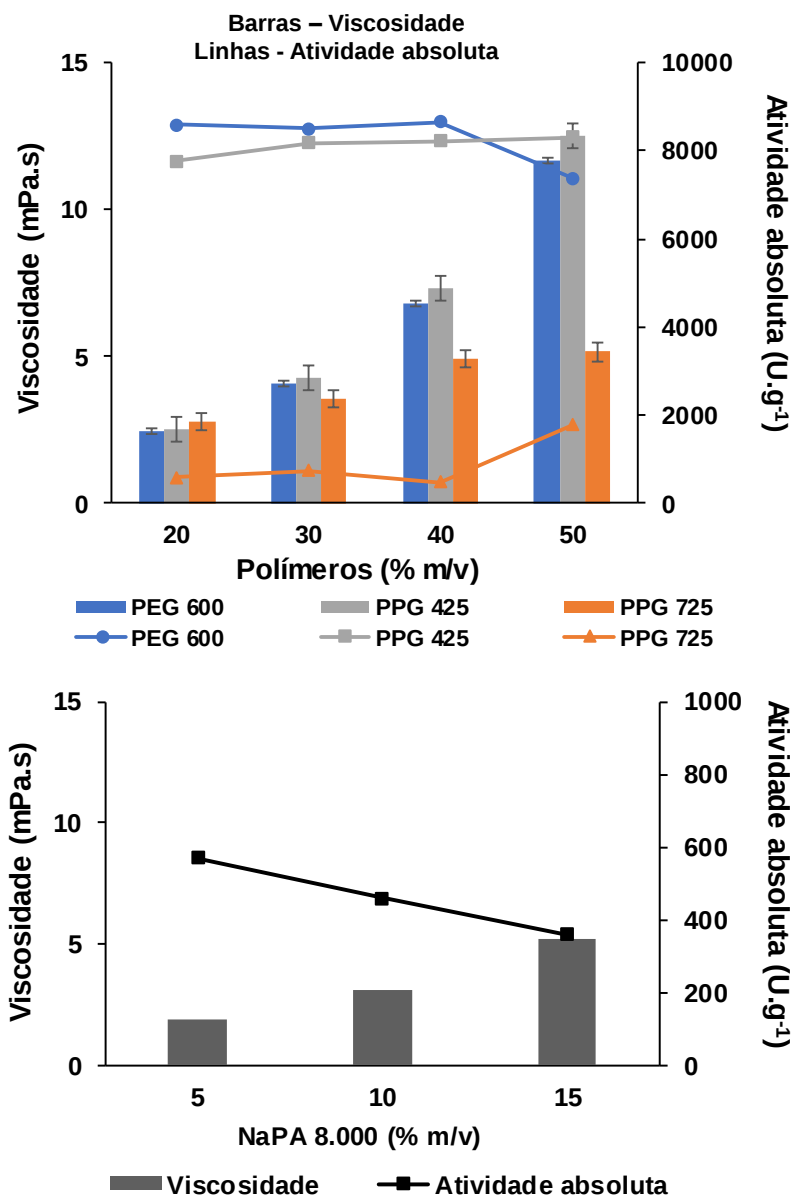


Figura 19. Viscosidade (mPa.s) a 25°C da solução aquosa do polímero PEG 600 e, dos polímeros PPG 425 e PPG 725 em tampão Mcllvaine a pH 5,5 nas seguintes concentrações (m/v): 20; 30; 40; 50% [A]. Viscosidade (mPa.s) a 25°C do polímero NaPA 8.000 em tampão Mcllvaine a pH 5,5 nas seguintes concentrações (m/v): 5; 10; 15% [B]. No eixo primário expresso em colunas tem-se a representação da viscosidade das soluções aquosas para os polímeros e no eixo secundário expressos em linha tem-se a atividade absoluta da lipase.

Analisando comparativamente a viscosidade das soluções aquosas dos polímeros PEG 600, PPG 425, PPG 725 (Figura 19A) e NaPA 8.000 (Figura 19B), nota-se apenas uma relação

entre viscosidade e atividade da lipase nas soluções aquosas do polímero NaPA 8.000, as quais aparentam demonstrar uma relação linear oposta à atividade da enzima. Embora, os ensaios com o NaPA 8.000 não tenham apresentado um efeito positivo sobre a atividade enzimática devido ao pH, a atividade absoluta diminuiu cerca de 63% com o aumento da concentração de 5% para 15% (m/v). Maiores concentrações de polímero NaPA acarretam um incremento da viscosidade na solução aquosa. No entanto, a causa principal da inatividade enzimática se deve possivelmente ao pH alcalino mesmo em solução tamponada, e fica muito difícil inferir que essa variação de viscosidade possa ser suficiente para causar uma redução significativa da atividade catalítica.

A partir dos resultados obtidos, somente o PEG 600 e o PPG 425 não desestabilizaram a enzima e podem ser usados como agentes formadores das fases em SDFA. Ambos os polímeros PPG 725 e NaPA 8.000 apresentaram características indesejáveis para extrações de lipases.

Sabe-se que as interações entre polímeros e distintas enzimas diferem, porém, a aplicação do PPG 725 pode ser interessante quanto ao seu efeito enzimático inibidor em diferentes reações biológicas. O uso de inibidores enzimáticos é requerido na área alimentícia para a inativação de enzimas da classe das oxidases como, peroxidase e polifenoloxidase²¹³. Na área farmacêutica para o desenvolvimento de novos fármacos²¹⁴, na inativação de lipases inibindo a absorção de gordura e, consequentemente reduzindo os fatores de risco para doenças relacionadas à obesidade como diabetes, aterosclerose e doenças cardiovasculares¹⁹⁰.

Atualmente o fármaco Orlistat^{190,215}, disponível no mercado, promove a inibição da lipase gástrica e pancreática. Orlistat atua sobre a Ser ativa através de uma ligação covalente²¹⁵. Além disso, a maioria dos inibidores de lipase testados são insolúveis em água¹⁹⁰. Desse modo, o PPG 725 e o NaPA 8.000 devido à suas grandes solubilidades em água surgem como potenciais agentes inibidores para as lipases ácidas, podendo ser de grande interesse para a indústria farmacêutica.

Posteriormente a esses estudos, se fez necessário o estudo de estabilidade frente ao PPG 400. Esse estudo foi requerido devido ao estágio de doutorado sanduíche no âmbito do projeto PDSE – Edital nº 19/2016 (Número do Processo: 88881.133279/2016-01), a qual foram realizados experimentos de extração da enzima fazendo uso deste polímero. Para analisar a estabilidade da lipase, a enzima foi incubada diante de soluções aquosas do polímero não-iônico PPG 400 nas concentrações de 30 a 60% (m/v). Todos os ensaios foram realizados a 25°C e, um ensaio na ausência do polímero foi considerado o controle. Na Figura 20 pode-se observar

a estabilidade da lipase na presença de diferentes soluções aquosas de PPG 400, estando os valores referentes a atividade absoluta detalhados na Tabela 24, Apêndice I.

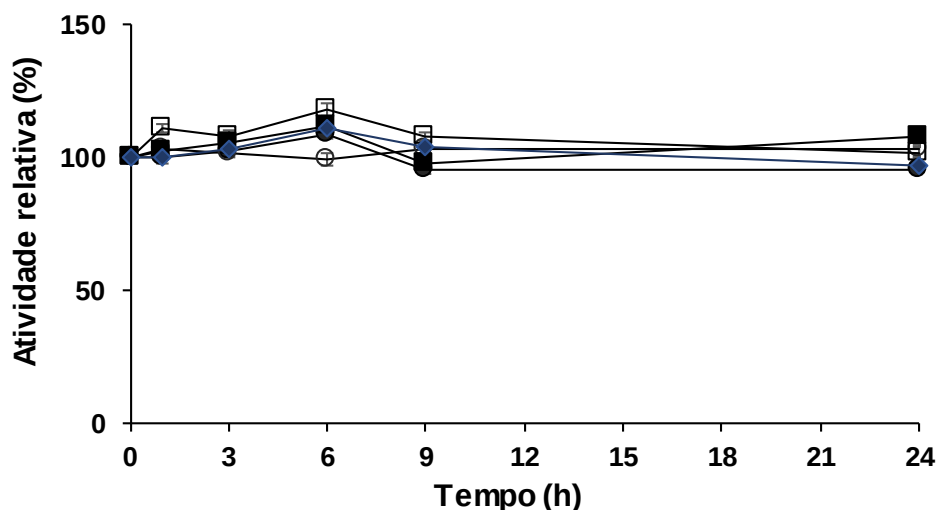


Figura 20. Estabilidade da lipase comercial de *A. niger* em soluções aquosas de PPG 400 nas concentrações (% m/v) de 30 [●], 40 [○], 50 [■] e 60 [□], a 25°C durante 24 h. O ensaio controle considerado como 100% foi realizado na ausência do polímero [◆], cuja atividade enzimática foi de 7.317,24 U.g⁻¹. As barras de erro representam 95% do intervalo de confiança para as medições.

Nota-se na Figura 20 que a estabilidade da lipase frente as soluções aquosas do PPG 400 apresentaram resultados similares aos reportados com o polímero PPG 425 em tampão McIlvaine (pH 5,5). As soluções aquosas do PPG 400 favoreceram a interação da lipase com o substrato, ademais, não houve diferenças significativas quanto as diferentes concentrações estudadas.

5.2.3 Efeito de diferentes Carboidratos

Esse estudo foi requerido devido ao estágio de doutorado sanduíche realizado na Universidade de Aveiro, Portugal no âmbito do projeto PDSE – Edital n° 19/2016 (Número do Processo: 88881.133279/2016-01).

O estudo de estabilidade da lipase comercial de *A. niger* na presença de diferentes carboidratos, precisamente, D- Frutose, D- Manose, D- Sacarose e D- Xilose foi realizado em solução aquosa nas concentrações de 20 e 50% (m/v), Figura 21. Os ensaios foram realizados a 25°C num período de incubação de 3 h. O ensaio na ausência dos carboidratos foi realizado como controle. No Apêndice I estão descritos os valores referentes a atividade absoluta de todos os carboidratos (Tabela 25).

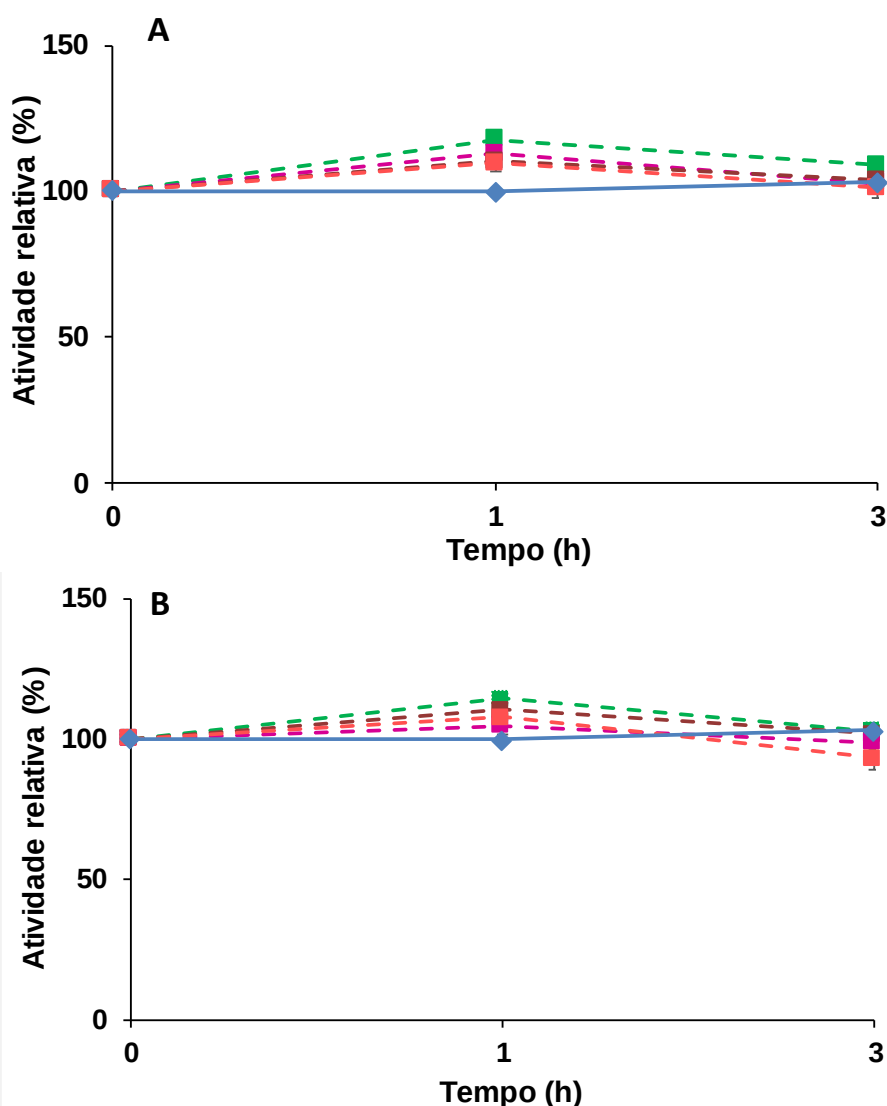


Figura 21. Estabilidade da lipase comercial de *A. niger* durante 3 h a 25°C na presença das soluções aquosas de: D-Xilose [■], D-Sacarose [■], D-Manose [■] e D-Frutose [■], nas seguintes concentrações (m/v): 20% [A] e 50% [B]. O ensaio controle considerado como 100% foi realizado na ausência dos carboidratos [◆], cuja atividade enzimática foi de 7.317,24 U.g⁻¹. As barras de erro representam 95% do intervalo de confiança para as medições.

Na Figura 21 pode-se observar que, independentemente do carboidrato estudado, a lipase manteve sua atividade hidrolítica durante o período de incubação de 3 h. Não houve diferenças significativas quanto as concentrações estudadas, ademais, os resultados foram similares a estabilidade enzimática na ausência de carboidratos. As interações dominantes entre o carboidrato e a enzima são formadas pelos grupos hidroxilas do carboidrato que podem atuar como doadores de ligação de hidrogênio e/ou aceptores estabelecendo uma estrutura bem organizada¹⁶⁷. Assim, o complexo pode ser estabilizado por interações de van der Waals entre os grupos aromáticos de aminoácidos das proteínas e a rede de carbono dos carboidratos¹⁶⁷.

Os solventes hidrofílicos levam ao desdobramento da enzima com exposição dos resíduos hidrofóbicos internos²¹⁶, no entanto, a presença dos carboidratos promoveu a mudança conformacional da lipase com exposição do sítio ativo favorecendo a interação enzima-substrato, a qual manteve sua estabilidade enzimática.

Considerando que todos os carboidratos, mesmo em alta concentração 50% (m/v), mantiveram a atividade catalítica da lipase, estes apresentam um grande potencial para serem utilizados como agente formador de fases em SDFA. Seu uso pode ser explorado em sistemas micelares, sistemas poliméricos e sistemas baseados em LIs. Adicionalmente, importa destacar que a produção de lipases em meio contendo carboidratos pode favorecer o processo de extração e a viabilidade econômica do processo.

Sabe-se que os substratos para as lipases são os triacilgliceróis, no entanto, os carboidratos já foram utilizados como fonte de carbono por microorganismos produtores de lipases. Lin e Ko (2005)²¹⁷ reportaram que a produção da lipase por Basidiomiceto *Antrodia cinnamomeas* aumentou consideravelmente quando no meio por cultura submersa foi adicionado glicose. Nutan et al. (2002)²¹⁸ também relataram que a adição de glicose no meio fermentado por fermentação submersa foi benéfica para a produção de lipase devido a rápida metabolização do carboidrato como fonte de carbono pelo microorganismo *A. niger* NCIM 1207 em comparação aos lipídeos. Assim, pode se considerar um sistema integrado, onde o carboidrato presente no meio fermentado será posteriormente utilizado para composição do SDFA.

5.2.4 Efeito de diferentes Líquidos Iônicos na atividade da lipase comercial de A. niger

A estabilidade da lipase comercial foi estudada frente a duas famílias de LIs, nomeadamente, a dos cloretos de imidazólio ($[C_n\text{mim}]\text{Cl}$) e das colinas ($[\text{Ch}]\text{X}$), tendo sido avaliado o efeito do aumento da cadeia alquílica sobre a atividade enzimática.

A. Efeito dos LIs baseados em Imidazólios ($[C_n\text{mim}]\text{Cl}$)

A estrutura dos imidazólios estudada consiste no cátion *n*-alquil-3-metilimidazólio ($[C_n\text{mim}]^+$) combinado com o ânion Cl^- , variando o número de carbonos da cadeia alquílica lateral catiônica. Sabe-se que os LIs $[C_n\text{mim}]\text{Cl}$ apresentam características de tensoativos quando sua cadeia alquílica é superior a 8 carbonos^{130,219,220} com capacidade de autoagregação. De modo a estudar a influência do comprimento da cadeia alquílica catiônica (C_4 a C_{12}), foram preparadas diferentes soluções aquosas de $[C_n\text{mim}]\text{Cl}$ em concentrações abaixo de sua CMC, conforme detalhado na Tabela 10.

Tabela 10. Concentrações das soluções aquosas de LIs em mM.

LIs	mM			
	CMC*	0,1	0,3	0,5
[C ₈ mim]Cl	195,00 ²²¹	0,044	0,133	0,221
[C ₁₀ mim]Cl	55,00 ¹⁷⁹	0,039	0,118	0,197
[C ₁₂ mim]Cl	15,00 ¹⁷⁹	0,035	0,107	0,178

*valores da Concentração Micelar Crítica dos LIs reportados na literatura.

Assim, para melhor compreensão do aumento da cadeia alquílica catiônica sobre a atividade/estabilidade e estrutura conformacional da lipase, o ânion Cl⁻ foi selecionado para o estudo, uma vez que é geralmente considerado um ânion limítrofe de acordo com a série de *Hofmeister*²²² e, teoricamente, exibiria um comportamento neutro (nem *salting-out* nem *salting-in*). A Figura 22 mostra a estabilidade da lipase na presença de diferentes soluções aquosas dos LIs, [C₄mim]Cl, [C₆mim]Cl, [C₈mim]Cl, [C₁₀mim]Cl e [C₁₂mim]Cl, nas concentrações (% v/v) de: 0,1, 0,3 e 0,5. O ensaio na ausência de LIs foi considerado o controle e a temperatura adotada para os ensaios foi de 35°C. No Apêndice I estão descritos os valores referentes à atividade absoluta dos LIs da família dos imidazólios (Tabela 26).

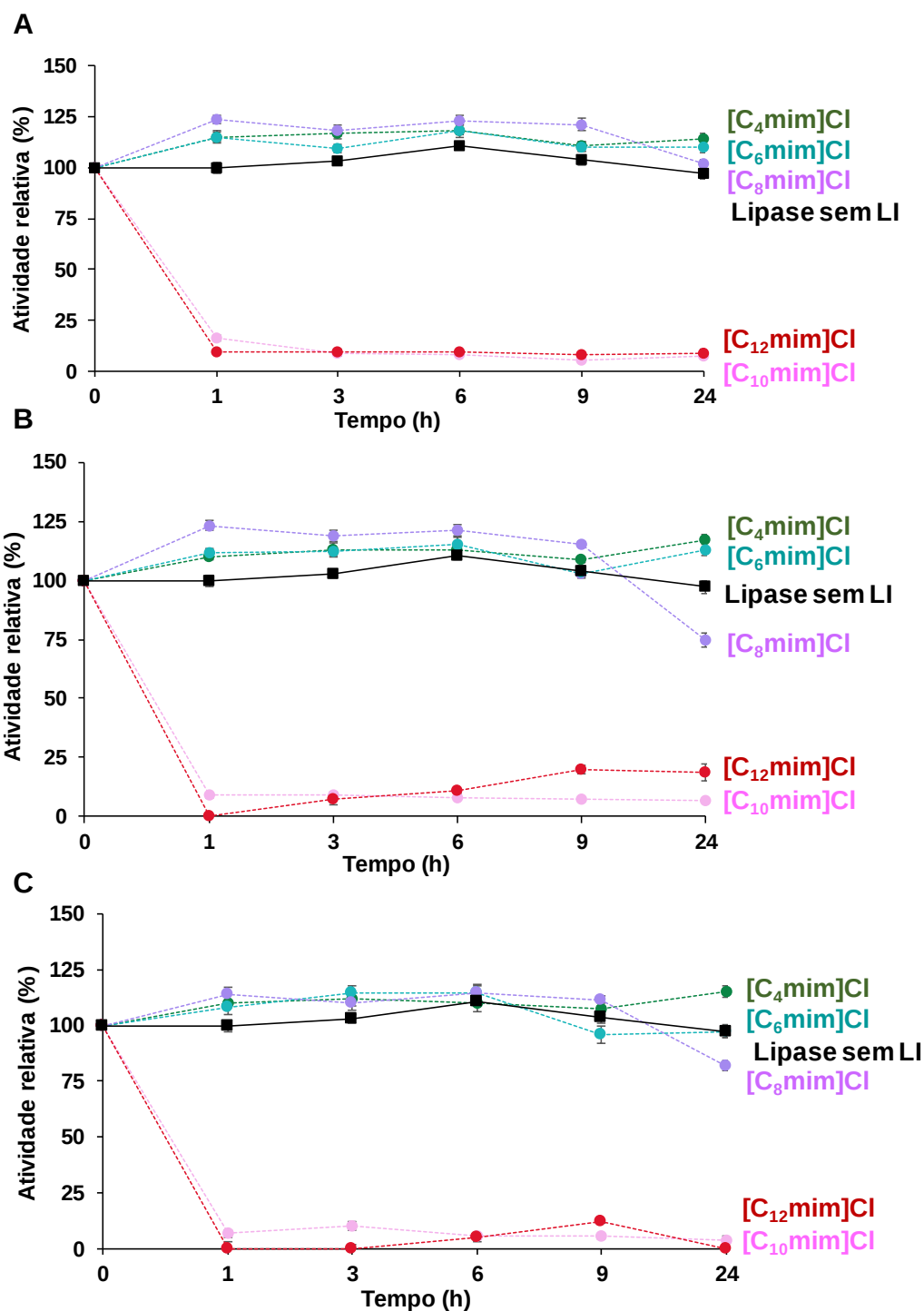


Figura 22. Estabilidade da lipase comercial de *A. niger* durante 24 h a 35°C na presença de diferentes concentrações de soluções aquosas de [C_nmim]Cl (% v/v) de 0,1 (A), 0,3 (B) e 0,5 (C). O ensaio controle considerado como 100% foi realizado na ausência de LIs [■], cuja atividade enzimática foi de 7.317,24 U.g⁻¹. As barras de erro representam 95% do intervalo de confiança para as medições.

Na Figura 22, pode ser visto que independentemente das concentrações dos LIs, foi observado um aumento (aproximadamente 25%) da atividade relativa da lipase quando a enzima foi exposta às soluções aquosas de LIs com cadeia alquílica catiônica com menos de 10

átomos de carbono. Ambas as soluções aquosas [C₄mim]Cl e [C₆mim]Cl mantiveram a atividade enzimática durante as 24 h de incubação. Contudo, após 9 h de exposição na presença de soluções aquosas de [C₈mim]Cl, particularmente 0,3 e 0,5% (v/v), a atividade catalítica foi reduzida em cerca de 25%. Um efeito negativo significativo na atividade da lipase foi observado na presença de ambas soluções aquosas de [C₁₀mim]Cl e [C₁₂mim]Cl. Após 1 h de incubação, ambos os LIs, [C₁₀mim]Cl e [C₁₂mim]Cl, independentemente das concentrações, fizeram com que a lipase apresentasse uma atividade relativa inferior a 10%. Nestas condições, a perda de atividade foi observada imediatamente após o contato da enzima com as soluções aquosas de LIs, i.e., no tempo 1 h.

A partir destes resultados, é evidente que o aumento no comprimento da cadeia alquílica induziu a um efeito negativo no comportamento catalítico da lipase. A estrutura química da enzima não foi significativamente afetada com a exposição às soluções aquosas de [C_nmim]Cl de cadeia mais curta, visto que a atividade relativa da lipase foi mantida ou mesmo aumentada.

