

IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE CAL B EM XEROGEL OBTIDO PELA TÉCNICA SOL-GEL UTILIZANDO LÍQUIDO IÔNICO COMO ADITIVO

Immobilization of cal B lipase in xerogel obtained by sol-gel technique using ionic liquid as an additive

Katarine Lia Dorigon Levandoski¹; Aline Matuella Moreira Ficanha¹; Angela Antunes¹; Rogério Marcos Dallago¹ e Marcelo Luis Mignoni¹

¹ Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Departamento de Engenharia de Alimentos - Erechim-RS-Brasil - E-mail para contato: mignoni@uricer.edu.br

Data do recebimento: 30/04/15 - Data do aceite: 03/07/2015

RESUMO: O principal objetivo da imobilização de enzimas é obter um biocatalisador com atividade e estabilidade que não sejam afetadas ao final de um processo, em comparação a sua forma livre, além de facilitar sua reutilização, e conseqüentemente, torna-se um processo viável. Dentre as diferentes formas de imobilização, a técnica sol-gel destaca-se devido a possibilidade de imobilização “in situ”, controle da temperatura e pH na polimerização do suporte, além de permitir o uso de aditivos que atuam na proteção da enzima, aumentando a atividade e a estabilidade. Neste contexto, o objetivo do presente trabalho foi imobilizar a lipase comercial de *Candida antarctica* (CAL B) pela técnica sol-gel e estudar diferentes concentrações do líquido iônico brometo de 1-octil-3-metilimidazólio, utilizado como aditivo na imobilização. As maiores atividades de esterificação, na síntese de oleato de etila, foram nas menores concentrações de líquido iônico. A maior atividade de esterificação foi no xerogel contendo 1% de líquido iônico, na qual apresentou atividade de 520 U e rendimento de 620%. Os xerogéis obtidos apresentaram características de materiais mesoporosos e as amostras com o uso de enzima e líquido iônico mostraram a área específica e volume médio de poros menor que as amostras com enzima e sem líquido iônico.

Palavras-chave: Biocatálise. Esterificação. Rendimento de Imobilização.

ABSTRACT: The main objective of immobilization of enzymes is to obtain a biocatalyst with activity and stability that aren't affected at the end of a

process, compared to its free form, and facilitates reuse and consequently becomes a viable process. Among the different ways of immobilization, the sol-gel technique stands out because to the possibility of immobilization *in situ* control of temperature and pH on polymerization of support, in addition to allowing the use of additives which operate in enzyme protection, increasing activity and stability. In this context, the objective of this study was to immobilize the commercial lipase from *Candida antarctica* (CAL B) the sol-gel technique and study different concentrations of ionic liquid bromide 1-octyl-3-methyl imidazolium, used as an additive in immobilization. The highest esterification activities, the synthesis of ethyl oleate, were lower in ionic liquid concentrations. The higher esterification activity was the xerogel containing 1% ionic liquid, which showed activity of 520 U and 620% yield. The obtained xerogels had mesoporous characteristics and samples using enzyme and the ionic liquid showed specific area and high pore volume is smaller than the samples with enzyme and without ionic liquid.

Keyword: Biocatalysis. Esterification. Yield of immobilization.

Introdução

Melhorar a qualidade de vida é um dos princípios da sustentabilidade, contudo, o maior desafio dá-se na continuidade dos avanços em pesquisas, diminuindo, principalmente, os danos ao meio ambiente. A aplicação de enzimas como catalisadores exemplifica muito bem os avanços na área, que apesar das limitações na aplicação industrial, vem sendo cada vez mais estimulada, pois as vantagens do ponto de vista ambiental são bem maiores do que a dificuldade encontrada na biotransformação utilizando enzimas livres ou imobilizadas para catalisar as diversas reações de interesse industrial (SOUZA et al., 2013).

As lipases destacam-se entre as principais enzimas usadas em biocatálise, pois apresentam capacidade de catalisar reações tanto em meio aquoso como em meio orgânico, onde o teor de água é limitado. Além disso, o elevado potencial de aplicação das lipases é justificado pela sua capacidade de utilização de uma ampla gama de substratos, sua estabilidade frente à temperatura, pH e

solventes orgânicos e sua quimio, regio e enantiosseletividade (KAPOOR et al., 2012).

