UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

PAULO RODOLFO RAMOS

Produção e aplicação da lipase de *Geotrichum candidum* obtida com soro de leite para reação de esterificação em meio supercrítico de dióxido de carbono ($SC\text{-}CO_2$)

Pirassununga
2019

PAULO RODOLFO RAMOS

Produção e aplicação da lipase de *Geotrichum candidum* obtida com soro de leite para reação de esterificação em meio supercrítico de dióxido de carbono ($SC-CO_2$)

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
Orientadora: Profª. Dra. Alessandra Lopes de Oliveira
Co-orientadora: Profª. Dra Eliana Setsuko Kamimura

Pirassununga
2019

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

R175p

Ramos, Paulo Rodolfo
Produção e aplicação da lipase de Geotrichum candidum obtida com soro de leite para reação de esterificação em meio supercrítico de dióxido de carbono / Paulo Rodolfo Ramos ; orientadora Alessandra lopes de Oliveira ; coorientadora Eliana Setsuko Kamimura. -- Pirassununga, 2019.
75 f.

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

1. Lipase. 2. Geotrichum candidum. 3. Esterificação. 4. Dióxido de carbono supercrítico. 5. SC-CO2. I. Oliveira, Alessandra lopes de, orient. II. Kamimura, Eliana Setsuko, coorient. III. Título.

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

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa Dra Alessandra Lopes de Oliveira, por ter contribuído com minha formação acadêmica e com valores morais e éticos inerentes aos profissionais da área.

À Profa Dra Eliana Setsuko Kamimura, pela contribuição nessa dissertação e na minha formação acadêmica.

Ao Prof. Rafael Resende Maldonado, pelo apoio na realização deste estudo.

À Pós Graduação da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos pela oportunidade de fazer parte do corpo discente desta universidade.

À CAPES pelo auxílio financeiro na realização desta dissertação.

Aos técnicos de laboratório Nilson José Ferreira e Marina Vieira de Carvalho pela ajuda na condução dos experimentos e pelo companheirismo e amizade.

Aos amigos do departamento de Engenharia de Alimentos.

Aos meus pais pela minha formação pessoal e apoio durante toda a vida.

Ao Frodo e à Amy, pelos momentos de carinho e brincadeiras.

À minha esposa Giselle, pelo apoio incondicional, amor e carinho durante todos esses anos.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

RESUMO

RAMOS, P. R. **Produção e aplicação da lipase de *Geotrichum candidum* com soro de leite para reação de esterificação em meio supercrítico de dióxido de carbono (SC-CO_2).** 2019. 74 f. Dissertação – (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

O intuito do estudo foi a produção e aplicação da lipase de *Geotrichum candidum*, produzida a partir do soro de leite, em reação de esterificação utilizando dióxido de carbono supercrítico como solvente meio reacional. Primeiramente foi feita a produção da lipase de *Geotrichum candidum* em fermentação submersa em frascos agitados a 200 rpm com temperatura de 30°C utilizando dois tipos de soro de leite diferente: soro de leite da produção do queijo minas frescal e soro de leite da produção de queijo tipo muçarela. A atividade enzimática máxima apresentada pela lipase de soro de minas frescal foi de 19,87 U/mL em 24 horas enquanto que a lipase de soro de muçarela apresentou atividade de 17,80 U/mL em 48 horas. Foi realizada a reação de esterificação do ácido oleico com o metanol em 3 diferentes meios (isento de solvente orgânico, com hexano como solvente e com dióxido de carbono supercrítico como solvente) utilizando as duas lipases produzidas como catalisador. A melhor condição para a reação de esterificação utilizando lipase de soro de minas frescal em meio isento de solvente foi na razão molar ácido:álcool de 1:3, concentração de lipase de 7,5 $U/g_{lipase\ liofilizada}$ e 50 °C em que apresentou rendimento de 12,65 %. Com a lipase de soro de muçarela apresentou rendimento máximo de 10,51 % em condições de razão molar 1:3, concentração de lipase 7,5 $U/g_{lipase\ liofilizada}$ e 30°C. Em meio reacional utilizando hexano e lipase de soro de minas frescal como catalisador a reação de esterificação apresentou rendimento de 11,20 $U/g_{lipase\ liofilizada}$ em condições em que a razão molar foi de 1:3, a concentração de lipase de 7,5 $U/g_{lipase\ liofilizada}$ e temperatura igual a 30°C. Já quando foi utilizado a lipase de soro de muçarela como catalisador, a reação teve rendimento de 10,10 % com razão molar ácido:álcool de 1:3, concentração de lipase em 2,5 $U/g_{lipase\ liofilizada}$ e temperatura igual a 30°C. Em meio contendo dióxido de carbono supercrítico como solvente e lipase de soro de minas frescal como catalisador, o rendimento da reação de esterificação foi de 37,73% em condições com razão molar ácido:álcool de 1:3,

concentração de lipase de 2,5 $U/g_{lipase\ liofilizada}$, pressão igual a 10MPa e temperatura igual 50°C. Com relação à reação de esterificação utilizando lipase de soro de muçarela como catalisador, em condições em que a razão molar ácido:álcool foi de 1:3, a concentração de lipase foi de 2,5 $U/g_{lipase\ liofilizada}$, a pressão foi de 10MPa e a temperatura foi de 50°C, o rendimento apresentado pela reação foi de 39,41%. A razão molar foi a variável com efeito significativo em todas as reações de esterificação estudadas. O rendimento da reação foi maior quando foi utilizado o dióxido de carbono supercrítico como solvente e meio reacional em comparação com o meio isento de solvente e com solvente orgânico, isso demonstra que o meio com CO_2 supercrítico favoreceu a reação de esterificação.

Palavras-chave: Enzima lipolítica, CO_2 supercrítico, esterificação, biocatálise.

ABSTRACT

RAMOS, P. R. **Production and application of *Geotrichum candidum* lipase with whey for esterification reaction in supercritical medium of carbon dioxide (SC-CO2).** 2019. 74 f. M. Sc. Dissertation – (MSc in Food Engineering) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

The aim of the study was to produce and apply lipase from *Geotrichum candidum*, produced from whey, in the esterification reaction using supercritical carbon dioxide as the medium reaction solvent. Firstly, the production of *Geotrichum candidum* lipase in submerged fermentation was carried out in flasks shaken at 200 rpm with a temperature of 30°C using two types of different whey: milk whey from the production of fresh minas cheese and whey from the production of cheese type. The maximum enzyme activity presented by minas frescal whey lipase was 19.87 U/mL in 24 hours whereas the whey lipase of the muçarela presented activity of 17.80 U/mL in 48 hours. The esterification reaction was carried out in 3 different media (solvent free, with hexane as organic solvent and with supercritical carbon dioxide as solvent) using the two types of lipase produced as catalyst. The best condition for the esterification reaction using whey lipase from minas frescal in solvent free medium was in the molar ratio acid:alcohol of 1:3, lipase concentration of 7.5 U/g and 50°C in which it yielded 12.65%. On the other hand, the lipase from muçarela whey showed maximum yield of 10.51% under conditions of 1:3 molar ratio, lipase concentration of 7.5 U/g and 30 ° C. In a reaction medium using organic solvent hexane and lipase from minas frescal whey as catalyst the esterification reaction showed a yield of 11.20 U/g under conditions where the molar ratio was 1:3, the lipase concentration was 7.5 U/g of lyophilized lipase and temperature equal to 30°C. When the muçarela whey lipase was used as the catalyst, the reaction had 10.10% yield with acid:alcohol molar ratio of 1:3, lipase concentration at 2.5 U/g and temperature at 30 ° C. In medium containing supercritical carbon dioxide as the solvent and lipase of minas frescal as catalyst, the yield of the esterification reaction was 37.73% under conditions

with acid:alcohol molar ratio of 1:3, lipase concentration of 2, 5 U/g, pressure equal to 10MPa and temperature equal 50 ° C. With respect to the esterification reaction using muçarela whey lipase as the catalyst, under conditions where the acid:alcohol molar ratio was 1:3, the lipase concentration was 2.5 U/g, the pressure was 10MPa and the temperature was 50°C, the yield of the reaction was 39.41%. The molar ratio was the variable with a significant positive effect in all the esterification reactions studied. The reaction yield was higher when the supercritical carbon dioxide was used as the solvent and the reaction medium in comparison to the solvent-free and organic solvent medium, this shows that the medium with supercritical CO_2 favored the esterification reaction.