Parece que na presença de LIs com comprimento de cadeia alquílica longa, as porções hidrofóbicas dos LIs podem interagir com o sítio ativo da enzima dificultando a interação entre a enzima e o substrato, reduzindo o desempenho catalítico. Os resultados obtidos estão de acordo com estudos anteriores mostrando que o longo comprimento de cadeia alquílica dos íons de LIs, mesmo abaixo da CMC, podem nanoagregar-se, criando um ambiente desfavorável para a lipase, reduzindo seu comportamento catalítico^{206,223}. Assim, na presença de LIs com comprimento de cadeia alquílica longa, a tensão superficial da solução é reduzida, a qual diminui os rendimentos catalíticos da lipase.

Alguns autores têm destacado que LIs moderadamente hidrofóbicos podem interagir com os domínios não polares do sítio ativo da lipase e, conseqüentemente, prejudicar sua atividade hidrolítica^{172,224,225}. A obstrução do sítio ativo não polar dificulta a ligação enzima-substrato¹⁷² ou até mesmo diminui a difusividade do substrato e a transferência de massa²⁰⁶, causando um efeito negativo na atividade enzimática a qual desestabiliza a estrutura proteica^{226,227}. Assim, o efeito inibitório dos LIs é acentuado com o aumento da hidrofobicidade do LI, como exemplo, aumentando o comprimento da cadeia alquílica de seus íons^{172,226,228–230}. Portanto, quanto maior o comprimento da cadeia alquílica (maior a hidrofobicidade dos LIs) mais acentuada serão as interações do tipo hidrofóbico devido a ligação da cadeia alquílica com o sítio ativo não polar da enzima^{172,226}.

Anteriormente, Na et al. (2013)²²³ relataram efeitos similares usando LIs baseados em [C_nmim]⁺ com diferentes ânions (Br⁻ e [BF₄]⁻); (n= 2, 4, 6, 8, 10, 12), demonstrando que a atividade da lipase de *Candida rugosa* foi inibida com o aumento do comprimento da cadeia

alquílica catiônica. Ventura e colaboradores (2012)²⁰⁶ também concluíram que o aumento do comprimento da cadeia alquílica do $[C_n\text{mim}]^+$ diminuiu a atividade da lipase *Candida antarctica*. O efeito negativo do aumento do comprimento da cadeia alquílica dos cátions foi largamente demonstrado para outras enzimas. A atividade da adenosina desaminase foi reduzida com o aumento do comprimento da cadeia alquílica dos LIs (e hidrofobicidade relativa), devido à mudanças na estrutura terciária da enzima²²⁸. Geng et al. (2010)²³¹ avaliaram o efeito do brometo de 1-tetradecil-3-metilimidazólio ($[C_{14}\text{mim}]\text{Br}$) na BSA, e a presença do LI induziu a desnaturação da proteína. Lange e colaboradores (2005)²³⁰ relataram que altas concentrações de $[C_6\text{mim}]\text{Cl}$ suprimiram de modo significativo a atividade da lisozima.

Como mostrado, o comprimento da cadeia alquílica exerce forte influência na atividade da lipase, e assim, para avaliar se este efeito é dependente da concentração de LI, foram realizados experimentos adicionais de atividade enzimática variando as concentrações de $[C_n\text{mim}]\text{Cl}$ (% v/v): 0,025; 0,05; 0,15, conforme apresentado na Figura 23.

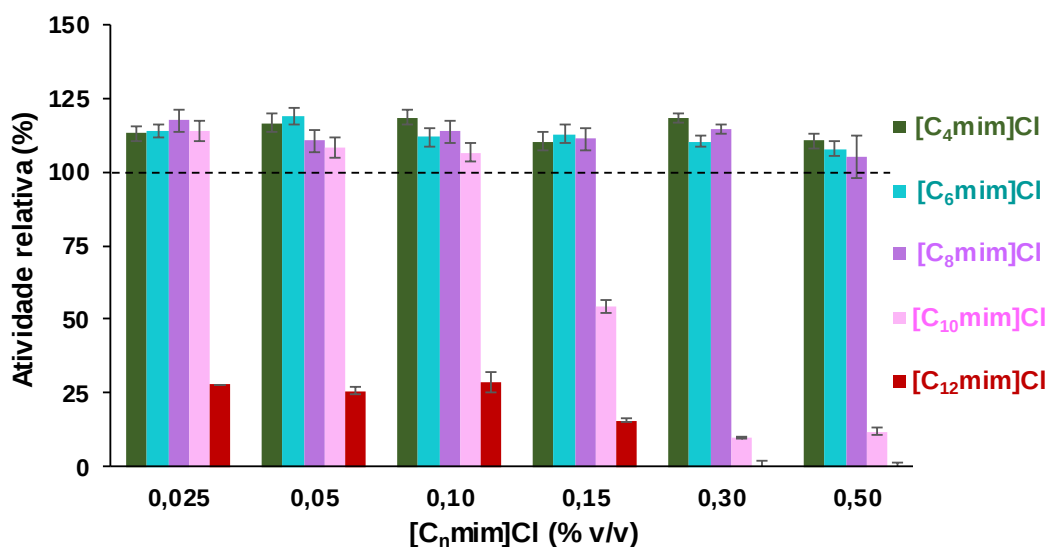


Figura 23. Atividade da lipase comercial de *A. niger* na presença de soluções aquosas de $[C_4\text{mim}]\text{Cl}$ [■], $[C_6\text{mim}]\text{Cl}$ [■], $[C_8\text{mim}]\text{Cl}$ [■], $[C_{10}\text{mim}]\text{Cl}$ [■] e $[C_{12}\text{mim}]\text{Cl}$ [■], nas seguintes concentrações (% v/v): 0,025, 0,05, 0,1, 0,15, 0,3 e 0,5 após 15 min de incubação a 35°C. As barras de erro representam 95% do intervalo de confiança para as medições.

Analisando os resultados da Figura 23, observa-se que o efeito inibitório sobre a atividade da lipase não é apenas dependente do comprimento da cadeia alquílica do cátion, mas também está relacionado com a concentração dos LIs. Similarmente, aos resultados da Figura 22, independente das concentrações de LIs, todas as soluções aquosas contendo $[C_4\text{mim}]\text{Cl}$, $[C_6\text{mim}]\text{Cl}$ e $[C_8\text{mim}]\text{Cl}$ aumentaram a atividade relativa da lipase (valores superiores a 100%).

Sabe-se que, a estabilidade de proteínas em soluções aquosas de LIs é um resultado de um equilíbrio de interações competitivas entre a água, a superfície da proteína e os íons dos LIs (cátion, ânion ou o próprio par iônico)²³². Dependendo de seu caráter hidrofóbico/hidrofílico/anfifílico, os íons do LI e a água podem interagir com as porções polares/apolares e a área carregada da superfície da proteína, causando efeitos favoráveis e desfavoráveis de acordo com a especificidade e predominância de cada uma destas interações^{216,233–235}. Os resultados obtidos neste trabalho mostram que alguns LIs promoveram um aumento nos valores de atividade relativa superior a 100% ([C₄mim]Cl, [C₆mim]Cl e [C₈mim]Cl), em comparação com a água (ensaio controle), provavelmente devido as interações eletrostáticas favoráveis entre os íons de LI e a lipase. Estas interações entre LIs-enzima permitiram uma mudança na estrutura conformacional para uma estrutura mais ativa, favorecendo a formação do complexo enzima-substrato, *i.e.*, aprimorando seu comportamento catalítico.

Previamente, já foi demonstrado, que [C_nmim]Cl de cadeia curta em menores concentrações, abaixo da CMC, os íons imidazólio e cloreto interagem seletivamente com a superfície da proteína através de interações eletrostáticas, formando complexos LI-proteína²³⁴. No entanto, com o aumento do comprimento da cadeia alquílica catiônica, (caráter mais hidrofóbico), interações dispersivas não específicas entre a cadeia alquílica aumentam e reduzem o grau de ionização²³⁶. Portanto, devido a formação de estruturas nanoagregadas de LIs, as interações eletrostáticas positivas dos íons de LIs e a lipase foram reduzidas, e a aptidão catalítica diminuiu. Os menores valores de condutividade elétrica para as soluções aquosas com maior comprimento da cadeia alquílica dos [C_nmim]Cl ([C₁₂mim]Cl < [C₁₀mim]Cl < [C₈mim]Cl < [C₆mim]Cl ≈ [C₄mim]Cl), apresentados na Figura 24, confirmam a diminuição do número da carga devido a formação de íons não-neutros agregados. As soluções aquosas de LIs com os maiores valores de condutividade, *i.e.*, [C_nmim]Cl de cadeia mais curta em altas concentrações, correspondem aos sistemas com as maiores atividades enzimáticas da lipase.

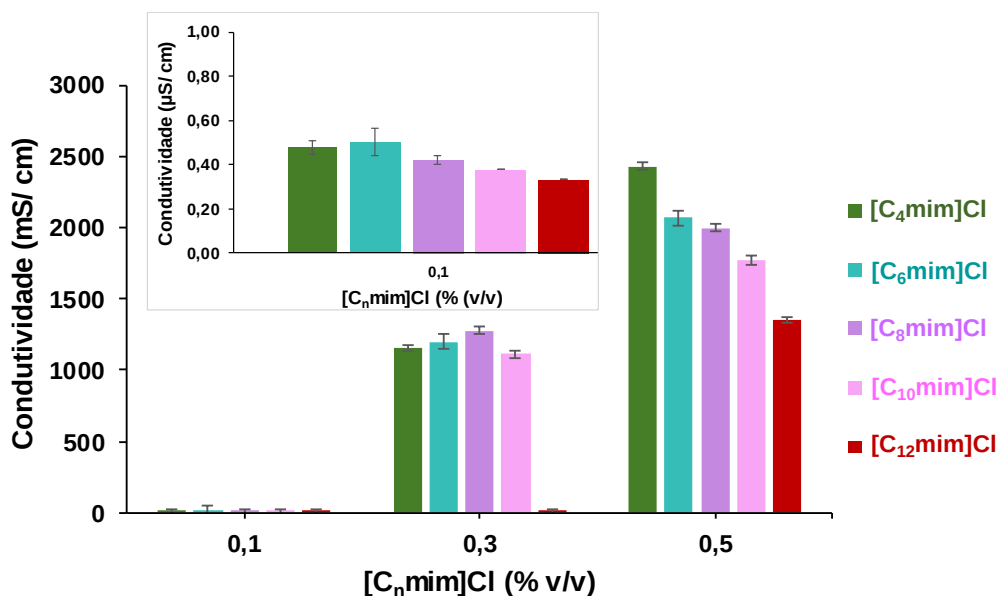


Figura 24. Condutividade (mS/cm) das soluções aquosas de [C₄mim]Cl [■], [C₆mim]Cl [■], [C₈mim]Cl [■], [C₁₀mim]Cl [■] e [C₁₂mim]Cl [■] nas seguintes concentrações (% v/v): 0,1; 0,3; 0,5. As barras de erro representam um limite de confiança de 95% para a média de três medições independentes a 25°C.

Curiosamente, quando a lipase foi exposta a soluções aquosas de [C₁₀mim]Cl, dois efeitos opostos foram observados: *i*) um aumento da atividade catalítica até 0,1% (v/v) de LI; *ii*) um efeito inibitório acima de 0,1% (v/v), diminuindo proporcionalmente a atividade hidrolítica da enzima com o aumento da concentração de LI (com 0,3% (v/v) restando apenas 10% da atividade da lipase), Figura 23. Soluções aquosas de [C₁₂mim]Cl induziram aos maiores efeitos inibitórios sobre a atividade hidrolítica da lipase, pois a atividade catalítica foi completamente inibida em concentrações de 0,3% (v/v). É importante notar que mesmo em concentrações muito baixas de [C₁₂mim]Cl (0,025- 0,10% (v/v)), apenas 25% das lipases permaneceram ativas.

Os resultados são consistentes com a literatura, sugerindo que a estabilidade da proteína é dependente da concentração dos LIs^{229,237} e que nem todos os LIs baseados em imidazólios exercem um efeito negativo sobre a atividade biocatalítica das enzimas^{229,238}. Assim, os efeitos positivos ou negativos de LIs são dependentes de uma combinação de vários parâmetros, como a natureza e o tipo do ânion dos LIs, a hidrofobicidade e o comprimento da cadeia alquílica do cátion de LIs, bem como a sua concentração²³⁸. Além disso, é importante destacar que o tipo de enzima, substrato e especificidade da reação catalítica também podem alterar o efeito de um LI sobre a ligação enzima-substrato.

Os resultados apresentados mostraram que ambas as soluções aquosas de [C₁₀mim]Cl e [C₁₂mim]Cl reduziram significativamente a atividade hidrolítica da lipase, o que parece indicar

que o caráter tensoativo dos LIs nem sempre é favorável ao comportamento catalítico da lipase. Pelo contrário, estas descobertas mostram que o aumento do comprimento da cadeia alquílica dos $[C_n\text{mim}]\text{Cl}$ afetou negativamente a funcionalidade da enzima. Embora as concentrações dos LIs estudados estivessem abaixo dos valores de CMC (reportados na literatura - detalhados na Tabela 10), a dinâmica de nano-agregação das moléculas de LIs podem ocorrer na presença de moléculas de tensoativos²³⁹. Assim, parece que a autoagregação de LIs afetou em certa extensão a mobilidade da enzima e/ou modificou sua estrutura terciária, prejudicando a aptidão catalítica da lipase.

A literatura descreve que a autoagregação de $[C_{10}\text{mim}]\text{Cl}$ e $[C_{12}\text{mim}]\text{Cl}$ ocorre facilmente em soluções aquosas, devido à sua alta afinidade na superfície e tensões superficiais muito baixas²⁴⁰. Além disso, o aumento das concentrações de $[C_n\text{mim}]\text{Cl}$ em solução aquosa pode também fortalecer simultaneamente a formação de micelas, devido ao aumento das interações do tipo hidrofóbicas²⁴¹. Para a agregação das moléculas de LIs, primeiramente, a interação da cadeia alquílica do cátion com a água é energeticamente desfavorável, sendo a água substituída. Essa substituição ocorre devido à baixa energia de solvatação do grupo da cabeça dos imidazólios, bem como pelo forte caráter polar da porção anexada (“cauda”). Assim, as interações de van der Waals das caudas hidrofóbicas contribuem para a dispersão da carga e reduzem a força de ligação de hidrogênio²²⁰.

O processo de micelização é um resultado da entropia de um sistema termodinâmico, que é iniciado com a estruturação altamente ordenada da água ao redor do domínio hidrofóbico dos LIs²²⁰. Em um sistema micelar termodinâmico baseado em LIs, quando a concentração de LIs permanece abaixo da CMC, existe uma grande contribuição entálpica resultante do calor do processo de demicelização por diluição micelar e diluição de monômeros no solvente²⁴², contra-íons e suas interações mútuas²⁴³. No presente trabalho, como as concentrações dos LIs foram menores que às suas respectivas CMC, a contribuição entálpica provavelmente desempenhou o papel principal na estabilidade da lipase.

Sabe-se que as interações entre a superfície da proteína e os íons dos LIs são determinadas, não somente pelo tipo, tamanho e estrutura da proteína, mas também pelo tamanho e magnitude da carga superficial iônica²²⁷. Assim, o efeito do ânion na atividade e estabilidade da lipase não pode ser simplesmente ignorado. Pelo contrário, a escolha do ânion geralmente é considerada como a chave para a estabilização de proteínas. A estabilização enzimática em soluções aquosas de sais (incluindo LIs) está associada a aptidão *salting-out* dos ânions e *salting-in* dos cátions; enquanto que a desestabilização está correlacionada com *salting-in* do ânion e *salting-out* do cátion²⁴⁴.

De acordo com a ordem de basicidade do ânion na série de *Hofmeister*, o íon Cl^- é um íon limítrofe, como demonstrado na tendência seguinte: $\text{PO}_4^{3-} > \text{SO}_4^{2-} > [\text{CH}_3\text{COO}^-] > \text{Cl}^- > \text{Br}^- > \text{I}^- > [\text{BF}_4]^- > [\text{PF}_6]^-$ ²²². Previamente, foi inclusive demonstrado que a hidratação ao redor dos LIs da família dos cloretos de imidazólio é significativamente diferente da água, a qual não interfere agressivamente na camada de solvatação da proteína²¹⁶. Por outro lado, o uso de soluções aquosas de LIs contendo um ânion com forte efeito *salting-out*, como exemplo $[\text{BF}_4]^-$, poderia afetar fortemente a estrutura conformacional da enzima, suprimindo a sua atividade catalítica^{245,246}.

Anteriormente Na et al. (2013)²²³ compararam o efeito de soluções aquosas de LIs baseados nos imidazólios com diferentes ânions (Cl^- , Br^- and $[\text{BF}_4]^-$) na atividade da lipase de *Candida rugosa*, mostrando um efeito positivo na seguinte ordem: $\text{Br}^- > \text{Cl}^- > [\text{BF}_4]^- > [\text{PF}_6]^-$. Contrariamente, Lau et al. (2004)²⁴⁷ descreveram que a lipase de *Candida antarctica* B manteve sua atividade na presença do $[\text{C}_4\text{mim}][\text{BF}_4]$. Contudo, o efeito estabilizante/desestabilizante do ânion dos LIs varia de proteína para proteína, e é importante destacar, que em soluções aquosas, o uso de certos ânions de LIs não é recomendado. Por exemplo, os LIs com os ânions $[\text{BF}_4]^-$ ou $[\text{PF}_6]^-$ podem sofrer hidrólise e formar o ácido hidrofúorídrico (um composto bastante tóxico)²⁴⁸, e portanto, é assim preferível a escolha de ânions mais biocompatíveis, como os ânions derivados de carboxilatos²⁴⁹ (derivados da desprotonação dos grupos carboxila)²⁵⁰.

Outro fator a considerar é a taxa de reação biocatalítica, que depende da concentração da enzima e do substrato. Contudo, acima de certa concentração do biocatalisador, seu sítio ativo encontra-se saturado com o substrato e, então, a taxa de reação tende a permanecer constante²⁵¹. Além disso, altas concentrações de enzima, pode ocorrer a formação de aglomerados, diminuindo sua eficiência catalítica²⁵². É evidente, que esses comportamentos negativos podem ser intensificados na presença de LIs, uma vez que alguns íons favorecem a agregação enzimática pelo efeito *salting-out* ou pelas forças dispersivas.

No entanto, se a concentração da enzima for aumentada até uma concentração ideal, antes da agregação da proteína ou da inibição do substrato, a reação catalítica será mais rápida. De qualquer forma, para a lipase de *Aspergillus*, deve-se ter especial atenção com os efeitos opostos causados pela presença de diferentes LIs baseados $[\text{C}_n\text{mim}]\text{Cl}$, *i.e.*: i) efeito positivo na presença de soluções aquosas de $[\text{C}_n\text{mim}]\text{Cl}$ de cadeia curta como resultado de interações eletrostáticas favoráveis entre os íons de LIs e a proteína; ii) efeito negativo ou efeito insignificante na presença de soluções aquosas de $[\text{C}_n\text{mim}]\text{Cl}$ com comprimento de cadeia longa como resultado de alterações conformacionais desfavoráveis na estrutura da enzima.

Para obter mais informações sobre os principais mecanismos que regem o comportamento catalítico da lipase na presença de LIs baseados em $[C_n\text{mim}]\text{Cl}$, o pH e a estrutura conformacional da enzima (avaliada por análise de fluorescência e espectroscopia de dicroísmo circular) foram determinados. Os valores de pH das soluções aquosas de LIs nas diferentes concentrações estão apresentados na Tabela 11.

Tabela 11. Valores de pH das soluções aquosas de $[C_n\text{mim}]\text{Cl}$.

LIs	pH*		
	0,1	0,3	0,5
$[C_4\text{mim}]\text{Cl}$	5,74	5,87	5,77
$[C_6\text{mim}]\text{Cl}$	6,00	6,32	6,22
$[C_8\text{mim}]\text{Cl}$	5,60	4,88	4,49
$[C_{10}\text{mim}]\text{Cl}$	5,74	5,77	5,76
$[C_{12}\text{mim}]\text{Cl}$	4,85	4,26	4,07

*(pH) = ± 0.01 ; pH em água ultrapura Mili-Q = 6,01 a 25°C

Como já descrito anteriormente, o pH desempenha um papel fundamental na atividade e estabilidade das enzimas, pois este pode favorecer o complexo enzima-substrato, aumentando ou diminuindo a atividade catalítica ou mesmo causando a inativação e desnaturação da proteína. Aqui, como todas as soluções aquosas de LIs foram preparadas em água ultrapura e não em tampão como a maioria dos estudos relatados na literatura^{130,206,223,231}, foram então determinados os respectivos valores de pH para todas as soluções. No entanto, não foram observadas alterações significativas na faixa de pH ótimo (5,5), e assim, assume-se que o pH de cada solução aquosa de $[C_n\text{mim}]\text{Cl}$ não influenciou na atividade da lipase, nem causou a desnaturação da enzima.

A espectroscopia de fluorescência é uma técnica que permite avaliar a estrutura conformacional de proteínas²⁵³. Particularmente, é possível medir a fluorescência intrínseca a 280 nm, revelando mudanças no ambiente dos resíduos de triptofano (Trp) e tirosina (Tyr)²⁵⁴ da estrutura proteica na presença de diferentes soluções. O processo de desnaturação das proteínas pode ser determinado pela avaliação das alterações na intensidade máxima de fluorescência (I_{max}) e no comprimento de onda máximo de emissão (E_{max})^{253,255}.

Pequenas diferenças no perfil de I_{max} e E_{max} indicam variações importantes na estrutura terciária das proteínas. Desta maneira, no próximo conjunto de experimento foram obtidos espectros de emissão de fluorescência da lipase, na ausência e presença das soluções aquosas de LIs, após 9 h de incubação (Figura 25).

