UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

ISABELY FERNANDA PIZARRO

**Imobilização da lipase de *Geotrichum candidum* em casca de ovo
em pó e aplicação para reação de esterificação assistida por
ultrassom**

Pirassununga - SP
Março - 2020

ISABELY FERNANDA PIZARRO

**Imobilização da lipase de *Geotrichum candidum* em casca de ovo
em pó e aplicação para reação de esterificação assistida por
ultrassom**

Versão corrigida

Dissertação apresentada à
Faculdade de Zootecnia e
Engenharia de Alimentos da
Universidade de São Paulo, como
parte dos requisitos para obtenção
do título de Mestre em Engenharia
de Alimentos

Área de Concentração: Ciência da
Engenharia de Alimentos

Orientador:
Prof. Dra. Eliana Setsuko Kamimura

Pirassununga - SP
Março - 2020

Ficha catalográfica elaborada pelo
Serviço de Biblioteca e Informação, FZEA/USP, com
os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

P695i Pizarro, Isabely Fernanda
Imobilização da lipase de *Geotrichum candidum*
em casca de ovo em pó e aplicação para reação de
esterificação assistida por ultrassom / Isabely
Fernanda Pizarro ; orientadora Eliana Setsuko
Kamimura. -- Pirassununga, 2020.
79 f.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-
Graduação em Engenharia de Alimentos) --
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos,
Universidade
de São Paulo.

1. Biotecnologia. 2. Fermentação. 3. Produção
de lipase 4. *Geotrichum candidum* I. Kamimura

Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte - o autor

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, prof(a) Dra. Eliana Setsuko Kamimura, por sua dedicação, incentivo e amizade e, também, por ser peça fundamental para minha formação acadêmica.

Ao prof. Dr. Rafael Resende Maldonado pelo apoio e realização deste trabalho.

À técnica do laboratório de Bioprocessos, Dra. Marina Vieira de Carvalho pela ajuda na condução dos experimentos.

À minha família, por estarem sempre presentes na minha trajetória apoiando no meu crescimento pessoal e profissional.

Ao meu noivo, Carlos, pelo amor, carinho e pelas conversas. Por sempre estar ao meu lado incentivando a alcançar meus sonhos.

À minha segunda família, da república Viracopos, que desde minha graduação me acompanham e me apoiam e que, apesar da distância, sempre estão presentes de alguma forma.

À CAPES pelo auxílio financeiro para realização desta pesquisa.

“Lembre-se que as pessoas podem tirar tudo de você, menos o seu conhecimento.”

Albert Einstein

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis”

José de Alencar

RESUMO

PIZARRO, I. F. **Imobilização da lipase de *Geotrichum candidum* em casca de ovo em pó e aplicação para reação de esterificação assistida por ultrassom.** 2020. 75f. Dissertação – (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

Lipases (glicerol éster hidrolases, E.C. 3.1.1.3) compreendem um grupo de enzimas hidrolíticas. Sabe-se que a lipase age na interface óleo-água e, por essa razão, a área interfacial livre total é um grande requisito de aumentar o rendimento de diferentes reações. Em termos comerciais, as enzimas imobilizadas são preferidas em relação às enzimas livres por apresentarem maior estabilidade, especificidade, atividade e por possibilitar a reutilização do biocatalisador. Dentre os métodos para imobilização, estão a encapsulação, podendo ser na matriz ou na membrana ou ligação, por adsorção ou ligação covalente. Um material utilizado como matriz no processo de imobilização é a casca de ovo de galinha. Essa matriz é considerada um resíduo inerte de menor custo e de fácil acesso, além de agregar valor quando utilizada no processo. Um mecanismo interessante que pode ser usado para acelerar as taxas iniciais de muitas reações químicas é a utilização do ultrassom. Essa técnica tem mostrado resultados favoráveis na melhora do desempenho de diferentes enzimas, como também, é considerada uma “química verde”, por causa da sua eficiência, necessidade de pouca instrumentação, redução do tempo do processo versus técnicas convencionais tornando o processo economicamente viável. Neste contexto, esta dissertação teve como objetivo produzir lipase de *Geotrichum candidum* por fermentação utilizando subprodutos da indústria de alimentos (torta de milho e água de maceração de milho), realizar a imobilização da lipase em casca de ovo em pó e, por fim, comparar a atividade da lipase livre e imobilizada para verificar o rendimento da esterificação enzimática com aplicação da técnica de ultrassom. LL é definida como lipase livre liofilizada e LIC é a lipase imobilizada em casca de ovo em pó. Para verificar a porcentagem de adsorção de lipase em casca de ovo, foi feito um delineamento fatorial 2^3 com as variáveis independentes pH da solução tampão fosfato (6 e 8), concentração da enzima (200 e 400 U/g) e temperatura (27 °C e 37°C). LL e LIC foram conduzidas em banho de ultrassom, 40 kHz, 132 W a 36° C, de 0 a 55 min, fez o acompanhamento da

atividade enzimática e foi obtida a melhor condição para reação de esterificação: proporção molar 1:3 de ácido oléico e álcool metílico, 7,5 U/g de lipase liofilizada, 50° C no agitador orbital por 1h, 200 rpm. LL apresentou 1875 U/g de atividade e a melhor condição da LIC foi: pH 8, 400 U/g de lipase e 27°C resultando em 107% de adsorção. LL e LIC aumentaram sua atividade enzimática em 5 minutos de banho de ultrassom obtendo um ganho de 14,29% e 56,47% em relação ao início. Os resultados foram promissores demonstrando eficiência na imobilização da lipase em casca de ovo em pó para aplicação no banho de ultrassom, como também, na reação de esterificação.

Palavras-chave: fermentação semi-sólida, resíduo agroindustrial, lipase ácido graxo específica, torta de milho, encapsulação

ABSTRACT

PIZARRO, I. F. **Immobilization of *Geotrichum candidum* lipase in eggshell powder and application for ultrasound-assisted esterification reaction.**2020.75f. M. Sc. Dissertation – (MSc in Food Engineering) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

Lipases (glycerol ester hydrolases, E.C. 3.1.1.3) comprise a group of hydrolytic enzymes. It is known that lipase acts at the oil-water interface and, for this reason, the total free interfacial area is a major requirement to increase the yield of different reactions. In commercial terms, immobilized enzymes are preferred over free enzymes because they have greater stability, specificity, activity and allow the reuse of the biocatalyst. Among the methods for immobilization, are encapsulation, which can be in the matrix or in the membrane or bond, by adsorption or covalent bond. A material used as a matrix in the immobilization process is chicken egg shell. This matrix is considered to be an inert residue of lower cost and easy access, in addition to adding value when used in the process. An interesting mechanism that can be used to accelerate the initial rates of many chemical reactions is the use of ultrasound. This technique has shown favorable results in improving the performance of different enzymes, as well as, it is considered a “green chemistry”, because of its efficiency, the need for little instrumentation, reduction of the process time versus conventional techniques making the process economically viable. In this context, this dissertation aimed to produce *Geotrichum candidum* lipase by fermentation using by-products from the food industry (corn steep liquor and corn cake), to perform the immobilization of the lipase in powdered eggshell and, finally, to compare the activity of free and immobilized lipase to verify the performance of enzymatic esterification with the application of the ultrasound technique. LL is defined as lyophilized free lipase and LIC is the lipase immobilized in powdered eggshell. To verify the percentage of lipase adsorption in eggshell, a factorial design 2³ was carried out with the independent variables pH of the phosphate buffer solution (6 and 8), enzyme concentration (200 and 400 U/g) and temperature (27 °C and 37°C). LL and LIC were carried out in an ultrasound bath, 40 kHz, 132 W at 36° C, from 0 to 55 min, followed the enzymatic activity and the best condition for the esterification reaction was

obtained: 1: 3 molar ratio of oleic acid and methyl alcohol, 7.5 U/g of lyophilized lipase, 50° C in the orbital shaker for 1h, 200 rpm. LL showed 1875 U/g of activity and the best condition of the LIC was: pH 8, 400 U/g of lipase and 27°C resulting in 107% adsorption. LL and LIC increased their enzyme activity in 5 minutes of ultrasound bath obtaining a gain of 14.29% and 56.47% in relation to the beginning. The results were promising, showing efficiency in the immobilization of lipase in eggshell powder for application in the ultrasound bath, as well as in the esterification reaction.

Keywords: semi-solid fermentation, agroindustry residues, specific fatty acid lipase, corn cake, encapsulation

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Reações catalisadas por lipase.....	18
Figura 2 - Principais aplicações de lipase na indústria.....	19
Figura 3 - Reação de transesterificação de triglicerídeos.....	31
Figura 4 - <i>Slant</i> de <i>Geotrichum candidum</i>	47
Figura 5 – (a) Placa de <i>Geotrichum candidum</i> (b) Caldo bruto após fermentação...	47
Figura 6 - Aparato utilizado na precipitação de lipase de <i>Geotrichum candidum</i> com álcool etílico a 70% de saturação.....	49
Figura 7 – (a) Álcool e extrato protéico contendo lipase precipitada no fundo do béquer de 5 litros, (b) Massa do extrato protéico contendo lipase após a separação do álcool (c) Massa do extrato protéico contendo lipase após lavagem em solução tampão fosfato 0,1 M, a pH 7, (d) Extrato protéico contendo lipase liofilizada.	50
Figura 8 – (a) Casca de ovo após secagem, (b) Peneiras com granulometria entre 16 a 36 mesh para a formação do pó, (c) Casca de ovo após o processo de imobilização por adsorção do extrato protéico contendo a lipase.	53
Figura 10 - Diagrama de Pareto para efeito principal da temperatura, pH e concentração de lipase e suas interações na adsorção de lipase de <i>Geotrichum candidum</i> na casca de ovo em pó.	56
Figura 11 - Fatorial 2 ³ - rendimento da adsorção de lipase de <i>Geotrichum candidum</i> em casca de ovo em pó. a) pH x Lipase; b) pH x Temperatura; c) Lipase x Temperatura; (1) Superfície de resposta; (2) Curva de contorno.	59
Figura 12 - Microscopia eletrônica de varredura (MEV) da superfície interna da casca do ovo.....	61
Figura 13- Microscopia eletrônica de varredura (MEV) do extrato protéico contendo a lipase de <i>Geotrichum candidum</i> liofilizada.	62
Figura 14 - Microscopia eletrônica de varredura (MEV) do extrato protéico contendo a lipase de <i>Geotrichum candidum</i> adsorvida na superfície da casca do ovo.	62
Figura 15 - Reutilização do extrato protéico contendo a lipase de <i>Geotrichum candidum</i> imobilizada em casca de ovo em pó.	63
Figura 17 - Atividade relativa (%) da lipase livre (LL) e lipase imobilizada em casca (LIC) em banho de ultrassom de 0 a 55 minutos, 40 kHz e 132 W.	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principais matrizes utilizadas na imobilização de enzimas.	23
Tabela 2 - Composição química da casca de ovo não calcinado.	24
Tabela 3 - Imobilização de lipase de bactéria (continua).	26
Tabela 4 - Imobilização de lipase de bolores (continua).	28
Tabela 5 - Imobilização de lipase de leveduras.	30
Tabela 6 - Lipase microbiana, comercial ou não, empregando o uso da técnica de ultrassom (continua).	34
Tabela 7 - Delineamento fatorial 2^3 para imobilização da lipase de <i>Geotrichum candidum</i> em casca de ovo em pó.	43
Tabela 8 - Atividade enzimática (U/g) dos lotes de caldo bruto após 48h de fermentação.	48
Tabela 9 – Fator de recuperação e fator de concentração relacionando etapas do processo de obtenção do extrato protéico contendo a lipase.	51
Tabela 10 – Comparação entre os fatores de concentração (FC) e de recuperação (FR) deste estudo com estudo de Maldonado et al. (2015).	52
Tabela 11 - Rendimento de adsorção de lipase de <i>Geotrichum candidum</i> em cascas de ovo em pó.	54
Tabela 12 - Efeitos principais e de interação na adsorção de lipase de <i>Geotrichum candidum</i> na casca de ovo em pó.	55
Tabela 13 - Coeficientes de regressão do fatorial 2^3 para avaliação do rendimento da adsorção da lipase de <i>Geotrichum candidum</i> na casca de ovo.	57
Tabela 14 - Análise de variância (ANOVA) para adsorção de lipase de <i>Geotrichum candidum</i> em casca de ovo em pó.	58
Tabela 15 - Valores de rendimento de adsorção de lipase de <i>Geotrichum candidum</i> em casca de ovo, previstas pelo modelo e erro relativo para o fatorial 2^3	60
Tabela 16 - Valores das quadruplicatas para cada tipo de tratamento da lipase com e sem aplicação do banho de ultrassom (5 min) com frequência de 40 kHz, a 36° C o rendimento do éster produzido (%). Lipase livre (LL), lipase imobilizada em casca de ovo em pó (LIC) e somente a casca de ovo.	67

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1. Lipase	18
2.2. Lipase de <i>Geotrichum candidum</i>	20
2.3. Imobilização	21
2.4. Aplicações para síntese de biodiesel e bioaromas	30
2.5. Banho de ultrassom	32
3. OBJETIVO	38
3.1. Objetivo Geral	38
3.2. Objetivos Específicos	38
4. MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1. Produção de lipase	39
4.2. Atividade enzimática da lipase de <i>Geotrichum candidum</i>	39
4.3. Pré-purificação da lipase	40
4.4. Imobilização da lipase de <i>Geotrichum candidum</i>	42
4.4.1. Lipase livre (LL)	42
4.4.2. Adsorção da lipase em casca de ovo em pó (LIC)	42
4.5. Banho de ultrassom	44
4.5.1. Efeito da sonicação na lipase de <i>Geotrichum candidum</i>	44
4.6. Reação de esterificação	45
4.7. Análise estatística	46
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5.1. Preparação do inóculo de <i>Geotrichum candidum</i> e produção de lipase por fermentação	47
5.2. Pré-purificação do extrato protéico contendo a lipase	48
5.3. Imobilização enzimática por adsorção	52
5.3.1. Imobilização em casca de ovo em pó	52
5.3.2. Reutilização da lipase imobilizada em casca de ovo em pó	63
5.4. Comportamento do extrato protéico contendo a lipase livre (LL) e lipase imobilizada em casca de ovo em pó (LIC)	64
5.5. Aplicação do extrato protéico contendo a lipase livre (LL) e lipase imobilizada em casca de ovo em pó (LIC) na reação de esterificação com e sem ultrassom	66
6. CONCLUSÃO	69

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	70
REFERÊNCIAS.....	71

1. INTRODUÇÃO

As enzimas são catalisadores que, nas condições moderadas de temperatura, pH e pressão das células, realizam reações químicas a uma taxa bastante superior aos catalisadores químico convencionais, que geralmente são utilizados em condições extremas de reação (BLANCO, 2017). Tais biocatalisadores são caracterizados por uma eficiência e especificidade considerável (PALMER; BONNER, 2008).

A inovação em aplicações de enzimas industriais revolucionou a indústria biotecnológica e proporcionou uma oportunidade para reduzir os custos de produção e fabricação. A tecnologia enzimática é o uso de enzimas isoladas e purificadas, como catalisadores em vários processos industriais. Os processos de purificação englobam uma variedade de técnicas químicas, mecânicas e térmicas, tais como concentração, precipitação, extração, centrifugação, filtração e cromatografia (BCC Research, 2017).