As potenciais aplicações industriais das lipases são demonstradas em diversos estudos de literatura. Em resumo, essas enzimas podem ser utilizadas na indústria de alimentos (KIM et al., 2006; ARAVINDAN et al., 2007; THAKUR et al., 2012), na indústria química (SILVA et al., 2008; CHAKRABORTY et al., 2010; PILISSÃO et al., 2012; BAI et al., 2013; MACARIO e GIORDANO, 2013), no tratamento de efluentes (CASTRO et al., 2004; MENDES et al., 2005; ROVEDA et al., 2010; DORS et al., 2013), na indústria têxtil (HASAN et al., 2006), na indústria farmacêutica (GHORAI et al., 2012), entre outras possíveis aplicações.

A imobilização de enzimas em suportes sólidos tem sido amplamente empregada para proteger e obter estabilidade da amostra enzimática durante o processo catalisado pela mesma. A imobilização tem como principal característica o uso de alguma estrutura física de confinamento, forçando a enzima a permanecer em uma região particular de um biorreator e apresentando vantagens como a

possibilidade de uso em processos contínuos, o aumento da estabilidade da enzima, redução do volume de reação, a regeneração e o reaproveitamento da enzima, e, consequentemente, a redução dos custos do processo (SOUZA, 2012).

Diferentes técnicas de imobilização são utilizadas para conservar a natureza catalítica do biocatalisador, dentre elas, destaca-se o método sol-gel baseado em métodos químicos e físicos, que consiste em proteger às biomoléculas em um volume definido e criar um único compartimento, representando um microambiente separado do ambiente externo (KATO et al., 2011). A imobilização da enzima no interior das matrizes produzidas pelo processo sol-gel é uma técnica vantajosa, pois reserva a atividade enzimática e evita a sua lixiviação (ALFAYA et al, 2002).

O uso de aditivos no processo de imobilização sol-gel é relatado na literatura como agentes que influenciam positivamente o aumento da atividade e da estabilidade de enzimas imobilizadas (HARA et al., 2010). Essa influência está diretamente associada à proteção da enzima contra a inativação durante a etapa de encapsulamento, à retenção da camada de água ao redor do biocatalisador e aos efeitos dispersantes das moléculas da enzima. Dentre os principais aditivos utilizados na imobilização de enzimas, destacam-se a albumina (SOARES et al., 2003), álcool polivinílico (FREITAS et al., 2009), polietilenoglicol (SOARES et al., 2006; PINHEIRO et al., 2008; FICANHA et al., 2015) e, recentemente, o uso de líquidos iônicos (ZARCULA et al., 2010; HARA et al., 2010; URSOIU et al 2012; BARBOSA et al., 2014).

Os líquidos iônicos são sais fundidos a baixas temperaturas e podem substituir solventes orgânicos voláteis, pois apresentam enorme potencial em aplicações como aditivo durante o processo de encapsulamento sol-gel

de enzimas (SOUZA 2012; SOUZA et al., 2013). O uso como aditivo tem sido sugerido, como o agente capaz de estabilizar enzimas, protegendo a camada de hidratação ao redor da enzima e/ou pela alteração conformacional ocasionando ativação permanente da enzima (HARA et al., 2010).

Neste sentido, o objetivo do presente trabalho foi imobilizar a lipase comercial de *Candida antarctica* (CAL B) pela técnica sol-gel e estudar diferentes concentrações do líquido iônico brometo de 1-octil-3-metilimidazólio, utilizado como aditivo na imobilização. Avaliou-se o comportamento da atividade de esterificação na síntese do oleato de etila e realizou-se caracterização dos xerogéis obtidos pela área específica e o volume médio dos poros.