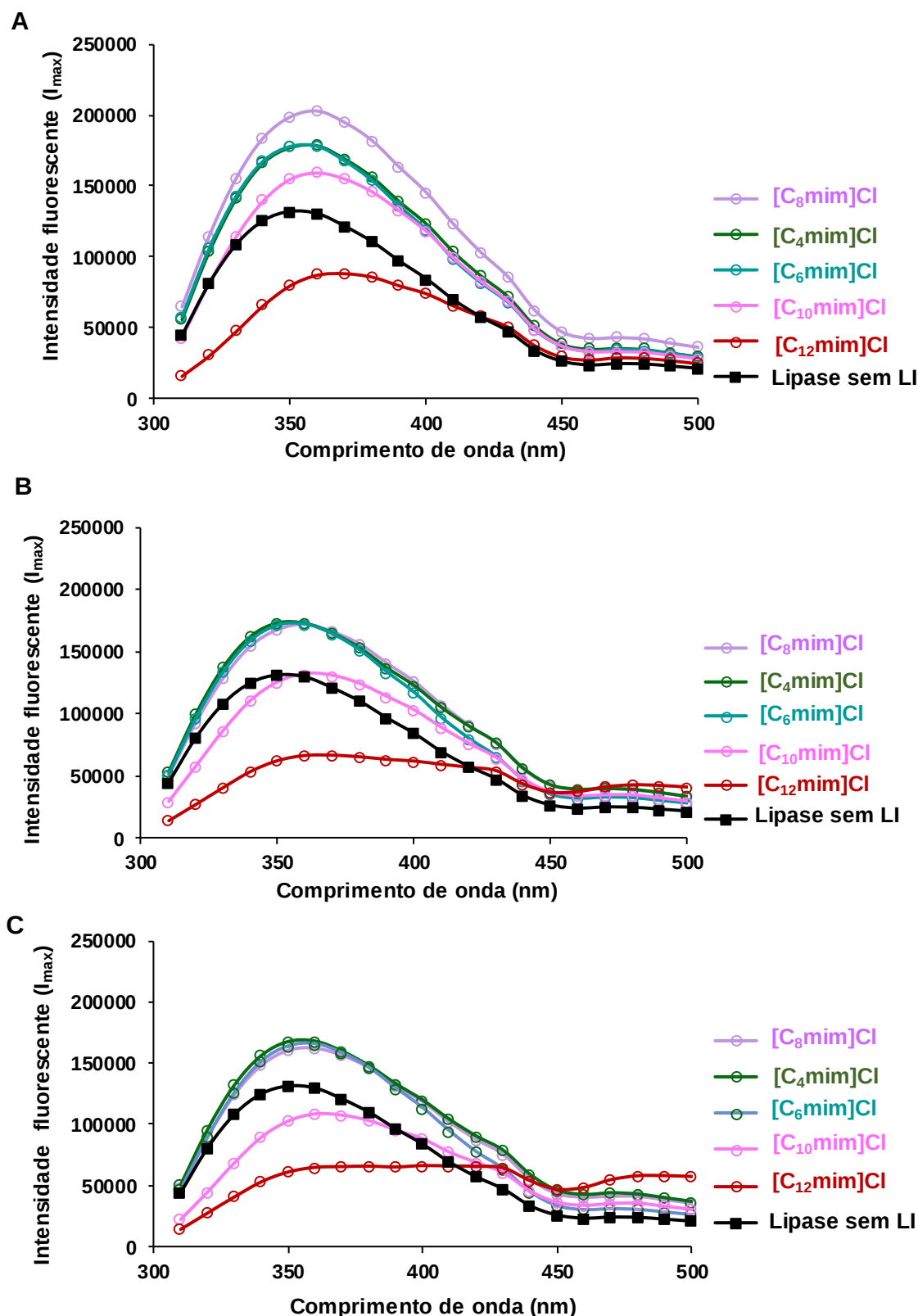


Figura 25. Espectros de emissão de fluorescência (expressos em intensidade fluorescente, $I_{\max}$) da lipase comercial de *A. niger* em solução aquosa de [C₄mim]Cl [círculo verde escuro]; [C₆mim]Cl [círculo claro verde]; [C₈mim]Cl [círculo roxo]; [C₁₀mim]Cl [círculo rosa]; [C₁₂mim]Cl [círculo vermelho] nas seguintes concentrações (% v/v) de 0,1 (A), 0,3 (B) e 0,5 (C) após 9 h de incubação a 35°C. O ensaio na ausência de LIs [quadrado escuro em linha contínua] foi considerado como controle.

Os resultados da Figura 25 mostram diferenças significativas da lipase na ausência e na presença de soluções aquosas de LIs. As soluções aquosas de $[C_n\text{mim}]\text{Cl}$ alteraram o ambiente ao redor da enzima, expondo os resíduos dos aminoácidos Trp, Tyr, o qual afetou significativamente a atividade catalítica da lipase. Essas mudanças no ambiente resultaram no deslocamento no comprimento de onda, que inicialmente, na ausência de LI era em 350 nm, mas na presença de soluções aquosas de $[C_n\text{mim}]\text{Cl}$, o E_{max} se deslocou para 360 nm.

Além disso, quando a lipase foi exposta a soluções aquosas de $[C_4\text{mim}]\text{Cl}$, $[C_6\text{mim}]\text{Cl}$ e $[C_8\text{mim}]\text{Cl}$, a I_{max} aumentou em comparação com o sinal da enzima na ausência de LI. Comparando a atividade enzimática relativa com o espectro de fluorescência, por exemplo, a lipase exposta a soluções aquosas com 0,1% (v/v) de $[C_{10}\text{mim}]\text{Cl}$, foi observado 100% de atividade relativa correspondente a um aumento da I_{max} . No entanto, aumentando a concentração de $[C_{10}\text{mim}]\text{Cl}$, a I_{max} foi reduzida, como esperado, uma diminuição na atividade relativa foi observada. Por outro lado, ambos os sinais I_{max} e E_{max} foram significativamente alterados quando a lipase foi exposta a solução aquosa de $[C_{12}\text{mim}]\text{Cl}$ na concentração de 0,5% (v/v), indicando mudanças irreversíveis na estrutura secundária da proteína, e consequentemente, o desdobramento.

Previamente, Attri e Venkatesu (2013)²⁵³ descreveram que o resíduo de Trp possui forte deslocamento de Stokes dependendo do ambiente. O deslocamento de Stokes é o deslocamento no potencial de superfície entre a absorção (estado fundamental) e a emissão (estado excitado) de um fluoróforo e perda de energia vibracional nos estados excitados²⁵⁶. Assim, o E_{max} é dependente do ambiente do co-solvente, devido a mudanças no E_{max} do resíduo de Trp.

Os resultados obtidos no presente trabalho estão de acordo com a literatura²⁵³, uma vez que as soluções aquosas de $[C_n\text{mim}]\text{Cl}$ alteraram o ambiente ao redor dos resíduos de aminoácidos, como Trp e Try, modificando o E_{max} da lipase para 360nm. É provável que a maior I_{max} ocorre quando a lipase é exposta a um ambiente hidrofóbico, o que favorece a conformação aberta da enzima pela remoção da tampa do sítio ativo e, consequentemente, promove um aumento da atividade enzimática, quando exposta a soluções de $[C_4\text{mim}]\text{Cl}$, $[C_6\text{mim}]\text{Cl}$ e $[C_8\text{mim}]\text{Cl}$.

A solução aquosa de $[C_{12}\text{mim}]\text{Cl}$ a 0,5% (v/v), causou mudanças irreversíveis na estrutura secundária da proteína, e consequentemente, acarretou em seu desdobramento. Provavelmente, o caráter mais anfifílico do $[C_{12}\text{mim}]\text{Cl}$ modificou o microambiente circundante da proteína, devido a possível autoagregação e a formação de micelas que favoreceram as interações do tipo hidrofóbicas. Consequentemente, os resíduos de Try e Trp

foram expostos a um ambiente hidrofílico, sugerido pelo baixo rendimento quântico do espectro de fluorescência da proteína^{227,231}.

No ambiente hidrofóbico (encontrado no núcleo da proteína), os resíduos de Trp possuem maior rendimento quântico e uma alta I_{max} , enquanto que no ambiente hidrofílico (exposto ao solvente) seu rendimento quântico diminui, devido a uma menor I_{max} ²⁵³. Fan et al. (2012)²⁵⁷ compararam o [C₄mim]Cl e [C₈mim]Cl e observaram uma forte supressão de fluorescência entre [C₈mim]Cl e papaína, o que pode ter afetado negativamente a atividade catalítica da enzima.

Posteriormente, para obter mais informações sobre a efetiva concentração de cada [C_nmim]Cl sobre a atividade enzimática da lipase, os espectros de emissão de fluorescência das soluções aquosas de [C₈mim]Cl, [C₁₀mim]Cl e [C₁₂mim]Cl (0,025; 0,05; 0,15 (% v/v)), foram adquiridos após 15 min de incubação (atividade pontual), Figura 26.

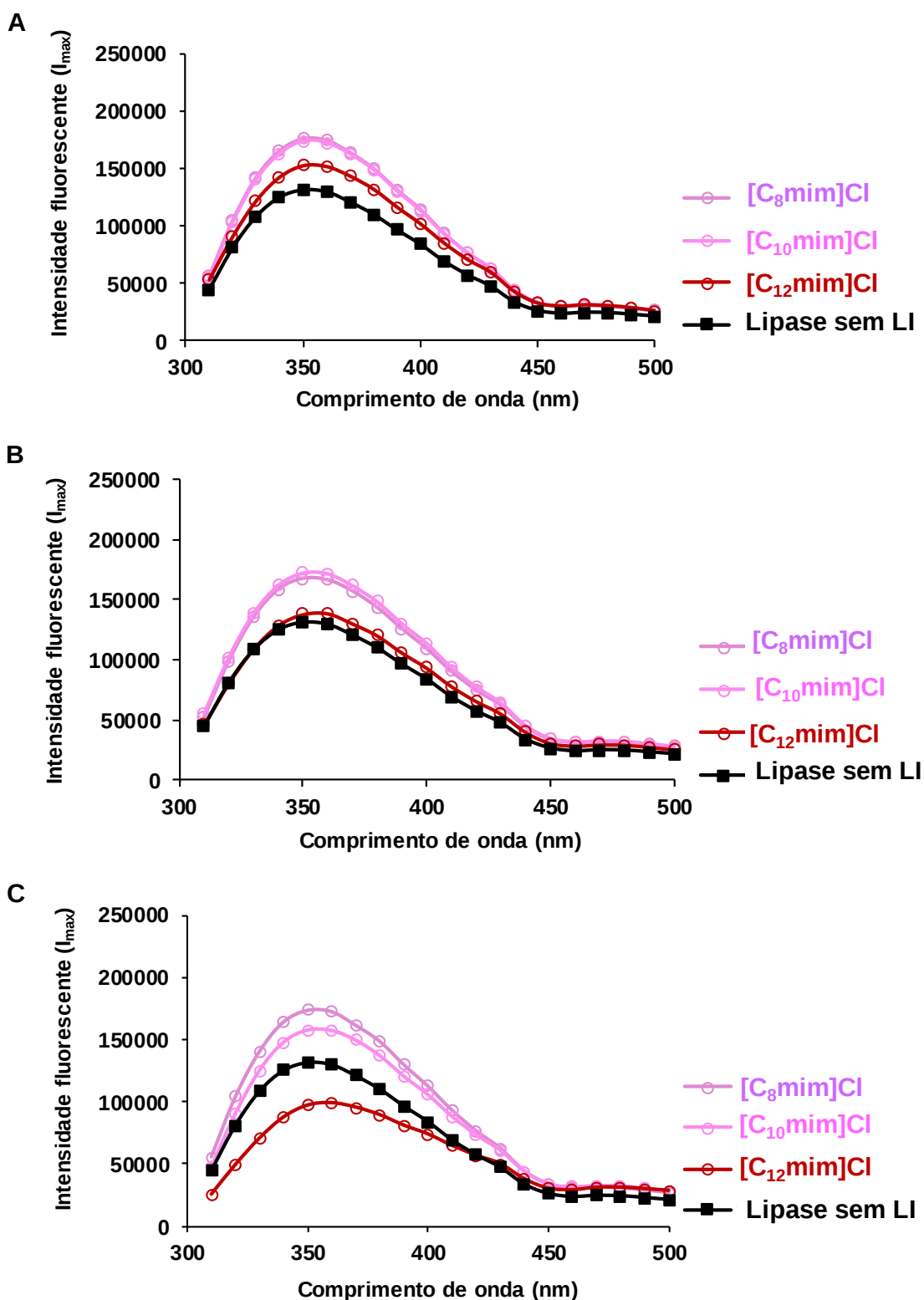


Figura 26. Espectros de emissão de fluorescência (expressos em intensidade fluorescente, $I_{\max}$) da lipase comercial de *A. niger* em solução aquosa de $[C_8\text{mim}]\text{Cl}$ [círculo roxo]; $[C_{10}\text{mim}]\text{Cl}$ [círculo rosa]; $[C_{12}\text{mim}]\text{Cl}$ [círculo vermelho] nas seguintes concentrações (% v/v) de 0,025 (A), 0,05 (B) e 0,15 (C) após 15 min de incubação a 35°C. O ensaio na ausência de LIs [quadrado preto] foi considerado o controle.

Os resultados mostraram que apenas [C₁₂mim]Cl a 0,15% (v/v) alterou o E_{max} e I_{max}. Particularmente, os valores da I_{max} de [C₁₂mim]Cl diminuíram, o que está de acordo com a baixa atividade relativa da lipase nesta concentração (aprox. 16%). Comportamento similar foi obtido com [C₁₀mim]Cl até 0,10% (v/v), mas com [C₁₂mim]Cl mesmo em menores concentrações (< 0,025% (v/v)) ocorreu uma inibição na atividade da lipase.

Por fim, como última etapa do trabalho, realizou-se experimentos de espectroscopia de dicroísmo circular (DC) para demonstrar as mudanças que cada [C_nmim]Cl causou na estrutura secundária da lipase. DC é uma técnica que fornece informações sobre a conformação de proteínas em solução baseada na relação da atividade óptica na cadeia peptídica, com pouca interferência da cadeia lateral (exceto por aminoácidos aromáticos)^{258,259}. Os espectros de DC da lipase de *A. niger* foram adquiridos após 15 min de incubação, como mostra a Figura 27.

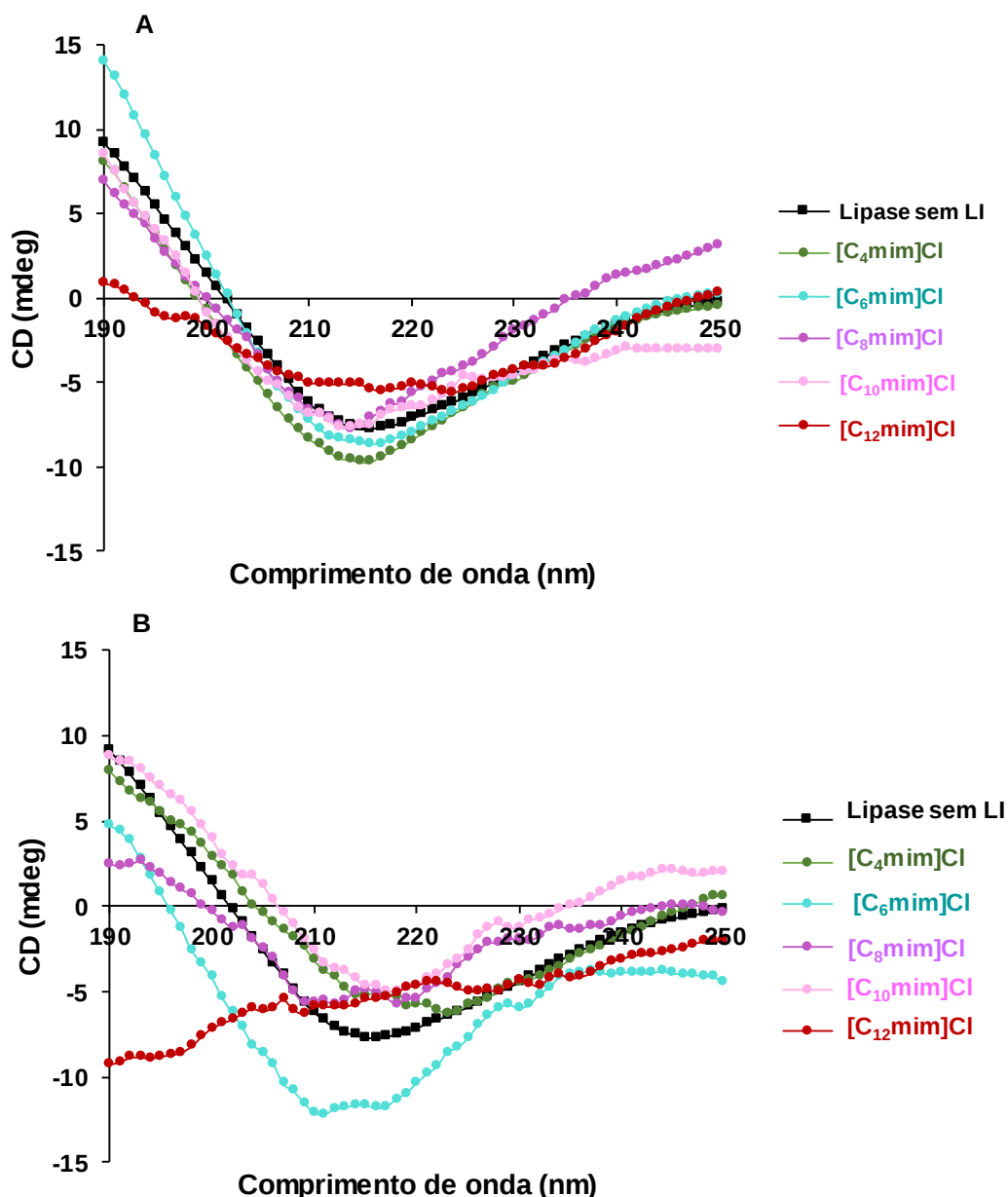


Figura 27. Espectros de dicroísmo circular da lipase comercial de *A. niger* em solução aquosa de [C₄mim]Cl [círculo verde escuro]; [C₆mim]Cl [círculo verde claro]; [C₈mim]Cl [círculo roxo]; [C₁₀mim]Cl [círculo rosa]; [C₁₂mim]Cl [círculo vermelho] nas concentrações (% v/v) de 0,1 (A) e 0,3 (B) após 15 min de incubação a 35°C. O ensaio na ausência do LI [quadrado preto] foi considerado o controle.

Os espectros de DC mostram que a elipicidade das estruturas α -hélice e β -pregueada da lipase foram semelhantes na ausência de LIs e com soluções aquosas de [C₄mim]Cl, [C₆mim]Cl, [C₈mim]Cl e [C₁₀mim]Cl a 0,1% (v/v), *i.e.*, exibindo o mesmo perfil. Um comportamento similar foi observado com [C₄mim]Cl, [C₆mim]Cl e [C₈mim]Cl a 0,3% (v/v). Contudo, a exposição da lipase em soluções aquosas de [C₁₀mim]Cl a 0,3% induziu algumas mudanças na estrutura secundária da lipase. Este comportamento é mais notório quando a lipase

foi exposta a soluções aquosas de $[C_{12}mim]Cl$ que, independente da concentração de LI, demonstraram uma perda da elipcidade na estrutura secundária da enzima. Estudos similares foram reportados por Adak et al. (2015)²⁶⁰ que avaliaram a atividade da lipase de *Rhizopus oryzae* na presença de $[C_{16}mim]Br$. Os autores mostraram que este LI induziu mudanças na estrutura secundária da enzima, inibindo o comportamento catalítico com alta concentração de LI²⁶⁰.

Embora a literatura tenha reportado o aumento da atividade enzimática na presença de $[C_nmim]Cl$, os resultados obtidos evidenciam que esse fenômeno é dependente da estrutura e concentração. Assim, estudar a influência dos LIs na atividade da lipase antes de sua aplicação é de suma importância.

B. Efeito dos LIs baseados nas Colinas ([Ch]X)

A estrutura das colinas estudada consiste no cátion colina combinado com os diferentes ânions: Cl^- , $[Ac]^-$, $[Prop]^-$, $[But]^-$, $[Pent]^-$ e $[Hex]^-$. Assim, buscou-se compreender o efeito do aumento do comprimento da cadeia alquílica aniônica (C_2-C_6) dos LIs da família das colinas ($[Ch]X$) sobre a atividade e estabilidade da lipase. Para tanto, soluções aquosas dos LIs foram preparadas nas seguintes concentrações (M): 0,05, 0,10, 0,50 e 1,00. O ensaio na ausência dos LIs foi considerado o controle e todos os experimentos foram realizados a 35°C. Os valores de pH para as soluções permaneceram na faixa de estabilidade da enzima, entre 4,79 e 6,22, apresentados na Tabela 28, e os valores referentes à atividade absoluta de todas as soluções aquosas de $[Ch]X$ estão na Tabela 27, ambos no Apêndice I.

Inicialmente, para se compreender qual o efeito do cátion na atividade da lipase, foi determinada a atividade da enzima na presença de diferentes concentrações de $[Ch]Cl$, conforme apresentado na Figura 28.

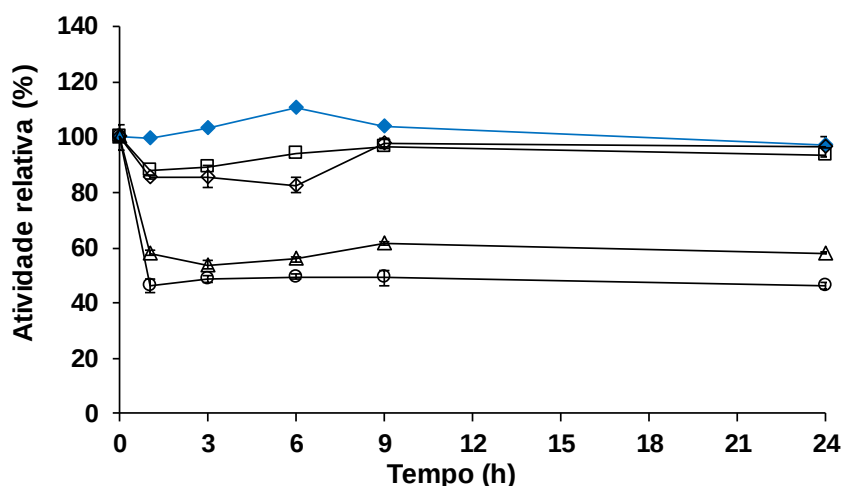


Figura 28. Estabilidade da lipase comercial de *A. niger* em solução aquosa de [Ch]Cl nas seguintes concentrações (M): {0,05 [▽], 0,10 [□], 0,50 [△] e 1,00 [○]}. O ensaio na ausência de LI [♦] foi considerado o controle. As barras de erro representam 95% do intervalo de confiança para as medições.

O ânion Cl^- apresenta uma característica hidrofílica o que confere ao sal de quartenário de amônio²⁶¹, [Ch]Cl, um caráter hidrofílico, contrário ao [C_nmim]Cl que possui um caráter mais hidrofóbico devido a cadeia alquílica do cátion imidazólio. O [Ch]Cl após 9 h de incubação manteve a atividade catalítica da lipase em menores concentrações, no entanto, em altas concentrações um efeito inibitório significativo foi obtido, mostrando uma diminuição da atividade enzimática em torno de 47% com 1,00 M de LI (em comparação com o sistema controle, sem LI), Figura 28.

A estabilidade da proteína em soluções aquosas de LIs resulta de um equilíbrio de interações competitivas entre a água, a superfície proteica e os íons de LI (cátion, ânion ou o par iônico)²³². Em geral, LIs hidrofílicos são constituídos de pequenos ânions, como o Cl^- , a qual estabelecem uma forte rede de ligação de hidrogênio ânion-água^{262,263}. Aqui, parece que a forte rede de ligação de hidrogênio entre o Cl^- e a água reduziu, não somente, a força da rede cátion-ânion, mas também as interações favoráveis entre a lipase e o LI²⁶⁴. Portanto, a diminuição destas interações afetaram a atividade e estabilidade da lipase, bem como sua mobilidade e estrutura conformacional^{244,263}, prejudicando a interação do complexo enzima-substrato. Anteriormente, Deive et al. (2015)²⁶⁵ mostraram que o uso de soluções aquosas de [Ch]Cl a 2,00 M levou a uma diminuição de 50% na atividade lipolítica da lipase de *Thermomyces lanuginous*. Os autores²⁶⁵ relacionaram a diminuição da aptidão catalítica com uma menor perturbação estrutural provocada pelo [Ch]Cl, uma vez que a perturbação é fundamental para que a enzima se encontre em sua conformação ativa.

Resultados e Discussão

Assim, para uma melhor compreensão da atividade catalítica da lipase em soluções aquosas de [Ch]X é necessário não apenas entender o comportamento da enzima, mas também relacioná-las com as características dos íons correspondentes. Após o estudo do efeito do cátion, e considerando que a diminuição das interações entre cátion-ânion e LI-proteína, podem ou não favorecer a atividade da lipase, foi então avaliado, qual seria o impacto do aumento da cadeia alquílica do ânion dos LIs baseados em colina na estabilidade da enzima. A atividade catalítica a 35°C ao longo do tempo foi determinada em diferentes soluções aquosas dos LIs, [Ch][Ac], [Ch][Prop], [Ch][But], [Ch][Pent] e [Ch][Hex], conforme apresentado na Figura 29.