Os processos enzimáticos se tornaram melhores alternativas ecológicas e financeiras aos processos químicos, devido à natureza biodegradável das enzimas e sua relação custo-benefício (BCC Research, 2017). Os biocatalisadores são considerados sustentáveis, visto que o uso de resíduos industriais como matérias-primas combinados com a aplicação de enzima em várias reações tem sido o objetivos de muitas pesquisas para obter um produto de alto valor agregado, provocando menos poluição e danos ambientais (SOUZA et al., 2018).

Segundo a BCC Research (2017), o mercado global de enzimas industriais atingiu quase US \$ 4,6 bilhões e US \$ 4,9 bilhões em 2014 e 2015, respectivamente. Este mercado deverá aumentar de quase US \$ 5,0 bilhões em 2016 para US \$ 6,3 bilhões em 2021, a uma taxa de crescimento anual composta (CAGR) de 4,7% para 2016-2021. As enzimas mais utilizadas no setor industrial são as proteases, com cerca de 40% do mercado de enzimas, seguindo de carboidrases e lipases (Sharma et al., 2001).

A lipase ou glicerol éster hidrolase são enzimas largamente distribuídas no ambiente, podendo ser de origem animal, vegetal e microbiana. São responsáveis pela hidrólise de óleos e gorduras (triacilgliceróis) e, em alguns casos, digliceróis e monogliceróis (JAVED et al., 2018; PAQUES; ALVES MACEDO, 2006). A lipase é

classificada como regiosseletivas, podendo ser divididas em: lipases não-específicas, lipases 1,3-específicas e lipase ácido graxo específica. As não-específicas tem como função hidrolisar ésteres de ácidos graxos primários ou secundários, liberando ácidos graxos na posição 1(3) ou 2. Por outro lado, as 1,3-específicas hidrolisam apenas ésteres de ácidos graxos primários, isto é, na posição 1 ou 3 (PAQUES; ALVES MACEDO, 2006). A lipase ácido graxo específica é a enzima produzida pelo fungo *Geotrichum candidum* (ESKIN, 1990; MALDONADO et al., 2016).

O *Geotrichum sp.* pode ser obtido de diferentes fontes naturais e seu cultivo ocorre nas mais variáveis condições de requisitos nutricionais, parâmetros de crescimento e condições do inóculo (MALDONADO, 2016). Para que a lipase de *Geotrichum candidum* seja produzida de forma eficiente, é necessário que o meio de fermentação contenha fontes de carbono, nitrogênio e vitaminas essenciais para o metabolismo do micro-organismo (MORAIS et al., 2016).

Contudo, para a aplicação em escala industrial, é vantajoso que a lipase esteja imobilizada. Essa estratégia minimiza o alto custo, pois permite que seja separada facilmente no final do processo ou até mesmo reutilizada. Além disso, a imobilização de enzima tem melhorado suas propriedades como, por exemplo, a estabilidade, atividade, redução da inibição por produtos da reação, seletividade e especificidade com respeito a substratos não naturais (FERREIRA, 2018).

Outra técnica ecologicamente correta que vem sendo pesquisada e tem atraído a atenção de maneira ampla é o uso do ultrassom. O ultrassom surgiu como opção simples de otimização de processos enzimáticos, no qual permite a estabilização do biocatalisador na presença de solventes orgânicos (TOMKE et al., 2017), quando expostos a um curto período de tempo (WANG et al., 2012). É considerada também uma tecnologia de alto desempenho e custo baixo (MULINARI et al., 2017).

A função das ondas ultrassônicas é aumentar as taxas de transferência de calor e massa na reação, e propiciar um aumento nas atividades enzimáticas e/ou reduzir o tempo de reação (MULINARI et al., 2017).

Levando estes aspectos em consideração, esta pesquisa pretende produzir lipase por fermentação utilizando resíduos da agroindústria do processamento de milho como a torta de milho, realizar a imobilização da lipase utilizando casca de ovo

em pó, como também testá-las em banho de ultrassom de forma livre e imobilizada para aplicação na reação de esterificação.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Lipase

Um grupo de enzimas que estão presentes abundantemente na natureza são as lipases (triacilglicerol acil hidrolases EC 3.1.1.3). Elas têm como função catalisar a hidrólise total ou parcial de triglicerídeos em diglicerídeos, monoglicerídeos, glicerol e ácidos graxos livres (FERREIRA et al., 2018)

Catalisa também reações de esterificação, transesterificação (interesterificação, alcóolises e acidólises), aminólise (síntese de amidas) e lactonização (Figura 1) (FERREIRA et al., 2018), levando em consideração que a atividade de água do meio reacional é um dos fatores determinantes para cada classe de reação (PAQUES; MACEDO, 2006).

Figura 1 - Reações catalisadas por lipase

Fonte: PAQUES; MACEDO, 2006

As lipases são importantes biocatalisadores que possuem uma notável aplicação na indústria bioquímica, como mostra a Figura 2. Observa-se que essa enzima catalisa inúmeros processos relevantes para a alimentação, indústria farmacêutica, couro, cosméticos, detergentes, diagnósticos médicos, indústria de lácteos, bebidas, ácidos graxos e indústria de papel (SARMAH et al., 2017).

Além das aplicações citadas na Figura 2, a lipase para a produção de biocombustível tem sido bastante estudada como forma de substituição aos combustíveis fósseis.

Em particular, os combustíveis derivados de biomassa (biocombustíveis) desempenham papel fundamental na sustentabilidade e no desenvolvimento sustentável da sociedade moderna, apresentando vantagem como, liberar menos poluentes ao meio ambiente, como monóxido de carbono (CO), material particulado (PM) e óxidos de enxofre (SOx) (LEE et al., 2019).

Figura 2 - Principais aplicações de lipase na indústria

Fonte: adaptado de ANGAJALA; PAVAN; SUBASHINI, 2016

Micro-organismos com potencial para produzir lipase podem ser encontradas em *habitats* diferentes, como resíduos de óleos vegetais e produtos lácteos, solos contaminados com óleo e alimentos deteriorados. Com isso, observa-se a grandeza que a natureza oferece para identificar novas fontes de lipases com novas propriedades (SALIHU et al., 2012).

Fungos são os preferidos para a produção industrial de lipases, pois geralmente produzem enzimas extracelulares, o que facilita a extração do meio de fermentação, como também tem a característica de serem mais estáveis quando comparados com lipases de outras fontes (MALDONADO; MACEDO; RODRIGUES, 2014).

As lipases podem ser produzidas por diferentes fontes, incluindo animais, plantas e micro-organismos. Com isso, a lipase microbiana (principalmente o fungo filamentoso e levedura) é comercialmente significativa por conta da sua alta produção e maior diversidade. Por volta de 50% das lipases comerciais são produzidas a partir de leveduras e fungos filamentosos e alguns gêneros são citados como bons produtores, por exemplo, *Aspergillus*, *Candida*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Mucor*, *Penicilium*, *Pseudomonas*, *Rhizopus*, *Rhodotorula*, etc., (MALDONADO et al., 2016)

2.2. Lipase de *Geotrichum candidum*

O *Geotrichum candidum* é denominado um fungo imperfeito, ou seja, apresenta grande variabilidade fenotípica, se comportando desde a forma semelhante a levedura até a forma semelhante a mofo (formação de micélio – conjunto de hifas) (POTTIER et al., 2008). O fungo cresce de maneira rápida quando presente em meio ótimo para sobreviver. Em ágar de extrato de malte a 25 °C formam-se colônias com diâmetro de 7 cm em 7 dias, cresce em temperaturas entre 5 a 35 °C, sendo que sua temperatura ótima é por volta de 25 °C. (ELISKASES-LECHNER; GUEGUEN; PANOFF, 2003).

Geotrichum candidum produz enzimas que degradam proteínas e lipídios, gerando compostos que contribuem para o desenvolvimento de aromas. Estas lipases são responsáveis pelo alto teor de ácidos graxos livres presentes em vários tipos de queijo (SACRISTÁN et al., 2012). Também atua em reações de esterificação. De acordo com SILVA (2012), a lipase de *Geotrichum candidum* (NRRL Y-552) produzida por fermentação submersa apresentou na reação de esterificação no valor de 97,2% de conversão molar em acetato de butila (bioaroma de abacaxi).

MALDONADO, MACEDO E RODRIGUES (2014) estudaram diferentes resíduos agroindustriais e diferentes cepas para obtenção de um microrganismo com

melhor atividade lipolítica e dentre estes o *Geotrichum candidum* (NRRL Y-552) apresentou valor de 17 U/mL utilizando meio contendo água de maceração de milho, óleo de soja e levedura hidrolisada.

Segundo RAMOS et al. (2015), os resultados da produção de lipase por *Geotrichum candidum* (NRRL Y-552) tiveram um bom desempenho quando fermentadas por 72h em óleo de semente de algodão. A atividade máxima da enzima foi de 22,91 UI/mL atingido em 48h de fermentação e atividade específica de 229,10 UI/mg de enzima. BURKET et al. (2004) também relataram que após a otimização do meio de cultura, obteve-se cerca de 20 UI/mL para lipase de *Geotrichum sp.* utilizando óleo de soja como agente indutor.

MAZZEU (2015) teve como intuito testar a partição da lipase de *Geotrichum candidum* em extrato fermentativo cru por sistema bifásico aquoso de polietileno glicol e citrato de sódio. Ele analisou que a atividade enzimática mais alta foi em 60 h de fermentação (22,4 U/mL), a concentração de proteína foi relativamente baixa (124 g/mL) e o pH foi mantido em 5,5 durante 72 h de fermentação. O sobrenadante foi utilizado como extrato enzimático, uma vez que o *Geotrichum candidum* produz lipase extracelular.

De acordo com MORAIS et al. (2016), a melhor atividade lipolítica do *Geotrichum candidum* (NRRL Y-552) foi de 11,40 U/mL em meio com pH por volta de 3,5, 200 g/L de melaço de soja a uma temperatura de $25,0 \pm 0,6$ °C variando o pH da fermentação. MALDONADO et al. (2016), fizeram um artigo de revisão focada na lipase de *Geotrichum sp.* e suas aplicações biotecnológicas relacionadas a produção, purificação, caracterização, imobilização e aplicação. Nesta pesquisa, foram previamente definidas as condições do pH, temperatura e concentração do melaço de soja para analisar a etapa experimental.

2.3. Imobilização

A imobilização de enzimas, segundo CHIBATA (1978), ocorre quando as enzimas são fisicamente confinadas ou localizadas em uma região definida no espaço com retenção de sua atividade catalítica, as quais podem ser usadas repetidamente e continuamente.

Para realizar a retenção, utiliza-se uma matriz ou suporte. Além de ser acessível, uma matriz ideal deve englobar características como inércia, força física, estabilidade, regeneração, habilidade de aumentar especificidade/atividade da enzima e reduzir a inibição do produto, adsorção não especificada e contaminação microbiana. Um exemplo disso são os polímeros inertes e materiais inorgânicos (DATTA; CHRISTENA; RAJARAM, 2013).

Enzimas imobilizadas oferecem, em geral, uma grande vantagem quando comparadas às enzimas livres. Elas são mais robustas e resistentes às mudanças ambientais. O sistema de imobilização permite uma recuperação fácil tanto das enzimas quanto dos produtos e, conseqüentemente possibilita a reutilização e operação contínua de processos enzimáticos. Além disso, a imobilização melhora a estabilidade térmica das enzimas e isso é crucial para realizar reações em meios não convencionais (MARTIN et al., 2018).

Conforme o estudo de GUPTA et al. (2009), CLEAs (da sigla em inglês - *cross-linked enzyme aggregates*), uma técnica de imobilização interessante, chamada de ligação cruzada de agregado de enzima, surgiu como um projeto de biocatalisador, utilizando lipase de *Thermomyces lanuginosa*. A ligação cruzada foi eficiente quando o sulfato de amônio foi usado como agente precipitante, com um aumento de duas vezes na atividade na presença de SDS (solução dodecil sulfato) e revelou nas imagens por microscopia eletrônica de varredura (MEV) que a enzima agregou na matriz.

Segundo a revisão feita por ZHAO et al. (2015), Figura 3, mostram os principais métodos de imobilização, classificados em: ligação do carreador, ligação cruzada, adsorção e ligação cruzada e imobilização por aprisionamento.

Figura 3 - Técnicas para imobilização de enzima

Fonte: ZHAO et al., 2015

A escolha da matriz depende dos recursos desejados e, sabe-se que as propriedades do suporte da enzima são governadas pelas propriedades da enzima e do material carregador. A interação entre os dois componentes proporciona um sistema de imobilização enzimático com propriedades químicas, bioquímicas, mecânicas e cinéticas específicas (MARTIN et al., 2018).

A Tabela 1 mostra polímeros naturais, polímeros sintéticos e materiais inorgânicos utilizados na fabricação de suportes/matriz para imobilização de enzimas.

Tabela 1 - Principais matrizes utilizadas na imobilização de enzimas.

Polímeros naturais	Polímeros sintéticos	Materiais inorgânicos
Alginato	DEAE (dietilaminoetil celulose)	Zeólito
Quitosana e quitina	PVC (policloreto de vinila)	Cerâmica
Colágeno	PEG (polietileno glicol)	Celite
Carragenina		Sílica
Gelatina		Carbono ativado
Celulose		Carvão vegetal
Amido		Diatomito
Pectina		
Agar sefarose		

Fonte: Adaptado de DATTA; CRISTENA; RAJARAM, 2013

Existe a alternativa de combinar componentes orgânicos e inorgânicos com o intuito de produzir matrizes com características específicas para uma aplicação particular ou para alcançar suportes diferentes que não são encontrados em materiais convencionais (MARTIN et al., 2018).

O uso de lipases comerciais torna-se um processo caro, pois estão associados ao preço do suporte. Como alternativa, utiliza-se matrizes hidrofóbicas de menor custo para imobilização de lipase por adsorção física. Exemplo disso é o uso de casca de ovo, polipropileno e bentonitas (MENDES et al., 2012).

Considerando a casca ovo como matriz, é interessante que a mesma representa cerca de 10% do ovo de galinha. Tal material é produzido em grandes quantidades pelas indústrias de processamento de ovos gerando grande quantidade de resíduos que são descartados em aterros sem qualquer pré-tratamento. Dessa maneira, uma enorme variedade de produtos de valor agregado pode ser obtida usando este subproduto, tornando-o vantajoso para o meio ambiente e para a economia (LACA et al., 2017).

Segundo GOLI e SAHU (2018), a casca de ovo é composta de óxidos metálicos (Na_2O , MgO , SiO_2 , KO_2 , CaO , Fe_2O_3 , CuO , SrO) e não metálicos (P_2O_5 , SiO_2), no entanto, as concentrações de óxidos não metálicos são insignificantes em relação aos metálicos (Tabela 2)

Tabela 2 - Composição química da casca de ovo não calcinado.

Composição química	Concentração (%)
Óxido de sódio - Na_2O	0,2169
Óxido de magnésio - MgO	0,785
Dióxido de silício - SiO_2	0,050
Pentóxido de fósforo - P_2O_5	0,387
Óxido sulfúrico - SO_3	0,454
Óxido de potássio - KO_2	0,088
Óxido de cálcio - CaO	97,86
Óxido de ferro (III) - Fe_2O_3	0,00361
Óxido de cobre (II) - CuO	0,02
Óxido de estrôncio - SrO	0,10

Fonte: Adaptado de GOLI e SAHU (2018)

Exemplificando, FERREIRA et al. (2018) determinaram parâmetros de imobilização utilizando os seguintes suportes: MANAE-agarose, Octil-glyoxil-sepharose (OCGLX) e octill-vinilsulfone-sepharose (OCDV).