Key words: Lipolytic enzyme, supercritical CO_2, esterification, biocatalysis

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Classificação das Lipases 19

Figura 2 - Reação de esterificação 29

Figura 3 - (a) Meio Yeast Malt Agar, (b) Inóculos em *slant* e placas de Petri .. 34

Figura 4 – Pré purificação da lipase 38

Figura 5 - Unidade de extração e reação em meio supercrítico 40

Figura 6 - Produto da reação de esterificação em meio supercrítico utilizando lipase de *Geotrichum candidum* e soro de leite 42

Figura 7 - Produtividade ao longo de 96 horas para a lipase obtida de soro de frescal. 44

Figura 8 - Diagrama de Pareto para os efeitos estimados na produção de lipase com soro de Minas Frescal (fatorial 2^3). 45

Figura 9 - Produtividade ao longo de 96 horas para a lipase obtida de soro de muçarela. 49

Figura 10 - Diagrama de Pareto para efeitos na produção da Lipase utilizando soro de Leite de tipo Muçarela (fatorial 2^3). 50

Figura 11 - Diagrama de Pareto dos efeitos na reação de esterificação em meio isento de solvente utilizando lipase obtida de soro de leite minas frescal. 54

Figura 12 - Diagrama de Pareto dos efeitos estimados das variáveis na reação de esterificação em meio isento de solvente utilizando lipase obtida de soro de muçarela. 56

Figura 13 - Diagrama de Pareto para os efeitos padronizados estimados das variáveis na reação de esterificação em meio contendo solvente orgânico utilizando lipase de soro de leite minas frescal. 58

Figura 14 - Diagrama de Pareto dos efeitos padronizados estimados das variáveis na reação de esterificação em meio contendo solvente utilizando Lipase SM. 60

Figura 15 - Diagrama de Pareto para os efeitos padronizados estimados na reação de esterificação em meio SC-CO_2 utilizando lipase produzido com soro de leite minas frescal..... 64

Figura 16 - Diagrama de Pareto dos efeitos padronizados estimados das variáveis na reação de esterificação em meio SC-CO_2 utilizando lipase obtida de soro de muçarela..... 66

Figura 17 - Gráfico de comparação de rendimentos..... 67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Tipos de enzimas 18

Tabela 2 - Aplicação da lipase na indústria..... 19

Tabela 3 - Fabricantes de lipases comerciais 20

Tabela 4 - Bolores utilizados para produção de lipase por via fermentativa. ... 23

Tabela 5 - Leveduras utilizadas para produção de lipases por via fermentativa. 24

Tabela 6 - Bactérias utilizadas para produção de lipase por via fermentativa. 25

Tabela 7 - Lipases utilizadas em reações de esterificação em meio supercrítico. 31

Tabela 8 - DCCR para 3 variáveis utilizando soro de queijo minas frescal para produção de lipase de *Geotrichum candidum*..... 36

Tabela 9 - DCCR para 2 variáveis utilizando soro de queijo muçarela para produção de lipase..... 37

Tabela 10 - Planejamento fatorial 2^3 para reação de esterificação em meio isento de solvente ou contendo hexano..... 39

Tabela 11 - Planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} para reação de esterificação em meio supercrítico..... 41

Tabela 12 – DCCR para avaliação da atividade enzimática ao longo de 96 horas para a lipase de *Geotrichum candidum* obtida de soro minas frescal. 43

Tabela 13 - Produtividade da lipase de *Geotrichum candidum* obtida de soro de leite do tipo minas frescal ao longo de 96 horas. 44

Tabela 14 - Análise de variância para a atividade enzimática da lipase de *Geotrichum candidum* obtida de soro de leite minas frescal (fatorial completo 2^3). 46

Tabela 15 - Análise de variância para a atividade da lipase obtida de soro de leite minas frescal (DCCR)..... 47

Tabela 16 – DCCR para avaliação da atividade enzimática ao longo de 96 horas para a lipase de *Geotrichum candidum* obtida de soro de leite tipo muçarela. 48

Tabela 17 - Produtividade da lipase obtida de soro de muçarela ao longo de 96 horas. 49

Tabela 18 - Análise de variância da produção de lipase obtida de soro de queijo tipo muçarela (fatorial completo 2^2). 50

Tabela 19 - Análise de variância para a atividade da lipase obtida soro de leite do tipo muçarela (DCCR). 51

Tabela 20 - Planejamento experimental 2^3 da reação de esterificação em meio isento de solvente orgânico utilizando lipase de soro de minas frescal. 53

Tabela 21 - Efeitos estimados das variáveis na reação de esterificação em meio isento de solvente utilizando lipase obtida de soro de minas frescal. 53

Tabela 22 - Planejamento experimental2^3 da reação de esterificação em meio isento de solvente orgânico utilizando lipase produzida com soro queijo muçarela..... 54

Tabela 23 - Efeitos estimados das variáveis na reação de esterificação em meio isento de solvente utilizando Lipase SM. 55

Tabela 24 - Planejamento experimental da reação de esterificação em meio contendo hexano utilizando lipase obtida de soro minas frescal. 57

Tabela 25 - Efeitos estimados para a reação de esterificação em meio contendo hexano utilizando lipase obtida de soro minas frescal. 57

Tabela 26 - Planejamento experimental da reação de esterificação em meio hexano utilizando lipase obtida de soro de muçarela..... 59

Tabela 27 - Efeitos estimados para as variáveis na reação de esterificação contendo hexano utilizando lipase obtida de soro de minas frescal. 59

Tabela 28 - Equações para cada tipo de reação de esterificação em pressão atmosférica. 61

Tabela 29 - Análise de variância para as reações de esterificação em pressão atmosférica. 61

Tabela 30 - Planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} para a reação de esterificação em meio SC-CO_2 utilizando lipase do soro do leite minas frescal..... 62

Tabela 31 - Efeitos estimados das variáveis para a reação de esterificação em meio SC-CO_2 utilizando lipase obtida de soro de minas frescal 63

Tabela 32 - Planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} para a reação de esterificação em meio SC-CO_2 utilizando lipase de soro de queijo tipo muçarela. . 64

Tabela 33 - Efeitos estimados para a reação de esterificação em meio SC-CO_2 utilizando a lipase obtida de soro de muçarela. 65

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 15

2. OBJETIVO 17

2.1. Objetivos específicos 17

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 18

3.1. Enzimas 18

3.2. Geotrichum candidum 21

3.2.1. Produção das lipases 22

3.2.2. Precipitação das lipases 27

3.3. Reação de esterificação 28

3.4. Fluído supercrítico 29

4. METODOLOGIA 34

4.1. Produção de lipase 34

4.2. Pré-purificação da lipase 37

4.3. Reação de esterificação 38

4.4. Método e equipamento para reação em meio supercrítico. 40

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 43

5.1. Produção da lipase 43

5.2. Reação de esterificação em pressão atmosférica 52

5.3. Reação de esterificação em meio utilizando dióxido de carbono supercrítico ($SC-CO_2$) como solvente. 62

6. CONCLUSÕES 69

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 70

1. INTRODUÇÃO

O interesse na utilização de resíduos industriais como matéria-prima para a produção de novos produtos vem crescendo nas últimas décadas e a tecnologia hoje permite que se utilizem processos com menos impacto ao meio ambiente para a transformação e reutilização de fontes que antes seriam descartadas. Entre esses resíduos pode-se citar o soro de leite proveniente da produção de queijos e a água de maceração de milho proveniente da indústria de produção de farinhas e cereais e ambos podem ser utilizados para a obtenção de lipases produzidas por microrganismos como o *Geotrichum candidum.*

Lipases são enzimas pertencentes à classe das hidrolases que catalisam as reações de quebra (lise) de ésteres de cadeias longas em alcoóis e ácidos graxos livres e podem ser utilizadas também na esterificação, transesterificação e aminólise e apresentam alta seletividade. As lipases podem ser encontradas em animais, plantas ou produzidas por microrganismos como o *Geotrichum candidum*, por exemplo (SILVA, 2012; MALDONADO et al., 2016).