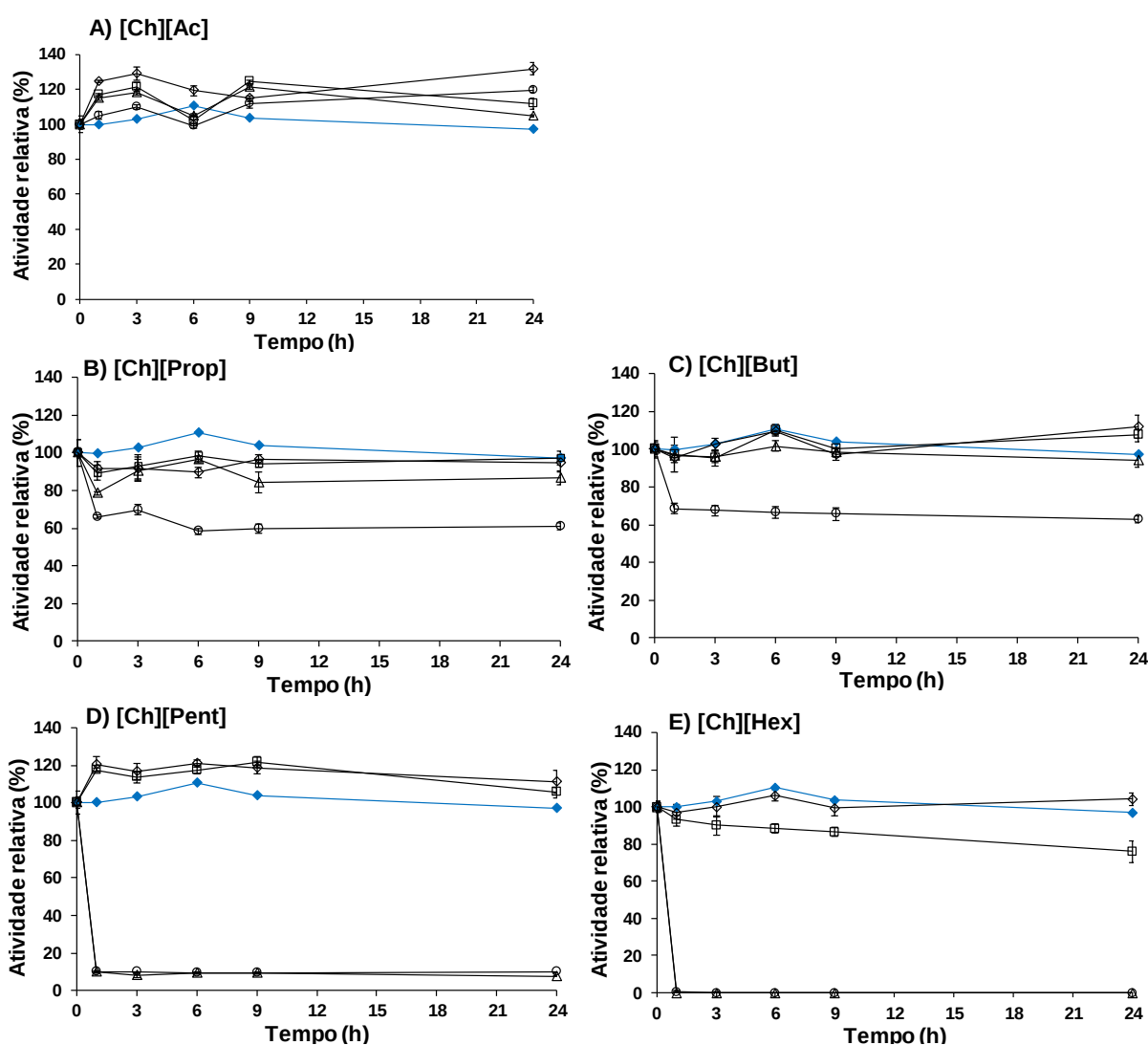


Figura 29. Estabilidade da lipase comercial de *A. niger* na presença das soluções aquosas dos LIs: **[A]** [Ch][Ac], **[B]** [Ch][Prop], **[C]** [Ch][But], **[D]** [Ch][Pent] e **[E]** [Ch][Hex]. As soluções aquosas foram preparadas nas seguintes concentrações (M), {0,05 [◇], 0,10 [□], 0,50 [△] e 1,00 [○]}. O ensaio na ausência de LI [◇] foi considerado o controle. As barras de erro representam 95% do intervalo de confiança para as medições.

Todos os estudos de estabilidade usando [Ch][Ac] mostraram que a lipase requer um tempo de adaptação do meio, independentemente da concentração de LI, uma vez que suas atividades hidrolíticas mudam com o tempo de exposição, a saber: um pequeno aumento na atividade relativa (3 e 9 h) e, uma diminuição (6 h); somente após 9 h de exposição, a atividade catalítica da lipase foi estabilizada. Estes resultados confirmam a necessidade de um tempo de exposição para estabilizar a estrutura conformacional da lipase.

Tendências similares foram obtidas para todos os LIs estudados (Figura 29). Este fenômeno pode ser justificado pela presença do cátion colina, um íon hidroxilado que mimetiza as moléculas de água e a funcionalidade das ligações de hidrogênio para ajudar a enzima a retornar à sua conformação flexível e ativa⁵⁸. Como a maioria das lipases possui uma tampa em sua superfície e sua atividade é predominantemente controlada pelo domínio da tampa⁴³ e depende do ambiente (solvente), o cátion colina pode ser o responsável por este comportamento.

O [Ch][Ac] promoveu um aumento na atividade enzimática independente das concentrações de LI em comparação ao controle (solução enzimática sem LI). Anteriormente, Xue et al. (2013)⁵⁷ avaliaram o efeito desse LI sobre a atividade da lipase de *Candida rugosa*, demonstrando que os átomos de oxigênio do cátion colina e do ânion acetato podem interagir com moléculas de água ao redor da lipase para formar ligações de hidrogênio, o que melhora a nucleofilicidade da água e, conseqüentemente, aumenta a eficiência catalítica da enzima. Além disso, os autores também avaliaram o efeito de ativação do cátion colina separado do ânion acetato, concluindo que o cátion promove um efeito de ativação mais pronunciado que o ânion.

A estabilidade da proteína em soluções aquosas iônicas geralmente está relacionada às características dos íons que as cercam, os quais podem ser classificados de acordo com a série de *Hofmeister*²⁶⁶. Os íons de *Hofmeister* promovem alterações nas propriedades de ligação de hidrogênio da água²⁶⁶ e esses efeitos influenciam indiretamente na estabilidade da proteína. A interação entre a proteína e os íons é determinada pelo tamanho e pela magnitude da carga na superfície do íon²¹⁶. Diversos LIs como [Ch][Ac], são formados por um ânion kosmotrópico e um cátion caotrópico⁵⁷ e, essa combinação pode ser um meio promissor para estabilização de proteínas²⁶⁷, além de aumentar a atividade hidrolítica da lipase⁵⁷.

Estudos anteriores mostraram que o [Ch][Ac] estimulou a ativação da lipase de *Candida rugosa* na hidrólise de *p*-nitrofenil butirato (*p*-NPB)⁵⁷, sendo esse associado às mudanças na conformação da lipase e ao aumento da nucleofilicidade da água. Embora, o substrato e a espécie da lipase sejam diferentes, devido à similaridade dos resultados utilizando soluções

aquosas de [Ch][Ac], o aumento da atividade da lipase resultou da modificação da estrutura conformacional na presença desse LI.

Em geral, a estabilização ou desestabilização de proteínas na presença de diferentes íons é classificada de acordo com a série de *Hofmesiter*, precisamente, a aptidão dos íons no efeito *salting-out* (alta densidade de carga) e *salting-in* (baixa densidade de carga)²⁶². O efeito *salting-out* tendem a formar complexos de hidratação longe da superfície hidrofóbica da proteína, enquanto que os íons *salting-in* favorecem a hidratação na superfície da proteína^{268,233}. No entanto, como observado por Marcus Y. (2010)²⁶⁹: “Apesar da semelhança parcial da série de *Hofmesiter* com os efeitos observados para os íons na estrutura da água, não existe uma correlação bem estabelecida entre a estabilidade da proteína e esses efeitos na estrutura da água.” (tradução de nossa autoria).

Considerando que o ânion Cl^- é um ânion limítrofe, entre os efeitos estabilizantes e desestabilizantes de proteínas²¹⁶, e a não correlação entre a estabilidade proteica e os efeitos estruturais das moléculas da água, o efeito do [Ch]Cl deve ser considerado como par iônico e não somente a influência do Cl^- . Aqui, o efeito desfavorável do [Ch]Cl sob a estabilidade da lipase parece estar relacionado, como destacado acima, à formação de uma forte rede de ligação de hidrogênio íon-água, o que diminuiu as interações favoráveis do complexo proteína-LI (menor alteração estrutural da lipase na presença do [CH]Cl). O efeito negativo dos LIs baseados em Cl^- já foi demonstrado para outras proteínas^{232,206}, como por exemplo, um estudo que avaliou o efeito do ânion usando diferentes LIs baseados em imidazólios na estabilidade da lipase de *Candida antarctica* B²⁰⁶. Similarmente, a atividade enzimática sobre a lipase também foi obtida para o Cl^- , seguindo a ordem: $\text{Cl}^- \gg \text{Br}^- > [\text{CH}_3\text{COO}]^- \approx [\text{CH}_3\text{SO}_3]^- \gg [\text{HSO}_4]^- > [\text{CF}_3\text{SO}_3]^-$.

De acordo com a literatura, os solventes hidrofílicos levam ao desdobramento das lipases com exposição dos resíduos hidrofóbicos internos, enquanto os solventes hidrofóbicos mantém a enzima em sua conformação flexível e ativa²¹⁶. No entanto, aqui o efeito favorável dos LIs mais hidrofóbicos não foram observados, uma vez que os LIs com comprimento de cadeia alquílica aniônica longa apresentaram um efeito inibitório mais acentuado sobre a atividade da lipase.

O efeito de diferentes LIs na atividade hidrolítica da enzima foi muito similar em concentrações abaixo de 0,10 M, onde a enzima permaneceu ativa e estável por 24 h. Porém, o aumento da concentração dos LIs (0,50 e 1,00 M) reduziu a atividade catalítica com soluções aquosas de [Ch][Prop] e [Ch][But], e levou à completa inibição do comportamento biocatalítico com soluções concentradas de [Ch][Pent] e [Ch][Hex].

Resultados e Discussão

Para avaliar o efeito de cada [Ch]X, a Figura 30 mostra os valores de atividade relativa da lipase (U.g^{-1}) após 9 h de incubação a 35°C , variando as concentrações de LIs. Nota-se que a atividade da lipase foi superior nas menores concentrações de LIs.

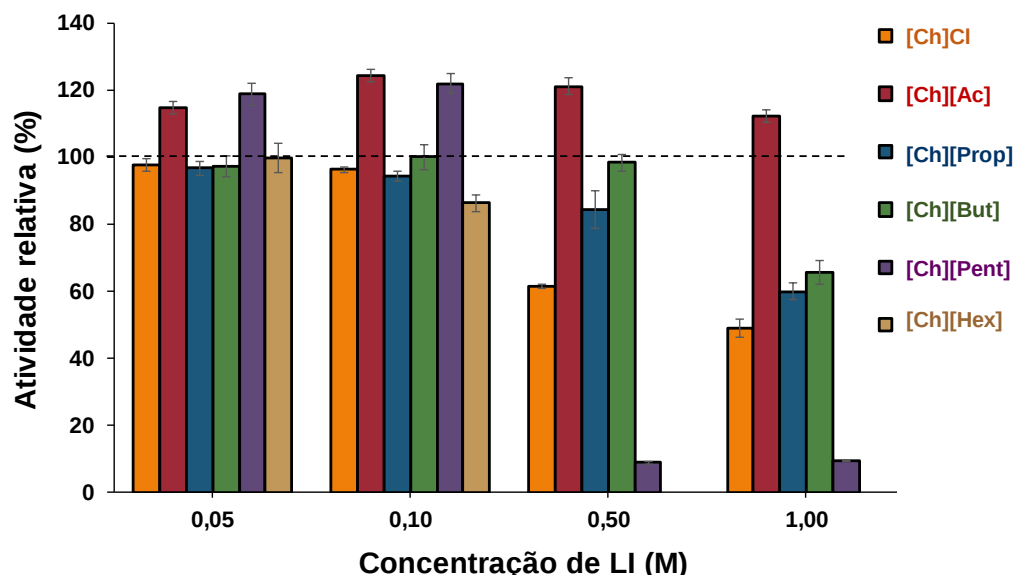


Figura 30. Influência da concentração de [Ch]X na atividade da lipase comercial de *A. niger* na presença das soluções aquosas de: {[Ch]Cl [■], [Ch][Ac] [■], [Ch][Prop] [■], [Ch][But] [■], [Ch][Pent] [■] e [Ch][Hex] [■]}, nas seguintes concentrações (M), [0,05, 0,10, 0,50 e 1,00] após 9 h de incubação a 35°C . As barras de erro representam 95% do intervalo de confiança para as medições.

Embora as atividades da lipase após 9 h de incubação em soluções aquosas de [Ch][Prop] e [Ch][But] (0,05, 0,10 e 0,50 M) mantiveram, aproximadamente, 90% e 100% da atividade da lipase, o aumento da concentração dos LIs para 1,00 M causou uma redução das atividades relativas para valores em torno de 35%. Este efeito inibitório foi ainda mais acentuado na presença de soluções aquosas concentradas de [Ch][Pent] e [Ch][Hex], onde 0,50 e 1,00 M de ambos LIs causaram quase a completa inibição da atividade biocatalítica da lipase. Portanto, estes LIs podem ser considerados para uso como inibidores de lipase.

Os efeitos do solvente podem: *i)* modificar a conformação e/ou flexibilidade da enzima; *ii)* modificar a solubilidade e dessolvatação de substratos e produtos; *iii)* atuar como inibidores competitivos do substrato²⁷⁰. Neste contexto, deve-se considerar que a lipase é capaz de hidrolisar ácidos graxos de cadeia curta, média e longa. A presença de aditivos no sistema pode mimetizar as moléculas do substrato e pode se comportar como inibidor competitivo. O pNPP usado nesse trabalho é um ácido graxo de cadeia longa com 16 átomos de carbono. Por outro lado, considerando que o comprimento da cadeia alquílica das [Ch]X aumentou de C_2 - C_6

(semelhante aos ácidos graxos pequenos e médios), traz-se a questão: *O [Ch][Pent] e [Ch][Hex] atuam como inibidores competitivos para o substrato da lipase?*

A literatura descreve que o n-propanol atuou como um inibidor para a lipase de *Candida antarctica*, cuja ligação inibiu sua capacidade de participar da reação de esterificação²⁷¹. Hari et al.(2001)²⁷² também reportaram uma inibição competitiva pelo ácido butírico, pois a ligação do ácido butírico à enzima formou um complexo improdutivo. Ademais, altas concentrações contribuíram à inativação da enzima. Enquanto que Fan et al. (2016)¹⁷² demonstraram que o comportamento catalítico da lipase pode ser comprometido pelos domínios não polares da cadeia alquílica do cátion de LIs que podem ser formados na entrada do sítio ativo da enzima através de interações de van der Waals, o que implica na formação do complexo enzima-substrato, acarretando na diminuição da atividade biocatalítica. Além disso, este efeito inibitório dos LIs na atividade da lipase foi intensificado com o aumento da hidrofobicidade dos LIs¹⁷². Supõe-se que um efeito similar pode ter ocorrido entre a cadeia alquílica do ânion dos LIs e sítio ativo da enzima.

Com estes resultados não é possível responder à questão. Embora, seja evidente que usando baixas concentrações de [Ch]X o comportamento catalítico da lipase não foi afetado, um efeito oposto foi observado em altas concentrações de LIs, *i.e.*, uma diminuição da atividade hidrolítica para [Ch][Prop] e [Ch][But] e uma inativação na atividade enzimática com [Ch][Pent] e [Ch][Hex], podendo gerar algumas dúvidas sobre uma inibição competitiva com o substrato. Infelizmente, estes resultados não são suficientes para confirmar o motivo da inibição e inativação da lipase, uma vez que três possibilidades podem ocorrer; *i)* modificação da estrutura conformacional da lipase através de interações hidrofóbicas entre a enzima-ânion, intensificadas com o aumento das concentrações de LI; *ii)* competição com o substrato pelo sítio ativo da lipase; *iii)* obstrução do sítio ativo da lipase causada pelo comprimento da cadeia alquílica aniônica, dificultando a formação do complexo enzima-substrato.

Na saúde humana, as lipases são importantes para a digestão, transporte e no processamento dos lipídeos da dieta²⁷³. Contudo, lipases específicas podem ser desreguladas ou geneticamente ligadas a diversas patologias humanas²⁷⁴. Como exemplo, as lipases de *Estafilococos* são produzidas por membros patogênicos do gênero *Estafilococos* (*E.*), como *E. aureus* e *E. epidermidis*²⁷⁵. Quando as lipases são produzidas por *E. aureus* em pacientes infectados, elas interferem na fagocitose das células indicando um envolvimento direto das lipases na patogênese²⁷⁵. Além disso, é possível que as lipases possam influenciar a persistência dessas espécies nas secreções gordurosas da pele de mamíferos e, assim, influenciar indiretamente em seu potencial patogênico²⁷⁵. Nessas situações, a inibição farmacológica de

lipases têm sido investigada, com o intuito de desenvolver novos compostos com essas características²⁷⁶. Portanto, a aplicação de [Ch]X como inibidores é promissora.

Considerando que a hidrofobicidade dos LIs desempenham um papel importante no efeito inibitório na atividade da lipase¹⁷², a supressão da atividade enzimática na presença das [Ch]X de carácter mais hidrofóbico, *i.e.*, [Ch][Pent] e [Ch][Hex], enfatizou a importância desse parâmetro.

Para obter informações sobre a estrutura da lipase e seu comportamento na presença de diferentes soluções aquosas de [Ch]X, os correspondentes valores de P_Z da lipase foram determinados como apresentado na Figura 31.

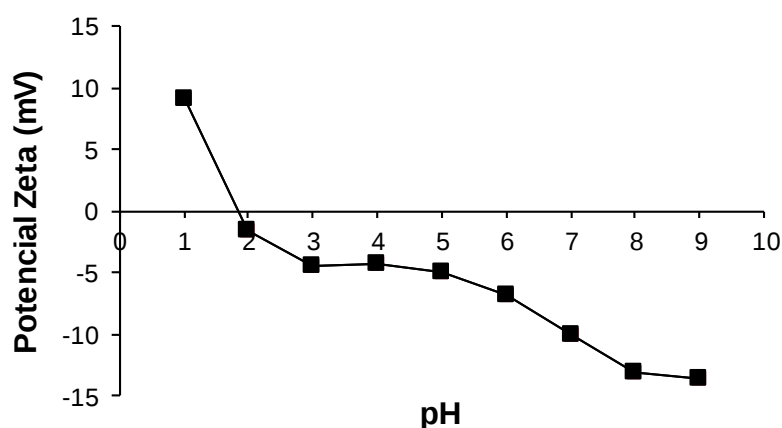


Figura 31. Potencial zeta da lipase comercial de *A. niger* em diferentes valores de pH (tampão Mcllvaine pH 1,0-8,0 e tampão Sörensen pH 9,0).

O potencial zeta fornece informações sobre as forças eletrostáticas repulsivas²⁷⁷, particularmente, permite inferir como mudanças no pH, força iônica e concentração de compostos iônicos influenciam o P_Z da proteína²⁷⁷. Em soluções aquosas o pH é um parâmetro importante que pode influenciar no P_Z devido a um pH mais ácido ou alcalino, tornando o P_Z mais positivo ou negativo, respectivamente²⁷⁷. O ponto isoelétrico (P_{IE}) da lipase, ponto de carga zero, foi próximo ao pH 2 e, portanto, no valor de pH ótimo (5,5), a enzima está negativamente carregada, exibindo potencial de -5,0 mV. Adicionalmente, o potencial zeta também fornece informações sobre a natureza da cadeia lateral ionizável³⁵, como exemplo, P_{IE} próximo de 2 indica a presença de pelo menos dois grupos ionizáveis com carga negativa. Acima do pH 3, os valores do potencial zeta diminuíram, alcançando um platô em torno de -14 mV para os valores de pH ≥ 9 , destacando a predominância de carga negativa sobre a positiva na estrutura da lipase, como resultado da dissociação de aminoácidos dos grupos carboxílicos.

Considerando que o sítio ativo da lipase é formado pelos resíduos de aminoácidos Ser, His, Glut ou Asp⁵⁵, interações eletrostáticas favoráveis ou desfavoráveis entre os resíduos de aminoácidos na superfície da lipase e os íons dos LIs podem ocorrer, aumentando ou diminuindo a atividade lipolítica, respectivamente.

Considerando que os cátions e ânions de LIs podem apresentar diferentes energias de ligação livre com a proteína, afetando diretamente sua atividade enzimática e estabilidade²³², o efeito dos LIs sem qualquer tampão foi determinado. Este ensaio permite uma análise precisa da enzima na presença das soluções aquosas de [Ch]X. Não foram observadas alterações significativas nos valores de pH ótimo (valores entre 4,79 e 6,22), confirmando que o pH de cada solução aquosa de LI não afetou a migração da lipase para o ânodo, ou seja, a enzima manteve uma carga global negativa. Assim, foi mostrado que o [Ch]Cl, [Ch][Ac], [Ch][Prop], [Ch][But], [Ch][Pent] e [Ch][Hex] não afetaram o P_z , e mostrou que o pH não influenciou a atividade hidrolítica da lipase, nem acarretou em sua desnaturação.

C. Estudo de atividade da lipase comercial de A. niger em diferentes LIs

Esse estudo foi realizado na Universidade de Aveiro, Portugal no âmbito do projeto PDSE – Edital nº 19/2016 (Número do Processo: 88881.133279/2016-01).

A CMC, como descrito anteriormente, corresponde à concentração limítrofe de tensoativo necessária para a formação de agregados, conhecidos como micelas, na qual as caudas hidrofóbicas migram para o interior enquanto que as cabeças hidrofílicas permanecem na superfície exterior, de modo a minimizar e maximizar o seu contato com a água, respectivamente^{134,135}. As moléculas de tensoativos iniciam a autoagregação em micelas na concentração crítica à qual corresponde ao ponto de intersecção entre as curvas, assim, o valor de CMC do sistema pode ser calculado de acordo com o ajuste das equações da curva²⁴¹. Nesta fase do trabalho, foram então determinadas os valores da CMC para os LIs [C₁₆mim]Cl e [Ch][Tetrad]. No Apêndice II são apresentadas a intersecção das retas (Figuras 39 e 40, respectivamente), que permitiram a determinação dos respectivos valores de CMC: 0,84 e 5,11 mM para ambos os LIs.

Posteriormente, foram então realizados os ensaios de atividade enzimática da lipase de *A. niger* com os LIs, [Ch][Tetrad], [C₁₄mim]Cl, [C₁₆mim]Cl, [C₁₆py]Cl, [N_{1,1,1,14}]Br, [N_{1,1,1,16}]Br e [C₁₄Im-6-ImC₁₄]Br₂, a fim de verificar se algum destes proporcionariam um efeito de superatividade, já que na literatura foi previamente reportado superatividade de lipases em concentrações superiores a CMC¹³⁰. As concentrações de LIs estudadas na atividade da lipase,

Resultados e Discussão

bem como a MM e os valores de CMC estão descritas na Tabela 12. O ensaio em tampão McIlvaine pH 5,5 foi utilizado como controle.

Tabela 12. Concentrações dos LIs utilizados no estudo de atividade da lipase comercial de *A. niger* realizados de acordo com a concentração micelar crítica*.

Descrição das concentrações de líquidos iônicos				
LIs	Massa Molecular (g.mol ⁻¹)	CMC (mM)	(n) X acima da CMC	Concentrações de LIs (mM)
[Ch][Tetrad]	331,54	5,11*	2	10,22
			4	20,44
			6	30,66
			10	51,10
			20	102,20
[C ₁₄ mim]Cl	314,91	4,00	2	8,00
			4	16,00
			6	24,00
			10	40,00
			20	80,00
[C ₁₆ mim]Cl	343,00	0,84*	2	1,68
			4	3,36
			6	5,04
			10	8,40
			20	16,80
[C ₁₆ py]Cl	358,00	0,96	2	1,92
			4	3,84
			6	5,76
			10	9,60
			20	19,20

Resultados e Discussão

[N _{1,1,1,14}]Br	336,39	3,80	2	7,60
			4	15,20
			6	22,80
			10	38,00
			20	76,00
[N _{1,1,1,16}]Br	364,45	0,92	2	1,92
			4	3,84
			6	5,76
			10	9,60
			20	19,20
[C ₁₄ mim-6-mimC ₁₄]Br ₂	612,76	0,27	2	0,54
			4	1,08
			6	1,62
			10	2,70
			20	5,40

*Os valores correspondes a CMC foram determinados na Universidade de Aveiro, Portugal, e os demais LIs foram consultados na literatura¹⁷⁹.