A lipase foi imobilizada em diferentes matrizes a 25 °C durante 12 horas de incubação, usando 1 mg/g de proteína para todos os ensaios. Portanto, dentre as matrizes testadas, o maior rendimento da imobilização foi de $(51,12 \pm 1,03)\%$ utilizando MANAE-agarose.

Ao imobilizar a lipase de *Geobacillus* sp. utilizando a matriz de sílica, BHARDWAJ, SAUN, GUPTA (2017) relataram que a eficiência máxima de ligação foi de 76,67% utilizando 4% de concentração de glutaraldeído, como agente para formação de ligação cruzada, com atividade da enzimática de 1,18 U/mg.

MALDONADO et al. (2015) também fizeram ensaios com diferentes tipos de matrizes, como alginato, liga de nióbio e grafite, celite e zeólito, para imobilização da enzima de *Geotrichum candidum* NRRLY-552. Dessa maneira, o melhor resultado encontrado foi com a matriz de liga de nióbio e grafite com rendimento de 65,7%.

Segundo CHATTOPADHYAY e SEN (2012), os valores para as atividades enzimáticas da lipase livre, imobilizadas na casca de ovo em pó e em juta foram, respectivamente, $426,6 \pm 2,1$, $355,7 \pm 1,7$ e $183,4 \pm 1,8$ ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ enzima) com retenção de 83% na matriz da casca de ovo em pó e 43% na matriz de juta.

As Tabelas 3, 4 e 5 mostram os métodos de imobilização utilizados de acordo com o suporte/matriz e a fonte de micro-organismo, podendo ser de origem bacteriana, bolor ou levedura.

Tabela 3 - Imobilização de lipase de bactéria (continua).

Fonte	Método de imobilização	Suporte/matriz	Referência
<i>Acinetobacter baylyi</i>	Adsorção	Resíduos agrícolas (sabugo de milho, cascas de arroz, talo de bananeira, folhas de <i>Wrightetiabifurcata</i> A. K.). Cascas de coco e caule de <i>Salaccawallichiana</i> (planta da família Arecaceae)	(ITTRAT et al., 2014)
<i>Arthrobacter</i> sp.	Ligação covalente e ligação cruzada	Gel de sílica ativado por glutaraldeído	(YANG et al., 2010)
<i>Bacillus subtilis</i>	Microencapsulação	Alginato	(OLIVEIRA; BASTOS; DE LA TORRE, 2019)
<i>Burkholderia cepacia</i>	Ligação cruzada	Quitosana	(WEBER; DA GRAÇA NASCIMENTO; PARIZE, 2019)
<i>Burkholderia cepacia</i>	Adsorção física e ligação cruzada	Membrana de casca de ovo	(JIANG et al., 2017)
<i>Burkholderia cepacia</i>	-	Filme de amido, gel de agar e esponja vegetal	(NASCIMENTO et al., 2015)
<i>Burkholderia</i> sp.	Adsorção	Sílica férrica	(TRAN; CHEN; CHANG, 2012)
<i>Escherichia coli</i>	Ligação covalente	SiO ₂ e quitosana revestida Fe ₃ O ₄	(MEMARPOOR-YAZDI; KARBALAEI-HEIDARI; DOROODMAND, 2018)
<i>Escherichia coli</i>	Aprisionamento	Xerogel de sílica e nanocarbono em sílica	(KOVALENKO et al., 2013)

Tabela 3 - Imobilização de lipase de bactéria (conclusão).

Fonte	Método de imobilização	Suporte/matriz	Referência
<i>Geobacillus sp.</i>	Adsorção de superfície	Sílica	(BHARDWAJ; SAUN; GUPTA, 2017)
<i>Lactobacillus plantarum</i>	-	Alginato de sódio	(UPPADA et al., 2017)
<i>Microbacterium sp.</i>	Adsorção física	Celite e carvão	(TRIPATHI et al., 2014)
<i>Pseudomonas antarctica</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i>	Adsorção hidrofóbica	Poli-hidroxibutirato	(MENDES et al., 2012)
<i>Pseudomonas cepacia</i>	Distribuição do tamanho dos poros e área interfacial específica	Cerâmica	(AL-ZUHAIR; DOWAIDAR; KAMAL, 2009)
<i>Pseudomonas cepacia</i>	Adsorção e ligação covalente	Hidróxidos duplos em camadas (Layered double hydroxides-LDH) de Zn/Al	(SILVA DIAS et al., 2019)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Adsorção hidrofóbica	Poli-hidroxibutirato	(MENDES et al., 2012)
<i>Pseudomonas sp.</i>	Adsorção física e ligação covalente	Carvão ativado	(KHOSLA et al., 2017)
<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus xylosus</i>	-	CaCO ₃	(HORCHANI et al., 2010)
<i>Staphylococcus warneri</i>	Adsorção interfacial	Octyl-sepharose	(DE ABREU et al., 2014)

Tabela 4 - Imobilização de lipase de bolores (continua).

Fonte	Método de imobilização	Suporte/matriz	Referência
<i>Aspergillus sp.</i>	Ligação covalente e adsorção	Partículas de magnetita, resíduos de indústria de açúcar pirolisado	(GRICAJEVA et al., 2018)
<i>Aspergillus niger</i>	Adsorção e ligação cruzada	Poliestireno	(PRABANINGTYAS et al., 2018)
<i>Fusarium incarnatum</i>	Ligação covalente	Nanopartículas de óxido de ferro (Fe ₃ O ₄)	(JOSHI; SHARMA; KUILA, 2019)
<i>Geotrichum candidum</i>	Encapsulação	Matriz polimérica de alginato de cálcio e gelatina reticulada com glutaraldeído	(SILVA 2012)
<i>Geotrichum candidum</i>	Adsorção	Alginato, liga de nióbio e grafite, celite, e zeólito	(MALDONADO et al., 2015)
<i>Hypocrea pseudokoningii</i>	Adsorção	Suportes hidrofóbicos e iônicos (Duolite, DEAE-agarose, PEI-agarose, MANAE-agarose e Q-sepharose)	(PEREIRA et al., 2015a)
<i>Hypocrea pseudokoningii</i>	Imobilização covalente multiponto	Octyl–Sephadex	(PEREIRA et al., 2015b)
<i>P. camembertii</i>	Adsorção	Sílica polivinil álcool (SiO ₂ -PVA)	(FREITAS et al., 2010)
<i>Rhizomucor miehei</i>	Aprisionamento	Microemulsões	(ZHANG et al., 2015)
<i>Mucor javanicus</i>			
<i>Rhizomucor miehei</i>	Adsorção física	Metacrilato de octadecil	(VERDASCO-MARTÍN et al., 2018)
<i>Rhizomucor miehei</i>	Adsorção e aprisionamento	Zeólitos e materiais relacionados	(MACARIO et al., 2008)
<i>Rhizomucor miehei</i>	Adsorção	Sílica	(MICHAUX et al., 2010)
<i>Rhizopus oryzae</i>	Adsorção	Polimetacrilato	(HARTWIG et al., 2015)
<i>Rhizopus oryzae</i>	-	CaCO ₃	(HORCHANI et al., 2010)

Tabela 4 - Imobilização de lipase de bolores (conclusão).

Fonte	Método de imobilização	Suporte/matriz	Referência
<i>Talaromyces thermophilus</i>	Adsorção, ligação iônica e ligação covalente	Quitosana	(ROMDHANE et al., 2011)
<i>Thermomyces lanuginosa</i>	Ligação cruzada de agregado de enzima (CLEA)	Glutaraldeído	(GUPTA et al., 2009)
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Adsorção física	Polimetacrilato	(LAGE et al., 2016)
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Ligação covalente	Immobead 150	(MATTE et al., 2016)
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Adsorção hidrofóbica	Poli-hidroxibutirato	(MENDES et al., 2012)
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Encapsulação	Sílica	(SÖRENSEN et al., 2010)
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Adsorção física	Óxido de ferro (Fe ₃ O ₄)	(SARNO et al., 2017)
<i>Thermomyces lanuginosus</i> (TLL)	Adsorção física	Metacrilato de octadecil	(VERDASCO-MARTÍN et al., 2018)
<i>Yarrowia lipolytica</i> Wt-11	Adsorção física	Resina acrílica macroporosa (AB-8)	(PING et al., 2018)
<i>Yarrowia lipolytica</i> 583	Adsorção	Magnetita	(AKIL et al., 2016)

Tabela 5 - Imobilização de lipase de leveduras.

Fonte	Método de imobilização	Suporte/matriz	Referência
<i>Candida antarctica</i>	Adsorção física	Metacrilato de octadecil	(VERDASCO-MARTÍN et al., 2018)
<i>Candida rugosa</i>	Encapsulação	Alginato	(NG; YANG, 2016)
<i>Candida rugosa</i>	Aprisionamento	Superfície da membrana de polissulfona	(YUJUN et al., 2008)
<i>Candida rugosa</i>	Ligação covalente	Microesferas magnéticas hidrofílicas	(YONG et al., 2008)
<i>Candida rugosa</i>	Ligação cruzada	Polipropileno de alta densidade (Accurel EG100 and EP100), e Polietileno de baixa densidade (Accurel EP400)	(ANAND; WEATHERLEY, 2018)
<i>Candida sp.</i>	Adsorção	Óxido de ferro (Fe_3O_4)	(ZHANG et al., 2016)
<i>Candida viswanathii</i>	Adsorção	Octol-agarose	(ALMEIDA et al., 2018)
<i>Rhodotorula glutinis</i>	Encapsulação	Cloreto de cálcio (CaCl_2) e alginato de sódio	(TASKIN et al., 2016)

TASKIN et al. (2016) produziram lipase livre e imobilizada de levedura (*Rhodotorula glutinis*) adaptadas e isoladas de *habitats* frios (15 °C ou menos). Os autores determinaram as atividades máximas da lipase com 54,4 e 75,2 U/L para células livres e imobilizadas, respectivamente, em que uma unidade (U) de atividade da lipase foi definida como a quantidade de enzima necessária para hidrolisar 1 μmol de ácidos graxo liberado/min. Notou-se que as células imobilizadas poderiam ser usadas em cinco ciclos de reação sucessivos sem qualquer perda na atividade máxima.

2.4. Aplicações para síntese de biodiesel e bioaromas

Em 1895, Emil Fisher descobriu a esterificação, que consiste na reação de ácidos carboxílicos com álcoois para formar ésteres. Para que isso ocorra, é necessário que a reação seja efetuada em solução ácida, não apenas para catalisar a reação, mas para manter o ácido carboxílico em sua forma ácida, direcionando,

dessa forma, para os produtos. Como as reações de esterificação ocorrem de forma lenta, utilizam-se catalisadores para aumentar a velocidade (BRUICE, 2006).

Dessa maneira, o biodiesel, como exemplo, é um combustível renovável e pode ser formado através da reação de transesterificação. Por meio desse processo, os triglicerídeos presentes nos óleos e gordura animal reagem com um álcool primário, metanol ou etanol, gerando dois produtos: o éster e a glicerina, Figura 3 (ANP, 2020). Esta alternativa tem como intuito substituir os combustíveis fósseis e diminuir a poluição ambiental.

Figura 3 - Reação de transesterificação de triglicerídeos

Fonte: PINHEIRO; LUIS; FERREIRA (2009)

Na indústria alimentícia também é utilizado aromas de frutas, obtido através da reação de esterificação, como o butirato de metila (odor de maçã), acetato de propila (odor de pera), butirato de etila (odor de abacaxi), acetato de octila (odor de laranja), dentre outros (BRUICE, 2006). As principais maneiras de produzir aromas são através da síntese química, extração de compostos da própria natureza ou por processos biotecnológicos. Estes, denominados bioaromas (BEN AKACHA; GARGOURI, 2015).

Além do mais, ésteres produzidos através de microorganismos e enzimas são considerados naturais de acordo com a legislação dos EUA e Europa, o que satisfaz a tendência do consumidor (TOMKE; RATHOD, 2015). No estudo de SILVA (2012), foi produzido acetato de butila (bioaroma de abacaxi) com rendimento de 99,1% de lipase imobilizada, produzida por *Geotrichum candidum* por fermentação submersa. A imobilização foi feita em matriz polimérica de alginato de bário e gelatina reticulada

com glutaraldeído.

ROSA et al. (2017), aplicaram a lipase não comercial de *Candida rugosa* concentrada na síntese enzimática acetato de geranil (bioaroma de rosa) em solvente orgânico. A condição ideal para a síntese de acetato de geranil foi a 45 °C, 12,5% (m/m) (razão de massa lipase/geraniol), 1: 1,5 (razão molar geraniol: acetato de vinila) por 8 h de reação em solvente orgânico (n-hexano).

MATINJA et al. (2019), otimizaram a produção de biodiesel a partir do efluente da extração do óleo de palma usando lipase de *Candida rugosa* imobilizada em cápsulas de álcool polivinílico-alginato-sulfato. O maior rendimento do palmitato de metila (PAME) e do oleato de metila (OAME) foi obtido nas seguintes condições ótimas; velocidade de agitação (300 rpm), razão molar óleo/metanol (1: 6), período de incubação (5 h) e peso das esferas imobilizadas (2 g).

PATCHIMPET et al. (2020), fizeram a síntese de biodiesel por reação de transesterificação usando óleo de cozinha e lipase da víscera da tilápia (*Oreochromis niloticus*). As condições otimizadas para alcançar o máximo de rendimento de biodiesel foram obtidas utilizando 30 kU de enzima, razão molar de metanol óleo 4:1 e 3% de água, a reação foi feita a 45° C por 28h. Os autores constataram que maior rendimento obtido foi de 96,5%.

2.5. Banho de ultrassom

Ultrassom é um tipo de energia não radiante (DELGADO-POVEDANO; LUQUE DE CASTRO, 2015), tecnologia emergente, considerada “verde” devido a suas propriedades, com alta eficiência e reprodutibilidade nas áreas que tem sido aplicada (DALAGNOL et al., 2017; DELGADO- POVEDANO; LUQUE DE CASTRO, 2015; FENG; BARBOSA-CÁNOVAS; WEISS, 2011).

O principal mecanismo envolvendo o ultrassom é a cavitação. Cavitação é definida pela formação de cavidades (bolhas de vapor ou de gás) em um líquido por efeito de uma redução da pressão total (PALUDO et al., 2015). As inúmeras bolhas formadas no meio sofrem formações consecutivas, crescimento e por fim, a implosão. Essas bolhas em colapso geram pontos quentes (temperatura) e pressão maior que 1000 atm (BANSODE; RATHOD, 2019).

Dessa forma, a irradiação ultrassônica melhora a mistura e a interação entre as fases, devido ao colapso de bolhas em solução aquosa (GALGALI; GAWAS;

RATHOD, 2017). Além disso, as ondas podem perturbar a estrutura enzimática, responsável por maior exposição dos locais ativos e seu contato efetivo com substâncias reativas (BANSODE; RATHOD, 2019).

O ultrassom e a cavitação geram efeitos físicos e químicos, respectivamente. Físicos, pois o ultrassom mistura o meio devido ao movimento oscilatório do fluido. E químico por conta da cavitação resultar em radicais; devido às condições extremas atingidas na bolha, o solvente, assim como as moléculas de gás, sofre dissociação para formar numerosas espécies químicas, que também reagem entre si (PALUDO et al., 2015)

Além disso, o ultrassom influencia nas reações enzimáticas de outras maneiras, incluindo os prováveis efeitos na formação e dissociação do complexo enzima-substrato, aumentando, dessa forma, a atividade enzimática.