Geotrichum candidum tem sido muito utilizado para a produção de lipases e pode se reproduzir em diversas condições reacionais (pH, temperatura e pressão) e diferentes fontes de carbono,de nitrogênio ou fontes de lipídeos. A lipase de *Geotrichum candidum* é ácido graxo específica, pois ela hidrolisa as ligações cis-9 em cadeias longas de ésteres e ácidos graxos e podem ser produzidas por fermentação submersa ou em estado sólido, sendo a primeira a mais comum (RATTRAY; HANSEN, 1999; DIAZ, 2007)

Comparada à fermentação em estado sólido, a fermentação submersa tem vantagens como uma maior homogeneidade do meio de cultura e maior facilidade de controle de parâmetros de processo com pH e temperatura. Entretanto apresenta algumas desvantagens como a dificuldade de troca de oxigênio no meio líquido (COLLA et al., 2016).

Entretanto, os processos enzimáticos geralmente utilizam uma grande quantidade de água como meio reacional e levando em consideração que a lipase apresenta uma boa estabilidade em fluídos pressurizados, pode-se

utilizar outros meios reacionais que acarretam menor impacto no meio ambiente, entre esses meios está o dióxido de carbono supercrítico.

Muito comum em técnicas de extração, o fluido supercrítico é considerado um solvente verde, pelo fato de não gerar efluentes tóxicos ou nocivos ao meio ambiente. Um fluido em condições supercríticas tem características intermediárias entre um líquido e um gás podendo assim tem propriedades como viscosidade e permeabilidade alteradas e benéficas à reação que se deseja realizar (CORNELIO-SANTIAGO et al., 2017; MELGOSA et al., 2017).

De acordo com a literatura consultada, não foi encontrado estudo envolvendo a produção de lipase de *Geotrichum candidum* utilizando soro de leite.

Da mesma forma, foram encontrados dois artigos envolvendo aplicação de lipase de *Geotrichum candidum* e dióxido de carbono supercrítico (SC-CO_2), mas em reações de redução de cetonas.

Levando esses aspectos em consideração, este estudo pretende fazer uma avaliação e comparação da reação de esterificação da lipase de *Geotrichum candidum* (obtida com soro de leite e água de maceração de milho) em meio reacional com dióxido de carbono supercrítico, meio contendo hexano e meio livre de solvente.

2. OBJETIVO

Avaliação do rendimento da reação de esterificação, usando como catalisador lipase produzida pelo *Geotrichum candidum,* em meio contendo soro de leite e água de maceração de milho em meio supercrítico de dióxido de carbono.

2.1. Objetivos específicos

- Produção da lipase de *Geotrichum candidum* utilizando água de maceração de milho e soro de leite minas frescal ou soro de leite de muçarela.

- Comparação da atividade enzimática de lipase produzidas com soro de leite minas frescal ou com soro de leite de muçarela

- Aplicação da lipase produzida em reação de esterificação de ácido oleico e metanol em três diferentes meios: livre de solvente, contendo hexano como co-solvente e em dióxido de carbono supercrítico

- Comparação do rendimento da reação de esterificação pela lipase nos diferentes meios reacionais.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Enzimas

As enzimas catalisam reações químicas e seu uso vem crescendo nos últimos anos devido a suas vantagens em relação a catalisadores químicos comuns. Fatores como seletividade, vida útil, rapidez de conversão de substrato em produto, especificidade, pouca ocorrência de reações secundárias e condições de reação mais brandas fazem com que reações utilizando enzimas como catalisador sejam vantajosas economicamente e benéficas ao meio ambiente (PENG et al., 2016).

Enzimas podem ser obtidas de fontes vegetais, animais ou por microrganismos originados de fungos ou bactérias. Grande parte das enzimas utilizadas em processos industriais são de origem microbiana, produzidas através de processos fermentativos e são classificadas de acordo com a função que exercem ou de sua fonte de origem. A Tabela 1 apresenta os tipos de enzimas e as definições de quais reações participam (SPIER, 2005).

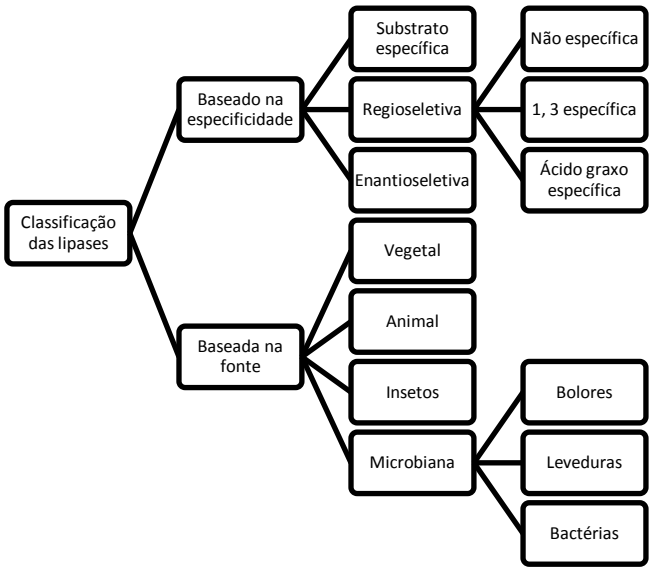
Tabela 1 - Tipos de enzimas

Classe de enzimas	Definição	Exemplo
1. Óxido-redutases	Reações de oxido-redução ou transferência de elétrons.	Desidrogenases, oxidases,catalase, peroxidase, polifenol-oxidase.
2. Transferases	Transferem grupos funcionais como amina, fosfato, acil, carboxil.	Quinasese e transferases.
3. Hidrolases	Hidrólises de ligações covalentes.	Peptidases, lipase, protease, celulase, pectinase e amilase.
4. Liases	Catalisam a quebra de ligações covalentes e a remoção de moléculas de água, amônia e gás carbônico.	Pectinaliase, dehidratases e descarboxilases.
5. Isomerases	Reações de interconversão entre isômeros óticos e geométricos.	Epimerases, glicose-isomerase.
6. Ligases	Catalisam reações de formação de novas moléculas a partir da ligação entre duas moléculas pré-existentes.	Sintetases.

Fonte: Adaptado de Knez (2009), Torres (2001) e Koblitz (2010).

Além das funções lipolíticas naturais das lipases, elas são responsáveis pela catálise da reação de hidrólise de ésteres de cadeias longas em alcoóis e ácidos graxos livres (MALDONADO et al., 2016). A Figura 1 apresenta a classificação das lipases baseado na sua especificidade e na fonte da qual a lipase é obtida e a Tabela 2 mostra algumas aplicações das lipases na indústria como alimentícia e química.

Figura 1 - Classificação das Lipases



Fonte: Adaptado de Sarmah et al. (2017)

Tabela 2 - Aplicação da lipase na indústria.

Setor	Reação
Laticínio	Hidrólise da gordura do leite
Panificação	Melhoramento da qualidade, prolongamento da vida útil de prateleira
Bebidas	Catalisador do processo fermentativo
Derivados de ovos	Melhoramento da qualidade do ovo
Processamento de carnes e peixes	Aromatização e remoção de excesso de gordura
Óleos	Esterificação de óleos naturais
Química fina	Síntese de ésteres
Detergentes	Remoção de manchas de óleo e gorduras
Farmacêutico	Digestão de óleos e gorduras de alimentos
Analítico	Análise de triacilgliceróis no sangue
Cosméticos	Remoção de lipídeos
Curtume	Remoção de gorduras das peles de animais
Diversos	Decomposição e remoção de substâncias oleosas

Fonte: Adaptado de Contesini et al. (2010), Orlandelli et al. (2012) e Barros, Fleuri e Macedo (2010).

Durante a hidrólise a lipase quebra a ligação do grupo acil do glicerol e o transfere para o grupo hidroxila (OH). O fato das lipases terem alta seletividade e especificidade e serem muito estáveis tornam-nas muito populares em indústrias como a de alimentos e cosméticos (LAGUERRE et al., 2017). Além da reação de hidrólise, as lipases são capazes de catalisar reações como aminólise, acidólise, alcoólise, esterificação e transesterificação (ORLANDELLI et al., 2010; ANGAJALA; PAVAN; SUBASHINI, 2016).

Geralmente as lipases utilizadas tanto na indústria em geral como em alguns experimentos em laboratório são lipases produzidas em grande escala em processos industriais, essas lipases são conhecidas como lipases comerciais e a Tabela 3 apresenta alguns tipos de lipases comerciais assim como seus respectivos fabricantes.