A superatividade da lipase poderia ser induzida utilizando LI de cadeia alquílica longa, pois a autoagregação da cadeia alquílica do LI²⁴¹ formaria microemulsões de modo a favorecer o contato do substrato com o sítio ativo da enzima¹³⁰. Ventura e colaboradores (2012)¹³⁰ mostraram que foi possível obter superatividade da lipase de *Candida antarctica* utilizando o [C₁₀mim]Cl, visto que o LI não compete com o substrato devido a formação de micelas. No entanto, conforme destacado pelos autores, esse fenômeno só ocorre quando as concentrações de LI estão acima da CMC. A Figura 32 mostra a atividade da lipase na presença dos diferentes LIs.

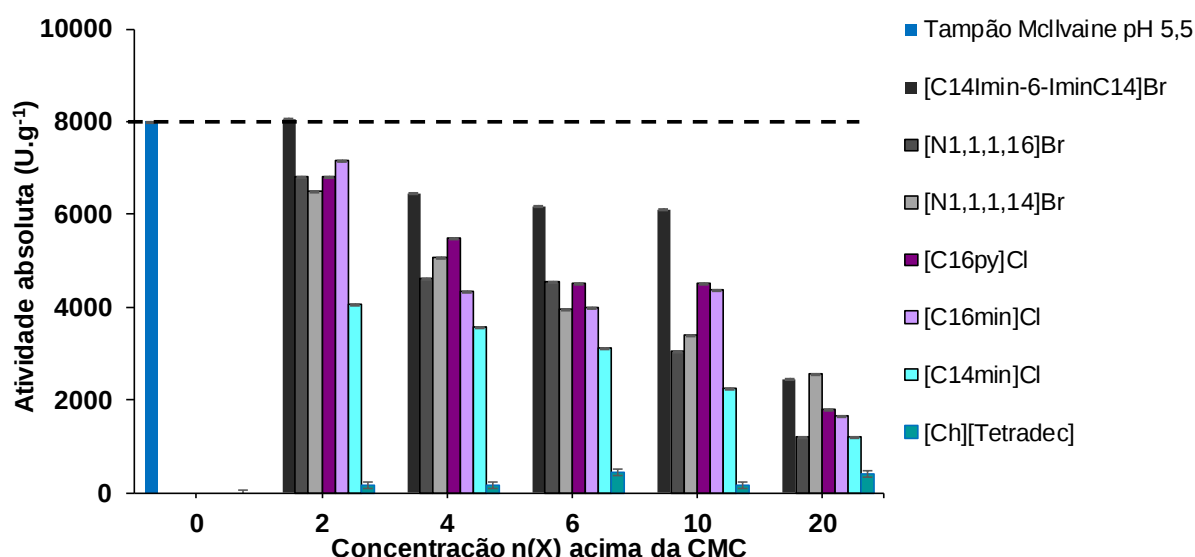


Figura 32. Estudo de atividade da lipase comercial de *A. niger* na presença de diferentes LIs {[C₁₄Im-6-ImC₁₄]Br₂ [■], [N_{1,1,1,16}]Br [■], [N_{1,1,1,14}]Br [■], [C₁₆py]Cl [■], [C₁₆mim]Cl [■], [C₁₄mim]Cl [■] e [Ch][Tetrad] [■]}, considerando as concentrações nX (números de vezes) acima da CMC. O ensaio realizado em tampão Mcllvaine pH 5,5 na ausência de LI [■] foi considerado o controle.

Na Figura 32 observa-se que nenhum dos LIs estudados apresentou um efeito de superatividade em relação à atividade catalítica da lipase na presença de tampão Mcllvaine pH 5,5 (controle). O aumento das concentrações de LIs acima da CMC não favoreceu a atividade hidrolítica da enzima, ao contrário, acarretou em perda de atividade, corroborando com os resultados de estabilidade descritos na seção anterior. O [C₁₄Im-6-ImC₁₄]Br₂ na concentração de 2x acima da CMC (0,54 mM) apresentou uma atividade semelhante ao controle, a qual favoreceu o comportamento catalítico da lipase, mas o efeito de superatividade não foi observado. O [Ch][Tetrad] apresentou-se como um inibidor para a lipase em todas as concentrações estudadas.

As soluções aquosas de LIs foram preparadas em tampão McIlvaine pH 5,5, visto que a referência da atividade enzimática foi nesse tampão. Deste modo, poderia-se manter o pH da solução e favorecer a atividade enzimática, no entanto, alguns LIs mesmo preparados em tampão, conseguiram romper a faixa de tamponamento alterando o pH da solução. Os valores de pH das soluções aquosas dos LIs estão descritos na Tabela 13. Nota-se que o [Ch][Tetrad] foi o LI que provocou maior perturbação no sistema alterando de modo abrupto o pH da solução, próximo de 9,0. O valor elevado de pH pode ser a possível causa da desnaturação da proteína, visto que o pH ótimo da lipase foi de 5,5, justificando assim a inatividade da lipase em todas as concentrações avaliadas. As demais soluções aquosas de LIs não apresentaram alterações significativas com relação ao pH, de modo que não interferiram na atividade hidrolítica da enzima.

Os resultados aqui reportados diferem dos obtidos por Ventura et al. (2012)¹³⁰, mas estão de acordo com os resultados de estabilidade descritos na seção 5.2.5, que demonstraram que um aumento da cadeia alquílica interfere na atividade da lipase. Assim, tanto a hidrofobicidade quanto a presença de agregados micelares promovidos pelos LIs de cadeia alquílica longa não favorecem a atividade catalítica da lipase de *A. niger*. Contudo, estes ensaios diferem dos ensaios de estabilidade em relação as condições avaliadas, pois aqui relacionam-se as atividades obtidas com a CMC de cada LI avaliado.

Resultados e Discussão

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 *A. niger*.

Descrição dos valores de pH das soluções aquosas dos LIs em Tampão McIlvaine pH 5,5			
LIs	CMC (mM)	nX Acima da CMC*	pH
[Ch][Tetrad]	5,11	2	9,1
		4	9,1
		6	8,9
		10	8,9
		20	9,1
[C ₁₄ mim]Cl	4,00	2	5,2
		4	5,4
		6	5,4
		10	5,2
		20	4,0
[C ₁₆ mim]Cl	0,84	2	4,7
		4	4,7
		6	4,7
		10	4,9
		20	4,9
[C ₁₆ pm]Cl	0,96	2	4,7
		4	4,7
		6	4,8
		10	4,9
		20	5,0
[N _{1,1,1,14}]Br	3,80	2	4,9
		4	5,0
		6	5,0
		10	5,1
		20	5,1
[N _{1,1,1,16}]Br	0,92	2	4,8
		4	4,9
		6	4,9
		10	5,0
		20	4,9
[C ₁₄ Im-6-ImC ₁₄]Br ₂	0,27	2	4,8
		4	4,8
		6	4,4
		10	4,4
		20	4,0

*nX = números de vezes acima da CMC.

5.3 Fase 3: Extração de lipases empregando SMDFA

5.3.1 Extração da lipase comercial de *A. niger* e *Aspergillus* sp. produzida em meio fermentado empregando SMDFA

A. SMDFA - Triton X-114 com [Ch]X como adjuvantes

Para determinar as condições de separação das fases para o SMDFA na presença de [Ch]X, a primeira etapa do trabalho foi a determinação da Temperatura de *Cloud Point* (T_{CP}) para os referidos sistemas a partir da construção da curva binodal. A curva binodal representa o limítrofe entre a região monofásica e bifásica (com duas fases parcialmente imiscíveis) e pode ser construída pela relação da concentração do tensoativo *versus* a T_{CP} . Assim, inicialmente foram construídas as curvas binodais para os sistemas Triton X-114/[Ch]X/H₂O, as quais estão apresentadas na Figura 33.

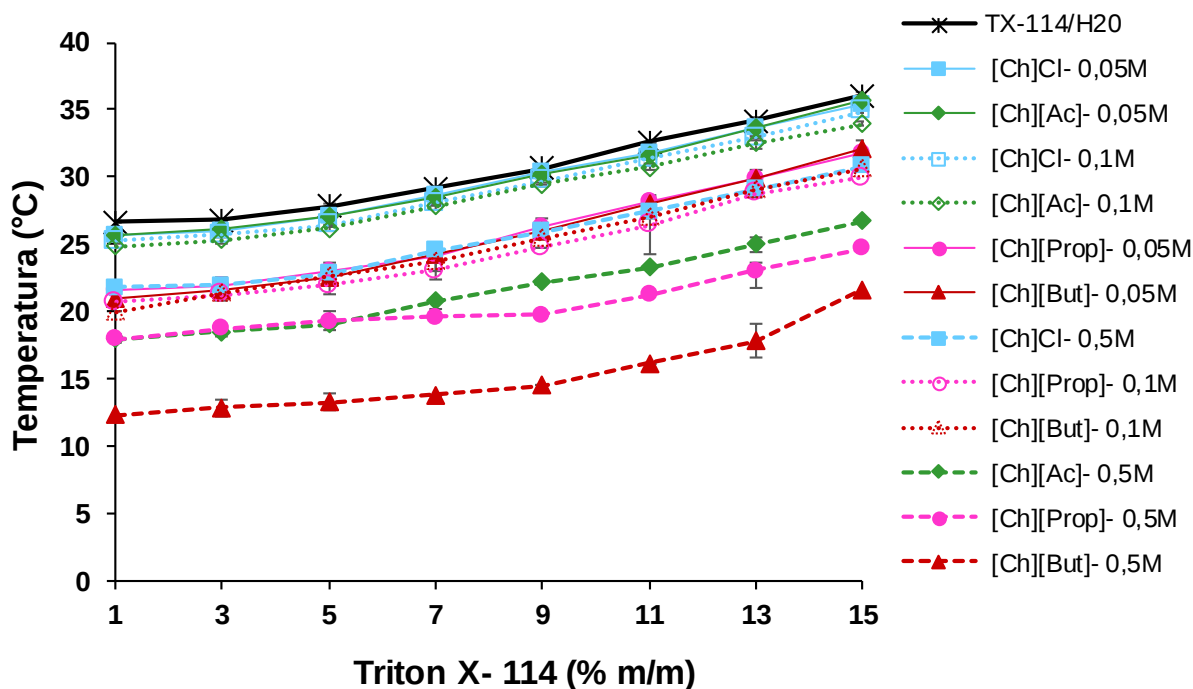


Figura 33. Curvas binodais para SMDFA compostas por Triton X-114 e os LIs, [Ch]Cl [■], [Ch]Ac [◆], [Ch]Prop [●] e [Ch]But [▲], em diferentes concentrações: (linha contínua e forma geométrica cheia- 0,05 M; linha pontilhada e forma geométrica vazia 0,1 M; linha tracejada e forma geométrica cheia 0,5 M). O ensaio na ausência de LI [*]. As barras de erro representam 95% do intervalo de confiança para as medições.

Conforme apresentado na Figura 33, a adição de pequenas concentrações de LIs (0,05 M) não influenciou significativamente a curva binodal, tendo sido obtida uma T_{CP} próxima a do sistema sem LI (somente tensoativo e água ultrapura). No entanto, com o aumento das

concentrações de LIs, particularmente com 0,50 M, nas soluções aquosas de Triton X-114 (com concentrações superiores a 7% (m/m)) influenciaram bastante na T_{CP} , provocando uma diminuição na temperatura necessária para a separação de fases.

O aumento da concentração acarretou na diminuição da T_{CP} de modo proporcional ao aumento da cadeia carbônica das [Ch]X. O [Ch]Cl na concentração de 0,5 M apresentou uma diminuição na T_{CP} , porém menor que os demais LIs. Nesse sistema, obteve-se uma T_{CP} de 21,8°C para a concentração com 1% (m/m) de Triton X-114. Os sistemas com o [Ch][Prop] e [Ch][But] apresentaram temperaturas próximas de 21,6 e 21,0°C, respectivamente, mas em uma concentração menor de LI (0,05 M) e com 1% (m/m) de Triton X-114, quando na concentração de 0,50 M as temperaturas foram de 18,0 e 12,3°C, respectivamente. Uma justificativa para essa diferença se deve principalmente a interação entre as micelas do tensoativo Triton X-114 e a porção hidrofóbica dos LIs através de interações hidrofóbicas, pois o aumento dos carbonos na cadeia alquílica, aumenta a hidrofobicidade dos LIs, e quanto mais hidrofóbico, mais forte é sua interação com as micelas²⁷⁸, de modo a facilitar a agregação micelar.

Aqui, os LIs relativamente mais hidrofóbicos ([Ch][Prop] e [Ch][But]) interagiram melhor com as micelas, justificando as diferenças nas T_{CP} . Com o aumento da concentração para 0,50 M, as [Ch]X diminuíram abruptamente a T_{CP} , sendo mais acentuada para o [Ch][But]. Uma explicação para este fato é que os LIs podem ter penetrado no interior das micelas e com a formação de micelas mistas promoveram sua desidratação, devido a expulsão das moléculas de água do núcleo micelar. Desse modo, foi favorecida a interação hidrofóbica entre a cadeia alquílica do LI e a cadeia carbonada do Triton X-114.

Dentre as [Ch]X, o [Ch][But] apresenta maior número de carbonos na cadeia alquílica, a qual pode alinhar-se mais facilmente com as micelas diminuindo as ligações de hidrogênio, enquanto aumenta as interações hidrofóbicas²⁷⁹. As interações entre [Ch][But] e as micelas do Triton X-114 apresentaram uma diferença proporcional quando comparado aos demais, pois se fez necessário menor energia para a quebra das ligações de hidrogênio e, conseqüentemente, revelou uma menor T_{CP} . Enquanto que os LIs, [Ch]Cl e [Ch][Ac] devido fomentar o efeito *salting-out*, os quais podem realizar ligações de hidrogênio com as moléculas da água, fazem com que as moléculas de tensoativos necessitem de maior energia para a quebra dessas ligações e assim, consigam nanoagregar-se formando as micelas.

Os LIs podem alterar não só o comportamento de agregação das micelas, mas o tamanho e a forma micelar, o número de agregação e a dipolaridade da fase pseudo-micelar¹⁵⁵. Estas interações podem ser interações eletrostáticas, ligações de hidrogênio, dipolo- dipolo e/ ou interações hidrofóbicas^{279,278}. Assim, é muito importante conhecer o comportamento da T_{CP} na

presença de LIs. A força predominante entre as micelas são forças de van der Waals contrárias às forças presentes nas ligações de hidrogênio, que são forças de dipolo-induzido somadas às forças de van der Waals. Desta maneira, é necessário uma maior energia para a quebra destas ligações e, de modo mais lento proporcione a formação do agregado micelar²⁸⁰.

Como o núcleo micelar é hidrofóbico e a cauda do tensoativo interage com a cauda de outro tensoativo de forma a minimizar seu contato com a água. Os aditivos podem aumentar ou reduzir a T_{CP} de acordo com a sua interação, principalmente com a água. A separação de fases ocorre devido à autoagregação de micelas de tensoativos não iônicos. A presença de LIs pode acarretar em uma perturbação do equilíbrio do sistema fazendo com que ocorra uma modificação na T_{CP} e, conseqüentemente, em um deslocamento da curva binodal.

A temperatura pode ter uma forte influência no processo de formação de micelas e, conseqüentemente, na separação de fases. Quanto mais energia existe no sistema, maior é o movimento das partículas promovendo a interação entre as porções hidrofóbicas do tensoativo. Qualquer composto presente no sistema pode acarretar em modificação no equilíbrio, alterando a temperatura de autoagregação das micelas. O comportamento de diminuição da T_{CP} em função do aditivo nesses sistemas seguiu a tendência: $[Ch]Cl < [Ch][Ac] < [Ch][Prop] < [Ch][But]$.

Parmar et al. (2012)²⁷⁹ utilizaram a técnica de dispersão de luz dinâmica, do inglês (*DLS - Dynamic Light Scattering*), para demonstrar que o agregado micelar é alterado não somente pela concentração do aditivo, mas também pela sua hidrofobicidade, a qual influencia diretamente na T_{CP} . A presença do LI, tetrafluoroborato de 1-alkil-3-metilimidazólio ($[C_nmim][BF_4]$), modificou a forma e o tamanho tensoativo Pluronic P103, promovendo a formação de micelas mistas²⁷⁹.

A partir das curvas binodais estabelecidas, foram então determinadas as temperaturas empregadas para cada condição experimental nos SMDFA-LIs (Tabela 14), enquanto os valores descritos para a Razão Volumétrica (R_v) estão apresentados na Tabela 15. Os resultados de estabilidade mostraram que o aumento do comprimento da cadeia alquílica do ânion, particularmente com mais de 4 carbonos, influenciou negativamente a atividade da lipase. Assim, para os estudos de particionamento foram apenas avaliados os LIs, $[Ch]Cl$, $[Ch][Ac]$, $[Ch][Prop]$ e $[Ch][But]$. Os sistemas foram preparados variando as concentrações de Triton X-114 de 3-13% (m/m) e as concentrações de $[Ch]X$ (M) de 0,05, 0,10 e 0,50.

Resultados e Discussão

Tabela 14. Temperatura de partição adotada para a formação dos SMDFA-LIs formados com Triton X-114/ [Ch]X/ H₂O.

Temperatura de Partição dos SMDFA- LIs							
LIs (M)	Sistemas	Triton X-114 (% m/m)					
		3	5	7	9	11	13
0	Triton X-114	28	30	35	35	40	40
0,05	[Ch]Cl	27,5	30	35	35	40	40
	[Ch][Ac]	27,5	30	35	35	40	40
	[Ch][Prop]	26	30	32,5	35	35	40
	[Ch][But]	27,5	30	35	35	37,5	40
0,10	[Ch]Cl	27,5	30	35	35	40	40
	[Ch][Ac]	27,5	30	30	35	40	40
	[Ch][Prop]	27,5	27,5	32,5	35	35	40
	[Ch][But]	26	30	30	32,5	35	40
0,50	[Ch]Cl	22,5	25	30	30	35	35
	[Ch][Ac]	20	25	25	28	30	30
	[Ch][Prop]	18	20	23	23	26	30
	[Ch][But]	18	20	26	26	30	35

Resultados e Discussão

Tabela 15. Valores obtidos para a Razão Volumétrica (R_V) das fases dos SMDFA-LIs baseados em Triton X-114/ [Ch]X/ H₂O.

LIs (M)	Sistemas	Razão Volumétrica das fases					
		Triton X-114 (% m/m)					
		3	5	7	9	11	13
0	Triton X-114	0,8 ± 0,4	1,4 ± 0,0	1,0 ± 0,4	1,8 ± 0,2	1,4 ± 0,0	2,0 ± 0,0
0,05	[Ch]Cl	0,5 ± 0,0	0,9 ± 0,0	1,0 ± 0,0	1,8 ± 0,2	1,0 ± 0,0	1,3 ± 0,1
	[Ch][Ac]	0,9 ± 0,4	0,5 ± 0,2	0,9 ± 0,0	1,4 ± 0,0	1,4 ± 0,4	1,6 ± 0,1
	[Ch][Prop]	1,7 ± 0,0	1,2 ± 0,1	1,2 ± 0,0	1,6 ± 0,2	2,5 ± 0,4	1,7 ± 0,0
	[Ch][But]	0,4 ± 0,0	1,2 ± 0,1	1,1 ± 0,1	1,8 ± 0,2	1,9 ± 0,0	1,8 ± 0,3
0,10	[Ch]Cl	0,5 ± 0,0	1,2 ± 0,0	0,9 ± 0,0	1,6 ± 0,3	1,1 ± 0,2	1,9 ± 0,0
	[Ch][Ac]	0,5 ± 0,2	0,8 ± 0,0	1,6 ± 0,0	1,3 ± 0,4	1,2 ± 0,0	1,4 ± 0,0
	[Ch][Prop]	0,6 ± 0,0	1,4 ± 0,2	1,1 ± 0,1	0,9 ± 0,4	2,1 ± 0,0	1,4 ± 0,2
	[Ch][But]	0,7 ± 0,0	1,1 ± 0,0	2,2 ± 0,4	1,9 ± 0,0	2,7 ± 0,4	1,7 ± 0,0
0,50	[Ch]Cl	0,5 ± 0,2	0,9 ± 0,0	1,4 ± 0,0	2,2 ± 0,0	0,8 ± 0,3	2,4 ± 0,2
	[Ch][Ac]	0,3 ± 0,0	0,5 ± 0,0	0,7 ± 0,0	0,8 ± 0,0	1,0 ± 0,0	1,4 ± 0,1
	[Ch][Prop]	0,4 ± 0,0	1,4 ± 0,2	0,8 ± 0,0	1,2 ± 0,0	1,6 ± 0,2	1,0 ± 0,1
	[Ch][But]	0,5 ± 0,0	0,7 ± 0,0	1,1 ± 0,1	1,8 ± 0,2	1,0 ± 0,0	1,6 ± 0,0

*Valores médios ± DP com intervalo de confiança de 95%.

Os SMDFA permitem a integração entre a etapa de recuperação e purificação de proteínas, além de apresentarem melhor capacidade e seletividade quando comparadas às técnicas de extração líquido-líquido convencional²⁸¹, utilizando solventes orgânicos. O particionamento de biomoléculas entre as duas fases em SMDFA é um fenômeno complexo, pois envolve várias interações no momento da partição entre o soluto e os agentes formadores de fases²⁸². Assim, diferentes interações entre a proteína e as moléculas circundadas no sistema podem ocorrer como, interações eletrostáticas, interações hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e forças dispersivas²⁸². A predominância de uma destas interações ou mesmo um equilíbrio entre elas será o fator determinante no particionamento da biomolécula.

O K_E mostra a partição preferencial da biomolécula de interesse por uma das fases em equilíbrio, permitindo compreender os mecanismos que governa a partição de solutos no sistema. O uso de [Ch]X em concentrações (M) de 0,05, 0,10 e 0,50 apresentou pequena influência na partição da lipase, *i.e.*, em geral o K_E foi superior a 1, demonstrando que a lipase

foi particionada preferencialmente para a fase inferior (rica em micelas). Porém, o particionamento da lipase foi bem variável a depender da condição estudada.

A exceção dos resultados acima foram os sistemas compostos de 3, 5 e 13% (m/m) de Triton X-114 e 0,50 M de [Ch][But], e os SMDFA compostos de 13% (m/m) de Triton X-114 juntamente com [Ch]Cl nas diferentes concentrações, em que o K_E foi um pouco menor que 1,0, demonstrando uma partição similar da lipase em ambas as fases. A Figura 34 ilustra os valores dos coeficientes de partição para os diferentes sistemas.