Metodologia

Caracterização dos xerogéis

Os xerogéis foram caracterizados por difração de raios X (DRX) (Rigaku, Miniflex II, Ka- 1,58 Cu) e análise textural de adsorção/ dessorção de N₂ (Quantachrome, Nova 2200e). As áreas específicas dos xerogéis sintetizados foram determinadas com o uso do método BET (BRUNAUER et al., 1938). Os volumes médios dos poros foram calculados pelo método de BJH (RAMOS et al., 1998). Para a análise da área superficial, previamente, as amostras foram submetidas a um tratamento térmico a 60 °C com pressão reduzida, por 12 h. A análise foi realizada em temperatura constante de 77 K (-196 °C).

Imobilização da enzima lipase pela técnica de sol-gel

A lipase CAL B foi imobilizada com base na metodologia descrita por Ficanha et al (2015). Inicialmente, 5 mL de tetraetilortossilicato (TEOS) foram dissolvidos em 5 mL de

álcool etílico absoluto, obtendo-se a solução A. Posteriormente, foram adicionadas na solução A 3 gotas de iniciador de polimerização (HBr) juntamente com 1,6 mL de água destilada, obtendo-se a solução B, apresentando uma proporção molar de TEOS:H₂O de 1:4. Esta solução B ficou sob agitação (180 rpm) por 90 min, a temperatura constante de 40 °C. Em seguida, foram adicionados 1 mL de solução enzimática e o líquido iônico brometo de 1-octil-3-metilimidazólio (sintetizado por rota clássica de literatura) (HOLBREY e SEDDON, 1999) como aditivo, em diferentes concentrações, obtendo-se a solução C. Após, foram adicionados 1,75 mL da solução hidrolisante (solução etanólica de hidróxido de amônio 1,0 mol L⁻¹), obtendo-se a solução D. Esta solução final foi mantida em condições estáticas por 24 h para completar a condensação química. Após este período, a enzima imobilizada (derivado) foi condicionada em dessecador sob vácuo por mais 24 h para a completa secagem. O derivado obtido, então, foi caracterizado por difração de raios X e análise textural de adsorção/dessorção de N₂.

Determinação da atividade de esterificação

A atividade de esterificação da lipase imobilizada foi determinada pela capacidade de síntese do oleato de etila realizada através da reação do ácido oleico e etanol (razão molar 1:1). Esta reação foi iniciada pela adição da enzima imobilizada (0,1 g de suporte) ao meio reacional e a reação foi conduzida a 40 °C, 160 rpm e durante 40 min. A quantidade de ácido consumido foi determinada por titulação com NaOH 0,05 M até pH 11 (FERRAZ et al., 2012). Os ensaios dos brancos das amostras continham 500 µL da mistura padrão e 15 mL da solução de acetona-etanol. As análises foram realizadas em triplicata. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que consome

1 µmol de ácido graxo por minuto, calculada pela Equação 1:

$$AE = \frac{(V_b - V_a) \times M \times 1000 \times V_f}{t \times m \times V_c} \quad (1)$$

Onde: AE: Atividade de esterificação (U/g); Va: Volume de NaOH gasto na titulação da amostra retirada após 40 min (mL); Vb: Volume de NaOH gasto na titulação da amostra do branco (mL); M: Molaridade da solução de NaOH; Vf: Volume final de meio reacional (mL); t: Tempo (min); m: Massa da solução enzimática ou do suporte utilizado (g); Vc: Volume da alíquota do meio reacional retirada para titulação (mL).

Determinação do rendimento da imobilização

O rendimento do derivado imobilizado foi calculado a partir da Equação 2:

$$AE = \frac{AT}{AA} \times 100 \quad (2)$$

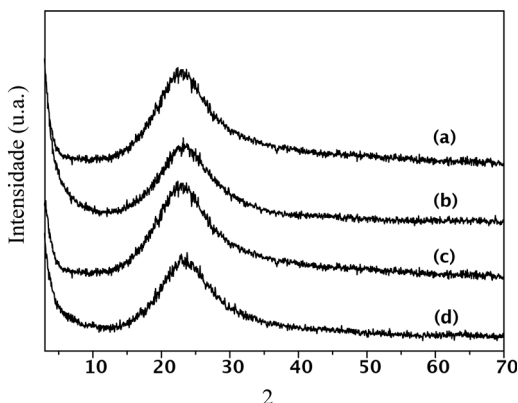
Onde: AT: Atividade de esterificação total do xerogel imobilizado; AA: Atividade de esterificação total presente na massa de enzima livre adicionada na imobilização.