Tabela 3 - Fabricantes de lipases comerciais

Fonte	Fabricante
Aspergillus niger	Aldrich, Amano, Biocatalysts, Fluka, Novozymes e Röhm.
Aspergillus sp.	Novozymes.
Candida antarctica	A Boehringer, Fluka, Novozymes, B Fluka, Novozymes e Boehringer.
Candida cylindracea	Meito.
Candida rugosa	Aldrich, Altus, Amano, Biocatalysts, Boehringer, Fluka, Meito Sangyo, Sigma e Roche.
*Geotrichum candidum**	Amano.
Mucor miehei	Amano, Boehringer, Biocatalysts, Fluka e Novozymes
Penicillium roqueforti	Amano, Biocatalysts e Fluka.
Pseudomonas sp.	Amano, Boehringer, Fluka, Mitsubishi, Röhm e Sigma.
Rhizopus arrhizus	Biocatalysts, Boehringer, Fluka e Sigma.
Rhizopus oryzae	Amano e Sigma.
Gérmen de trigo	Fluka e Sigma
Pâncreas suíno	Aldrich, Amano, Biocatalysts, Boehringer, Fluka, Röhm e Sigma.

Fonte: Adaptado de Kuhn (2010), *atualizado neste trabalho.

Dentre as lipases mais utilizadas na indústria de alimento de encontram-se o Geotrichum fragrans e *Geotrichum candidum* que podem ser utilizados para obtenção de bioaromas e biodiesel.

3.2. Geotrichum candidum

O *Geotrichum* é conhecido como um fungo anamórfico e apenas duas espécies, de um total de 22, estão relacionadas à indústria de alimentos: o *Geotrichum candidum* e o *Geotrichum fragrans*. A produção do fungo pode ocorrer em diferentes condições de necessidades nutricionais como carbono, nitrogênio ou fontes de lipídeos, diferentes condições do meio reacional (temperatura, pH, agitação e aeração), condições de inóculo ou tipos de biorreatores (BOTHA; BOTES, 2014; MALDONADO et al., 2016).

O *Geotrichum candidum* possui uma faixa de crescimento ótima de 25°C, sendo inativado com temperaturas superiores a 55 °C e pH ideal na faixa de 7,0, sendo o mínimo de 4,6. Como a maioria dos fungos, o *Geotrichum candidum* pode ser encontrado em silagens, plantas, frutas e animais e nos alimentos, seja como parte natural ou como contaminante (DIAZ, 2007).

Está presente naturalmente no leite cru e é utilizado na indústria alimentícia geralmente no processamento e produção de queijos devido à presença de enzimas com atividades lipolíticas e proteolíticas como a lipases, que produz compostos aromatizantes e reduz o amargor do queijo (JACQUES et al., 2017; ZHU et al., 2017).

Fontes de nitrogênio orgânicas e inorgânicas são frequentemente utilizadas como substrato na produção de lipase através do *Geotrichum candidum* e várias outras fontes de substratos têm sido estudados ao longo dos anos para buscar uma produtividade maior e menor custo de processo, como o cloreto de amônia, peptona e nitrato de sódio (JAVED et al., 2018).

A faixa de concentração mais utilizada é a de 0,1% até 5,0% m/m (enzima/substrato). Pode-se ainda utilizar azeite de oliva como fonte de lipídio para se aumentar a atividade do microrganismo na produção de lipase (MALDONADO et al., 2015).

Outro importante fator que pode influenciar na produção da lipase pelo *Geotrichum candidum* é o inóculo, geralmente utilizado na forma líquida. Entretanto, alguns autores compararam a atividade enzimática utilizando inóculos inicialmente sólidos e verificaram que houve um aumento significativo dessa atividade quando comparado a reações que utilizaram inoculo no estado

líquido. Outros autores verificaram ainda que a atividade aumentava conforme a área utilizada do inoculo sólido era maior (MALDONADO et al., 2012).

A atividade e a estabilidade das enzimas são aspectos importantes para que se possa avaliar a viabilidade econômica, e a resistência a altas temperaturas e a especificidade faz com que enzimas sejam de grande valia para a indústria. Estudos relacionados à ação da lipase de *Geotrichum candidum* em ambientes industriais são escassos, mas de grande interesse da indústria de alimentos pela economia que seria gerada (MUHAMMAD et al., 2017).

3.2.1. Produção das Lipases

Os métodos de obtenção de lipases são por fermentação submersa (FS) ou fermentação em estado sólido (FES). Industrialmente, a fermentação submersa é a mais utilizada, pois favorece o controle de parâmetros como a temperatura e o pH e facilita a quantificação e a recuperação de enzimas extracelulares, além de promover maior homogeneidade do meio de cultura, se comparado à fermentação em estado sólido (SILVA, 2012).

Alguns estudos citam como desvantagem na fermentação em estado sólido a coloração do meio reacional, devido à presença de esporos de fungos e outros componentes remanescentes da extração celular. Por outro lado, a fermentação submersa traz como desvantagem a difícil transferência de oxigênio no meio reacional, que pode ser agravada no caso dos fungos pelas hifas e sua morfologia filamentosa (COLLA et al., 2016).

Vários microrganismos são capazes de produzir lipase por via fermentativa, seja ela submersa ou em estado sólido e esses microrganismos podem ser divididos em bolores (perfeitos e imperfeitos) (Tabela 4), leveduras (Tabela 5) e bactérias (Tabela 6).

Tabela 4 - Bolores utilizados para produção de lipase por via fermentativa.

Microrganismo	Autores	Ano
Aspergillus nidulans	Shukla	2014
Aspergillus niger	Ghaly et al.	2010
Aspergillus niger	Zdarta, Jesionowski e Luffa	2016
Aspergillus oryzae	Mayordomo, Randez-Gil e Prieto	2000
Aspergillus oryzae	Abe et al.	2006
Aspergillus sp.	Bagewadi et al.	2013
Colletotrichum gloeosporioides	Sande et al.	2015
Colletotrichum gloeosporioides	Gofferjé et al.	2014
Geotrichum candidum	Brabcová et al.	2013
*Geotrichum candidum**	Burkert et al.	2011*
*Geotrichum candidum**	Maldonado et al.	2012*, 2014*, 2015* e 2016*
Geotrichum sp.	Dhake, Thakare e Bhanage	2013
*Geotrichum sp.**	Kamimura et al.	2001*
Penicillium camemberti	Padhi, Haas e Bornscheuer	2012
Penicillium chrysigenum	Kumar e Negi	2015
Penicillium citrinum	Sharma D, Sharma B e Shukla	2011
Penicillium expansum	Zhao e Baker	2013
Penicillium expansum	Gutiérrez-Arnillas et al.	2016
Penicillium restrictum	Ramos-Sánchez et al.	2015
Penicillium roqueforti	Mioso et al.	2015
Penicillium simplicissimum	Thakus	2012
Penicillium solitum	Salimon, Abdullah e Salih	2012
Penicillium solitum	Chunaglia et al.	2014
Pythium ultimum	Horner, Greenville-Briggs e Van West	2012
Rhizopus chinensis	Xiao et al.	2015
Rhizomucor meihei	Gumel et al.	2011
Rhizopus oryzae	Borrelli e Trono	2015
Rhizopus oryzae	Sellami et al.	2011
Rhizopus oryzae	Kartal	2016
Rhizopus sp.	Dhake, Thakare e Bhanage	2013
Thermomyces lanuginosus	Gog et al.	2012
Yarrowia lipolytica	Gomes et al.	2013

Fonte: Adaptado de Sarmah et al. (2017) e *atualizado neste trabalho

Tabela 5 - Leveduras utilizadas para produção de lipases por via fermentativa.