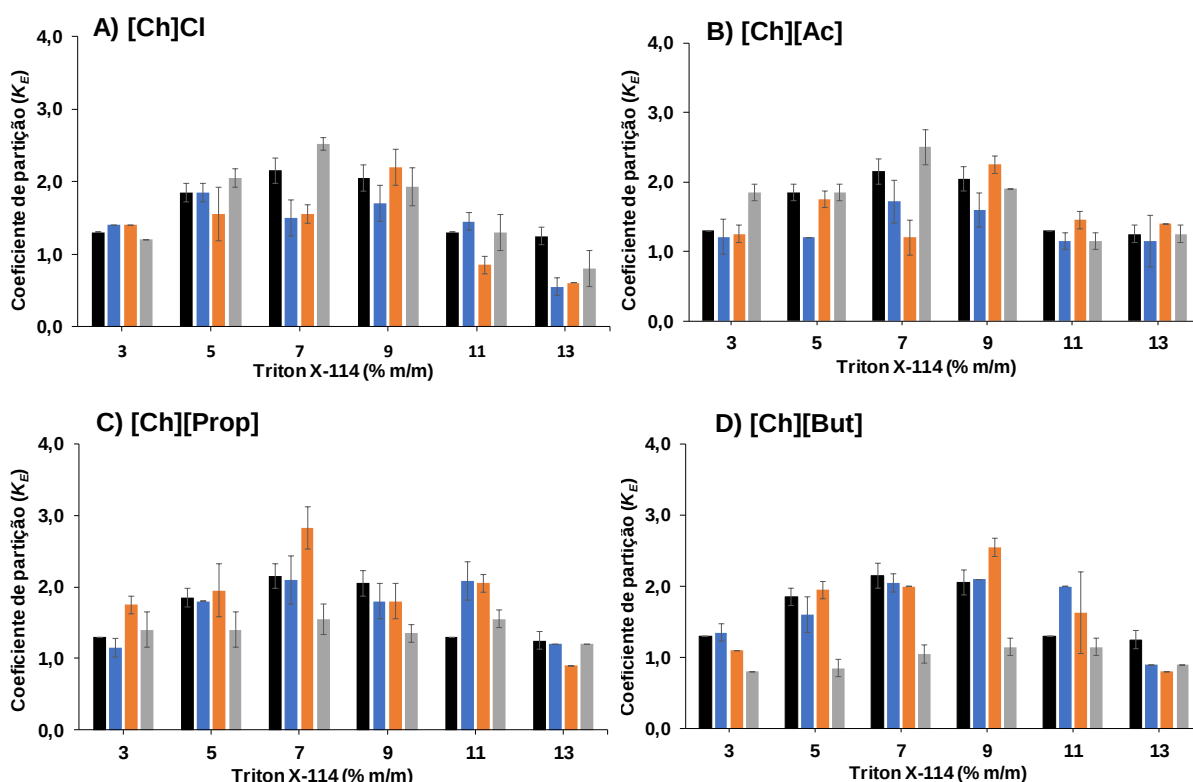


Figura 34. Coeficiente de partição (K_E) da lipase comercial de *A. niger* nos SMDFA compostos por Triton X-114 [3 a 13 % (m/m)] e **A)** [Ch]Cl; **B)** [Ch][Ac]; **C)** [Ch][Prop]; **D)** [Ch][But], nas seguintes concentrações (M): 0,00 [■]; 0,05 [■]; 0,10 [■]; 0,50 [■]. As barras de erro representam 95% do intervalo de confiança para as medições.

Ao observar a Figura 34, pode-se destacar alguns sistemas que apresentaram maiores K_E , por exemplo, [Ch]Cl 0,50 M e 7% (m/m) de Triton, [Ch][Ac] nas mesmas condições. Interessante, que quando se aumentou a cadeia alquílica do ânion na condição com 7% (m/m) Triton X-114 e 0,50M de LI, o K_E reduziu, tem-se: [Ch]Cl e [Ch][Ac] – 2,5; [Ch][Prop] – 1,8 e [Ch][But] – 1,0. Curiosamente o mesmo ocorreu para os sistemas com 9 % (m/m) de Triton X-114 e 0,50M de LI; [Ch]Cl e [Ch][Ac] com K_E de 1,9; [Ch][Prop] K_E de 1,4 e [Ch][But] K_E de 1,2.

As lipases migraram preferencialmente para a fase mais concentrada em micelas¹⁷³ devido à interação hidrofóbica¹²⁶. Nesse caso, o particionamento resultou da interação entre o núcleo hidrofóbico das micelas de Triton X-114 e a superfície hidrofóbica da lipase¹²⁶. Os sistemas formados apenas com o tensoativo Triton X-114/H₂O apresentaram *EE* superiores a 60%, com exceção do sistema composto de 3% (m/m) de Triton.

A adição de [Ch]X nos sistemas não somente influenciam na solubidade e na formação das micelas de Triton X-114, mas na solubilidade da lipase nos sistemas. Assim, a presença de LIs nos sistemas poderia promover os efeitos *salting-in ou salting-out* influenciando diretamente no equilíbrio das fases e na propensão da lipase por uma das fases. Contudo, esses efeitos não foram observados, de modo que as interações hidrofóbicas foram predominantes entre a lipase e as micelas do tensoativo, a qual determinou a preferência da enzima para a fase inferior mais hidrofóbica, rica em Triton X-114.

O aumento das concentrações de [Ch]X para 0,50 M influenciou em alguns sistemas, acarretando na diminuição dos valores de K_E , como destacado acima. Nestes sistemas, possivelmente houve um equilíbrio entre as interações hidrofóbicas na superfície da lipase, na fase inferior com as micelas de Triton X-114 e na fase superior com a cadeia alquílica das [Ch]X, acarretando em uma partição similar. Infelizmente, não foi possível observar o efeito dos sistemas com maiores concentrações de [Ch]X devido a supressão da atividade catalítica da lipase provocada pelo aumento da concentração destes LIs.

Outra observação importante, o aumento da concentração de tensoativo também influenciou na partição da enzima. Quanto maior a concentração de Triton X-114 no sistema maior o valor do coeficiente de partição, entretanto, acima de determinada concentração de tensoativo o K_E diminui. No sistema formado com 7% (m/m) Triton X-114/H₂O e com 7% (m/m) Triton X-114 e 0,50 M [Ch]Cl e [Ch][Ac] nas mesmas condições, essa aptidão ocorre precisamente acima de 7% (m/m) tensoativo. Resultado similar ocorreu nos sistemas com 9% (m/m) Triton X-114 e 0,1 M [Ch]Cl e [Ch][But] nas mesmas condições. Uma justificativa para a diminuição do K_E nos sistemas com maiores concentrações de tensoativo é que possivelmente o aumento do agregado micelar diminuiu a área interfacial disponível para a enzima-alvo⁹⁰, efeito relacionado ao volume de exclusão. O volume de exclusão²⁸³ resulta de interações hidrofóbicas predominantes entre as micelas de tensoativos devido a formação de uma rede micelar²⁸⁴, o que acarretou na expulsão das lipases para a fase oposta.

A diferença entre os ambientes físico-químicos nas fases micelares são cruciais para uma separação efetiva, promovendo a concentração e possível purificação de biomoléculas¹²⁶. Embora o uso de [Ch]X no SMDFA tenha apresentado pequena influência na partição da lipase,

Resultados e Discussão

foi possível alcançar uma *EE* superior a 80% em alguns sistemas. Na Tabela 16 estão descritos os valores referentes a *EE* (%) para a lipase comercial de *A. niger*. Os valores destacados em negrito correspondem aos sistemas onde houve inversão dos valores do K_E , quando a lipase migrou para a fase superior (pobre em micelas) e, os valores destacados em vermelho correspondem aos sistemas selecionados para o estudo com a lipase de *Aspergillus* sp produzida em meio fermentado.

Tabela 16. Eficiência de Extração (*EE* %) da lipase comercial *A. niger* utilizando SMDFA baseados em Triton X-114/ [Ch]X/ H₂O.

LIs (M)	Sistemas	<i>EE</i> (%)					
		Triton X-114 (% m/m)					
		3	5	7	9	11	13
0	Triton X-114	52 ± 2,8	72 ± 4,3	69 ± 4,2	78 ± 2,0¹	64 ± 1,4	71 ± 5,2
0,05	[Ch]Cl	43 ± 3,4	62 ± 1,3	60 ± 3,0	76 ± 4,5	59 ± 1,6	40 ± 4,9²
	[Ch][Ac]	41 ± 8,4	38 ± 3,5	61 ± 8,2	70 ± 3,4	60 ± 4,7	65 ± 9,2
	[Ch][Prop]	66 ± 2,8	68 ± 4,0	72 ± 5,1	74 ± 4,8	84 ± 6,0	66 ± 0,8
	[Ch][But]	34 ± 2,4	65 ± 4,8	69 ± 6,2	79 ± 3,0	79 ± 2,4	61 ± 2,7
0,10	[Ch]Cl	41 ± 0,3	66 ± 5,1	57 ± 2,4	78 ± 5,4	48 ± 8,8	52 ± 4,6
	[Ch][Ac]	39 ± 5,8	59 ± 2,9	66 ± 4,4	74 ± 5,0	63 ± 1,7	67 ± 3,0
	[Ch][Prop]	51 ± 2,1	73 ± 5,1	76 ± 5,9	61 ± 1,8	81 ± 4,1	55 ± 1,8
	[Ch][But]	42 ± 6,5	68 ± 1,7	82 ± 2,0	83 ± 2,2	81 ± 6,7	58 ± 2,0
0,50	[Ch]Cl	38 ± 1,7	64 ± 3,3	78 ± 5,3	80 ± 2,3	50 ± 6,4	65 ± 3,5
	[Ch][Ac]	38 ± 3,8	47 ± 2,1	65 ± 1,8	61 ± 1,2	53 ± 6,6	62 ± 4,3
	[Ch][Prop]	35 ± 2,7	67 ± 0,8	57 ± 6,2	63 ± 4,3	71 ± 5,2	54 ± 3,7
	[Ch][But]	30 ± 3,9	39 ± 2,4	52 ± 3,9	67 ± 2,5	53 ± 5,1	58 ± 4,1

*Valores médios ± DP com intervalo de confiança de 95%. *Fcal* = valor de F calculado; *Fcri* = valor de F tabelado; df = graus de liberdade. Não houve diferenças significativas entre os valores médios de cada grupo. Em todos os casos, o *Fcal* < *Fcri*; Probabilidade de 5%; df = 51. [Ch]Cl = 0,75 < 3,40; [Ch][Ac] = 0,99 < 3,40; [Ch][Prop] = 0,88 < 3,40; [Ch][But] = 1,90 < 3,40.

¹Valores em negrito correspondem aos sistemas onde houve inversão dos valores do K_E , quando a lipase migrou para a fase superior (pobre em micelas);

²Valores em vermelho correspondem aos sistemas selecionados para o estudo com a lipase de *Aspergillus* sp.

A extração e concentração da enzima em uma das fases não significa que a lipase apresentará uma maior atividade catalítica ou que não apresente atividade na fase oposta. Embora o rendimento final da enzima seja uma medição indireta, uma vez que os compostos formadores de fases podem manter ou incrementar a atividade catalítica da lipase, esse

Resultados e Discussão

parâmetro foi avaliado e os valores referentes ao rendimento final (η) da lipase comercial de *A. niger* estão apresentados na Tabela 17.

Tabela 17. Rendimento final (η) da lipase comercial *A. niger* utilizando SMDFA baseados em Triton X-114/ [Ch]X/ H₂O.

LIs (M)	Sistemas	η Triton X-114 (% m/m)					
		3	5	7	9	11	13
0	Triton X-114	2298,43	2164,81	1407,59	1435,56	978,70	996,30
0,05	[Ch]Cl	2186,47	2037,78	1211,76	1379,17	1211,76	650,65
	[Ch][Ac]	1964,51	895,09	1477,78	1497,22	1147,13	1212,31
	[Ch][Prop]	2489,58	2190,14	1390,28	1055,00	1328,06	1243,06
	[Ch][But]	1596,53	2029,86	1369,72	1672,50	1635,83	900,56
0,10	[Ch]Cl	2466,67	2439,41	1218,82	1464,81	1218,82	603,05
	[Ch][Ac]	1245,93	1995,00	1603,33	1436,02	880,00	1477,79
	[Ch][Prop]	1260,42	1525,14	1197,50	726,81	790,83	522,50
	[Ch][But]	2104,44	1887,08	1972,50	1885,00	1291,48	690,97
0,50	[Ch]Cl	1471,37	1954,51	1759,72	1491,94	1759,71	483,33
	[Ch][Ac]	791,67	720,09	819,31	995,00	572,22	655,19
	[Ch][Prop]	455,28	264,58	517,50	556,11	632,92	553,75
	[Ch][But]	649,44	736,67	785,14	884,86	544,44	558,89

Outro parâmetro que também pode influenciar no particionamento através de interações eletrostáticas com os grupos da cadeia lateral ionizável da enzima é o pH do sistema, a qual pode modificar a carga global da enzima. Em todos os sistemas estudados, Triton X-114/[Ch]X/ H₂O, não foram observadas alterações significativas nos valores de pH (5,0 e 6,0), confirmando que o pH de cada sistema não influenciou no particionamento da lipase.

De acordo com as observações descritas e os resultados obtidos, optou-se em correlacionar os melhores K_E e sua respectiva EE (%) para cada sistema e assim, foram selecionados dois sistemas de cada [Ch]X com Triton X-114 (9 e 11% m/m) para avaliar a partição da lipase de *Aspergillus* sp. produzida em meio fermentado¹⁶⁸ pelo nosso grupo de pesquisa. Para uniformizar os ensaios foi utilizada uma temperatura fixa de 35°C e, posterior determinação da concentração de proteínas totais para calcular o respectivo fator de purificação (FP).

Resultados e Discussão

Os sistemas selecionados estão destacados em vermelho na Tabela 16, sendo eles: 9% (m/m) Triton X-114/ H₂O; 9% (m/m) Triton X-114 e 0,05M de [Ch][Ac]; 11% (m/m) Triton X-114 e 0,05M [Ch][Prop]; 9% (m/m) Triton X-114 e 0,10M de [Ch]Cl, e [Ch][Ac] e [Ch][But] nas mesmas condições; 11% (m/m) Triton X-114 e 0,10M [Ch][Prop], e [Ch][But] nas mesmas condições; 9% (m/m) Triton X-114 e 0,50M [Ch]Cl; 11% (m/m) Triton X-114 e 0,50M [Ch][But].

Primeiramente, foi avaliado o sistema micelar sem LI, Triton X-114/H₂O e, um comportamento de partição diferente foi observado entre a lipase produzida pela espécie *Aspergillus* sp.¹⁶⁸ e a lipase comercial de *A. niger*. A lipase de *Aspergillus* sp. migrou para a fase superior (pobre em micelas), apresentando um K_E de 0,4, EE de 25% e FP de 4,34. Na Tabela 18 estão descritos os valores da R_V , do K_E , da EE (%) e o FP obtidos para lipase de *Aspergillus* sp.

Tabela 18. Resultados experimentais da lipase de *Aspergillus* sp. produzida em meio fermentado usando SMDFa baseado em Triton X-114/[Ch]X/H₂O.

LIs (M)	Sistemas	R_V		K_E		EE (%)		FP	
		9	11	9	11	9	11	9	11
0	TX-114	0,8	-	0,4	-	25	-	4,34	-
0,05	[Ch]Cl	-	-	-	-	-	-	-	-
	[Ch][Ac]	1,1	-	1,1	-	55	-	7,18	-
	[Ch][Prop]	-	2,0	-	0,9	-	64	-	8,33
	[Ch][But]	-	-	-	-	-	-	-	-
0,10	[Ch]Cl	1,0	-	0,7	-	41	-	4,00	-
	[Ch][Ac]	1,0	-	1,2	-	54	-	6,58	-
	[Ch][Prop]	-	1,7	-	0,9	-	59	-	5,44
	[Ch][But]	1,0	1,7	0,8	0,7	46	53	5,56	7,25
0,50	[Ch]Cl	0,7	-	1,0	-	40	-	2,64	-
	[Ch][Ac]	-	-	-	-	-	-	-	-
	[Ch][Prop]	-	-	-	-	-	-	-	-
	[Ch][But]	-	1,1	-	0,6	-	38	-	4,71

Deve-se considerar que as lipases, comercial e a produzida pelo *Aspergillus* sp.¹⁶⁸, diferem em pH e temperatura ótimas, bem como na respectiva massa molecular. Embora a tríade catalítica das lipases seja formada pelos mesmos resíduos de aminoácidos e possam apresentar similaridade na sequência de aminoácidos na estrutura primária³⁵, sua organização

no sítio ativo da proteína podem se enovelar de modo distintos influenciando no comportamento enzimático, bem como nas possíveis interações com o ambiente à qual enzima foi exposta (solvente). Por outro lado, deve-se também ter em consideração que os contaminantes presentes no meio fermentado (outras proteínas, ácidos nucleicos, lipídeos, dentre outros) também podem afetar o comportamento de partição da lipase. Possivelmente, a lipase de *Aspergillus* sp. na presença dos contaminantes, não conseguiu interagir com as micelas do tensoativo e por consequência foi excluída para a fase superior (pobre em micelas). A presença de impurezas pode modificar as forças eletrostáticas e a combinação das fases, podendo alterar o K_E e consequentemente influenciar na afinidade preferencial da lipase por uma das fases em equilíbrio²⁸⁵, neste caso, a interação com as micelas do tensoativo (fase inferior).

Assim como nos sistemas com a lipase comercial, a adição de [Ch]X nos sistemas apresentou pouca influência na partição da lipase de *Aspergillus* sp. Nos sistemas formados com 9% (m/m) de Triton e [Ch][Ac], nas concentrações de 0,05 e 0,10 M, a lipase de *Aspergillus* sp. apresentou uma inversão nos valores do K_E , superiores a 1, correspondendo a partição da lipase preferencialmente para a fase inferior rica em micelas, com uma EE (%) cerca de 55% e um FP de 7,18 e 6,58 para as concentrações 0,05 e 0,10M, respectivamente. Os demais sistemas apresentaram um K_E próximos a 1, demonstrando uma partição similar da lipase em ambas as fases. Contudo, foi possível obter uma EE de 64% e um FP de 8,33 no sistema formado com 11% (m/m) de Triton X-114 e 0,05M de [Ch][Prop], na qual a lipase particionou preferencialmente para a fase superior (pobre em micelas), Tabela 18.

Ao comparar estes resultados com os dados da literatura em sistemas micelares, pode-se considerar que a partição da lipase com uma EE (%) superior a 60% foi apenas satisfatória. Por exemplo, o grupo de Duarte et al. (2015)¹²⁶ utilizaram o 10,38% (m/m) de Triton X-114 e tampão Mcllvaine pH 5,1 para a extração da lipase de *Leucosporidium scottii* L117, tendo obtido excelente EE (%), na ordem dos 94%. No entanto, destacamos que os autores tiveram um baixo FP (1,2), inferior ao obtido neste trabalho (FP de 8,33). Embora os autores tenham ainda otimizado a temperatura e o pH dos sistemas, não conseguiram melhorar o FP.

Ooi et al. (2011)¹⁷³ utilizaram o SMDFA formado com 24% (m/m) de Pluronic (L81), adicionando 0,5% (m/m) de cloreto de potássio, e alcançaram uma purificação de 7,2x e uma EE (%) de 89% para a lipase de *Burkholderia* sp. ST8. Os autores¹⁷³ relataram que a adição de sal melhorou a solubilização das proteínas na fase micelar, pois foi possível promover a desidratação das enzimas pela remoção da tampa da lipase.

Como destacado anteriormente, o melhor sistema para a lipase de *Aspergillus* sp. foi alcançado com 11% de Triton X-114 e 0,05M de [Ch][Prop], com uma EE (%) de 64% e um

FP de 8,33. No entanto, experimentos adicionais podem incrementar os resultados obtidos, visto que SMDFA são pouco explorados. Como sugestão pode-se variar a temperatura e fazer a adição de sal, pois espécies carregadas²⁴ podem influenciar no comportamento de partição em decorrência do efeito *salting-in/salting-out*. Altas concentrações de sais podem afetar as interações hidrofóbicas, pois os íons desidratam as proteínas e reagem com os grupos de carga oposta¹²⁵. Assim, diferenças entre a hidrofobicidade relativa das fases em equilíbrio podem favorecer a partição da lipase¹⁴⁰.

Apesar dos resultados obtidos com a lipase produzida mostrar um comportamento diferente da lipase comercial, principalmente pela presença dos contaminantes, o estudo prévio com a enzima comercial facilita a compreensão da organização das moléculas no sistema e as interações predominantes.

Os resultados mostraram que a adição de diferentes [Ch]X não influenciou o comportamento de partição de ambas lipases. No entanto, ainda assim foi possível alcançar resultados de purificação mais expressivos do que os reportados na literatura. Os SMDFA baseados em [Ch]X representam uma alternativa para extração e parcial purificação de lipases. A otimização desses sistemas pode melhorar a eficiência e viabilidade econômica de sua futura aplicação, principalmente visando o incremento da partição e extração da lipase.

B. SMDFA - Triton X-114 com [C_nmim]Cl como adjuvantes

Nesses sistemas foram avaliadas somente a extração e partição da lipase comercial.

De acordo com os estudos de estabilidade para a formação dos SMDFA-LIs da família dos cloretos de imidazólios, o [C₈mim]Cl não acarretou em perda de atividade para lipase e esse foi empregado nos ensaios de extração em SMDFA-LIs. As condições de extração foram definidas a partir de curvas binodais previamente construídas¹¹² pelo nosso grupo de pesquisa.

Desta forma, prosseguiu-se os estudos de extração da enzima utilizando o SMDFA-LIs formado pelo Triton X-114 variando as concentrações de 5-11% (m/m), [C₈mim]Cl nas concentrações de 0,1 e 0,5% (m/m) e tampão McIlvaine pH 6,5. A temperatura empregada nos experimentos, os resultados de *EE* (%) e *R_V* estão apresentados na Tabela 19, enquanto que os resultados de *K_E* são apresentados na Figura 35. Destaca-se que não foi possível analisar os resultados dos sistemas formados com [C₈mim]Cl 0,5% (m/m), pois o LI apresentou significativa interferência no método de quantificação de atividade enzimática adotado e o sistema controle neste caso específico não minimizou o erro obtido.

Resultados e Discussão

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.

Triton X-114 (% m/m)	Eficiência de Extração (%)*	Razão volumétrica (R_v)*	Temperatura (°C)
5	$70 \pm 2,1$	$1,0 \pm 0,0$	35
7	$46 \pm 3,2$	$0,8 \pm 0,0$	40
9	$59 \pm 3,8$	$1,4 \pm 0,0$	40
11	$67 \pm 11,7$	$2,0 \pm 0,0$	40

*Valores médios $\pm$ DP com intervalo de confiança de 95%.

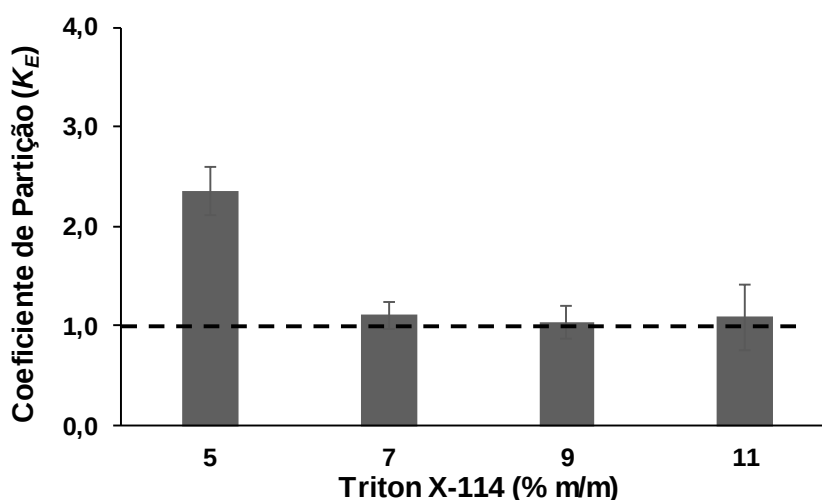


Figura 35. Coeficiente de partição dos SMDFA-LIs composto por concentrações de 5 a 11 % (m/m) de Triton X- 114 e 0,1% (m/m) de $[C_8mim]Cl$. As barras de erro representam 95% do intervalo de confiança para as medições.

O sistema formado com 0,1% (m/m) de $[C_8mim]Cl$ e 5% (m/m) de Triton X-114 apresentou um K_E de 2,4, indicando que a enzima particionou para a fase rica em micelas (fase inferior) com uma EE de 70%. Similar aos SMDFA empregando as $[Ch]X$, a lipase particionou preferencialmente para a fase rica em micelas, devido a afinidade hidrofóbica onde o núcleo hidrofóbico da micela interage com a superfície da tampa hidrofóbica da lipase¹²⁶.