Resultados e Discussão

Caracterização dos xerogéis sintetizados – Difração de raios X e Análise textural de adsorção/dessorção de N₂

Os difratogramas de raios X referentes aos xerogéis obtidos com e sem o uso de enzima e líquido iônico, são apresentados na Figura 1.

Figura 1- Difratomogramas de raios X das amostras (a) com enzima, sem líquido iônico; (b) sem enzima, sem líquido iônico; (c) com enzima, com líquido iônico; (d) sem enzima, com líquido iônico.



Na Figura 1 é possível verificar que todos os xerogéis sintetizados apresentaram a mesma particularidade, não apresentaram picos característicos de materiais cristalinos, e sim, halos na região compreendida entre 15-30° (2θ), o que os caracterizam como materiais sem ordenação cristalina, sendo então caracterizados como materiais amorfos.

As estruturas amorfas dos xerogéis obtidos sugerem que nas reações de hidrólise e condensação dos monômeros de silício, os iniciadores da reação de polimerização (HBr) atua como agentes de ligações cruzadas, conduzindo a formação da estrutura amorfa de SiO₂, na qual o reticulado tridimensional está se formando ao redor da enzima, característica esta que dificulta a reprodutibilidade da síntese, como descreve a literatura (HENCH e WEST, 1990).

Os resultados das análises texturais de adsorção/dessorção de N₂ realizadas para os diferentes xerogéis, obtidos com e sem o uso do líquido iônico, estão apresentados na Figura 2.

Pode-se observar, na Figura 2, que para todas as amostras a isoterma representa a de tipo II. As isotermas do tipo II são características de adsorventes não porosos ou macroporosos, com histerese tipo H4 que não exibem

qualquer adsorção limitante em altas pressões relativas. Esta é uma evidência clara de que os adsorventes não possuem estruturas bem definidas (GUAN-SAJONZ et al., 1997).

Os resultados referentes à análise textural dos xerogéis, obtidos como o volume médio dos poros e a área específica são apresentados na Tabela I.

Figura 2- Análise textural de adsorção/dessorção de N₂ para as amostras (a) com enzima, sem líquido iônico; (b) sem enzima, sem líquido iônico; (c) com enzima, com líquido iônico; (d) sem enzima, com líquido iônico.

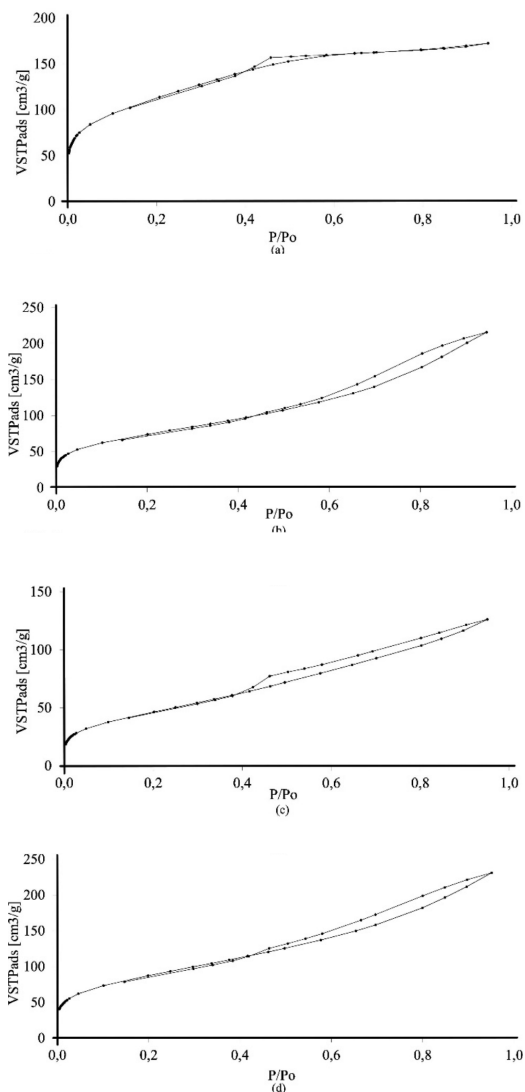


Tabela I - Características dos xerogéis com e sem o uso de enzima e LI

Amostras	Volume médio dos poros (cm ³ STP g ⁻¹)	Área específica (m ² g ⁻¹)
Com enzima e sem líquido iônico	92,46	402
Sem enzima e sem líquido iônico	61,23	266
Com enzima e com líquido iônico	38,94	169
Sem enzima e com líquido iônico	72,28	315