O efeito da combinação do ultrassom e enzimas imobilizadas também podem melhorar a taxa de reação e diminuir o tempo de reação reduzindo as limitações de transferências de massa entre enzima e substrato (GALGALI; GAWAS; RATHOD, 2017).

Na Tabela 6, pode-se observar micro-organismos produtores de lipase utilizando a técnica de banho de ultrassom com enzimas comerciais ou não.

Tabela 6 - Lipase microbiana, comercial ou não, empregando o uso da técnica de ultrassom (continua).

Micro-organismos	Lipase comercial ou não	Principais resultados	Fonte
<i>Aspergillus niger</i>	Comercial (Sigma Aldrich)	Atividade da lipase aumentou em até 1,6 vezes após o tratamento ultrassônico em 22 kHz e 11,38 W cm ² por 25 min.	(NADAR; RATHOD, 2018)
<i>Aspergillus niger</i>	Fermentação	Aumento de cerca de 320% em sua atividade hidrolítica, utilizando 50% da potência ultrassônica por 25 min a 45 ° C. Melhor condição: óleo:água de 1:3 (v: v) e concentração de enzima de 15% (v/v), gerando 62,67 l mol/mL de ácidos graxos livres em 12 h Banho de ultrassom: Unique Inc., USC-1800A model, frequência US 40 kHz e potência máxima de 132 W – 0.42 W/cm ²)	(MULINARI et al., 2017)
<i>Candida antarctica</i>	Comercial (Fermase CALB)	Temperatura de 60 °C, razão molar de propilamida e acetato de butila 1: 1,5, 3% (p/v) de carga de lipase com frequência de ultrassom (US) de 22 kHz, potência de 100W do banho ultrassônico e velocidade de agitação de 100 rpm, 98% de conversão foi obtida em 2 h.	(BANSODE; RATHOD, 2019)
<i>Candida antarctica</i>	Comercial (Fermase CALB™)	Maior taxa de conversão atingida foi 65,3% na hidrólise enzimática assistida por ultrassom de AME (aspirin methyl ester) na presença de água usando trioleína como solvente 1% de CALB, 5 mL de trioleína, 1% de H ₂ O (v/v) alternando 100 rpm em banho-maria com banho de ultrassom a 53 kHz, 100 W, ciclo de trabalho de 50%, 35 ° C por 12 h.	(CHIPLUNKAR et al., 2018)
<i>Candida antarctica</i>	Comercial (Fermase CALB™)	Efeito do ultrassom nas esferas poliméricas foi avaliado e melhorou a síntese de todos os poliésteres. Ultrassom: 53kHz e 100 W	(TOMKE et al., 2017)

Tabela 6 - Lipase microbiana, comercial ou não, empregando o uso da técnica de ultrassom (continua).

Micro-organismos	Lipase comercial ou não	Principais resultados	Fonte
<i>Candida antarctica</i>	Comercial (Novozym 435)	Condições ótimas de irradiação de 30 min com frequência de 20 kHz, 240 W, 70% de ciclo de trabalho (7 s em 3 s off), enquanto as condições ótimas de reação foram 4: 1 relação molar de ácido caprílico e glicerol, 3% carga enzimática e temperatura de 50 °C Pré-tratamento por ultrassom influenciou na taxa de reação e no rendimento máximo de tricaprilina (94,8%) em 7 h sob condições ótimas	MORE; WAGHMARE; GOGATE, 2017)
<i>Candida antarctica</i> e <i>Rhizomucor miehei</i>	Comercial (lipase B Novozyme CALB)	O rendimento máximo, 88% de ésteres metílicos (m/m de óleo) foi obtido em 4 h com tratamento com ultrassom, comparado com um rendimento máximo de 78% de ésteres metílicos (m/m de óleo), após 36 h sem ultrassom.	(SIVARAMAKRISHNAN; INCHAROENSAKDI, 2017)
<i>Candida antarctica</i>	Comercial (Novozym 435)	Glicerólise catalisada por lipase assistida por ultrassom pode ser uma via alternativa potencial para métodos convencionais, pois altos teores de produtos de reação, especialmente monoglicerídeos, foram alcançados com fornecimento de energia de irradiação leve ($\leq 130\text{W}$), em uma reação relativamente curta (2 h) e baixo teor de enzima (7,5% em peso).	(FIAMETTI et al., 2012)

Tabela 6 - Lipase microbiana, comercial ou não, empregando o uso da técnica de ultrassom (conclusão).

Micro-organismos	Lipase comercial ou não	Principais resultados	Fonte
<i>Rhizomucor miehei</i> e <i>Thermomyces lanuginosus</i>	Comercial (Lipozyme RM IM) e Comercial (Novozyme 435, Lipozyme TL IM)	<p>Rendimento máximo de 99,79% foi obtido usando irradiação de ultrassom com uma frequência 25 kHz e 150 W nas seguintes condições: Novozym 435 como biocatalisador, [Bmim] [Tf2N] como meio de reação, lipase 60 g/L, temperatura de reação de 75 °C e tempo de reação de 9 horas.</p> <p>Utilizando as condições ótimas sob irradiação ultrassônica, o tempo de reação foi reduzido em 0,75 vezes, e o parâmetro cinético aparente (V_m/K_m) foi aumentado em 2 vezes. A lipase pode ser reutilizada 11 vezes sem perda significativa de atividade.</p>	(WANG et al., 2015)
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Comercial (Lipozyme TL-IM)	<p>As reações de esterificação foram realizadas em banho ultrassônico (Unique Inc., modelo USC 2880A, 40 kHz, 220 W, Brasil). As melhores concentrações de biocatalisadores (35%) e ácido butírico (0,7 M) foram testadas utilizando ultrassom.</p> <p>A reutilização da Lipozima TL-IM para a síntese de butirato etílico assistida por ultrassom foi verificada em 10 bateladas, sem perda apreciável de atividade</p> <p>Em sistemas que usavam agitação mecânica, o biocatalisador foi completamente inativado após 5 bateladas.</p>	(PALUDO et al., 2015)

Portanto, o uso desta tecnologia em vários processos de reação como esterificação, transesterificação, produção de nanopartícula, extração, emulsificação

e tratamento de águas residuais têm sido benéficos quando comparada com processos convencionais (GALGALI; GAWAS; RATHOD, 2017).

Realizando um levantamento bibliográfico, pode-se observar que apenas MULINARI et al. (2017) produziram lipase de *Aspergillus niger* por fermentação no estado sólido e em seguida foi aplicada a técnica de ultrassom para a melhoria da atividade enzimática, enquanto que os demais autores utilizaram a lipase comercial (Tabela 6).

Os resultados obtidos foram que o tratamento com lipase em ultrassom (Unique Inc., USC-1800A model, frequência US 40 kHz e potência máxima de 132 W – 0,42 W/cm²) gerou um aumento de cerca de 320% em sua atividade hidrolítica, utilizando 50% da potência ultrassônica por 25 min a 45 ° C. Através do delineamento experimental realizado para hidrólise assistida por ultrassom, concluiu-se que a melhor condição era utilizar uma relação óleo: água de 1: 3 (v: v) e concentração de enzima de 15% (v/v), gerando 62,67 µmol/mL de ácidos graxos livres (AGL) em 12 horas de reação (MULINARI et al., 2017)

Desta forma este estudo pretende produzir a lipase de *Geotrichum candidum* utilizando resíduos do processamento de milho e imobilizar a lipase na casca de ovo em pó. Realizar a aplicação do banho de ultrassom na lipase livre e imobilizada para melhorar a atividade enzimática e, conseqüentemente, obter melhor rendimento na reação de esterificação.

3. OBJETIVO

3.1. Objetivo Geral

Produzir lipase de *Geotrichum candidum* com resíduos da agroindústria de milho por fermentação, imobilizar em casca de ovo em pó e comparar a atividade enzimática livre e imobilizada no rendimento na reação de esterificação e empregar a técnica de ultrassom.

3.2. Objetivos Específicos

- a) Produzir lipase de *Geotrichum candidum* utilizando torta de milho e água de maceração de milho em fermentação;
- b) Imobilizar a lipase em casca de ovo em pó
- c) Comparar a atividade das lipases livre e imobilizada com e sem aplicação de ultrassom;
- d) Comparar a atividade da lipase livre e imobilizada em reação de esterificação com e sem aplicação de ultrassom.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Produção de lipase

O micro-organismo estudado foi o *Geotrichum candidum* Y- 552, gentilmente cedido pela NRRL (*Northern Regional Research Laboratory, Agricultural Research Service*) dos EUA. Este micro-organismo foi escolhido por ser um produtor de lipase extracelular na presença de um meio de cultura, como por exemplo, os triglicerídeos (CHARTON et al., 1992; RAMOS et al., 2015; SHIMADA et al., 1992; MALDONADO et al., 2015).

O micro-organismo foi armazenado em tubos de ensaio contendo meio Yeast Malt Agar (YMA) (%m/v: 0,3% extrato de malte, 0,3% extrato de levedura, 0,5% peptona, 1,0% de glicose e 3,0% ágar) mantidos a 4 °C. O inóculo foi obtido pelo cultivo do micro-organismo em placas de Petri contendo meio YMA incubadas por 48 h a 30 °C. Após este período, uma área circular de diâmetro 1 cm foi recortada do meio com auxílio de um tubo de ensaio estéril e os micro-organismos lipolíticos contidos na superfície desse disco foram transferidos para meio de pré- fermentação (6,0% água de maceração de milho, 0,25% NH₄SO₄ e 1% de óleo de milho) com tempo de incubação de 24 h, 30°C a 200 rpm.

Depois do período de pré- fermentação foi feito a transferência deste inóculo para os meios de fermentação na razão de 10% v/v, para concentração da AMM, torta de milho, óleo de milho e ajuste inicial de pH para 6. A fermentação foi realizada em frascos agitados (250 mL) a 30 °C, por 48h com agitação de 200 rpm seguindo o processo sugerido no trabalho de MALDONADO et al. (2012).

4.2. Atividade enzimática da lipase de *Geotrichum candidum*

A determinação da atividade enzimática consiste em um sistema de reação composto de 5 mL de emulsão de goma arábica ÊXODO (7%) e óleo de oliva extra virgem da marca ANDORINHA (até 0,8% de acidez) , na proporção de 75:25% (v/v), nesta ordem, 2 mL de solução tampão fosfato (pH 7) e 1 mL da solução ou massa contendo a enzima. Essa mistura foi mantida a 37° C por 30 minutos em banho-maria. A reação foi paralisada adicionando 10 mL de solução acetona : álcool (1:1) e os ácidos graxos liberados foram titulados utilizando uma solução de NaOH (0,05M)

e fenolftaleína como indicador (MACEDO; PASTORE, 1997) modificada por KAMIMURA et al. (1999).

Foi construída uma curva padrão de ácidos graxos utilizando-se ácido oléico em solução tampão fosfato de sódio 0,01 M (pH 7,0) em um volume total de 1 mL de solução. Em seguida, adicionou-se mais 2 mL de tampão fosfato e 5 mL de emulsão de goma arábica (7%) e óleo de oliva, na proporção de 75 : 25% (v/v), respectivamente. As amostras foram colocadas em agitador orbital a 37 °C por 30 minutos. A mistura foi retirada do agitador orbital e adicionou-se 10 mL de solução álcool : acetona (1:1) e titulou-se com solução de NaOH (0,05 M) utilizando-se fenolftaleína como indicador. A atividade enzimática foi calculada de acordo com a equação da reta, eq. (1),

$$Y = \frac{51,056 \times (V_{amostra} - V_{branco}) - 73,793}{30} \quad (1)$$

Onde,

Y: atividade enzimática expressa em U/mL ou U/g.

$V_{amostra}$: volume (mL) de NaOH 0,05 M utilizado na titulação contendo a lipase.

V_{branco} : volume (mL) de NaOH 0,05 M utilizado na titulação sem a presença da lipase.

Os valores foram expressos em U/mL, onde uma unidade (U) é definida como a quantidade de enzima liberada em 1 μ mol de ácido graxo por minuto de reação (MACEDO; PASTORE, 1997).

4.3. Pré-purificação da lipase

Após a fermentação, foi adicionado solução tampão fosfato 0,1M (pH 7) no caldo bruto na proporção de 1:1 e colocado por 1 h sob agitação magnética. O caldo bruto obtido foi centrifugado a 5000 rpm, por 10 minutos, para separação das células. O sobrenadante obtido foi encaminhado para etapa de pré-purificação

utilizando a técnica de precipitação com solvente de acordo com método descrito por MALDONADO et al. (2015).

A etapa de precipitação da enzima foi baseada em MALDONADO et al., (2015) com modificações. O solvente utilizado foi o etanol (99% v/v) (Dinâmica) gotejado com o auxílio de uma bureta de 50 mL ao caldo centrifugado com agitação magnética e controle de temperatura a 2 °C. A adição de etanol foi feita até a concentração final de etanol atingir 70% v/v de saturação, eq. (2).

$$0,7 = \frac{\text{Volume etanol (l)}}{\text{Volume etanol (l)} + \text{Volume inicial caldo centrifugado(l)}} \quad (2)$$

Em seguida, o material foi centrifugado a 5000 rpm por 15 minutos para separação da enzima precipitada. A enzima foi então ressuspensa em tampão fosfato 0,1 mol/L a pH 7,0, congelada e na sequência liofilizada no liofilizador Terroni -LC 1500.

Nesta etapa foi feita a análise de atividade enzimática para determinar os fatores de concentração e recuperação da enzima parcialmente purificada em relação à enzima bruta. O fator de concentração (FC) é definido como a razão entre a atividade da lipase concentrada (U/g) e a atividade da lipase inicial do caldo bruto (U/mL), eq. (3). Foi considerado o fator de 1 g/mL para transformar volume em massa.

$$FC = \frac{\text{Atividade enzimática final } U/g}{\text{Atividade enzimática inicial } U/g} \quad (3)$$

O fator de recuperação (FR) é determinado como a razão entre a quantidade de enzima concentrada (U total) e a quantidade total de enzima inicial do caldo bruto (U total), eq. (4) (MALDONADO et al., 2015).

$$FR = \frac{\text{Atividade enzimática final (U)}}{\text{Atividade enzimática inicial (U)}} \times 100 \quad (4)$$

4.4. Imobilização da lipase de *Geotrichum candidum*

4.4.1. Lipase livre (LL)

Lipase livre (LL) é definida nesta pesquisa como um concentrado protéico contendo a lipase liofilizada, sendo a unidade utilizada em U/g.

4.4.2. Adsorção da lipase em casca de ovo em pó (LIC)

O concentrado protéico contendo a lipase imobilizada em casca de ovo em pó (LIC) é a sigla que se refere ao processo de imobilização da lipase na casca de ovo. A atividade lipolítica neste caso é expressa em U/g_{casca de ovo}.

Foram realizados dois processos de imobilização combinados, no qual o primeiro foi a imobilização por adsorção física e o segundo, a imobilização por encapsulamento.