Levedura	Referência	Ano
Aureobasidium pullulans	Liu et al.	2008
Candida adriatica	Cadez et al.	2012
Candida cylindracea	Kim e Hou	2006
Candida cylindracea	D'Annibale et al.	2006
Candida diddensiae	Zullo et al..	2010
Candida parapsilosis	Zullo e Ciafardini	2008
Candida parapsilosis	Zullo et al.	2010
Candida rugosa	Puthli et al.	2006
Candida rugosa	Boareto et al.	2007
Candida rugosa	Rajendran et al.	2008
Candida rugosa	Zhao et al.	2008
Candida rugosa	Rosa et al.	2017*
Candida rugosa	Tommaso et al.	2015*
Candida sp.	He e Tan	2006
Candida utilis	Grbavcic et al.	2007
Meyerozyma guilliermondii	Zullo et al.	2010
Nakazawaea (anamorph's name)	Zullo e Ciafardini	2008
Nakazawaea molendini-olei	Cadez et al.	2012
New species	Cadez et al.	2012
New species	Cadez et al.	2012
New species	Cadez et al.	2012
New species	Ciafardini e Zullo	2015
Ogataea histrianica	Cadez et al.	2013
Ogataea kolombanensis	Cadez et al.	2013
Rhodotorula mucilaginosa	Potumarthi et al.	2008
Saccharomyces cerevisiae	Ciafardini et al.	2006
Trichosporon asahii	Kumar e Gupta	2008
Williopsis californica	Ciafardini et al.	2006
Yamadazyma terventina	Ciafardini et al.	2013
Yarrowia lipolytica	Alonso et al.	2005
Yarrowia lipolytica	Fickers et al.	2006
Yarrowia lipolytica	Amaral et al.	2007
Yarrowia lipolytica	Kar et al.	2008
Yarrowia lipolytica	Lopes et al.	2009

Fonte: Adaptando de Treichel (2010) e Ciafardini (2017) e atualizado neste trabalho*

Tabela 6 - Bactérias utilizadas para produção de lipase por via fermentativa.

Bactéria	Referencia	Ano
Acinetobacter baylyi	Uttatree et al.	2010
Acinetobacter EH28	Ahmed et al.	2010
Acinetobacter radioresistens	Cherif et al.	2011
Acinetobacter XMZ-26	Zheng et al.	2011
Aeribacillus 096201	Lokre e Kadam	2015
Aneurinibacillus migulanus	Mandepudi et al.	2013
Aneurinibacillus thermoaerophilus	Masomian et al.	2016
Bacillus aerius	Saun et al.	2014
Bacillus amyloliquefaciens	Saengsanga et al.	2016
Bacillus cereus	Akanbi et al.	2010
Bacillus cereus	Ananthi et al.	2014
Bacillus DH4	Bora e Kalita	2008
Bacillus DOD9	Mahale et al.	2015
Bacillus J33 and Bacillus A30-1	Tripathi et al.	2014
Bacillus pumilus	Faouzi et al.	2015
Bacillus smithii	Chandrasekaran	2013
Bacillus sonorensis	Nerurkar et al.	2013
Bacillus sphaericus	Joseph e Ramteke	2013
Bacillus stearothermophilus, *Bacillus atrophaeus e Bacillus licheniformis*	Ashfaq	2015
Bacillus stratosphericus	Gricajeva et al.	2016
Bacillus thermocatenulatus	Khoramnia et al.	2011
Bacillus thermoleovorans	Tripathi et al.	2014
Burkholderia cepacia	Liu et al.	2011
Burkholderia multivorans	Treichel et al.	2010
Burkholderia pseudomallei	Ooi et al.	2011
Burkholderia ubonensis	Yang et al.	2016
Chromobacterium viscosum	Bajaj et al.	2010
Colwellia psychrerythraea	Do et al.	2013
Colwellia psychrerythraea	Maiangwa et al.	2015
Desulfotalea psychrophila	Maiangwa et al.	2015
Enterobacter Bn12	Farrokh et al.	2014
Enterococcus durans	Ramakrishnan et al.	2012
Enterococcus durans	Salihu e Alam	2015
Enterococcus faecium	Ramakrishnan et al.	2016

Continua

Tabela 6 - Bactérias utilizadas para produção de lipase por via fermentativa (*conclusão)*

Bactéria	Referência	Ano
Geobacillus EPT9	Zhu et al.	2015
Geobacillus stearothermophilus	Dror et al.	2015
Geobacillus stearothermophilus	Ekinci et al.	2015
Geobacillus thermodenitrificans	Christopher et al.	2015
Geobacillus thermoleovorans	Abol-Fotouh et al.	2016
Geobacillus zalihae	Lee et al.	2015
Janibacter sp.	Castilla et al.	2017
Lactococcus chungangensis	Konkit et al.	2016
Lysinibacillus mangiferihumi	Tambekar e Dhandale	2012
Microbacterium luteolum	Tripathi et al.	2014
Micrococcus luteus	Akbar et al.	2014
Pelosinus fermentans	Biundo et al.	2016
Pseudoalteromonas NJ 70	Wang et al.	2012
Pseudomnas aeruginosa	Mobarak-Qamsari et al.	2011
Pseudomonas ADT3	Dey et al.	2014
Pseudomonas aeruginosa	Bisht et al.	2012
Pseudomonas BUP6	Priji et al.	2015
Pseudomonas cepacia	Zheng et al.	2012
Pseudomonas fluorescence	Kumar et al.	2012
Pseudomonas gessardii	Ramani et al.	2010
Pseudomonas gessardii	Veerapagu et al.	2013
Pseudomonas luteola	Ribeiro et al.	2011
Pseudomonas pseudoalcaligenes	Khoramnia et al.	2011
Pseudomonas putida	Ananthi et al.	2014
Pseudomonas SPSU B3	Mandepudi et al.	2013
Pseudomonas stutzeri	Thakur et al.	2014
Psychrobacter cryohalolentis	Novototskaya-Vlasova et al.	2013
Staphylococcus	Kumar e Singh	2012
Staphylococcus sp.	Daoud et al.	2013
Staphylococcus warneri	Yele e Desai	2015
Stenotrophomonas maltophilia	Li et al.	2016
Streptomyces lividans	Wang et al.	2016
Thalassospira permensis	Kai e Peisheng	2016
Xanthomonas oryzae	Mo et al.	2016
Yersinia enterocolitica	Ji et al.	2015

Fonte: Adaptado de Javed et al. (2017)

Colla et al. (2016) utilizaram 3 modelos de delineamento fatorial para evidenciar quais variáveis foram significativas na produção da lipase de *Aspergillus niger* e *Aspergillus flavous* por fermentação submersa. Foi utilizado um delineamento Placket & Burman com 16 experimentos para avaliar o tipo de farelo (trigo ou soja), fonte de nitrogênio, indutor, concentração da fonte de nitrogênio, concentração do indutor, diâmetro do inoculo, velocidade de agitação e pH. Posteriormente, já se utilizando das condições ótimas obtidas no primeiro delineamento, fez-se um delineamento Fatorial Completo 2^3 para avaliar a influência do extrato de levedura, da concentração do óleo de soja e do pH.

Por último, foi realizado um delineamento composto central rotacional (DCCR) para 2 variáveis com 3 pontos centrais, trocando-se a faixa de pH e de extrato de levedura para uma melhor análise dos resultados obtidos. Porém, a atividade lipolítica residual não apresentou melhora quando se mudou as condições em relação ao segundo delineamento (COLLA et al., 2016).

Em outro estudo foi utilizada a *Candida rugosa* para produção de lipase usando soro de leite e uma combinação de produtos de cervejaria (leveduras e extrato de malte) em fermentação submersa. A atividade lipolítica apresentou um valor de 5,18 U/mL após 120 h de fermentação em soro de leite sem adição de outros componentes e teve um aumento de 287,5% quando se utilizou soro de leite com a mistura de produtos de cervejaria (TOMMASO et al., 2011).

Já Maldonado et al. (2014 e 2015) produziram lipase a partir de *Geotrichum candidum* utilizando dois meios de reação diferentes. O primeiro era composto de uma mistura de óleo de soja e água de maceração de milho e o segundo continha óleo de soja e hidrolisado de levedura e ambos os casos obtiveram atividade de lipase em torno de 20 U/mL após 48 horas de fermentação com as condições otimizadas do meio de fermentação.

3.2.2. Precipitação das lipases

Com relação às etapas de purificação, muitos autores descrevem processos aplicados ao *Geotrichum candidum*, entre eles pode-se citar a

precipitação com solução salina ou solvente orgânico, ultrafiltração e diferentes técnicas de cromatografia (MALDONADO et al., 2016).

Em artigo sobre revisão de *Geotrichum candidum*, Maldonado et al. (2016) apresentam alguns casos de estudos já realizados e publicados e ainda citam que uma precipitação com acetona, etanol e sulfato de amônio, ultrafiltração e extração com sistema aquoso de duas fases são eficientes e mais baratos.