Observa-se na Tabela I que o maior valor para volume médio de poro e para a área específica é para a amostra com enzima e sem líquido iônico. Por outro lado, o menor volume e área específica são observados nas amostras com enzima e com líquido iônico. Desta forma, o uso de aditivo reduz tanto a área específica, quanto o volume médio dos poros provando que há a presença do par enzima-líquido iônico confinados no interior do suporte. Tendências similares são descritas na literatura. (HARA et al., 2008; SOUZA et al., 2010; SOUZA et al., 2012; FICANHA et al., 2015).

Rendimento de imobilização

A Tabela II apresenta os resultados da atividade de esterificação, obtidos após a imobilização em xerogel com e sem a presença da lipase de *Candida antarctica* B (CAL B) e do líquido iônico.

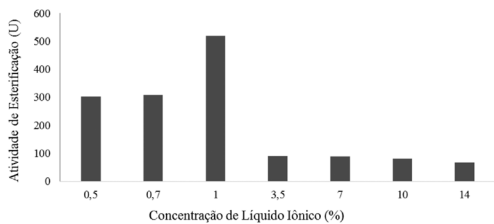
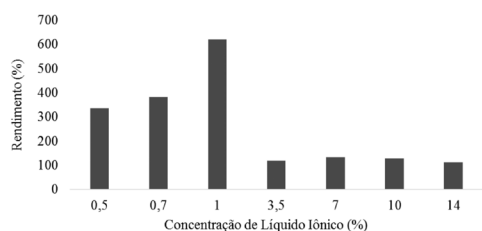
De acordo com a Tabela II, os xerogéis sem enzima, e, sem ou com o líquido iônico não possuem poder de catalisar a reação. Este fato prova que somente a enzima suportada atua como catalisador. Os derivados imobilizados apresentaram rendimento maior que

100 %, o que indica que a enzima não sofreu desnaturação, após a imobilização, e ocorreu um aumento no rendimento e na atividade enzimática, quando adicionado o LI como aditivo, que representa uma melhor distribuição da enzima com o uso do aditivo. Para avaliar o efeito da concentração do líquido iônico como aditivo outros testes foram realizados. As Figuras 3 e 4 apresentam a atividade de esterificação e o rendimento, respectivamente, obtidos pela imobilização da lipase *Candida antarctica* B (CAL B) com o uso de diferentes concentrações de líquido iônico como aditivo.

Pode-se observar, na Figura 3, que as melhores atividades de 302, 308 e 520 U nas amostras com 0,5, 0,7 e 1% de concentração de LI, respectivamente, indicam que boas atividades podem ser observadas quando se utiliza menores concentrações de líquido iônico como aditivo e a melhor atividade de esterificação encontrada foi na concentração de 1% de líquido iônico. É possível observar, também, que em concentrações maiores compreendidas entre 3,5 e 14 % a atividade praticamente permaneceu constante, em torno de 100 U, indicando que o líquido iônico afeta a atividade da enzima, devido suas propriedades e seu pH.

Tabela II - Resultados da atividade de esterificação com e sem a presença da lipase de *Candida antarctica* B (CAL B) e do líquido iônico.