Nesta primeira etapa da imobilização foi feita a adsorção física da lipase liofilizada em casca de ovo em pó. As cascas de 10 ovos foram fervidas em solução de dodecil sulfato de sódio (SDS) 0,1% m/v, por 15 minutos, seguida de lavagem com água destilada (3 vezes) para remover o excesso de SDS e lavagem com acetona (3 vezes) para remoção de água residual. Após a lavagem, as cascas foram secas em estufa a 60 °C por 5 horas para evaporação da acetona e depois trituradas para formação do pó seguindo a granulometria entre 16 a 36 mesh (CHATTOPADHYAY; SEN, 2012).

Antes de iniciar a imobilização da lipase em casca de ovo em pó, a solução tampão fosfato pH 6, 7 ou 8 a 0,1 M, foi pré-aquecida em banho-maria seguindo as temperaturas do planejamento experimental (Tabela 11). Após esta etapa, a lipase liofilizado foi dissolvida na solução e então, ofertada ao suporte. A mistura da casca de ovo em pó, lipase e solução tampão ficaram por 2 h no banho-maria e 16 h a 4° C.

O suporte com a enzima imobilizada foi filtrado em bomba a vácuo, utilizando papel de filtro qualitativo UNIFIL com gramatura de 80 g/m². Após o processo de filtração, o imobilizado foi retirado do papel e armazenado a 4° C para posteriormente realizar o segundo processo de imobilização, o encapsulamento na condição ótima de adsorção física.

Foram retiradas amostras no início e no final do processo para análise da atividade enzimática e verificação do percentual de retenção do concentrado protéico de lipase liofilizada no suporte ao final do experimento, eq. (5), (6) e (7).

$$\text{Ativ. enz. imobilizado } (U/g) \times \text{fator conversão} = \text{Ativ. enz. (U) no imobilizado} \quad (5)$$

$$\text{Ativ. enz. } (U/mL) \times 17 \text{ mL} = \text{Ativ. enz. (U) no início} \quad (6)$$

$$\text{Rendimento de adsorção (\%)} = \frac{\text{Ativ. enz. (U) no início}}{\text{Ativ. enz. (U) no imobilizado}} \quad (7)$$

O valor de 17 mL corresponde à quantidade de solução tampão fosfato de sódio (0,1M, pH 6-8), utilizado no início do experimento.

Com isso, foram avaliadas as variáveis independentes – pH da solução tampão, concentração da enzima (U/g) e temperatura (°C) de acordo com delineamento fatorial 2^3 conforme mostrado na Tabela 7.

Tabela 7 - Delineamento fatorial 2^3 para imobilização da lipase de *Geotrichum candidum* em casca de ovo em pó.

Ensaio	pH	Lipase (U/g)	Temperatura (°C)	Resposta: Rendimento de adsorção (%)
1	6,0 (-1)	200,0 (-1)	27 (-1)	
2	8,0 (+1)	200,0 (-1)	27 (-1)	
3	6,0 (-1)	400,0 (+1)	27 (-1)	
4	8,0 (+1)	400,0 (+1)	27 (-1)	
5	6,0 (-1)	200,0 (-1)	37 (+1)	
6	8,0 (+1)	200,0 (-1)	37 (+1)	
7	6,0 (-1)	400,0 (+1)	37 (+1)	
8	8,0 (+1)	400,0 (+1)	37 (+1)	
9 pc	7,0(0)	300,0 (0)	32,0 (0)	
10 pc	7,0(0)	300,0 (0)	32,0 (0)	
11 pc	7,0(0)	300,0 (0)	32,0 (0)	

pc- pontos central, U = 1µmol de ácidos graxos liberado por minuto

Fonte: autoria própria

A condição ótima para imobilização da lipase por adsorção física em casca de ovo em pó foi obtida e os ensaios com maior porcentagem de rendimento de adsorção calculados. Foi verificada também a estabilidade do biocatalisador imobilizado em casca de ovo em pó. Esse processo foi desenvolvido em septuplicatas, com massa inicial de 0,5 g do concentrado protéico contendo a lipase imobilizada em casca de ovo, feito a atividade enzimática através da titulação com NaOH 0,05M.

4.5. Banho de ultrassom

O equipamento utilizado foi o banho de ultrassom (Unique Inc., model 1400, Brasil), frequência de 40 kHz e potência ultrassônica de 132 Watts. Foi realizado teste preliminar para que a temperatura do equipamento se mantivesse constante. Desta forma, o banho de ultrassom foi deixado ligado por 50 minutos para atingir a temperatura de 36° C em todos os experimentos.

4.5.1. Efeito da sonicação na lipase de *Geotrichum candidum*

Para verificar o efeito da sonicação na atividade enzimática do concentrado protéico contendo a lipase de *Geotrichum candidum*, a LL e LIC foram sonicadas a 40 kHz separadamente.

Para determinação da cinética de acompanhamento da atividade enzimática da LL e LIC, foram feitos ensaios em triplicatas, nos tempos de 0, 5, 10, 20, 30, 40, 50 minutos, a uma temperatura constante de 36 °C.

Pesou-se cerca de 0,0133 g (25 U) de enzima liofilizada, no qual foi dissolvida em 5 mL de tampão fosfato 0,1 M, pH 7. Para quantificar a atividade enzimática (U/mL) e a atividade relativa, foi retirado uma amostra de 1 mL de cada ensaio.

No experimento da lipase imobilizada em casca, mediu-se 0,2 g e adicionaram-se 5 mL de tampão fosfato. Depois de ter colocado no banho de ultrassom, essa mistura foi filtrada em bomba a vácuo, utilizando papel de filtro qualitativo UNIFIL com gramatura de 80 g/m² e, desta forma, medido a atividade enzimática e relativa.

4.6. Reação de esterificação

A reação de esterificação foi baseada nas condições que forneceram maior rendimento de reação de esterificação de acordo com o estudo de RAMOS, P. R. (2019). Com isso, o experimento foi realizado em Erlenmeyers de 125 mL na proporção 1:3 de ácido oléico e metanol, 7,5 U/g de lipase, por 1 hora a 50 °C e 200 rpm no agitador orbital. Os biocatalisadores utilizados foram a lipase livre (LL), lipase imobilizada em casca de ovo (LIC) e apenas a casca de ovo.

Foi retirado uma amostra de 1 mL da mistura e então, transferido para um novo Erlenmeyer contendo 10 mL da solução de acetona:álcool (1:1). A quantidade de éster formado foi feita pelo método volumétrico utilizando NaOH 0,5 mol/L e fenolftaleína como indicador ácido-base. O rendimento da reação (%) foi calculado pela molaridade com base na quantidade de ácido oléico remanescente, eq. (8), (9) e (10) (DOS SANTOS; REZENDE; MARTÍNEZ, 2016).

$$\begin{aligned} n_{\text{éster máximo}} &= n_{\text{NaOH}} \\ n_{\text{éster máximo}} &= (C \times V_{\text{branco}}) \text{NaOH} \end{aligned} \quad (8)$$

$$n_{\text{éster reação}} = C \times (V_{\text{branco}} - V_{\text{amostra}}) \quad (9)$$

$$y \% = \frac{100 \% \times n_{\text{éster reação}}}{n_{\text{éster máximo}}} \quad (10)$$

Onde,

y: rendimento da reação de esterificação em porcentagem

n éster máximo: número de mols (mmol) de éster máximo formado

n éster reação: número de mols (mmol) de éster formado na reação

n NaOH: número de mols (mmol) de NaOH

C: concentração molar NaOH

V_{amostra} : volume (mL) de NaOH 0,5 M utilizado na titulação contendo a lipase.

V_{branco} : volume (mL) de NaOH 0,5 M utilizado na titulação sem a presença da lipase.

Com o intuito de melhorar o rendimento da reação de esterificação, as duas condições da enzima (lipase livre, lipase imobilizada em casca de ovo) e a casca de ovo sem a presença da enzima foram submetidas ao banho de ultrassom por 5 minutos antes de serem colocadas no agitador orbital, visto que a atividade enzimática aumenta nesse tempo.

4.7. Análise estatística

As análises estatísticas dos resultados foram realizadas utilizando o Software Statistica® versão 13.5. Todos os experimentos foram feitos, pelo menos, em triplicatas e os resultados considerados estatisticamente significativos a um p-valor menor que 0,05.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Preparação do inóculo de *Geotrichum candidum* e produção de lipase por fermentação

A cepa do micro-organismo *Geotrichum candidum* Y-552 foi ativada e, após essa etapa, foram repicados em tubos inclinados - *slants* (Figura 4) e placas de Petri (Figura 5a) para a propagação em meio YMA.

Figura 4 - *Slant* de *Geotrichum candidum*.

Fonte: autoria própria

Figura 5 – (a) Placa de *Geotrichum candidum* (b) Caldo bruto após fermentação.

(a)

(b)

Fonte: autoria própria

Para realizar a etapa de produção de lipase, a condição de fermentação utilizada neste estudo foi baseada em KAMIMURA et al. (2017), que fizeram um planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} variando a composição do meio com água de maceração de milho de 6 - 10% m/v, óleo de milho de 0,5 – 1% m/v, torta de milho de 4 - 10% m/v e pH de 6 a 8. A melhor condição obtida foi AMM - 10% m/v, torta de

milho - 4% m/v, óleo de milho - 1% m/v, 150 mL de água destilada e ajuste do meio para pH 6. As amostras eram mantidas no agitador orbital por 48 horas, 30 °C a 200 rpm (Figura 5b)

Foram produzidos cinco lotes de caldo fermentado (A, B, C, D e E), sendo que nos quatro primeiros lotes foram feitos 10 ensaios e o último, foram feitos 12 ensaios utilizando Erlenmeyers de 250 mL, contendo em torno de 150 mL de caldo ao final deste processo. Foi medida a atividade enzimática (U/g) de cada ensaio e calculado a média e o desvio-padrão de cada lote (Tabela 8).

Tabela 8 - Atividade enzimática (U/g) dos lotes de caldo bruto após 48h de fermentação.

Ensaio / Fermentação	Atividade enzimática (U/g)				
	Lote A	Lote B	Lote C	Lote D	Lote E
1	20,92	22,88	28,75	16,84	17,95
2	20,07	21,95	27,9	16,84	19,48
3	20,33	21,78	22,12	17,52	18,03
4	25,01	21,01	25,01	16,16	18,46
5	23,65	22,37	23,31	18,78	17,86
6	27,48	22,37	21,86	17,86	22,29
7	23,99	22,97	30,2	17,09	19,82
8	26,97	22,46	21,52	18,12	17,86
9	23,99	21,18	24,92	17,27	21,43
10	25,52	21,35	25,52	15,9	20,67
11	-	-	-	-	19,82
12	-	-	-	-	19,31
Média	23,79	22,03	25,11	17,24	19,41
Desvio padrão	2,63	0,69	3,03	0,88	1,48

Fonte: autoria própria

5.2. Pré-purificação do extrato protéico contendo a lipase

Para etapa de precipitação do extrato protéico contendo a lipase (Figura 6), o álcool preparado foi gotejado no caldo centrifugado e mantido em banho de gelo sob agitação magnética. Ao final da precipitação, o caldo foi colocado em repouso por 30 minutos para decantação da enzima e separação do sobrenadante alcoólico (Figuras 7a e 7b). Desta forma, o extrato protéico contendo a lipase foi

ressuspendido em um volume pequeno de solução tampão fosfato 0,1 mol/L a pH 7 (Figura 7c) e liofilizado (Figura 7d) para ser utilizada nos demais experimentos.

Figura 6 - Aparato utilizado na precipitação de lipase de *Geotrichum candidum* com álcool etílico a 70% de saturação.

Fonte: autoria própria

Figura 7 – (a) Álcool e extrato protéico contendo lipase precipitada no fundo do béquer de 5 litros, **(b)** Massa do extrato protéico contendo lipase após a separação do álcool **(c)** Massa do extrato protéico contendo lipase após lavagem em solução tampão fosfato 0,1 M, a pH 7, **(d)** Extrato protéico contendo lipase liofilizada.

(a)

(b)

(c)

(d)

Fonte: autoria própria

Foram produzidos cerca de 8 litros de caldo fermentado, 13 litros de caldo centrifugado, resultando em um total de 14 gramas de extrato protéico de lipase liofilizada com atividade de 1875 U/g_{lio}filizado. Ressalta-se que na etapa de precipitação foram utilizados 28 litros de álcool etílico absoluto, de maneira que, ao final do processo, o álcool foi separado do precipitado e armazenado para destilação.

Depois do processo de concentração da enzima foi analisado o fator de recuperação (FR) e o fator de concentração (FC). Os valores obtidos foram de 2,1% e 2,14 vezes, respectivamente, relacionando o início do processo (caldo bruto) e a enzima após a precipitação (Tabela 9). Esses resultados podem ser explicados pela alteração da estabilidade da lipase quando utilizado o álcool etílico na etapa de precipitação, desnaturando a enzima.

Tabela 9 – Fator de recuperação e fator de concentração relacionando etapas do processo de obtenção do extrato protéico contendo a lipase.

Processo de obtenção do extrato protéico contendo lipase		Atividade U/mL ou U/g	Volume mL ou g	FR %	FC
Início	Caldo fermentado	16	8399,03	2,09	2,14
Final	Após precipitação	34,19	82,45		
Início	Caldo fermentado	16	8399,03	19,74	117,19
Final	Após liofilização	1875	14,15		

Fonte: autoria própria.

Já em relação à enzima liofilizada e o início do processo, foram obtidos valores do FR de 19,74% e do FC foi de 117,2 vezes. Tal melhora pode ser explicada pela redução da quantidade de água e etanol na enzima liofilizada (MALDONADO, 2012).

No estudo de MALDONADO et al. (2015), foi feito uma purificação parcial da lipase de *Geotrichum candidum* utilizando etanol (70% v/v) para precipitação seguido de liofilização. O meio da fermentação da lipase foi composto de 8% (m/v) de água de maceração de milho e 0,6% (m/v) de óleo de soja, com pH inicial de 7, por 48 h a 30 °C.

Na Tabela 10, foi feito uma comparação entre os fatores de concentração e de recuperação, sendo que neste estudo, o que diferenciou foi o uso da torta de milho no meio de fermentação.

Tabela 10 – Comparação entre os fatores de concentração (FC) e de recuperação (FR) deste estudo com estudo de Maldonado et al. (2015).

Lipase	Fator de concentração e fator de recuperação (FC e FR)	Neste estudo	Maldonado et al. (2015)
Etanol saturação 70% e precipitada	FC	2,14	15,3
	FR%	2,1	36,86
Etanol saturação 70% e liofilizada	FC	117,2	64,6
	FR%	19,74	59,75

5.3. Imobilização enzimática por adsorção

5.3.1. Imobilização em casca de ovo em pó

A casca de ovo em pó foi preparada de acordo com o item 4.3.1 e a Figura 8a mostra a casca de ovo após a secagem na estufa a 60 °C por 5 horas e a Figura 8b representa o processo de formação do pó da casca de ovo. A Figura 8c mostra a casca de ovo após o processo de imobilização por adsorção do extrato protéico contendo a lipase.

Figura 8 – (a) Casca de ovo após secagem, **(b)** Peneiras com granulometria entre 16 a 36 mesh para a formação do pó, **(c)** Casca de ovo após o processo de imobilização por adsorção do extrato protéico contendo a lipase.

(a)

(b)

(c)

Fonte: autoria própria

O rendimento de adsorção do extrato protéico contendo a lipase de *Geotrichum candidum* em casca de ovo em pó foi analisado de acordo com as condições do fatorial 2^3 apresentadas na Tabela 11.