A precipitação por solvente orgânico é bastante utilizada e se baseia na diminuição da constante dielétrica da solução, o que promove uma aglutinação das lipases por interação eletrostática. Este processo deve ser mantido a temperaturas próximas de 0°C para evitar desnaturação das enzimas (LIMA et al., 2001)

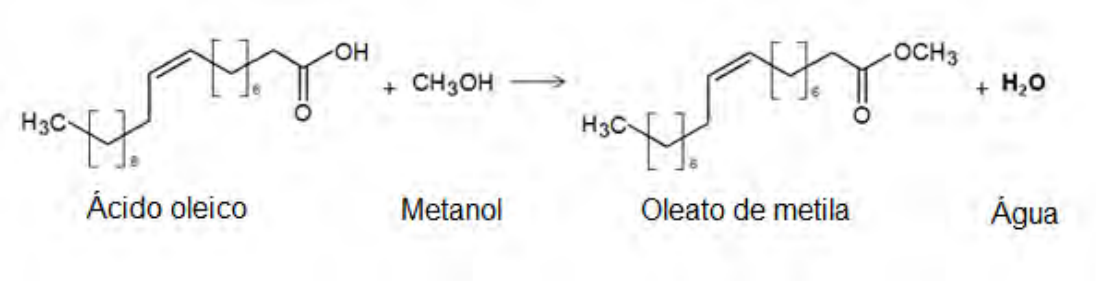
3.3. Reação de esterificação

A maioria dos processos enzimáticos convencionais utiliza uma grande quantidade de água no meio reacional, isso acarreta problemas ambientais como o descarte da água de rejeito com carga orgânica alta que demanda uma quantidade igualmente alta de oxigênio para ser degradada (PENG et al., 2016).

As lipases, por apresentar boa estabilidade em fluidos pressurizados, têm sido estudadas por alguns autores como catalisador em reações em condições supercríticas, na qual há uma alteração na característica do fluido utilizado. Dentre as reações utilizadas está a esterificação, que visa a produção de ésteres que podem utilizar lipases como catalisador bioquímico. A Figura 2 apresenta a reação de esterificação do ácido oleico como metanol, foco desse estudo (SANTOS; REZENDE; MARTÍNEZ, 2015).

Alguns autores mencionam que a adição de compostos orgânicos, como solventes ou co-solventes, nas reações de esterificação aumenta o seu rendimento e dentre os solventes mais utilizados está o hexano. Esse aumento no rendimento se deve pelo fato da polaridade do solvente afetar as propriedades enantiosseletivas da lipase. Porém em certas concentrações de hexano que torna o substrato muito diluído, esse rendimento tende e diminuir (COSTA; DE AMORIM, 1999; MOAZENI; CHEN; ZHANG, 2019).

Figura 2 - Reação de esterificação



Fonte: Adaptado de Nicolau (2009).

A reação de esterificação pode ser utilizada para a obtenção de bioaromas de interesse da indústria de alimentos ou biodiesel, que é uma fonte renovável de energia. Silva (2012) utilizou o *Geotrichum candidum* para a síntese de acetato de butila (bioaroma de abacaxi) a partir de acetato de vinila e butanos utilizando ciclo hexano como meio reacional.

Já Rosa et al. (2017), sintetizaram acetato de geranila em solvente orgânico hexano utilizando lipase de *Candida rugosa*. O acetato de geranila tem o aroma de rosas e é muito utilizado na indústria de cosméticos e alimentos.

A utilização de lipases para a produção de biodiesel e bioaromas é considerado ambientalmente benéfico e tem boa eficiência no processo de conversão de óleos em ácidos graxos livres, além de ter baixo consumo de energia (FONSECA et al., 2019).

3.4. Fluído supercrítico

Um fluido supercrítico é definido como sendo um fluido que está acima da temperatura critica T_C e da sua pressão critica P_C e apresenta propriedades físico-químicas intermediárias entre gases e líquidos. Acima do ponto conhecido como ponto critico, a substância apresenta uma única fase com viscosidade de gás, densidade de líquido e difusividade intermediária entre os dois estados. Como o fluido supercrítico apresenta um meio de reação mais homogêneo, difusividade maior e viscosidade menor, se comparado a outros solventes líquidos em condições normais, ele pode permear por espaços em que um fluido convencional não permearia, aumentando a superfície de contato

entre o fluido e outra substância, melhorando o processo que se deseja realizar (SAITO, 2013).

Outras vantagens apresentadas pelo fluido supercrítico são o aumento da transferência de calor e de massa, tornam as reações mais rápidas, são ambientalmente inofensivos quando, por exemplo, o CO_2 é recuperado no sistema e de fácil operação, podendo-se alterar a densidade do fluido apenas mudando sua pressão ou temperatura. Além disso, fluidos supercríticos são ideais para separação e extração de produtos úteis e para oxidação de materiais orgânicos. Entretanto, algumas substâncias nas condições supercríticas podem favorecer a corrosão, como a água, que pela alta concentração de oxigênio dissolvido e pH elevado cria um ambiente propício à oxidação (WEN; JIANG; ZHANG, 2009; DA SILVA; ROCHA-SANTOS; DUARTE, 2016).

Existem estudos que relatam a utilização de CO_2 supercrítico (SC-CO_2) como solvente no processo de extração de diversas matrizes. A utilização de temperaturas menores gera uma economia de energia e a ausência de solvente no meio reacional. Como no estudo de Santos et al. (2015), que utilizaram o SC-CO_2 para obter extrato de sementes de Pitanga variando a temperatura e a pressão do fluido.

Além de serem utilizados em processos físicos de extração, os fluidos supercríticos podem ser utilizados como meio reacional para reações enzimáticas como oxidação, hidrólise, esterificação e transesterificação. A Tabela 7 apresenta alguns estudos realizados referentes à esterificação.

Pode-se notar que entre os fluidos supercríticos o dióxido de carbono é o mais utilizado e vem recebendo grande atenção nos últimos anos pelo fato de ter baixa toxicidade, não prejudicial ao meio ambiente, promover taxas de difusão elevadas, menor índice de reações secundárias e principalmente pela ausência da limitação de transferência de massa. Por essas características é denominado como solvente verde (PENG et al., 2016).

Tabela 7 - Lipases utilizadas em reações de esterificação em meio supercrítico.

Fonte/Enzima	Fluído	Autores	Ano
Burkholderia cepacia	SC-CO_2	Badgujar e Bhanage	2015
Candida antarctica	SC-CO_2 e hexano	Escandell et al.	2015
Candida antarctica	SC-CO_2 e água	Housaindokhta, Bozorgmehrb e Monhemia	2011
Candida antarctica	SC-CO_2 e hexano	Knéz et al.	2012
Candida antarctica	SC-CO_2	Santos et al.	2012
Candida antarctica	SC-CO_2	dos Santos et al.	2017
Candida antarctica	SC-CO_2, trifluormetano supercrítico e líquido iônico	Primozic et al.	2015
Candida antarctica	Trifluormetano supercrítico	Kavicic, Knez e Leitgeb	2013
Candida antarctica	SC-CO_2	Colombo et al.	2014
Candida antarctica e Mucor miehei	SC-CO_2 e líquidos iônicos	Lozano et al.	2004
Candida rugosa	SC-CO_2 e propano quase crítico	Habulin e Knez	2001
Candida rugosa	SC-CO_2	Liu e Huang	2010
Candida rugosa	SC-CO_2	Liu, Chen e Yan	2013
Candida rugosa e pancreas de porco	SC-CO_2	Novak et al.	2003
Corymbia citriodora	SC-CO_2	Dogenski, Ferreira e Oliveira	2016
Euphasia superba	SC-CO_2	Xi et al.	2016
Geotrichum candidum	SC-CO_2 e água	Harada et al.	2009
Geotrichum candidum	SC-CO_2	Matsuda et al.	2008
Lipozyme RM e Novozym 435	SC-CO_2	More et al.	2018
Lipozyme RM IM e TL IM	SC-CO_2	Jenab et al.	2013

Continua

Tabela 7 - lipases utilizadas em reações de esterificação em meio supercrítico *(conclusão)*

Lipozyme TL IM	SC-CO_2	Jenab, Temelli e Curtis	2013
Lipozyme 435 e Novozym 435	SC-CO_2	Santos et al.	2016
Pseudomonas cepacia	SC-CO_2	Chen et al.	2013
Pseudomonas cepacia	SC-CO_2	Celia et al.	2005
Pseudomonas fluorescens	SC-CO_2 e propano quase crítico	Habulin e Knez	2001
Rhizomucor miehei	SC-CO_2	Melgosa et al.	2016
Rhizomucor miehei	SC-CO_2	Ma et al.	2013
Rhizopuz javanicus	SC-CO_2 e propano quase crítico	Habulin e Knez	2001
Rhizopuz niveus	SC-CO_2 e propano quase crítico	Habulin e Knez	2001
Thermomuces lanuginosa	SC-CO_2	Shin et al.	2012
Yarrowia lipolytica	SC-CO_2 e água	Gérard et al.	2017

Fonte: Autoria própria

Em contraponto às vantagens listadas, um ponto importante a se levar em consideração ao fluido supercrítico no tratamento de enzimas é a estabilidade da enzima em condições de pressão e temperaturas elevadas (supercríticas), já que em temperaturas e pressões elevadas pode ocorrer a desativação das enzimas pela desnaturação. Outros fatores que influenciam na estabilidade são o tipo da enzima, o tipo de meio reacional, a atividade da água e o número de ciclos de pressurização e despressurização. (SANTOS; REZENDE; MARTÍNEZ, 2015; PENG *et al*., 2016).