Xerogel	Atividade±desvio padrão (U/g)	Rendimento (%)
Com enzima e sem L.I.	142,71 ± 27,47	182,81
Com enzima e com L.I.	240,92 ± 33,12	246,24
Sem enzima e com L.I.	0,00	0,00
Sem enzima e sem L.I.	0,00	0,00

Figura 3 - Atividade de esterificação em diferentes concentrações de líquido iônico**Figura 4** - Rendimento de imobilização em diferentes concentrações de líquido iônico

É possível verificar, na Figura 4, que o mesmo comportamento observado em relação à concentração do líquido iônico, é obtido para o rendimento de imobilização. Os maiores rendimentos de imobilização, 330, 380 e 620 % foram obtidos nos ensaios com menores valores de concentrações de líquido iônico, 0,5, 0,7, e 1% respectivamente. Sendo possível determinar que a concentração de melhor rendimento foi igual a 1%. Em todos os ensaios, os rendimentos foram maiores que 100%, indicando que, além de proteger a enzima contra a inativação no processo de formação do sol-gel, o líquido iônico proporciona um aumento na atividade de esterificação e no rendimento em até 5 vezes.

Ficanha (2014) obteve um rendimento de 294,75% com a adição do polietilenoglicol (PEG) no processo de imobilização sol-gel, provando, assim, que a presença do líquido iônico como aditivo na imobilização pode atuar de maneira favorável ao processo, fazendo com que rendimentos superiores sejam obtidos comparados com os outros aditivos descritos na literatura. Durante o processo de imobilização ou síntese do suporte, possivelmente, o aditivo pode estar modificando a hidrofobicidade do microambiente, exercendo influência no nível de umidade dentro do suporte proporcionando melhores resultados (MOHIDEM et al., 2011).

Conclusões

Os resultados obtidos no estudo do uso de diferentes concentrações de líquidos iônicos, na imobilização da lipase CAL B em xerogel, demonstram a importância do estudo e os efeitos destes fatores no aumento da atividade e do rendimento da imobilização. As maiores atividades foram encontradas nas menores concentrações estudadas, e a maior atividade (520 U) foi na concentração de 1 % de líquido iônico. A atividade de esterificação variou nas menores concentrações de LI de 300 a 520 U e o rendimento de imobilização de 330 a 620 %. Isto demonstra que o LI apresenta efeito positivo na imobilização quando utilizado em baixas concentrações. A melhor concentração encontrada, neste estudo, foi de 1 % na qual apresentou atividade de 520 U e rendimento de 620 %.

REFERÊNCIAS

- ALFAYA, A.; KUBOTA, L. T. A. Utilização de materiais obtidos pelo processo de sol-gel na construção de biossensores. **Química Nova**, v. 25, p. 935-941, 2002.
- ARAVINDAN, R.; ANBUMATHI, P.; VIRUTHAGIRI, T. Lipase applications in food industry. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 6, p. 141-158, 2007.
- BAI, S.; AZIZ, S.; KHODADADI, M.; MITRI, C. B.; ST-LOUIS, R.; KERMASHA, S. Lipase-catalyzed synthesis of medium-long-medium type structured lipids using tricaprylin and trilinolenin as substrate models. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 90, p. 377-389, 2013.
- BARBOSA, A. DOS S.; SILVA, M. A. DE O.; CARVALHO, N. B.; MATTEDI, S.; IGLESIAS, M. A.; FRICKS, A. T.; LIMA, A. S.; FRANCESCHI, E.; SOARES, C. M. F. Immobilization of lipase by encapsulation in silica aerogel. **Química Nova**, v. 37, p. 969-976, 2014.
- BRUNAUER, S.; EMMET, T. P. H.; TELLER, E. Adsorption of gases in multimolecular layers. **Journal of the American Chemical Society**, v. 60, p. 309-319, 1938.
- CASTRO, H. F.; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. **Química Nova**, v. 27, n. 1, p. 146-156, 2004.
- CHAKRABORTY, K.; VIJAYAGOPAL, P.; CHAKRABORTY, R. D.; VIJAYAN, K. K. Preparation of eicosapentaenoic acid concentrates from sardine oil by *Bacillus circulans* lipase. **Food Chemistry**, v. 120, p. 433-442, 2010.
- DORS, G.; MENDES, A. A.; PEREIRA, E. B.; CASTRO, H. F.; FURIGO JR., A. Simultaneous enzymatic hydrolysis and anaerobic biodegradation of lipid-rich wastewater from poultry industry. **Applied Water Science**, v. 3, p. 343-349, 2013.
- FERRAZ, L. R.; OLIVEIRA, D. S.; SILVA, M. F.; RIGO, E.; DI LUCCIO, M.; OLIVEIRA, J. V.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H. Production and partial characterization of multifunctional lipases by *Sporobolomyces ruberrimus* using soybean meal, rice meal and sugarcane bagasse as substrates. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 1, p. 243-252, 2012.
- FICANHA, A. M. M. **Imobilização de lipase de *Candida antarctica* B (CAL B) pela técnica de sol-gel**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões- URI, Erechim, Brasil, 2014.
- FICANHA, A. M. M.; NYARI, N. L.D.; LEVANDOSKI, K.; MIGNONI, M. L.; DALLAGO, R. M.; Estudo da imobilização de lipase em sílica obtida pela técnica sol-gel. **Química Nova**, v.38, p. 364-369, 2015.
- FREITAS, L.; DA RÓS, P. C. M.; SANTOS, J. C.; DE CASTRO, H. F. An integrated approach to produce biodiesel and monoglycerides by enzymatic interestification of babassu oil (*Orbinya* sp). **Process Biochemistry**, v. 44, p. 1068-1074, 2009.
- GHORAI, M. K.; SHUKLA, D.; BHATTACHARYYA, A. Syntheses of chiral β - and γ -amino ethers, morpholines, and their homologues via nucleophilic ring-opening of chiral activated aziridines and azetidines. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 77, p. 3740-3753, 2012.
- GUAN-SAJONZ, H., GUIOCHON, G., DAVIS, E., GULAKOWSKI, K., SMITH, D.W., Study of the physico-chemical properties of some packing materials. III. Pore size and surface area distribution. **Journal of Chromatography A**, v. 773, p. 33-51, 1997.
- HARA, P.; MIKKOLA, J. P.; MURZIN, D. Y.; KANERVA, L. T. Supported ionic liquids in