Tabela 11 - Rendimento de adsorção de lipase de *Geotrichum candidum* em cascas de ovo em pó

Ensaio	pH	Lipase (U/g)	Temperatura (°C)	Rendimento de adsorção (%)
1	6,0 (-1)	200,0 (-1)	27 (-1)	63,58
2	8,0 (+1)	200,0 (-1)	27 (-1)	107,69
3	6,0 (-1)	400,0 (+1)	27 (-1)	60,16
4	8,0 (+1)	400,0 (+1)	27 (-1)	92,45
5	6,0 (-1)	200,0 (-1)	37 (+1)	31,58
6	8,0 (+1)	200,0 (-1)	37 (+1)	55,99
7	6,0 (-1)	400,0 (+1)	37 (+1)	30,68
8	8,0 (+1)	400,0 (+1)	37 (+1)	51,82
9 pc	7,0(0)	300,0 (0)	32,0 (0)	46,46
10 pc	7,0(0)	300,0 (0)	32,0 (0)	45,64
11 pc	7,0(0)	300,0 (0)	32,0 (0)	42,93

pc – ponto central

Fonte: autoria própria

Observando a Tabela 11, nota-se que o ensaio 2 obteve o maior e melhor valor de rendimento de adsorção de lipase de *Geotrichum candidum* de 107,69% seguindo as condições de pH 8, concentração de lipase de 200 U/g e temperatura de 27°C, enquanto que quando dobrou a quantidade de lipase dissolvida no meio de 200 U/g para 400 U/g, o rendimento foi menor com 92,45% de adsorção. Os pontos centrais, ensaios 9, 10 e 11, obtiveram média e desvio padrão de 45,34% $\pm$ 1,29.

Nos ensaios 5 e 7, mantendo o pH 6 a temperatura de 37° C e dobrando a concentração da enzima, os rendimentos foram menores (31,58% e 30,68%). A temperatura de 37° C é considerada ótima para lipase em 30 minutos de reação, condição da determinação de atividade enzimática. Pode ser que este experimento conduzido por 2 horas a 37° C tenha influenciado na diminuição do rendimento.

O tempo de meia vida da lipase de *Geotrichum candidum* estudada por MALDONADO et al. (2016), é de 19 horas em pH 7 a 37° C e de 48 horas em pH 8 a 30° C. CHATTOPADHYAY e SEN, (2012); VEMURI e BANERJEE; BHATTACHARYYA (1998) apresentaram 83% e 85% de lipase retida após a imobilização na casca de ovo em pó, sendo que a temperatura ótima foi de 37° C e pH por volta de 7-8.

-Análise do planejamento fatorial 2³

Pela análise dos resultados do fatorial 2³ (Tabela 12) podem-se calcular os efeitos principais e de interação apresentados na Tabela 15. O pH e a temperatura apresentaram efeitos estatisticamente significativos a 95% de confiança, enquanto que a concentração de lipase e as interações entre as variáveis não foram estatisticamente significativas.

Pode-se verificar que o efeito do pH propiciou um ganho de 30,48% no rendimento da lipase em casca de ovo e o efeito da temperatura teve uma perda de 38,46% do rendimento. A média dos rendimentos dos ensaios foi de 57,27%.

Tabela 12 - Efeitos principais e de interação na adsorção de lipase de *Geotrichum candidum* na casca de ovo em pó.

Fator	Efeito (%)	Erro Padrão	t(4)	p-valor	LC -95,%	LC +95,%
*Média	57,27	3,69	15,51	0,00	47,02	67,52
*pH	30,48	8,65	3,52	0,02	6,44	54,52
Lipase (U/g)	-5,92	8,65	-0,68	0,53	-29,96	18,11
*T (° C)	-38,46	8,65	-4,44	0,01	-62,50	-14,42
pH x Lipase	-3,78	8,65	-0,44	0,68	-27,82	20,26
pH x T	-7,70	8,65	-0,89	0,42	-31,74	16,33
Lipase x T	3,39	8,65	0,39	0,71	-20,65	27,43

*p≤0,05 e LC-limite de confiança

Fonte: autoria própria

Outra forma de expressar os efeitos principais e de interação é pelo Diagrama de Pareto (Figura 10). As barras horizontais representam a magnitude das estimativas de efeitos divididas pelo erro padrão (efeito estimado padronizado). As barras que cruzam a linha pontilhada representam efeitos estatisticamente significativos com confiança de limite de 95% ou a p≤0,05.

Figura 9 - Diagrama de Pareto para efeito principal da temperatura, pH e concentração de lipase e suas interações na adsorção de lipase de *Geotrichum candidum* na casca de ovo em pó.

Fonte: autoria própria

Em vista disso, a temperatura e o pH são estatisticamente significativos, pois as barras horizontais cruzam a linha pontilhada e apresentam valores de efeitos estimados padronizados. O efeito da temperatura encontrado foi uma perda de 38,46% e o efeito do pH foi um ganho de 30,48% na porcentagem de adsorção do extrato protéico contendo a lipase de *Geotrichumcandidum* em casca de ovo em pó.

-Metodologia de superfície de resposta

A partir dos resultados do delineamento fatorial 2^3 (Tabela 11) foram obtidos os coeficientes de regressão, apresentados na Tabela 13.

Tabela 13 - Coeficientes de regressão do fatorial 2^3 para avaliação do rendimento da adsorção da lipase de *Geotrichum candidum* na casca de ovo.

Fator	β_i	CR	Erro Padrão	t(4)	p-valor	LC -95,%	LC +95,%
*Média	β_0	57,27	3,69	15,51	0,00	47,02	67,52
*pH	β_1	15,24	4,33	3,52	0,02	3,22	27,26
Lipase (U/g)	β_2	-2,96	4,33	-0,68	0,53	-14,98	9,06
*T ($^{\circ}$ C)	β_3	-19,23	4,33	-4,44	0,01	-31,25	-7,21
pH x Lipase	β_{12}	-1,89	4,33	-0,44	0,68	-13,91	10,13
pH x T	β_{13}	-3,85	4,33	-0,89	0,42	-15,87	8,17
Lipase x T	B_{23}	1,70	4,33	0,39	0,72	-10,32	13,71

*variáveis estatisticamente significativas a $p \leq 0,05$, β_i e CR – coeficientes de regressão, EP – Erro padrão, LC-limite de confiança.

Fonte: autoria própria

Os coeficientes de regressão estatisticamente significativos foram a média, pH e temperatura. Dessa forma, pôde-se escrever a equação de primeira ordem – modelo reduzido, Eq. (11).

$$Y(\%) = \beta_0 + \beta_1.pH + \beta_3.T = 57,27^* + 15,24.pH^* - 19,23.temperatura^* \quad (11)$$

*estatisticamente significativo a 95 % de confiança, Y(%) é o rendimento de adsorção

Portanto, conforme a equação, uma pequena variação na temperatura tem uma drástica influência na redução do rendimento, enquanto que o pH tem efeito inverso.

De acordo com a Tabela 14 da análise de variância (ANOVA) foi feito os coeficientes de regressão do modelo reduzido da Eq. (11), para o rendimento de adsorção de lipase em casca de ovo. Para que a equação 11 seja estatisticamente significativa pelo teste F, o valor do F calculado precisa ser maior que F tabelado.

A análise de variância (ANOVA) demonstrou que o F calculado foi maior que o F tabelado e o valor de R^2 foi de 89,4. Desta maneira, foram feito os gráficos de superfícies de resposta e curvas de contorno do rendimento de adsorção do extrato protéico contendo a lipase de *Geotrichum candidum* em casca de ovo em pó, relacionando a interação entre pH *versus* concentração de lipase, pH *versus* temperatura e concentração de lipase *versus* temperatura, conforme a Figura 11.

Tabela 14 - Análise de variância (ANOVA) para adsorção de lipase de *Geotrichum candidum* em casca de ovo em pó.

Fator	SQ	Graus de Liberdade	QM	F _{calc}	F _{tab}	p-valor
Regressão	4816,4	2 (p-1)	2408,2	22,93	4,46	0,000487
Resíduo	840,16	8 (n-p)	105,020 1			
Total	5656,56	10 (n-1)	565,65			
R ²	89,4					

SQ – Soma dos quadrados; QM – Quadrado médio; F_{calc} – F calculado; F_{tab}-F tabelado; n – número de ensaios totais (11); p – número de parâmetros do modelo reduzido (3)

$R^2 = \text{SQ}_R / \text{SQ}_T$; limite confiança de 95%

Fonte: autoria própria

Nas Figuras 11 (a1) e (a2), notam-se que com o aumento do pH e diminuição na concentração de lipase (U/g), o rendimento na adsorção aumenta. Nas Figuras 11 (b1) e (b2), verifica-se que quando o pH é alto e a temperatura é baixa, o rendimento de adsorção de lipase em casca de ovo em pó é maior. Já nas Figuras 11 (c1) e (c2) a diminuição da temperatura e da concentração de lipase proporcionam uma maior adsorção na casca de ovo em pó.

À vista disso, as condições para melhores rendimentos na adsorção da lipase de *Geotrichum candidum* na casca de ovo em pó abrangem as faixas de pH 8, temperatura de 27 °C e concentração de enzima de 200 U/g, conforme a Figura 11.

Figura 10 - Fatorial 2^3 - rendimento da adsorção de lipase de *Geotrichum candidum* em casca de ovo em pó. a) pH x Lipase; b) pH x Temperatura; c) Lipase x Temperatura; (1) Superfície de resposta; (2) Curva de contorno.

Fonte: autoria própria

- Cálculo dos valores de rendimento de adsorção de lipase previstos pelo modelo e seus erros gerados pelo modelo

Conforme a ANOVA (Tabela 14) pode-se observar que o modelo reduzido é estatisticamente significativo a 95% do limite de confiança e preditivo de acordo com a Tabela 15, que apresenta os valores experimentais, os previstos pelo modelo reduzido Eq. (1) para o rendimento de adsorção de lipase em casca de ovo e erros relativos.

Tabela 15 - Valores de rendimento de adsorção de lipase de *Geotrichum candidum* em casca de ovo, previstas pelo modelo e erro relativo para o fatorial 2³.

Ensaio	Rendimento de adsorção (%)	Rendimento de adsorção (%)	Erro de ajuste (EA)	Erro relativo (ER) (%)
	Experimental	Previsto pelo modelo reduzido (eq.1)		
	(Y)	($\hat{Y}$)	$EA = Y - \hat{Y}$	$ER = ((Y - \hat{Y})/Y)*100$
1	63,58	61,26	2,32	3,65
2	107,69	91,74	15,95	14,81
3	60,16	61,26	-1,1	-1,83
4	92,45	91,74	0,71	0,77
5	31,58	22,8	8,78	27,80
6	55,99	53,28	2,71	4,84
7	30,68	22,8	7,88	25,68
8	51,82	53,28	-1,46	-2,82
9 pc	46,46	57,27	-10,81	-23,27
10 pc	45,64	57,27	-11,63	-25,48
11 pc	42,93	57,27	-14,34	-33,40

*Rodrigues e Iemma, 2014, pc- ponto central

Fonte: autoria própria

De maneira geral, a análise estatística tendo sido realizada a $p < 0,05$ e a ANOVA sendo válida, observa-se erros relativos de 0,77% a 27,8%. As condições dos ensaios 2 e 4 que forneceram os melhores resultados de adsorção apresentaram o erro relativo de 14,81% e 0,77%, respectivamente. Portanto, o modelo correspondeu aos melhores resultados obtidos, visto que os resultados experimentais e previstos pelo modelo estão em boa concordância com erro relativo.

-Microscopia eletrônica de varredura (MEV) da casca de ovo, lipase e lipase imobilizada em casca de ovo

Para visualizar a microestrutura da casca de ovo, foram preparadas amostras para microscopia eletrônica de varredura (MEV) com e sem o extrato protéico contendo a lipase imobilizada. Uma estrutura semelhante a uma rede é observada na superfície interna da casca de ovo limpa, indicando que a casca de ovo consiste em fibras proteicas altamente reticuladas (diâmetro de 1–3 μm) e com cavidades, observada na Figura 12.

Figura 11 - Microscopia eletrônica de varredura (MEV) da superfície interna da casca do ovo.

Fonte: autoria própria

Pode-se visualizar na Figura 13 a estrutura do extrato protéico contendo a lipase liofilizada com um aumento de 3000 vezes. Após a imobilização, a morfologia da superfície mudou e, dessa forma, as cavidades observadas na Figura 12 foram ocupadas por aglomerados de enzimas (Figura 14), confirmando a adsorção.

CHATTOPADHYAY e SEM (2012), fizeram um estudo comparativo entre a adsorção de lipase pancreática comercial em juta e casca de ovo. Os resultados obtidos foram de 80% de retenção de lipase em casca de ovo em pó e 43% para juta. Neste estudo, as Figuras 13 e 15 mostram que a superfície interna da casca de ovo e a retenção da lipase de *Geotrichum candidum* foram similares às imagens feitas por CHATTOPADHYAY e SEM (2012).

Figura 12- Microscopia eletrônica de varredura (MEV) do extrato protéico contendo a lipase de *Geotrichum candidum* liofilizada.

Fonte: autoria própria

Figura 13 - Microscopia eletrônica de varredura (MEV) do extrato protéico contendo a lipase de *Geotrichum candidum* adsorvida na superfície da casca do ovo.

Fonte: autoria própria

5.3.2. Reutilização da lipase imobilizada em casca de ovo em pó

O experimento de reutilização do extrato protéico contendo a lipase imobilizada em casca de ovo foi realizado em septuplicatas a fim de analisar a quantidade de ciclos que a lipase continuaria aderida ao suporte. As médias das atividades da lipase (U/g de casca de ovo) e os desvios padrões foram calculados ao final de cada ciclo (Figura 15).

Figura 14 - Reutilização do extrato protéico contendo a lipase de *Geotrichum candidum* imobilizada em casca de ovo em pó.

Fonte: autoria própria

CHATTOPADHYAY e SEN (2012) observaram que a atividade da lipase pancreática comercial adsorvida em casca de ovo reduziu depois de 15-16 ciclos. Neste estudo, nota-se que a lipase de *Geotrichum candidum* imobilizada na casca de ovo em pó pode ser reutilizada por 13 ciclos.

Percebe-se que as atividades relativas mais baixas foram o 7º e 13º ciclo com 55% e 59%, respectivamente e a mais alta com 125,5% no 3º ciclo.

No estudo de GALGALI, GAWAS e RATHOD (2017), a lipase de *Candida antarctica* imobilizada em resina macroporosa para síntese de laurato de citrionelol foi submetida ao processo de reutilização. Foi observado que a taxa de conversão caiu de 96,43% para 58,67% depois de 5 ciclos. Isso pode ser explicado devido a

perda da enzima durante o processo ou a utilização no ultrassom pode ter mudado a conformação da enzima, diminuindo a atividade enzimática.

BANSODE e RATHOD (2019) relataram que a lipase comercial de *Candida antarctica* imobilizada para síntese de propionamida pôde ser reutilizada em mais de seis ciclos, sendo que no sexto ciclo a perda de lipase foi por volta de 50%.

5.4. Comportamento do extrato protéico contendo a lipase livre (LL) e lipase imobilizada em casca de ovo em pó (LIC)

Reações assistidas por ultrassom são feitas em baixa frequência para a cavitação ser estável, geralmente entre 20-50 kHz. Frequências elevadas causam mudanças conformacionais na enzima implicando na desativação das mesmas. (GALGALI; GAWAS; RATHOD, 2017).