Em estudo realizado por Melgosa et al. (2016) foi avaliado a influência da razão molar inicial de substrato, da pressão e da temperatura na taxa de reação e no rendimento da etanólise de óleo de peixe catalisado pela Lipozyme RM IM em SC-CO_2. Os autores relataram que houve uma grande influência na velocidade de conversão quando se aumentou a pressão de 10 MPa para 30 MPa, mantendo-se a temperatura em 232,15K. Na proporção molar de 6:1

(etanol:óleo), a velocidade inicial de reação teve um aumento de 195% passando de 71 $\mu mol.g^{-1}.min^{-1}$ para 210 $\mu mol.g^{-1}.min^{-1}$.

Em outro estudo, Santos et al. (2016) avaliaram o efeito da concentração de enzima e substrato na produção do acetato de eugenila pela esterificação do eugenol e anidrido acético em dióxido de carbono supercrítico utilizando duas enzimas comerciais como catalisadores: a Lipozyme 435 e a Novozym 435. Foi também estudado o efeito da temperatura e pressão e foi verificado que há um aumento tanto na taxa de conversão de substrato em produto conforme se aumentam a pressão e temperatura.

Estudos com *Geotrichum candidum* em SC-CO_2 são escassos, entretanto, Matsuda *et al*. (2008) utilizaram a lipase comercial de *Geotrichum candidum* NBCR 5767 imobilizada em resina de troca iônica de polialilamina para a redução de cetonas em meio aquoso normal e em meio com SC-CO_2 e descreveram que várias cetonas foram reduzidas com elevada seletividade e Harada *et al.* (2009), em outro estudo, desenvolveram um novo método para redução de cetonas pela álcool desidrogenase, com lipase obtida de *Geotrichum candidum*, em um sistema bifásico de água e dióxido de carbono supercrítico.

Estudos referentes à lipase obtida de *Geotrichum candidum* não comercial são escassos e levando em consideração as vantagens apresentadas pelas enzimas em relação aos métodos catalíticos químicos comuns, especialmente as lipases, e que as condições supercríticas têm influência no comportamento, atividade residual e estrutura conformacional, um estudo para um melhor entendimento das características afetadas por esse processo é importante.

4. METODOLOGIA

4.1. Produção de lipase

O micro-organismo utilizado foi o *Geotrichum candidum* Y-552, gentilmente cedido pela NRRL dos EUA. A escolha desse micro-organismo foi feita devido a sua comprovada capacidade na produção de lipase verificada em diversos estudos anteriores conforme citado em Maldonado et al. (2016).

O microorganismo foi armazenado em tubos de ensaio contendo meio Yeast Malt Agar (YM) (%m/v: 0,3% extrato de malte, 0,3% extrato de levedura, 0,5% peptona, 1,0% de glicose e 3,0% agar bacteriológico) mantidos a 4°C. O inóculo foi obtido pelo cultivo do micro-organismo em placas de Petri contendo meio YM incubadas por 48 horas a 30 °C. Após esse período uma área circular de diâmetro 1 cm foi recortada do meio com auxílio de um tubo de ensaio estéril e foram transferidos para meio de pré-fermentação (5,0% peptona, 0,25% de amônio sulfato e 1% de óleo de milho) com tempo de incubação de 24 h. A Figura 3 (a) mostra o meio Yeast Malt Agar enquanto que a Figura 3 (b) apresenta os tubos de ensaio (*slant*) onde foi armazenado o microrganismo e as placas de Petri contendo o *Geotrichum candidum*.

Figura 3 - (a) Meio Yeast Malt Agar, (b) Inóculos em *slant* e placas de Petri

Fonte: Autoria própria

Após o período de pré-fermentação foi feita a transferência de alíquota do meio de pré-fermentação para os meios de fermentação na razão de 10% v/v. (MALDONADO et al., 2015)

A composição dos meios de fermentação foi estudada a partir de uma estratégia de planejamento fatorial para avaliar o efeito da concentração de cada componente do meio de fermentação. Os componentes do meio avaliados foram água de maceração de milho, óleo de milho e soro do leite utilizado na fabricação de queijo Minas Frescal ou soro do leite utilizado na fabricação de queijo muçarela (RODRIGUES; IEMMA, 2005).

A escolha desses componentes baseou-se em estudo anterior que demonstrou o potencial da água de maceração de milho (subproduto do processamento do milho) e do soro (subproduto do processamento de queijos) como nutrientes para produção de lipase por *Candida rugosa.* Além disso, o óleo de milho também tem se mostrado um indutor eficiente para produção de lipases por fungos. Água de maceração de milho foi gentilmente doada pela empresa Ingredion (Mogi Guaçu, São Paulo, Brasil), tanto o soro de leite da produção de queijo minas frescal quanto o da produção de queijo muçarela foram gentilmente doados pelo Laticínio Escola do campus USP Fernando Costa da Universidade de São Paulo (Pirassununga, São Paulo, Brasil) e o óleo de milho, da marca Liza (Gargill, Brasil), foi adquirido em supermercado local (TOMMASO et al., 2011; RIBEIRO et al., 2015; MELQUIDES et al., 2016).

A fermentação foi realizada por meio de fermentação submersa em frascos agitados. Foi utilizado um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para 3 variáveis para o soro do queijo minas fresca e um DCCR para 2 variáveis para o soro de queijo tipo muçarela para avaliar as condições mais indicadas para a fermentação em grande quantidade.

Estas condições foram escolhidas baseando-se no estudo preliminar publicado por Zitongo et al. (2017) em que foi feito um planejamento fatorial para a produção de lipase utilizando soro como fonte de carbono. Foi identificado que as variáveis com efeitos significativos quando utilizado soro de leite minas frescal foram água de maceração de milho, o soro de leite e o pH. Já quando se utilizou o soro de leite de muçarela, as variáveis com efeito significativo foram a água de maceração de milho e a concentração de soro no meio reacional.

As fermentações foram conduzidas em *Erlenmeyers* de 250 mL contendo 100 mL de meio de fermentação a 30 °C, com agitação de 200 rpm e amostragens a cada 24 horas para análise da atividade enzimática (U). Sendo

que 1 U equilave a 1 µmol de ácido graxo liberado por minuto (MALDONADO et al., 2012).

A Tabela 8 e a Tabela 9 apresentam o planejamento experimental utilizado para a avaliação e identificação das condições ótimas do processo para a produção das lipases utilizando o soro de leite do tipo minas frescal e do tipo muçarela, respectivamente. A determinação da atividade enzimática nesta etapa foi realizada de acordo com método descrito por Burkert et al. (2005).

Tabela 8 - DCCR para 3 variáveis utilizando soro de queijo minas frescal para produção de lipase de *Geotrichum candidum*.

Ensaio	AMM	Soro	pH
1	7,02% (-1)	56,07% (-1)	5,4 (-1)
2	12,98% (+1)	56,07% (-1)	5,4 (-1)
3	7,02% (-1)	73,93% (+1)	5,4 (-1)
4	12,98% (+1)	73,93% (+1)	5,4 (-1)
5	7,02% (-1)	56,07% (-1)	6,6 (+1)
6	12,98% (+1)	56,07% (-1)	6,6 (+1)
7	7,02% (-1)	73,93% (+1)	6,6 (+1)
8	12,98% (+1)	73,93% (+1)	6,6 (+1)
9 pc	10% (0)	65% (0)	6 (0)
10 pc	10% (0)	65% (0)	6 (0)
11 pc	10% (0)	65% (0)	6 (0)
12 pc	10% (0)	65% (0)	6 (0)
13	5% (-1,68)	65% (0)	6 (0)
14	15% (+1,68)	65% (0)	6 (0)
15	10% (0)	50% (-1,68)	6 (0)
16	10% (0)	80% (+1,68)	6 (0)
17	10% (0)	65% (0)	5 (-1,68)
18	10% (0)	65% (0)	7 (+1,68)

AMM – Água de maceração de milho; pc - ponto central

Fonte: Autoria própria

Tabela 9 - DCCR para 2 variáveis utilizando soro de queijo muçarela para produção de lipase.