- Burkholderia cepacia* lipase-catalyzed asymmetric acylation. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 67, p. 129-134, 2010.
- HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 235-251, 2006.
- HENCH, L. L.; WEST, J. K. The Sol-Gel Process. **Chemical. Reviews**, p. 33-72.1990.
- HIRATSUKA, R. S.; SANTILLI, C. V.; PULCINELLI, S. H. O Processo Sol-Gel: uma visão físico-química. **Química Nova**, v. 18, n. 2, p. 171-180, 1995.
- HOLBREY, J. D.; SEDDON, K. R The phase behaviour of 1-alkyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborates; ionic liquids and ionic liquid crystals. **Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions**, v.13, p.2133-2140, 1999.
- KAPOOR, M; GUPTA, M. N. Obtaining monoglycerides by esterification of glycerol with palmitic acid using some high activity preparations of *Candida antarctica* lipase B. **Process Biochemistry**, v. 47, p. 503-508, 2012.
- KATO, K.; NAKAGAKI, S.; NISHIDA, M.; HIRAO, K. Enzyme encapsulation in silica particles prepared using enzyme-assisted sol-gel reactions in ionic liquids. **Journal of the Ceramic Society of Japan**, v. 119, p. 140-143, 2011.
- KIM, H. J.; YOUN, S. H.; SHIN, C. S. Lipase-catalyzed synthesis of sorbitol-fatty acid esters at extremely high substrate concentrations. **Journal of Biotechnology**, v. 123, P. 174-184, 2006.
- MACARIO, A.; GIORDANO, G. Catalytic conversion of renewable sources for biodiesel production: a comparison between biocatalysts and inorganic. **Catalysis Letters**, v. 143, p. 159-168, 2013.
- MENDES, A. A; CASTRO, H. F. Aplicação de lipases no tratamento de águas residuárias com elevados teores de lipídeos. **Química Nova**, v. 28, n. 2, p. 296-305, 2005.
- MOHIDEM N. A.; MAT H. B. Catalytic activity and stability of laccase entrapped in sol-gel silica with additives. **The Journal of Sol-Gel Science and Technology**, v. 61, p. 96-103, 2011.
- PILISSÃO, C.; CARVALHO, P. O.; NASCIMENTO, M. G. The influence of conventional heating and microwave irradiation on the resolution of (RS)-*sec*-butylamine catalyzed by free or immobilized lipases. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, p. 1688-1697, 2012.
- PINHEIRO, R. C.; SOARES, C. M. F.; DE CASTRO, H. F.; MORAES, F. F.; ZANIN, G. M. Response surface methodology as an approach to determine optimal activities of lipase entrapped in sol-gel matrix using different vegetable oils. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v, 146, p. 203-214, 2008.
- RAMOS, M. A.; GIL, M. H.; SCHACHT, E.; MATTHYS, G.; MONDELAERS, W.; FIGUEIREDO, M. M. Physical and chemical characterisation of some silicas and silica derivatives. **Powder Technology**, v. 99, p. 79-85, 1998.
- ROVEDA, M; HEMKEMEIER, M; COLLA, L. M. Avaliação da produção de lipases por diferentes cepas de microrganismos isolados em eluentes de laticínios por fermentação submersa. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, p. 126-131, 2010.
- SILVA, V. C. F.; CONTESINI, F. J.; CARVALHO, P. O. Characterization and catalytic activity of free and immobilized lipase from *Aspergillus niger*: a comparative study. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 19, p. 1468-1474, 2008.
- SOARES, C. M. F.; SANTANA, M. H. A.; ZANIN, G. M.; CASTRO, H. F. DE; Efeito do polietilenoglicol e da albumina na imobilização de lipase microbiana e na catálise em meio orgânico. **Química Nova**, v. 26, p. 832-838, 2003.