Neste estudo, Figura 17, observa-se que a atividade enzimática do extrato protéico contendo a lipase livre (LL) e lipase imobilizada em casca de ovo em pó (LIC) aumentaram em 5 minutos de banho de ultrassom utilizando a frequência de 40 kHz a 36°C, obtendo um ganho de 14,29% e 56,47% em relação ao início. Para todos os casos, experimentos o tempo 0 representa a enzima sem tratamento.

FEITEN et al. (2014), realizaram a hidrólise enzimática de óleo de soja utilizando irradiação ultrassônica, com lipase comercial imobilizada (Lipozyme TL IM) em biorreatores do tipo batelada e batelada alimentada. Os experimentos em batelada e batelada alimentada foram feitos a 65° C, concentração de 10% em peso de ácidos graxos livres, razão molar de óleo água 1:9, potência de 132 W e agitação de 600 rpm. Em batelada, os resultados com ultrassom foram de quase 70% em peso de ácidos graxos livres em 60 minutos, enquanto que sem ultrassom foi por volta de 35% no mesmo tempo. Ou seja, a conversão dobrou quando submetido ao banho de ultrassom.

Figura 15 - Atividade relativa (%) da lipase livre (LL) e lipase imobilizada em casca (LIC) em banho de ultrassom de 0 a 55 minutos, 40 kHz e 132 W.

Fonte: autoria própria

MULINARI et al., (2017), estudaram a hidrólise de óleo de cozinha usado em sistema de ultrassom utilizando lipase de *Aspergillus niger* produzido por fermentação submersa como catalisador. Quando o tempo foi de 25 minutos, a temperatura de 45° C, potência de 132 W e 40 kHz, a atividade relativa zerou. Enquanto que neste estudo, em 20 minutos, a uma temperatura de 36° C na mesma potência e frequência, houve um ganho de 10,3% e 55,38% para LL e LIC, respectivamente, quando utilizado o banho de ultrassom para tratamento da lipase de *Geotrichum candidum*.

Adicionalmente, DALAGNOL et al. (2017) realizaram a pesquisa para melhorar a atividade enzimática da pectinase, xilase e celulase utilizando o banho de ultrassom. As enzimas (2,5 mg/mL em 0,05 M tampão citrato, pH 4,8, volume total de 5 mL) foram sonicadas individualmente em tempos diferente (0, 1, 5, 10, 15 e 30 minutos). O ultrassom favoreceu a atividade de pectinase (37° C; pH 4,8) principalmente em temperaturas mais baixas, melhorando 10% a atividade enzimática; por outro lado, a celulase (50° C, pH 4,8) e xilase (50° C, pH 5) apresentaram melhores resultados em temperaturas mais altas no ultrassom, onde a atividade foi 15 e 33% maior, respectivamente

O pré-tratamento ultrassônico pode induzir um desdobramento molecular da cadeia de proteínas, destruindo as interações hidrofóbicas das moléculas de proteínas, resultando em grupos mais hidrofóbicos e regiões internas expostas ao exterior, provendo, assim, alterações no arranjo conformacional. Essas mudanças levaram a molécula de celulase ter mais uniformidade e flexibilidade, aumentando a acessibilidade do substrato e melhorando a atividade da enzima. (DALAGNOL et al., 2017)

5.5. Aplicação do extrato protéico contendo a lipase livre (LL) e lipase imobilizada em casca de ovo em pó (LIC) na reação de esterificação com e sem ultrassom

Foi feita a reação de esterificação utilizando a proporção molar 1:3 de ácido oléico e álcool metílico, 7,5 U/g de lipase, por 1 hora a 50 °C e 200 rpm no agitador orbital e calculado o rendimento de éster para cada tratamento. Os tratamentos foram: extrato protéico contendo a lipase livre (LL), lipase imobilizada em casca de ovo em pó (LIC) e somente a casca de ovo. Todos com e sem o tratamento de banho de ultrassom (40 kHz, 132 W a 36° C) e considerando o tempo de 5 minutos que foi o melhor resultado do item anterior.

Na Tabela 16, pode-se visualizar que quando foi empregado o banho de ultrassom, o rendimento do éster aumentou em todas as condições, sendo que, o que chama atenção, é que a casca de ovo sem a presença da lipase possui um efeito catalisador ($5,53\% \pm 1,12$) e, quando aplicado o ultrassom, o rendimento de éster aumenta consideravelmente ($19,72\% \pm 1,67$).

Conforme o teste de Tukey realizado pelo Software Statistica 13.5, observa-se que as médias seguidas da mesma letra não apresentam diferença significativa, ao nível de 5%. Logo, as médias de LL, LIC com e sem aplicação de ultrassom e casca de ovo com ultrassom, não apresentaram diferença significativa entre si. Contudo, a casca de ovo em pó difere em relação às outras condições.

Tabela 16 - Valores das quadruplicatas para cada tipo de tratamento da lipase com e sem aplicação do banho de ultrassom (5 min) com frequência de 40 kHz, a 36° C o rendimento do éster produzido (%). Lipase livre (LL), lipase imobilizada em casca de ovo em pó (LIC) e somente a casca de ovo.

Ensaio	Rendimento éster %	*média
¹ LL	25,0	23,48 ± 2,23 ^A
² LL	25,76	
³ LL	21,21	
⁴ LL	21,97	
¹ LL Ultrassom	27,91	24,42± 2,23 ^A
² LL Ultrassom	24,81	
³ LL Ultrassom	22,48	
⁴ LL Ultrassom	22,48	
¹ LIC	19,7	22,54 ± 2,26 ^A
² LIC	21,97	
³ LIC	23,48	
⁴ LIC	25,0	
¹ LIC Ultrassom	23,48	25,0 ± 1,86 ^A
² LIC Ultrassom	23,48	
³ LIC Ultrassom	27,27	
⁴ LIC Ultrassom	25,76	
¹ Casca ovo	5,31	5,53 ± 1,12 ^B
² Casca ovo	5,31	
³ Casca ovo	4,42	
⁴ Casca ovo	7,08	
¹ Casca ovo ultrassom	19,51	19,72 ± 1,67 ^A
² Casca ovo ultrassom	19,51	
³ Casca ovo ultrassom	17,89	
⁴ Casca ovo ultrassom	21,95	

1,2,3 e 4 - quadruplicatas *médias marcadas com letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente entre si ($p \leq 0,5$) pelo teste de Tukey.

Fonte: autoria própria

GOLI e SAHU (2018) pesquisaram sobre a produção de biodiesel a partir de óleo de soja refinado utilizando casca de ovo como catalisador. As cascas sofreram um processo de calcinação de maneira que o componente que predominou foi óxido de cálcio (derivado do carbonato de cálcio) com cerca de 98%. O melhor rendimento de biodiesel foi de 93% nas seguintes condições: 57,5° C, 3 horas, razão molar de 10:1 de metanol e óleo, concentração de 7% em peso do ovo como catalisador.

De acordo com GALGALI; GAWAS; RATHOD (2017), o laurato de citronelol foi sintetizados através de uma reação de esterificação utilizando lipase comercial imobilizada (Novozym 435) como catalisador em um sistema livre de solvente e ultrassom como uma forma de dissipação de energia. Com isso, foram sintetizados 96,43% de laurato de citronelol em 40 minutos seguindo as seguintes condições:

razão molar de 1:4,2 de ácido láurico e citronelol, 2,11% (m/m) de enzima, 83,85 W de potência e 48,54% de ciclo de trabalho ativo (duty cycle).

BANSODE e RATHOD (2019) pesquisaram sobre a síntese propionamida catalisado pela lipase imobilizada utilizando banho de ultrassom. Nos resultados, os autores mostram a influência da frequência (22 kHz e 40 kHz) ultrassônica na amidação (lipase 3% (m/v), razão molar propionamida: butil acetato 1:1.5, 60 °C, 100 W, duty cycle 75% e 100 rpm).

A taxa de conversão final é maior quando utilizado frequência de 22 kHz (98%) do que 40 kHz (83%). Ou seja, uma frequência maior, reduz o efeito de cavitação e leva à menores taxas de reação. Embora a geração de bolhas em uma frequência mais alta seja grande, seu crescimento e intensidade de implosão são comparativamente menores que a frequência mais baixa, e isso pode ser uma possível razão para o declínio na conversão (BANSODE; RATHOD, 2019).

6. CONCLUSÃO

A produção do extrato protéico contendo a lipase de *Geotrichum candidum*, por meio da fermentação submersa, utilizando torta de milho se mostrou eficiente apresentando uma média na atividade enzimática de 21,5 U/g_{caldo bruto} após 48h de fermentação e 1875 U/g após liofilizada.

A partir dos métodos de imobilização, a lipase imobilizada em casca de ovo em pó (LIC) obteve um rendimento de adsorção de 107,69%, podendo ser reutilizada 13 vezes no processo.

O banho de ultrassom aumentou a atividade do extrato protéico contendo a lipase (LL) e lipase imobilizada em casca de ovo em pó (LIC) em 5 minutos, com um ganho de 14,29% e 56,47%, respectivamente, na condição de 36° C, 40 kHz e 132 W.

Na reação de esterificação, os resultados do ganho relacionando a aplicação da lipase de *Geotrichum candidum* aplicando ou não do banho de ultrassom foram: 4%, 10,9% e 256,5%, para LL, LIC e casca de ovo, nesta ordem, em 1 hora de reação. É interessante salientar a possibilidade da casca de ovo participar da reação como catalisador sendo que o rendimento apenas da casca foi de 5,53% sem ultrassom e de 19,72% com ultrassom.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Conforme resultados obtidos, alguns tópicos são sugeridos:

- Imobilização pelo CLEAs (da sigla em inglês - cross-linked enzyme aggregates).
- Microscopia eletrônica de varredura (MEV) da lipase adsorvida em casca de ovo após a utilização da mesma.
- Análise de Cromatografia Gasosa (GC – FID) dos produtos da reação de interesterificação.
- Calcinação da casca de ovo para testes como sendo o biocatalisador.
- Testes da lipase no banho de ultrassom com outras potências e frequências.

REFERÊNCIAS

- AKIL, E. et al. Accessing regio-and typo-selectivity of *Yarrowia lipolytica* lipase in its free form and immobilized onto magnetic nanoparticles. **Biochemical Engineering Journal**, v. 109, p. 101–111, 2016.
- AL-ZUHAIR, S.; DOWAIDAR, A.; KAMAL, H. Dynamic modeling of biodiesel production from simulated waste cooking oil using immobilized lipase. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, n. 2–3, p. 256–262, 2009.
- ALMEIDA, A. F. DE et al. Biochemical properties of free and immobilized *Candida viswanathii* lipase on octyl-agarose support: Hydrolysis of triacylglycerol and soy lecithin. **Process Biochemistry**, v. 65, n. October 2017, p. 71–80, 2018.
- ANAND, A.; WEATHERLEY, L. R. The performance of microbial lipase immobilized onto polyolefin supports for hydrolysis of high oleate sunflower oil. **Process Biochemistry**, n. January, 2018.
- BANSODE, S. R.; RATHOD, V. K. An intensified technique for lipase catalysed amide synthesis. **Chemical Engineering and Processing - Process Intensification**, v. 143, p. 107605, 1 set. 2019.
- BCC Research. Global Markets for Enzymes in Industrial Applications. Disponível em: < <https://www.bccresearch.com/market-research/biotechnology/global-markets-for-enzymes-in-industrial-applications.html>>. Acesso em: 12 fev.2020.
- BEN AKACHA, N.; GARGOURI, M. Microbial and enzymatic technologies used for the production of natural aroma compounds: Synthesis, recovery modeling, and bioprocesses. **Food and Bioprocesses Processing**, v. 94, p. 675–706, 1 abr. 2015.
- BHARDWAJ, K. K.; SAUN, N. K.; GUPTA, R. Immobilization of Lipase from *Geobacillus* sp. and Its Application in Synthesis of Methyl Salicylate. **Journal of Oleo Science J. Oleo Sci**, v. 66, n. 4, p. 391–398, 2017.
- BRUICE, P. Y.; Química Orgânica. 4ª edição, volume 2, capítulo 17, p. 113.
- CHATTOPADHYAY, S.; SEN, R. A comparative performance evaluation of jute and eggshell matrices to immobilize pancreatic lipase. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 5, p. 749–757, 1 maio 2012.
- CHIBATA, I. Immobilized enzyme research and development. John Wiley & Sons, New York, 1978, Cap 1.
- CHIPLUNKAR, P. P. et al. Ultrasound-assisted lipase catalyzed hydrolysis of aspirin methyl ester. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 40, n. January 2017, p. 587–593, 2018.
- DALAGNOL, L. M. G. et al. Improvement of pectinase, xylanase and cellulase activities by ultrasound: Effects on enzymes and substrates, kinetics and thermodynamic parameters. **Process Biochemistry**, v. 61, p. 80–87, 1 out. 2017.

DATTA, S.; CHRISTENA, L. R.; RAJARAM, Y. R. S. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. **3 Biotech**, v. 3, n. 1, p. 1–9, 2013.

DE ABREU, L. et al. Efficient purification-immobilization of an organic solvent-tolerant lipase from *Staphylococcus warneri* EX17 on porous styrene-divinylbenzene beads. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 99, p. 51–55, 2014.

DE MORAIS, W. G. et al. Optimization of the production and characterization of lipase from *Candida rugosa* and *Geotrichum candidum* in soybean molasses by submerged fermentation. **Protein Expression and Purification**, v. 123, p. 26–34, 2016.

DE SOUZA, S. P. et al. Immobilization of lipase B from *Candida antarctica* on epoxy-functionalized silica: characterization and improving biocatalytic parameters. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 93, n. 1, p. 105–111, 2018.

DOS SANTOS, P.; REZENDE, C. A.; MARTÍNEZ, J. Activity of immobilized lipase from *Candida antarctica* (Lipozyme 435) and its performance on the esterification of oleic acid in supercritical carbon dioxide. **Journal of Supercritical Fluids**, 2016.

DELGADO-POVEDANO, M. M.; LUQUE DE CASTRO, M. D. A review on enzyme and ultrasound: A controversial but fruit relationship. *Analytica Chimica Acta*, v. 889, p. 1-21, 2015

ESKIN, N. A. M. *Biotechnology: Enzymes in the food industry*. Biochemistry of foods. Second edition. Sand Diego, California: Academic Press, 1990. Cap.11.

ELISKASES-LECHNER, F.; GUEGUEN, M.; PANOFF, J. M. *Geotrichum candidum*. 2003.

FENG, H.; BARBOSA-CÁNOVAS, G. V.; WEISS, J. *Ultrasound Technologies for Food and Bioprocessing*. Springer, 2011.

FEITEN, M. C. et al. Batch and fed-batch enzymatic hydrolysis of soybean oil under ultrasound irradiation. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 3, n. 3, p. 83–85, 2014.

FERREIRA, M. M. et al. Different strategies to immobilize lipase from *Geotrichum candidum*: Kinetic and thermodynamic studies. **Process Biochemistry**, n. October 2017, 2018.

FIAMETTI, K. G. et al. Kinetics of ultrasound-assisted lipase-catalyzed glycerolysis of olive oil in solvent-free system. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 19, n. 3, p. 440–451, 2012.

FREITAS, L. et al. Enzymatic synthesis of monoglycerides by esterification reaction using *Penicillium camembertii* lipase immobilized on epoxy SiO₂-PVA composite. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 65, n. 1–4, p. 87–90, 2010.