No entanto, para os demais sistemas com 0,1% (m/m) de $[C_8mim]Cl$ e 7, 9 e 11% (m/m) de Triton X-114 o K_E diminuiu próximo de 1, mostrando que a enzima particionou de modo similar para ambas as fases. Sabe-se que a diferença entre os ambientes físico-químicos nas fases micelares são cruciais para uma separação efetiva¹²⁶ e, aqui, a hidrofobifidade nos sistemas aumentou comparado aos SMDFA empregando as $[Ch]X$ devido o caráter mais hidrofóbico do cátion imidazólio presente no $[C_8mim]Cl$. Como a diminuição do K_E está

relacionado com o aumento da concentração de tensoativo e não com a concentração de LI, acredita-se que o tensoativo, em maiores concentrações, diminuiu a área interfacial disponível para a enzima-alvo⁹⁰, acarretando na partição similar da lipase em ambas as fases. Desta forma, talvez não tenha sido uma partição preferencial da lipase em ambas as fases e sim um efeito relacionado ao volume de exclusão.

Os LIs da família dos cloretos de imidazólios com menor cadeia alquílica, especificamente [C₄mim]Cl e [C₆mim]Cl, não foram explorados porque as curvas binodais com estes LIs ainda não estão reportadas na literatura e os estudos com as colinas apresentaram resultados similares aos obtidos com o [C₈mim]Cl.

5.3.2 Extração da lipase comercial de *A. niger* em SPDFA com carboidrato

Parte desse estudo foi realizado em parceria com Universidade de Aveiro, Portugal no âmbito do projeto PDSE – Edital n° 19/2016 (Número do Processo: 88881.133279/2016-01). Do mesmo modo, nesses sistemas foram avaliadas somente a extração e partição da lipase comercial.

As condições de extração foram definidas a partir de curvas binodais descritas na literatura¹¹³. Para os ensaios de partição utilizando SPDFA com carboidrato foi utilizado o PPG 400 a 40% (m/m) e os carboidratos, D-Fructose, D-Manose, D-Sacarose e D-Xilose, a 20% (m/m).

A lipase, nos quatro sistemas, particionou preferencialmente para a fase inferior, rica em carboidratos, não sendo possível calcular o K_E pois os valores de atividade hidrolítica na fase superior se encontravam abaixo do limite de detecção do método empregado. A EE (%) na fase inferior dos sistemas foram de 100% para todos os carboidratos estudados como pode ser observado na Figura 36.

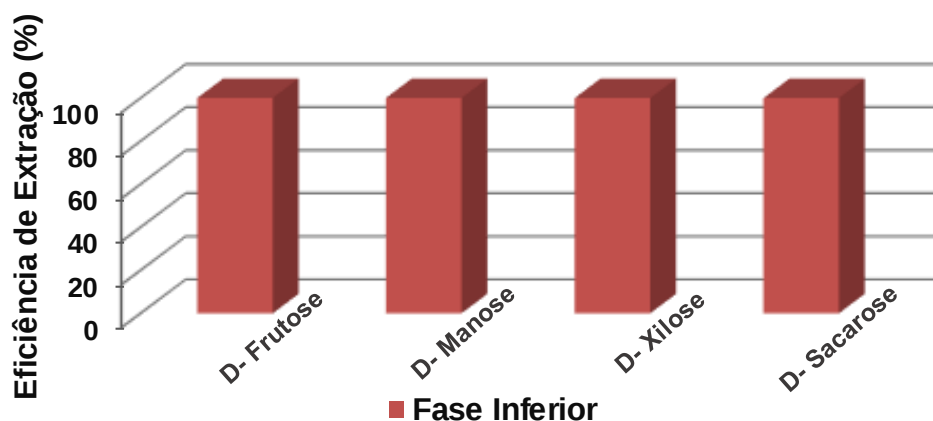


Figura 36. Eficiência de extração ($EE\%$) dos SPDFAs baseados em PPG 400 (40% m/m) com carboidrato (20% m/m).

A análise da Figura 36 mostra que foi possível concentrar a enzima na fase inferior (rica em carboidrato), possivelmente devido a interações favoráveis entre o complexo carboidrato-proteína¹⁶⁷. Estas interações dominantes entre o carboidrato e a enzima são formadas pelos grupos hidroxilas do carboidrato que podem atuar como doadores de ligação de hidrogênio e/ou aceptores estabelecendo uma estrutura bem organizada¹⁶⁷. Assim, o complexo pode ser estabilizado por interações de van der Waals entre os grupos aromáticos de aminoácidos das proteínas e a rede de carbono dos carboidratos¹⁶⁷.

Como descrito anteriormente, solventes hidrofílicos podem levar ao desdobramento da enzima com exposição dos resíduos hidrofóbicos internos, enquanto que solventes hidrofóbicos podem manter a lipase em sua conformação flexível e ativa²¹⁶. No entanto, os carboidratos altamente hidrofílicos não acarretaram na perda de atividade enzimática nas condições estudadas no presente trabalho, devido as possíveis ligações de hidrogênio, efeito *sugaring-out*. Além disso, contribuíram para a concentração total da enzima em apenas uma etapa do processo *downstream*. Isso ocorreu provavelmente devido a rede de carbono dos carboidratos e os grupos aromáticos de aminoácidos da lipase, simultaneamente com as interações promovidas pelo efeito *sugaring-out* com as moléculas da água presente no sistema. Pode-se destacar ainda, que a adição de carboidratos como agente formador de fases em SDFA são mais benéficos comparados aos sais inorgânicos, pois não alteram o pH do ambiente²⁸⁶ devido as interações eletrostáticas provocadas pela alta força iônica dos sais.

Infelizmente, não foi possível a quantificação de proteínas totais nos sistemas, devido a presença dos carboidratos, o que inviabiliza a determinação de atividade específica e, consequentemente, a determinação do FP. Como alternativa aos métodos tradicionais, BCA¹⁷⁶, Bradford^{177,178} e Lowry¹⁷⁶, foi proposto o uso da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) para determinar proteínas totais utilizando um padrão conhecido, o BSA. Além do BSA, também foram utilizadas as proteínas: GFP e L-Asparaginase. O resultado positivo foi a confirmação que os sistemas formados com PPG 400 e carboidrato foram capazes de concentrar a lipase na fase inferior com algum grau de purificação não definido (Figura 37).

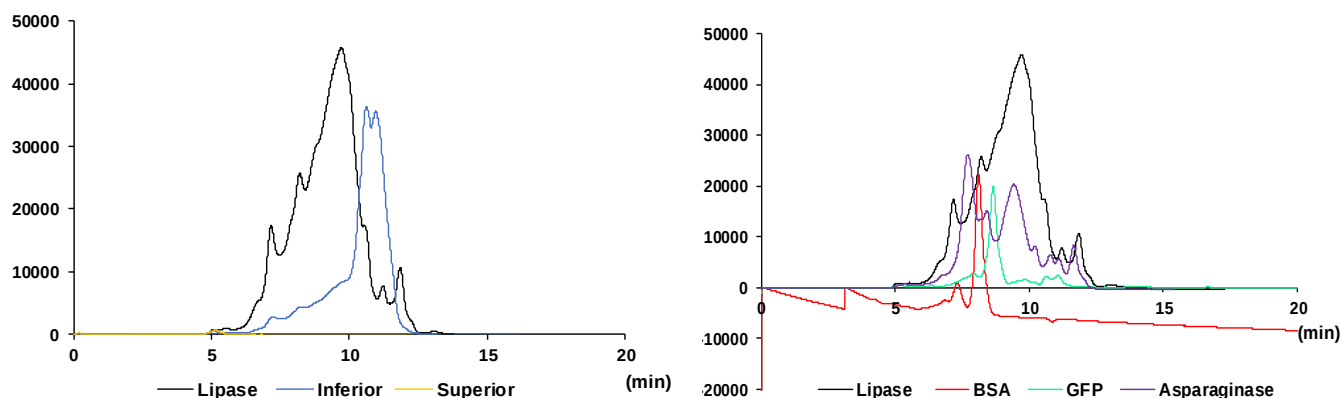


Figura 37. (A) Cromatograma da lipase microbiana de *A. niger* 10 mg.mL⁻¹ (linha preta) e das fases do SPDA + carboidrato: fase inferior (linha azul) e fase superior (linha amarela). (B) Cromatogramas das proteínas (10 mg.mL⁻¹): Lipase (linha preta), BSA (linha vermelha), GFP (linha verde) e L-Asparaginase (linha roxa). CLAE – Coluna Vydac 218TP54 (C18,5 μ m, 4.6mm i.d x 250 mm). Fase móvel: acetonitrila:água; Condição: eluição gradiente de 2 a 15% (v/v) em 15 min e, 15 a 50% (v/v) em 10 min; fluxo de 1,0 mL.min⁻¹ em temperatura ambiente.

Os SPDA com carboidrato representam uma alternativa para recuperação e extração de lipases em apenas uma etapa do processo *downstream*, não apresentando perdas da atividade enzimática durante o processo. Adicionalmente uma reextração da enzima para remoção dos carboidratos permitiria a determinação de proteínas totais possibilitando não somente a quantificação do grau de pureza obtido no processo bem como sua aplicação nos diversos segmentos biotecnológicos.

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 consequentemente 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 consequentemente 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* NCFT 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 Processes 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. LAZNIEWSKI, 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.; POMPEIA, 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.

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.

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.

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 na extracelular 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 lynferdii* Y-7723: pH-dependant activity deviation. **Biotechnology Bioprocess Engineering**, 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.

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 miellar 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.

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.

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 QUÍMICA, 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.; GRIOGORIEV, 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-RIABI, 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-RIABI, 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 tetrahydrolipstatin: 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.; KHIRI, 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.

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

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.; JUNGNICKE, 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.

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.

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.

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.

APÊNDICE I

Tabela 20. Atividade absoluta da lipase comercial de *A. niger* em diferentes condições de pH e temperatura.

Atividade Absoluta (U.g ⁻¹)						
pH						
Tempo (h)	3,5	4,5	5,5	6,5	7,5	8,5
0	6407,15	6250,83	6848,02	7095,96	862,32	728,99
1	6280,97	6195,15	7026,82	7574,97	894,00	703,45
3	8062,84	7446,96	8569,46	8601,15	892,98	663,60
6	6362,07	6953,26	8191,79	8632,95	926,98	729,50
9	7224,54	6725,42	8493,92	8875,86	1031,93	678,93
24	5117,24	7392,08	9302,30	9660,28	1347,64	601,79
Temperatura (°C)						
Tempo (h)	20	30	40	50		
0	4134,87	4405,11	4840,87	5378,80		
1	5755,81	5707,79	6098,08	6376,50		
3	6691,70	6312,64	6585,44	6789,66		
6	6161,43	6507,28	7370,88	7785,44		
9	6475,10	7201,15	8237,55	7806,39		
24	4147,13	5804,60	7582,76	8057,47		

Apêndice

Tabela 21. Atividade absoluta da lipase comercial de *A. niger* na presença das soluções aquosas do tensoativo Triton X-114 ao longo do tempo.

Tempo (h)	Controle*	Atividade Absoluta (U.g ⁻¹)								
		Triton X-114 (% m/v)								
		1	3	5	7	9	11	13	15	20
0	7317,24	4255,43	4275,86	4880,20	5619,92	4268,20	4409,20	4798,47	5347,64	3383,91
1	7305,75	6107,06	5934,61	5886,59	6466,67	6536,78	6144,06	6633,17	7009,45	4276,88
3	7537,68	6095,89	6024,54	6571,65	7177,01	6341,76	6400,00	6787,74	7306,90	5114,48
6	8104,60	5487,61	6111,26	7073,56	7814,56	6530,05	6604,60	7383,91	7817,11	4946,62
9	7591,83	5802,30	6685,06	7740,49	8548,28	6416,86	6358,62	8145,59	8201,79	5791,95
24	7116,22	5249,04	69997,70	8517,57	8868,97	5909,89	5328,74	7050,90	8877,01	6855,17

*Atividade da lipase na ausência de triton X-114.

Tabela 22. Atividade absoluta da lipase comercial *A. niger* 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.

Atividade absoluta (U.g⁻¹)				
20 (% m/v)				
Tempo (h)	Controle*	PEG 600	PPG 725	PPG 425
0	7317,24	8598,72	587,48	7761,94
1	7305,75	9520,82	955,81	7469,22
3	7537,68	9168,84	333,59	7745,59
6	8104,60	9483,91	621,71	7501,15
9	7591,83	9964,53	-	8771,26
24	7116,22	9523,37	621,71	8783,58
30 (% m/v)				
Tempo (h)	Controle*	PEG 600	PPG 725	PPG 425
0	7317,24	8495,02	754,53	8169,09
1	7305,75	8764,75	409,20	7416,09
3	7537,68	8773,07	761,17	7192,34
6	8104,60	8967,05	889,40	7719,54
9	7591,83	9767,56	-	8498,60
24	7116,22	9461,15	358,62	8148,15
40 (% m/v)				
Tempo (h)	Controle*	PEG 600	PPG 725	PPG 425
0	7317,24	8651,09	483,27	8234,48
1	7305,75	8401,97	0,00	8486,44
3	7537,68	8677,01	1071,78	8041,91
6	8104,60	8386,86	724,14	7871,26
9	7591,83	9545,98	-	8495,02
24	7116,22	8359,28	0,00	9255,17
50 (% m/v)				
Tempo (h)	Controle*	PEG 600	PPG 725	PPG 425
0	7317,24	7379,31	1792,34	8307,54
1	7305,75	8145,59	965,52	8244,19
3	7537,68	7819,38	0,00	7598,98
6	8104,60	7845,72	0,00	8651,34
9	7591,83	8345,48	-	8867,43
24	7116,22	7988,51	0,00	8454,15

*Atividade da lipase na ausência dos Polímeros.

Tabela 23. Atividade absoluta da lipase comercial de *A. niger* na presença do polímero NaPA 8.000 em tampão McIlvaine pH 5,5 e solução aquosa ao longo do tempo.

Atividade absoluta (U.g ⁻¹)				
NaPA 8.000 em tampão McIlvaine pH 5,5 (% m/v)				
Tempo (h)	Controle*	5	10	15
0	7317,24	567,05	455,68	362,20
1	7305,75	533,33	517,50	508,81
3	7537,68	478,67	452,62	486,33
6	8104,60	398,98	451,60	455,94
9	7591,83	411,24	502,68	413,79
24	7116,22	397,96	433,21	485,06
NaPA 8.000 em solução aquosa (% m/v)				
Tempo (h)	Controle*	5	10	15
0	7317,24	342,78	433,72	449,04
1	7305,75	361,69	383,14	452,62
3	7537,68	394,89	478,16	485,31
6	8104,60	459,77	400,51	498,08
9	7591,83	441,89	395,40	476,63
24	7116,22	357,09	380,59	438,83

*Atividade da lipase na ausência de NaPA.

Tabela 24. Atividade absoluta da lipase comercial de *A. niger* na presença das soluções aquosas do polímero PPG 400 ao longo do tempo.

Atividade absoluta (U.g ⁻¹)					
PPG 400 (% m/v)					
Tempo (h)	Controle*	30	40	50	60
0	7317,24	8643,68	8813,79	8282,76	7992,34
1	7305,75	8657,47	9127,97	8466,67	8844,44
3	7537,68	8866,09	9001,15	8759,20	8590,04
6	8104,60	9354,79	8762,07	9259,20	9418,97
9	7591,83	8248,28	908,99	8101,15	8614,56
24	7116,22	8248,28	9080,46	8928,74	8139,46

*Atividade da lipase na ausência de PPG 400.

Tabela 25. Atividade absoluta da lipase comercial de *A. niger* na presença das soluções aquosas dos carboidratos ao longo do tempo.

Atividade absoluta (U.g⁻¹)					
20 (% m/v)					
Tempo (h)	Controle*	D-Fructose	D-Manose	D-Sacarose	D-Xilose
1	7305,75	8010,73	8052,11	8552,87	8606,90
3	7537,68	7382,38	7577,01	7506,90	7970,88
50 (% m/v)					
Tempo (h)	Controle*	D-Fructose	D-Manose	D-Sacarose	D-Xilose
1	7305,75	7884,29	8076,63	7664,37	8373,95
3	7537,68	6804,60	7449,81	7230,65	7514,18

*Atividade da lipase na ausência dos Carboidratos.

Tabela 26. Atividade absoluta da lipase comercial de *A. niger* na presença das soluções aquosas de [C_nmim]Cl ao longo do tempo.

Atividade absoluta (U.g ⁻¹)						
0,1 (% v/v)						
Tempo (h)	Controle*	[C ₄ mim]Cl	[C ₆ mim]Cl	[C ₈ mim]Cl	[C ₁₀ mim]Cl	[C ₁₂ mim]Cl
0	7317,24	8759,93	8186,97	8320,31	7801,15	753,00
1	7305,75	8423,91	8422,11	9057,47	1193,87	701,40
3	7537,68	8556,32	7996,93	8645,21	632,44	716,73
6	8104,60	8671,62	8657,47	9014,05	622,73	692,72
9	7591,83	8096,55	8073,56	8859,77	421,46	609,45
24	7116,22	8366,91	8076,63	7468,97	526,18	671,78
0,3 (% v/v)						
Tempo (h)	Controle*	[C ₄ mim]Cl	[C ₆ mim]Cl	[C ₈ mim]Cl	[C ₁₀ mim]Cl	[C ₁₂ mim]Cl
0	7317,24	8660,54	8068,97	8377,01	717,75	0,00
1	7305,75	8041,38	8156,32	9023,32	659,00	0,00
3	7537,68	8260,54	8199,23	8712,64	681,99	546,62
6	8104,60	8249,59	8432,18	8880,72	563,47	778,54
9	7591,83	7960,15	7543,30	8447,51	525,16	1447,77
24	7116,22	8550,19	8274,33	5475,86	486,85	1376,76
0,5 (% v/v)						
Tempo (h)	Controle*	[C ₄ mim]Cl	[C ₆ mim]Cl	[C ₈ mim]Cl	[C ₁₀ mim]Cl	[C ₁₂ mim]Cl
0	7317,24	8090,42	7881,99	7878,62	873,56	0,00
1	7305,75	8041,38	7900,16	8323,37	499,62	0,00
3	7537,68	8213,03	8389,27	8049,55	744,83	0,00
6	8104,60	8050,57	8389,49	8400,00	397,37	348,91
9	7591,83	7886,67	7014,56	8129,25	406,64	889,66
24	7116,22	8444,44	7127,97	5992,34	280,46	0,60

*Atividade da lipase na ausência de [C_nmim]Cl.

Tabela 27. Atividade absoluta da lipase comercial de *A. niger* na presença das soluções aquosas das [Ch]X ao longo do tempo.

Atividade Absoluta (U.g ⁻¹)							
0,05 M							
Tempo (h)	Controle*	[Ch]Cl	[Ch][Ac]	[Ch][Prop]	[Ch][But]	[Ch][Pent]	[Ch][Hex]
0	7317,24	7935,63	9264,88	6864,60	7347,67	9042,15	8102,84
1	7305,75	6242,15	9032,95	6689,18	6962,86	8824,52	7299,48
3	7537,68	6190,34	9434,48	6720,02	7689,35	8667,32	7375,84
6	7977,01	6042,91	8727,97	6559,14	8154,08	8798,85	8115,06
9	7591,83	7149,43	8398,16	7083,52	6994,93	8839,46	7321,88
24	7170,11	7077,70	9691,95	6922,64	8387,11	7916,09	7411,48
0,10 M							
Tempo (h)	Controle*	[Ch]Cl	[Ch][Ac]	[Ch][Prop]	[Ch][But]	[Ch][Pent]	[Ch][Hex]
0	7317,24	7013,03	8903,70	7159,16	7444,22	8868,05	7127,40
1	7305,75	6452,11	8569,60	6549,60	8044,44	8672,29	6785,29
3	7537,68	6530,78	8881,23	6776,02	7417,49	8424,52	6583,68
6	7977,01	6864,37	7472,80	7194,50	8414,40	8740,74	6482,88
9	7591,83	7052,36	9093,10	6836,10	7544,76	8911,49	6314,88
24	7170,11	6835,25	8180,84	7191,07	8292,12	7914,94	5497,26
0,50 M							
Tempo (h)	Controle*	[Ch]Cl	[Ch][Ac]	[Ch][Prop]	[Ch][But]	[Ch][Pent]	[Ch][Hex]
0	7317,24	4700,38	8377,01	6098,28	6933,84	562,96	536,59
1	7305,75	4251,34	8420,95	5653,84	7280,41	715,20	19,35
3	7537,68	3924,39	8605,36	6632,46	7022,43	566,03	13,75
6	7977,01	4084,29	7688,89	7077,66	7634,36	697,32	0,00
9	7591,83	4501,66	8865,90	6100,95	7348,25	657,98	0,00
24	7170,11	4254,92	7673,56	6331,07	7043,81	563,22	0,00
1,00 M							
Tempo (h)	Controle*	[Ch]Cl	[Ch][Ac]	[Ch][Prop]	[Ch][But]	[Ch][Pent]	[Ch][Hex]
0	7317,24	3778,29	7563,22	5002,32	5947,21	669,73	280,00
1	7305,75	3375,73	7675,61	4843,99	5070,79	713,15	36,94
3	7537,68	3578,54	8148,28	5183,05	4941,22	710,60	0,00
6	7977,01	3624,01	7252,11	4277,79	4866,90	686,08	0,00
9	7591,83	3592,34	8249,81	4385,14	4806,82	696,81	0,00
24	7170,11	3373,69	8761,38	4508,49	4587,91	729,50	0,00

*Atividade da lipase na ausência de [Ch]X.

Tabela 28. Valores de pH das soluções aquosas de [Ch]X.

LIs	pH*			
	0,05 M	0,10 M	0,50 M	1,00 M
[Ch]Cl	5,65	5,80	5,84	6,01
[Ch][Ac]	5,65	5,71	5,76	5,89
[Ch][Prop]	5,83	5,78	5,83	5,98
[Ch][But]	5,54	5,51	5,58	5,71
[Ch][Pent]	6,22	6,00	6,10	5,98
[Ch][Hex]	4,79	4,82	5,33	5,83

*(pH) = ± 0.01 ; pH da água ultrapura “Milli-Q” = 6,01 a 25,0°C

APÊNDICE II

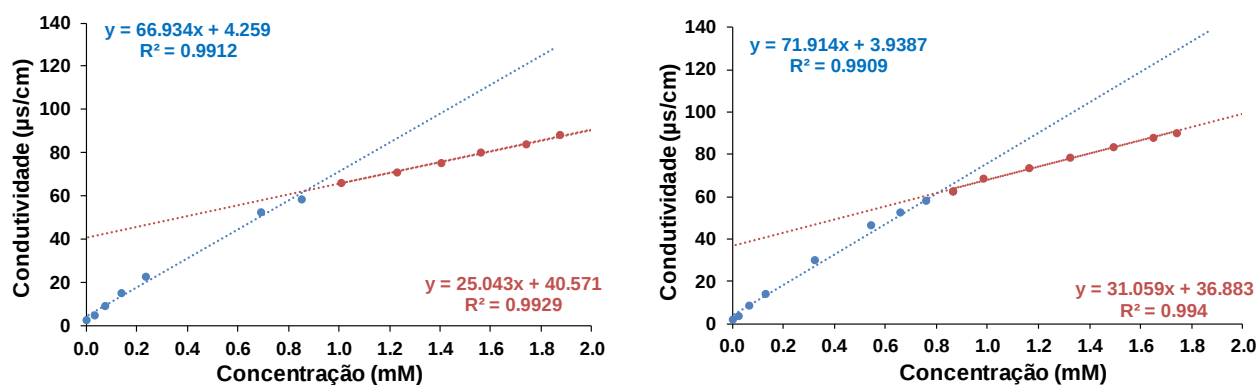


Figura 38. Os gráficos apresentam a intersecção das retas de modo a determinar a CMC do LI [C₁₆mim]Cl que foi de 0,84 mM corresponde à média das duplicatas.