- SOARES, C. M. F.; SANTOS, O. A.; CASTRO, H. F.; MORAES, F. F.; ZANIN, G. M. Characterization of sol-gel encapsulated lipase using tetraethoxysilane as precursor. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 39, p.69-76, 2006.
- SOUZA, R. L. **Emprego de aditivos na imobilização sol-gel de lipases**. 2012, 111 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos). Universidade Tiradentes- UNIT, Aracaju, 2012.
- SOUZA, R. L.; BARBOSA, J. M. P.; ZANIN, G. M.; LOBÃO, M. W. N.; SOARES, C. M. F., LIMA, A. S. Partitioning of porcine pancreatic lipase in a two-phase systems of polyethylene glycol/potassium phosphate aqueous. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 161, p. 228-300, 2010.
- SOUZA, R. L.; FARIA, E. L. P.; FIGUEIREDO, R. T.; FREITAS, L. S.; IGLESIAS, M.; MATTEDI, S.; ZANIN, G. M.; SANTOS, O. A. A.; COUTINHO, J. A. P.; LIMA, A. S.; SOARES, C. M. F. Protic ionic liquid as additive on lipase immobilization using silica sol-gel. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 52, p. 141-150, 2013.
- SOUZA, R. L.; RESENDE, W. C.; BARÃO, C. E.; ZANIN, G. M.; CASTRO, H. F. DE; SANTOS, O. A. A.; FRICKS, A. T.; FIGUEIREDO, R. T.; LIMA, A. S.; SOARES, C. M. F. Influence of the use of Aliquat 336 in the immobilization procedure in sol-gel of lipase from *Bacillus* sp. ITP-001. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 84, p.152-159, 2012.
- THAKUR, A.; KUMAR, A.; KANWAR, S. S. Production of n-propyl cinnamate (musty vine amber flavor) by lipase catalysis in a non-aqueous medium. **Current Biotechnology**, v. 1, p. 234-240, 2012.
- URSOIU, A.; PAUL, C.; KURTÁN, T.; PÉTER, F. Sol-gel entrapped *Candida antarctica* lipase B- A Biocatalyst with excellent stability for kinetic resolution of secondary alcohols. *Molecules*, v. 17, p. 13045-13061, 2012.
- ZARCULA, C.; CORÍCI, L.; CROITORU, R.; URIOIU, A.; PETER, F. Preparation and properties of xerogels obtained by ionic liquid incorporation during the immobilization of lipase by the sol-gel method. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 65, p. 79-86, 2010.