GALGALI, A.; GAWAS, S. D.; RATHOD, V. K. Ultrasound assisted synthesis of citronellol laurate by using Novozym 435. **Catalysis Today**, n. August, 2017.

GOLI, J.; SAHU, O. **Development of heterogeneous alkali catalyst from waste chicken eggshell for biodiesel production** *Renewable Energy*, 2018.

GRICAJEVA, A. et al. Analysis of *Aspergillus* sp. lipase immobilization for the application in organic synthesis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 108, p. 1165–1175, 2018.

GUPTA, P. et al. Characterization of cross-linked immobilized lipase from thermophilic mould *Thermomyces lanuginosa* using glutaraldehyde. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 18, p. 4074–4076, 2009.

HARTWIG, S. et al. Enzymatic biodiesel synthesis from yeast oil using immobilized recombinant *Rhizopus oryzae* lipase. **Bioresource Technology**, v. 183, p. 175–180, 2015.

HORCHANI, H. et al. Enzymatic synthesis of eugenol benzoate by immobilized *Staphylococcus aureus* lipase: Optimization using response surface methodology and determination of antioxidant activity. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 8, p. 2809–2817, 2010.

ITTRAT, P. et al. Application of agriculture waste as a support for lipase immobilization. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 3, n. 3, p. 77–82, 2014.

JAVED, S. et al. Bacterial lipases: A review on purification and characterization. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 132, p. 23–34, 2018.

JIANG, C. et al. Enhanced catalytic stability of lipase immobilized on oxidized and disulfide-rich eggshell membrane for esters hydrolysis and transesterification. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 105, p. 1328–1336, 2017.

JOSHI, R.; SHARMA, R.; KUILA, A. Lipase production from *Fusarium incarnatum* KU377454 and its immobilization using Fe₃O₄ NPs for application in waste cooking oil degradation. **Bioresource Technology Reports**, 2019.

KAMIMURA, E.S. et al. Production of lipase from *Geotrichum* sp and adsorption studies on affinity resin. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.16, n.2, p.103-112, 1999.

KAMIMURA, Eliana S et al. Production of fungal lipase utilizing by-products of corn processing. In: XXI SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS XII SIMPÓSIO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BIOMASSAS, 21., 2017, Aracaju. **Simpósio**. Aracaju: ., 2017. p. 1 - 2.

KHOSLA, K. et al. Biodiesel production from lipid of carbon dioxide sequestering bacterium and lipase of psychrotolerant *Pseudomonas* sp. ISTPL3 immobilized on biochar. **Bioresource Technology**, v. 245, n. September, p. 743–750, 2017.

KOVALENKO, G. A. et al. Immobilization of recombinant *E. coli* thermostable lipase by entrapment inside silica xerogel and nanocarbon-in-silica composites. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 98, p. 78–86, 2013.

LACA, A.; LACA, A.; DÍAZ, M. Eggshell waste as catalyst: A review. *Journal of Environmental Management*, v. 197, p. 351-359.

LAGE, F. A. P. et al. Preparation of a biocatalyst via physical adsorption of lipase from *Thermomyces lanuginosus* on hydrophobic support to catalyze biolubricant synthesis by esterification reaction in a solvent-free system. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 84, p. 56–67, 2016.

LEE, J. H. et al. Biodiesel production by lipases co-immobilized on the functionalized activated carbon. **Bioresource Technology Reports**, 2019.

MACARIO, A. et al. Biodiesel production by immobilized lipase on zeolites and related materials. **Zeolites and related materials: Trends, targets and challenges, Proceedings of the 4th International FEZA Conference**, v. Volume 174, p. 1011–1016, 2008.

MARTIN, L. S. et al. Journal of Industrial and Engineering Chemistry Different organic components on silica hybrid matrices modulate the lipase inhibition by the glycerol formed in continuous transesterification reactions. p. 1–9, 2018.

MAZZEU, C. J. et al. Partitioning of *Geotrichum candidum* Lipase from fermentative crude extract by aqueous two-phase system of polyethylene glycol and sodium citrate. **Separation and Purification Technology**, v. 156, p. 158–164, 2015.

MORE, S. B.; WAGHMARE, J. T.; GOGATE, P. R. Ultrasound pretreatment as a novel approach for intensification of lipase catalyzed esterification of tricaprylin. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 36, p. 253–261, 2017.

MALDONADO, R. R. Aplicação Da Lipase De *Geotrichum Candidum* Para Biocatálise De Óleos Vegetais Com Vistas À Produção De Biodiesel. 2012.

MALDONADO, R. R. et al. Evaluation of partial purification and immobilization of lipase from *Geotrichum candidum*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, n. 3, p. 321–326, 2015.

MALDONADO, R. R. et al. A Review on *Geotrichum* Lipases: Production, Purification, Immobilization and Applications. **Chemical and Biochemical Engineering Quarterly Journal**, v. 30, n. 4, p. 439–454, 2016a.

MALDONADO, R. R. et al. Characterization of Crude and Partially Purified Lipase from *Geotrichum candidum* Obtained with Different Nitrogen Sources. p. 1355–1364, 2016b.

MATINJA, A. I. et al. Optimization of biodiesel production from palm oil mill effluent using lipase immobilized in PVA-alginate-sulfate beads. **Renewable Energy**, v. 135, p. 1178–1185, 1 maio 2019.

MATTE, C. R. et al. Synthesis of butyl butyrate in batch and continuous enzymatic reactors using *Thermomyces lanuginosus* lipase immobilized in Immobead 150. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 127, p. 67–75, 2016.

MACEDO, G.A.; PASTORE, G.M. Lipases microbianas na produção de ésteres formadores de aroma. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.17, n.2, p.115-119, 1997.

MEMARPOOR-YAZDI, M.; KARBALAEI-HEIDARI, H. R.; DOROODMAND, M. M. Enantioselective hydrolysis of ibuprofen ethyl ester by a thermophilic immobilized lipase, ELT, from *Rhodothermus marinus*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 130, p. 55–65, 2018.

MENDES, A. A. et al. Evaluation of immobilized lipases on poly-hydroxybutyrate beads to catalyze biodiesel synthesis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 50, n. 3, p. 503–511, 2012.

MICHAUX, F. et al. Immobilization and activity of *Rhizomucor miehei* lipase. Effect of the matrix properties prepared from nonionic fluorinated surfactants. **Process Biochemistry**, v. 45, n. 1, p. 39–46, 2010.

MULINARI, J. et al. Ultrasound-assisted hydrolysis of waste cooking oil catalyzed by homemade lipases. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 35, p. 313–318, 2017.

NASCIMENTO, M. DA G. et al. The use of organic solvents/ionic liquids mixtures in reactions catalyzed by lipase from *Burkholderia cepacia* immobilized in different supports. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 112, p. 1–8, 2015.

NADAR, S. S.; RATHOD, V. K. Encapsulation of lipase within metal-organic framework (MOF) with enhanced activity intensified under ultrasound. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 108, n. June 2017, p. 11–20, 2018.

NG, C. H.; YANG, K. L. Lipase in biphasic alginate beads as a biocatalyst for esterification of butyric acid and butanol in aqueous media. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 82, p. 173–179, 2016.

OLIVEIRA, A. F.; BASTOS, R. G.; DE LA TORRE, L. G. *Bacillus subtilis* immobilization in alginate microfluidic-based microparticles aiming to improve lipase productivity. **Biochemical Engineering Journal**, v. 143, p. 110–120, 15 mar. 2019.

PAQUES, F. W.; ALVES MACEDO, G. LIPASES DE LÁTEX VEGETAIS: PROPRIEDADES E APLICAÇÕES INDUSTRIAIS. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 93–99, 2006.

PEREIRA, M. G. et al. Immobilized lipase from *Hypocrea pseudokoningii* on hydrophobic and ionic supports: Determination of thermal and organic solvent stabilities for applications in the oleochemical industry. **Process Biochemistry**, v. 50, n. 4, p. 561–570, 2015a.

PEREIRA, M. G. et al. Stabilization of the lipase of *Hypocrea pseudokoningii* by multipoint covalent immobilization after chemical modification and application of the biocatalyst in oil hydrolysis. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 121, p. 82–89, 2015b.

PING, L. et al. Improvement of extracellular lipase production by a newly isolated *Yarrowia lipolytica* mutant and its application in the biosynthesis of L-ascorbyl palmitate. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 106, p. 302–311, 2018.

PINHEIRO, I.; LUIS, S.; FERREIRA, C. BIODIESEL: PARÂMETROS DE QUALIDADE E MÉTODOS ANALÍTICOS. v. 32, n. 6, p. 1596–1608, 2009.

POTTIER, I. et al. **Safety assessment of dairy microorganisms: *Geotrichum candidum***, [s.d.]. (Nota técnica).

PRABANINGTYAS, R. K. et al. **Production of immobilized extracellular lipase from *Aspergillus Niger* by solid state fermentation method using palm kernel cake, soybean meal, and coir pith as the substrate**. Energy Procedia. **Anais...**2018

PALUDO, N. et al. The combined use of ultrasound and molecular sieves improves the synthesis of ethyl butyrate catalyzed by immobilized *Thermomyces lanuginosus* lipase. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 22, p. 89–94, 2015.

PALMER, T; BONNER, P. L. **ENZYMES: Biochemistry, Biotechnology, Clinical Chemistry**. 2. ed. Chichester, Uk, United Kingdom: Elsevier Science & Technology, 2008.

PATCHIMPET, J. et al. Optimization of process variables for the production of biodiesel by transesterification of used cooking oil using lipase from Nile tilapia viscera. *Renewable Energy*, 2020.

RAMOS, E. Z. et al. Production and immobilization of *Geotrichum candidum* lipase via physical adsorption on eco-friendly support: Characterization of the catalytic properties in hydrolysis and esterification reactions. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 118, p. 43–51, 2015.

RAMACHANDRAN, K. B. et al. Kinetic study on hydrolysis of oils by lipase with ultrasonic emulsification. **Biochemical Engineering Journal**, v. 32, n. 1, p. 19–24, 2006.

RODRIGUES, M. I., & IEMMA, A. F. (2014). *Experimental design and process optimization*. CRC Press

ROMDHANE, I. B. BEN et al. Esterification activity and stability of *Talaromyces thermophilus* lipase immobilized onto chitosan. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 68, n. 3–4, p. 230–239, 2011.

ROSA, B. H. et al. Application of partially concentrated *Candida rugosa* lipase in the enzymatic synthesis of geranyl acetate in organic solvent. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 12, p. 90–95, 1 out. 2017.

SARNO, M. et al. High activity and selectivity immobilized lipase on Fe₃O₄ nanoparticles for banana flavour synthesis. **Process Biochemistry**, v. 56, p. 98–108, 2017.

SACRISTÁN, N. et al. Technological characterization of *Geotrichum candidum* strains isolated from a traditional Spanish goats' milk cheese. **Food Microbiology**, v. 30, n. 1, p. 260–266, 2012.

SALIHU, A. et al. Lipase production: An insight in the utilization of renewable agricultural residues. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 58, p. 36–44, 2012.

SARMAH, N. et al. Recent advances on sources and industrial applications of lipases. **Biotechnology Progress**, n. February, 2017.

SILVA, Guilherme de Sousa. Imobilização de lipase em matriz polimérica para produção de bioaroma. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciências da Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2012.

doi:10.11606/D.74.2012.tde-19032013-135820. Acesso em: 2018-03-22.
SIVARAMAKRISHNAN, R.; INCHAROENSAKDI, A. Direct transesterification of *Botryococcus* sp. catalysed by immobilized lipase: Ultrasound treatment can reduce reaction time with high yield of methyl ester. **Fuel**, v. 191, p. 363–370, 2017.

SILVA DIAS, G. et al. Immobilization of *Pseudomonas cepacia* lipase on layered double hydroxide of Zn/Al-Cl for kinetic resolution of rac-1-phenylethanol. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 130, p. 109365, 1 nov. 2019.

SÖRENSEN, M. H. et al. Improved enzymatic activity of *Thermomyces lanuginosus* lipase immobilized in a hydrophobic particulate mesoporous carrier. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 343, n. 1, p. 359–365, 2010.

TASKIN, M. et al. Lipase production with free and immobilized cells of cold-adapted yeast *Rhodotorula glutinis* HL25. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 8, p. 97–103, 2016.

TOMKE, P. D.; RATHOD, V. K. Ultrasound assisted lipase catalyzed synthesis of cinnamyl acetate via transesterification reaction in a solvent free medium. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 27, p. 241–246, 1 nov. 2015.

TRAN, D. T.; CHEN, C. L.; CHANG, J. S. Immobilization of Burkholderia sp. lipase on a ferric silica nanocomposite for biodiesel production. **Journal of Biotechnology**, v. 158, n. 3, p. 112–119, 2012.

TRIPATHI, R. et al. Isolation, purification and characterization of lipase from microbacterium sp. and its application in biodiesel production. **Energy Procedia**, v. 54, p. 518–529, 2014.

UPPADA, S. R. et al. Immobilized lipase from Lactobacillus plantarum in meat degradation and synthesis of flavor esters. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 15, n. 2, p. 331–334, 2017.

VEMURI, G.; BANERJEE, R.; BHATTACHARYYA, B. C. Immobilization of lipase using egg shell and alginate as carriers: Optimization of reaction conditions. **Bioprocess Engineering**, v. 19, n. 2, p. 111–114, 1998.

VERDASCO-MARTÍN, C. M. et al. Selective synthesis of partial glycerides of conjugated linoleic acids via modulation of the catalytic properties of lipases by immobilization on different supports. **Food Chemistry**, v. 245, n. August 2017, p. 39–46, 2018.

WANG, J. et al. Ultrasound irradiation accelerates the lipase-catalyzed synthesis of methyl caffeate in an ionic liquid. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 111, p. 21–28, 2015.

WANG, Z. et al. Effects of low intensity ultrasound on cellulase pretreatment. **Bioresource Technology**, v. 117, p. 222–227, 2012.

WEBER, D.; DA GRAÇA NASCIMENTO, M.; PARIZE, A. L. Immobilization of Burkholderia cepacia lipase on crosslinked chitosan-based support for the synthesis of geranyl acetate. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, 2019.

YANG, G. et al. Comparative study of properties of immobilized lipase onto glutaraldehyde-activated amino-silica gel via different methods. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 78, n. 2, p. 351–356, 2010.

YONG, Y. et al. Characterization of Candida rugosa lipase immobilized onto magnetic microspheres with hydrophilicity. **Process Biochemistry**, v. 43, n. 11, p. 1179–1185, 2008.

YUJUN, W. et al. Immobilization of lipase by ultrafiltration and cross-linking onto the polysulfone membrane surface. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 7, p. 2299–2303, 2008.

ZHANG, Q. et al. Biodiesel production using lipase immobilized on epoxychloropropane-modified Fe₃O₄sub-microspheres. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 140, p. 446–451, 2016.

ZHANG, W. W. et al. Improved activity of lipase immobilized in microemulsion-based organogels for (R, S)-ketoprofen ester resolution: Long-term stability and reusability. **Biotechnology Reports**, v. 7, p. 1–8, 2015.

ZHAO, X. et al. Lipase-catalyzed process for biodiesel production: Enzyme immobilization, process simulation and optimization. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 44, p. 182–197, 1 abr. 2015.

ZHAO, K., CAO, X., DI, Q., WANG, M., CAO, H., DENG, L., LIU, J., WANG, F., & TAN, T. (2017). Synthesis, characterization and optimization of a two-step immobilized lipase. *Renewable Energy*, 103, 383-387, 2017.