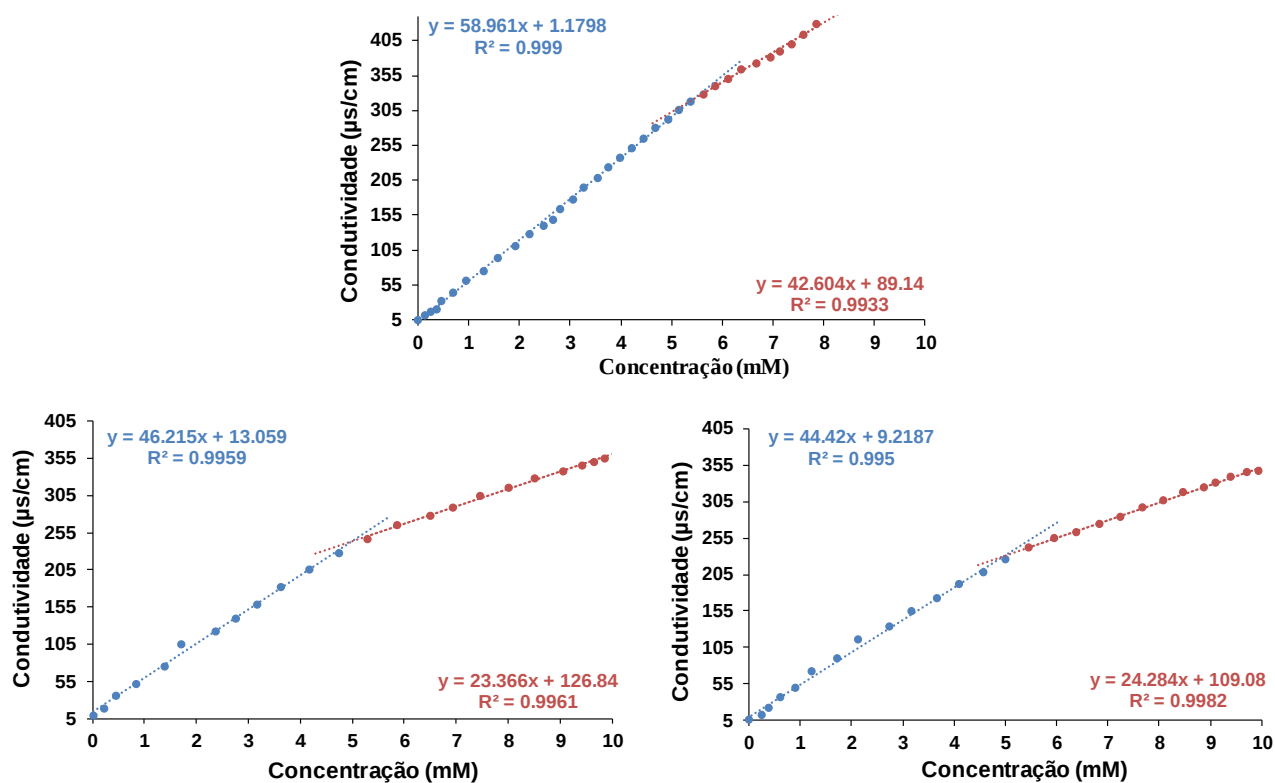
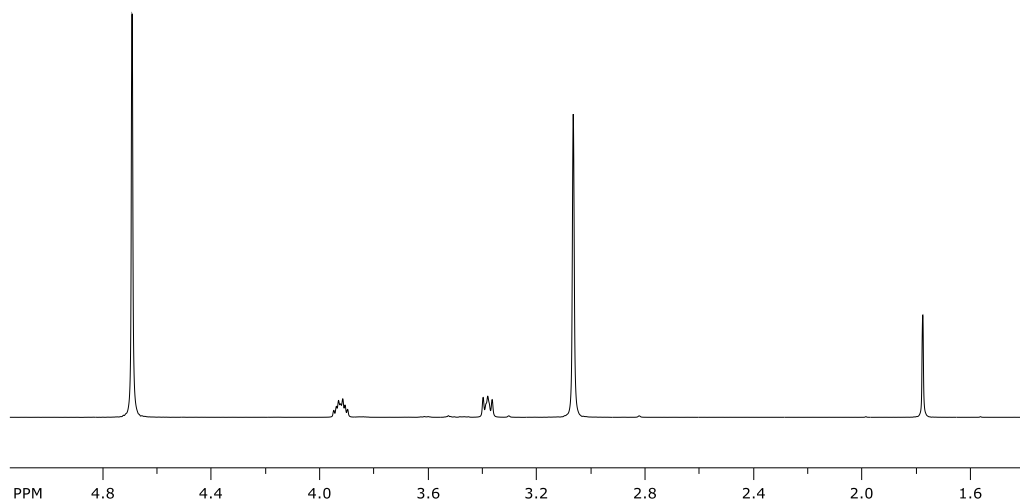


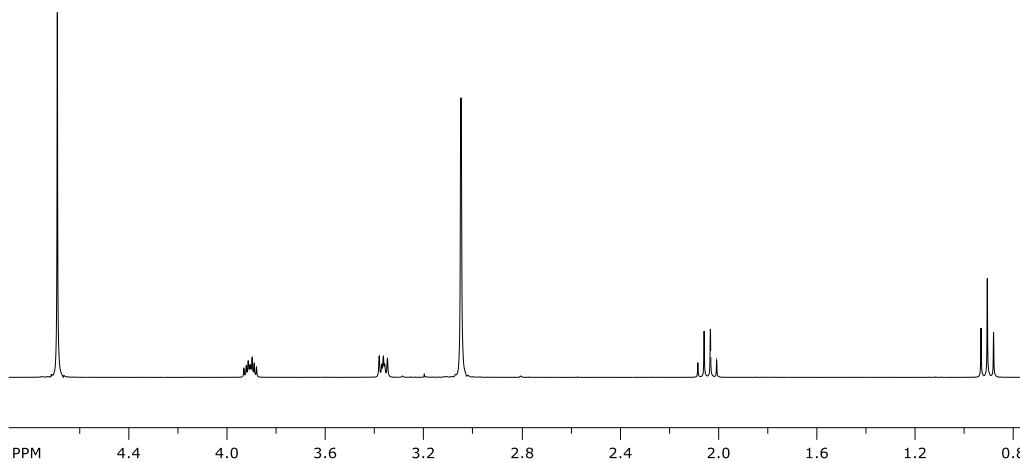
Figura 39. Os gráficos apresentam a intersecção das retas de modo a determinar a CMC do LI [Ch][Tetrad] que foi de 5,11mM corresponde à média das triplicatas.

APÊNDICE III

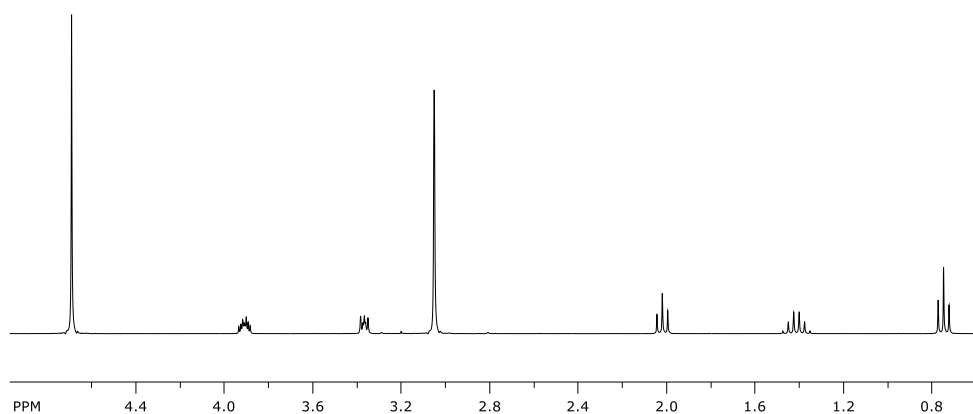
SpinWorks 4: [Ch][Ac]

**Figura 40.** Espectro de RMN da amostra sintetizada de [Ch][Ac].

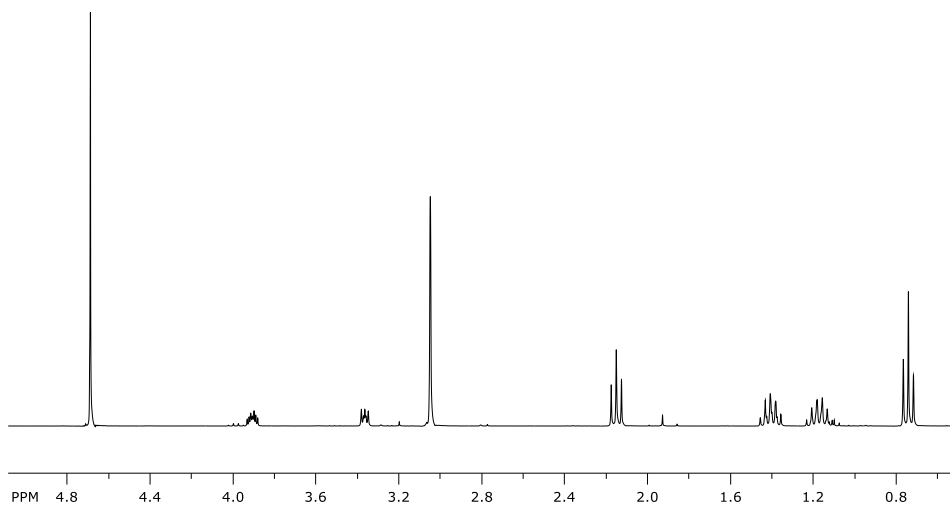
SpinWorks 4: [Ch][Prop]

**Figura 41.** Espectro de RMN da amostra sintetizada de [Ch][Prop].

SpinWorks 4: [Ch][But]

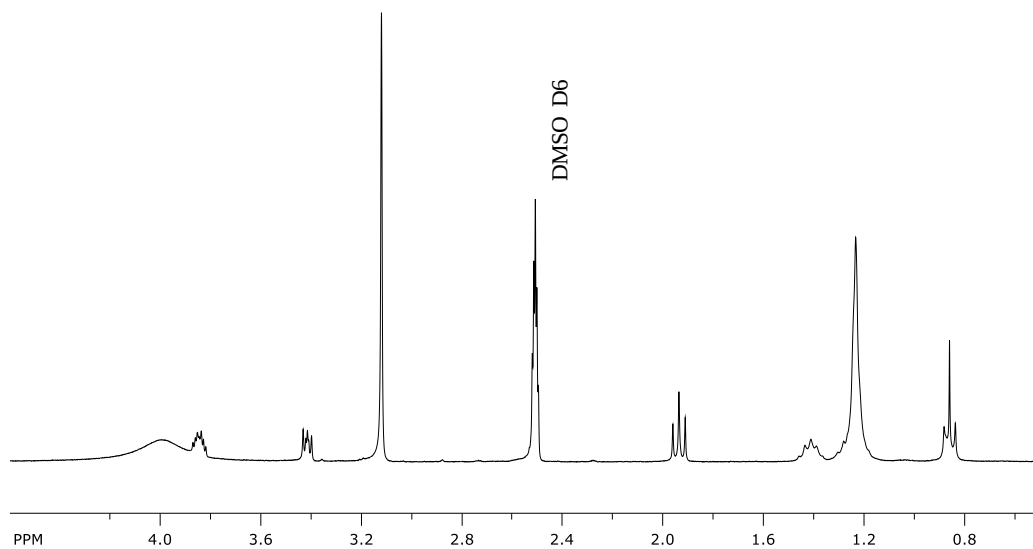
**Figura 42.** Espectro de RMN da amostra sintetizada de [Ch][But].

SpinWorks 4: [Ch][Pent]

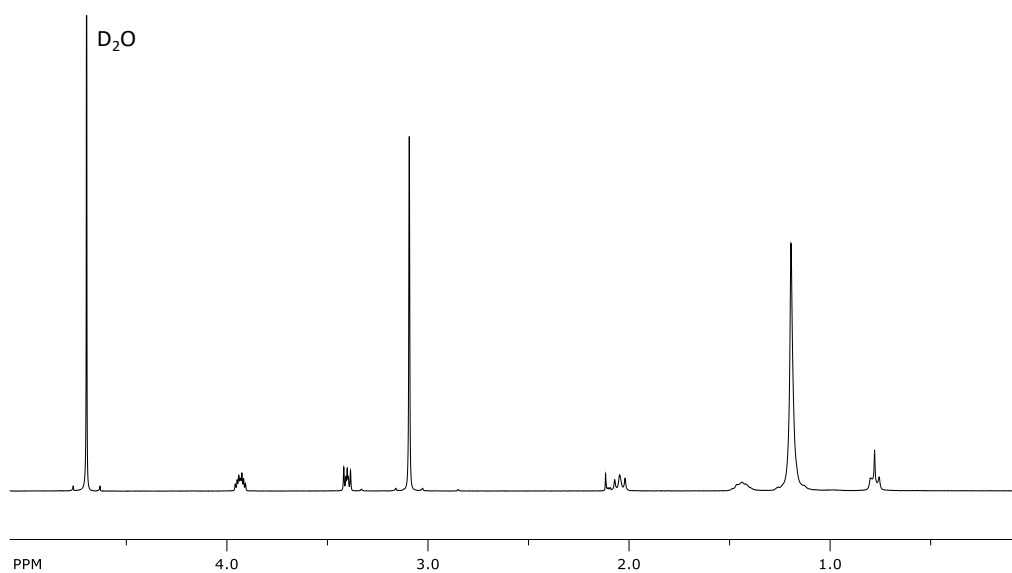
**Figura 43.** Espectro de RMN da amostra sintetizada de [Ch][Pent].

SpinWorks 4: [Ch][Dec]

Solvente: DMSO D6

**Figura 44.** Espectro de RMN da amostra sintetizada de [Ch][Dec].

SpinWorks 4: [Ch][Tetradec]

**Figura 45.** Espectro de RMN da amostra sintetizada de [Ch][Tetrad].

Apêndice IV

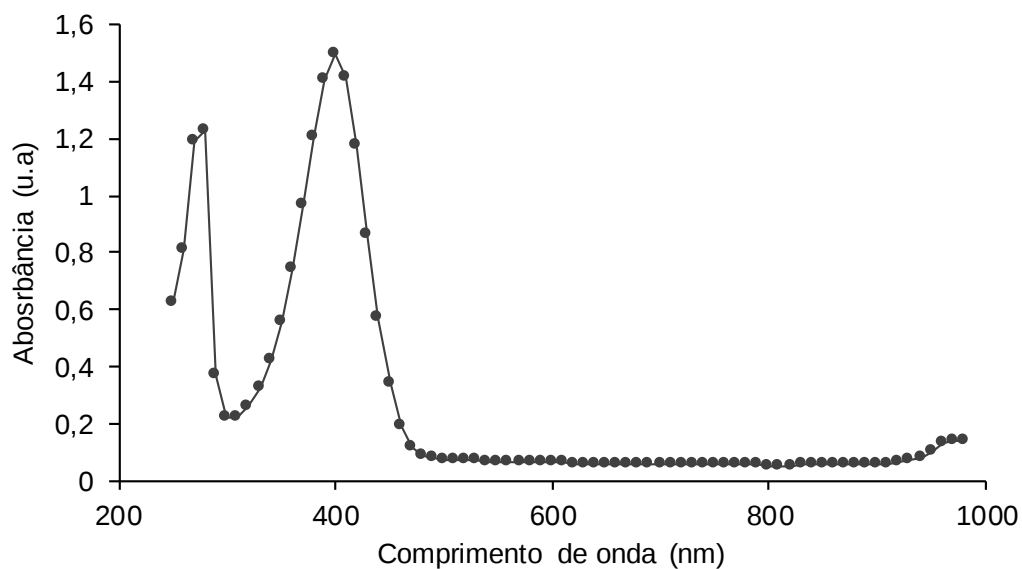
Varredura do substrato *p*-Nitrofenol

Figura 46. Varredura espectral referente ao *p*-Nitrofenol, realizada em leitor de placas espectrofotômetro modelo Multimode Plate Reader (Perkim Elmer, EUA.)

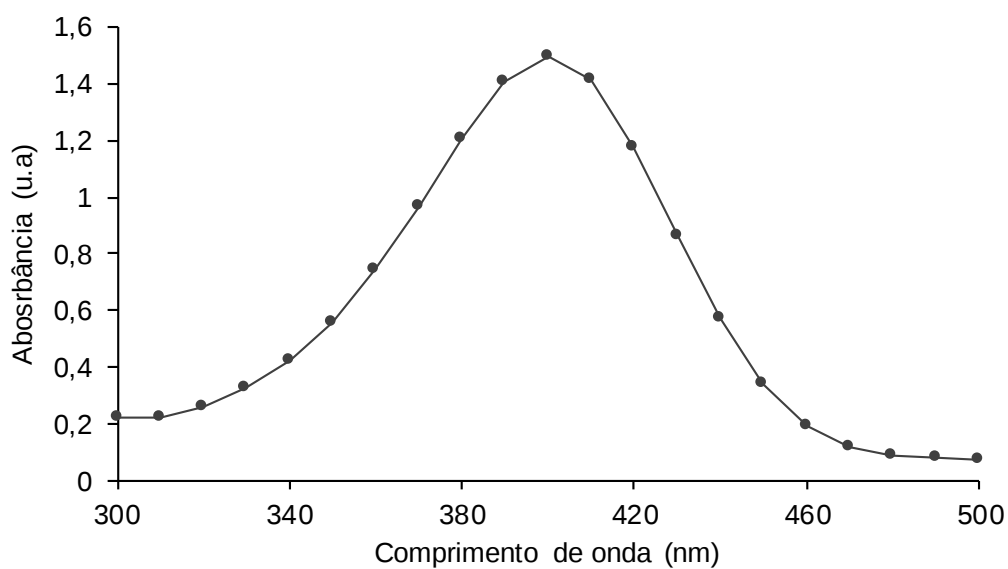


Figura 47. Varredura espectral na faixa entre 300 a 460 nm do *p*-Nitrofenol.

Curva Analítica

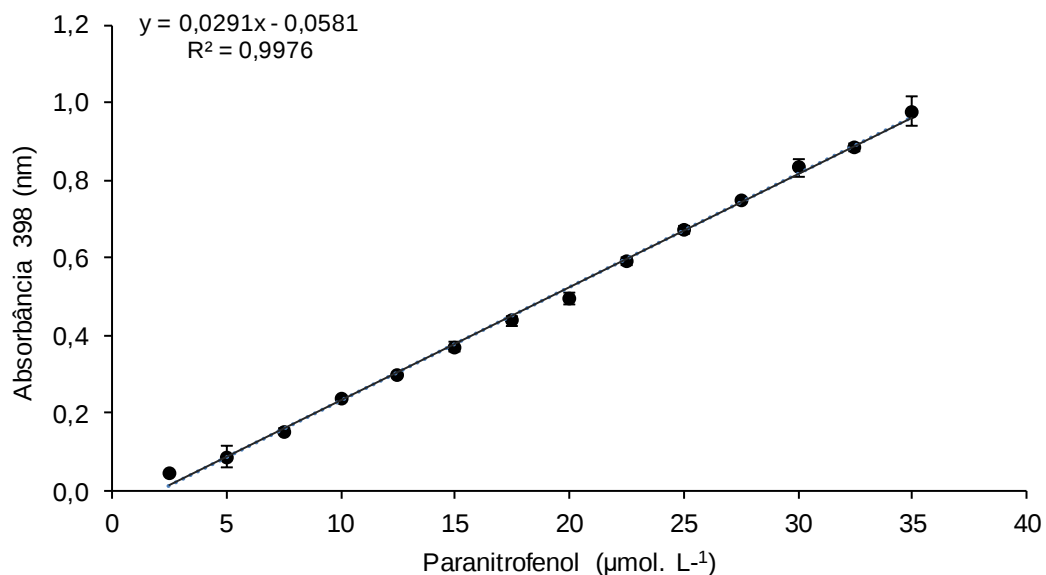


Figura 48. Curva analítica do *p*-Nitrofenol. As barras de erro representam 95% do intervalo de confiança.

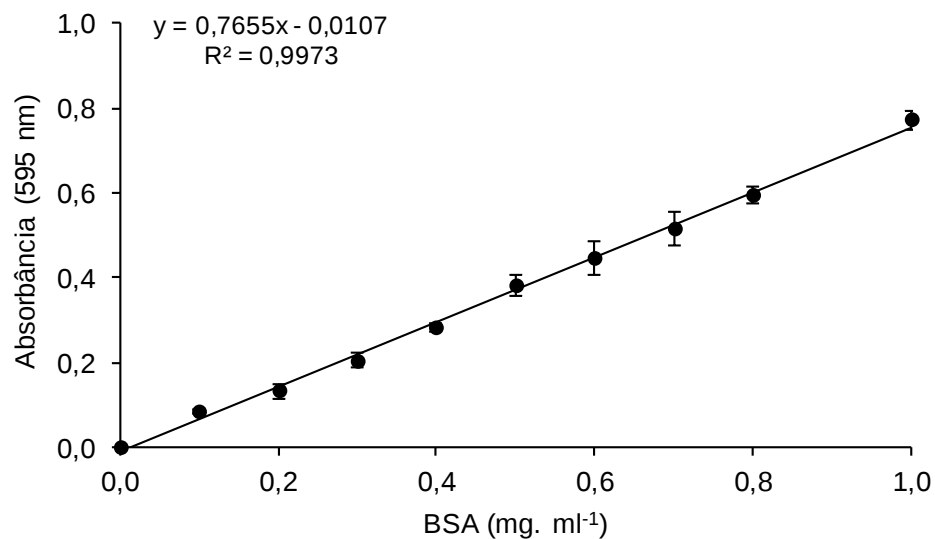


Figura 49. Curva analítica da proteína padrão BSA. As barras de erro representam 95% do intervalo de confiança.

CAPÍTULO II

Artigo publicado:

Insights into the effect of imidazolium-based ionic liquids on chemical structure and hydrolytic activity of microbial lipase

Bioprocess and Biosystems Engineering
https://doi.org/10.1007/s00449-019-02121-w

RESEARCH PAPER



Insights into the effect of imidazolium-based ionic liquids on chemical structure and hydrolytic activity of microbial lipase

Paloma Andrade Martins Nascimento¹ · Jorge Fernando Brandão Pereira¹ · Valéria de Carvalho Santos-Ebinuma¹

Received: 18 January 2019 / Accepted: 3 April 2019
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2019

Abstract

This work studied the effect of the cation alkyl chain length of 1-alkyl-*n*-methylimidazolium chloride ([C_{*n*}mim]Cl)-based ILs on the activity of *Aspergillus niger* lipase. First, the lipase activity in the presence of different ILs concentration over time was determined. ILs with shorter cation alkyl side chain length, namely [C₄mim]Cl and [C₆mim]Cl, promoted an increase of lipase activity; while, [C₈mim]Cl, depending on its concentration, maintained or decreased the enzyme activity. In the presence of ILs with longer cation alkyl chain length, i.e., [C₁₀mim]Cl and [C₁₂mim]Cl, the lipase relative activity was reduced with 0.1 (%v/v) and until suppressed ([C₁₂mim]Cl at 0.3 (%v/v)) as a result of irreversible changes in its secondary structure. Fluorescence and circular dichroism spectroscopy analysis confirmed the results achieved. These findings show that [C_{*n*}mim]Cl-based ILs can exert different behavior on the lipase' activity (enhance, maintain or even inhibit) and structural conformation, depending on the cation alkyl chain length and their relative concentration.

Keywords Lipase · Ionic liquid · Hydrolytic activity · Stability-inhibition · Imidazolium-based ILs

Artigo aceito para publicação:

Cholinium-based ionic liquids effects on *Aspergillus niger* lipase: stabilizers or inhibitors



Biotechnology Progress

Cholinium-based ionic liquids effects on *Aspergillus niger* lipase: stabilizers or inhibitors

Journal:	Biotechnology Progress
Manuscript ID	BTPR-19-0021.R1
Wiley - Manuscript type:	Research Article
Date Submitted by the Author:	16-Apr-2019
Complete List of Authors:	Nascimento, Paloma; School of Pharmaceutical Sciences, São Paulo State University (UNESP), Department of Bioprocesses and Biotechnology Picheli, Flávio; Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Bioprocesses and Biotechnology Lopes, André Pereira, Jorge; Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Bioprocesses and Biotechnology Santos-Ebinuma, Valeria
Keywords:	Ionic Liquid, Lipase Interaction, Enzymatic activity, stability/inhibition, cholinium-based ILs

SCHOLARONE™
Manuscripts