Ensaio	AMM	Soro
1	6,4% (-1)	22,9% (-1)
2	13,6% (+1)	22,9% (-1)
3	6,4% (-1)	37,1% (+1)
4	13,6% (+1)	37,1% (+1)
5	10% (0)	30% (0)
6	10% (0)	30% (0)
7	10% (0)	30% (0)
8	10% (0)	30% (0)
9	5% (-1,41)	30% (0)
10	15% (+1,41)	30% (0)
11	10% (0)	20% (-1,41)
12	10% (0)	40% (+1,41)

AMM – Água de maceração de milho; pc - ponto central

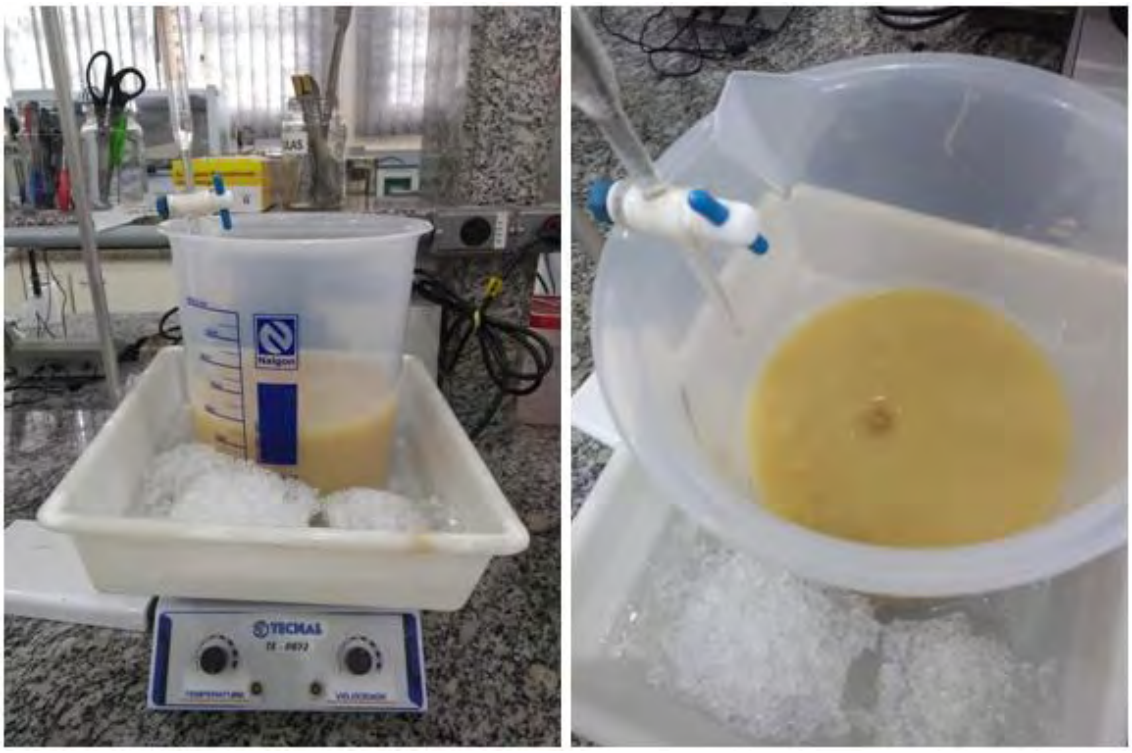
Fonte: Autoria própria

4.2. Pré-purificação da lipase

A partir dos meios otimizados na etapa anterior foram realizadas fermentações em maior volume para produção da enzima para as aplicações propostas neste estudo. Após a fermentação, o caldo bruto obtido foi centrifugado em equipamento centrifuga 5430 R da marca Eppendorf a aproximadamente 500g (3000 rpm) 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) e adaptado neste trabalho.

A precipitação da enzima foi realizada com etanol (99% v/v) adicionado ao caldo bruto com velocidade constante de 15 mL/min em um sistema com agitação magnética com controle de temperatura a 0° C. A adição de etanol, na razão 2:1 (etanol: caldo bruto), foi feita com auxílio de bureta até a concentração final de etanol atingir saturação de 70% v/v. A Figura 4 mostra o sistema de precipitação utilizado neste trabalho.

Figura 4 – Pré purificação da lipases



Fonte: Autoria própria

Após período de decantação de 30 minutos, o material foi centrifugado a 5000 rpm por 3 minutos para separação da enzima precipitada do restante do caldo. A enzima foi então ressuspendida em pequeno volume de tampão fosfato 0,1 mol/L pH igual a 7,0, congelada e na sequência liofilizada em liofilizador da marca Terroni -LC 1500 para ser utilizada nas reações de esterificação em meio isento de solvente, com solvente orgânico e em meio SC-CO_2. (MALDONADO et al., 2015).

4.3. Reação de esterificação

O modelo de reação avaliado foi de esterificação de ácido oleico com metanol conforme descrita por Maldonado (2012) e adaptada neste trabalho. A reação à pressão ambiente foi feita em Erlenmeyer de 125 mL sob agitação constante em *shaker* da marca Tecnal TE-420 a temperatura constante durante 1 hora inicialmente sem a adição de solvente orgânico. As variáveis avaliadas na reação de esterificação foram a razão molar ácido:álcool, a quantidade de lipase e a temperatura. Foi utilizado um planejamento fatorial completo para 3 variáveis independentes para avaliação das variáveis que influenciam no

processo tanto para as lipases produzidas com o soro de leite minas frescal quanto para àquelas produzidas com o soro de queijo tipo muçarela.

Foi realizada uma reação de esterificação em meio supercrítico de dióxido de carbono para avaliar como as condições supercríticas influenciavam na reação. As condições de temperatura e pressão para a reação em meio supercrítico foram pré definidas com base na temperatura de produção da lipase de *Geotrichum candidum* apresentada em alguns artigos e na temperatura e pressão na qual o dióxido de carbono apresenta características de fluido supercrítico (T>31,1°C e P>7,38MPa) (MATSUDA; HARADA; NAKAMURA, 2005; MALDONADO et al., 2016)

A Tabela 10 apresenta o delineamento experimental 2^3 utilizado para a reação de esterificação em meio isento de solvente orgânico em pressão atmosférica e as variáveis analisadas foram a razão molar entre ácido e álcool, a quantidade de lipase de soro de minas frescal ou lipase de soro de muçarela utilizada e a temperatura. O mesmo planejamento foi feito para a reação de esterificação utilizando hexano no meio reacional. Neste caso, adicionou-se hexano na proporção 10%v/v em relação ao metanol e seguiram-se as etapas subseqüentes da mesma maneira que se procedeu na reação isento de solvente orgânico.

Tabela 10 - Planejamento fatorial 2^3 para reação de esterificação em meio isento de solvente ou contendo hexano.

Ensaio	Razão Molar (ácido:álcool)	Lipase (U/g)	Temperatura (°C)
1	1:1 (-1)	2,5 (-1)	30 (-1)
2	1:3 (+1)	2,5 (-1)	30 (-1)
3	1:1 (-1)	7,5 (+1)	30 (-1)
4	1:3 (+1)	7,5 (+1)	30 (-1)
5	1:1 (-1)	2,5 (-1)	50 (+1)
6	1:3 (+1)	2,5 (-1)	50 (+1)
7	1:1 (-1)	7,5 (+1)	50 (+1)
8	1:3 (+1)	7,5 (+1)	50 (+1)
9 pc	1:2 (0)	5,0 (0)	40 (0)
10 pc	1:2 (0)	5,0 (0)	40 (0)
11 pc	1:2 (0)	5,0 (0)	40 (0)
12 pc	1:2 (0)	5,0 (0)	40 (0)

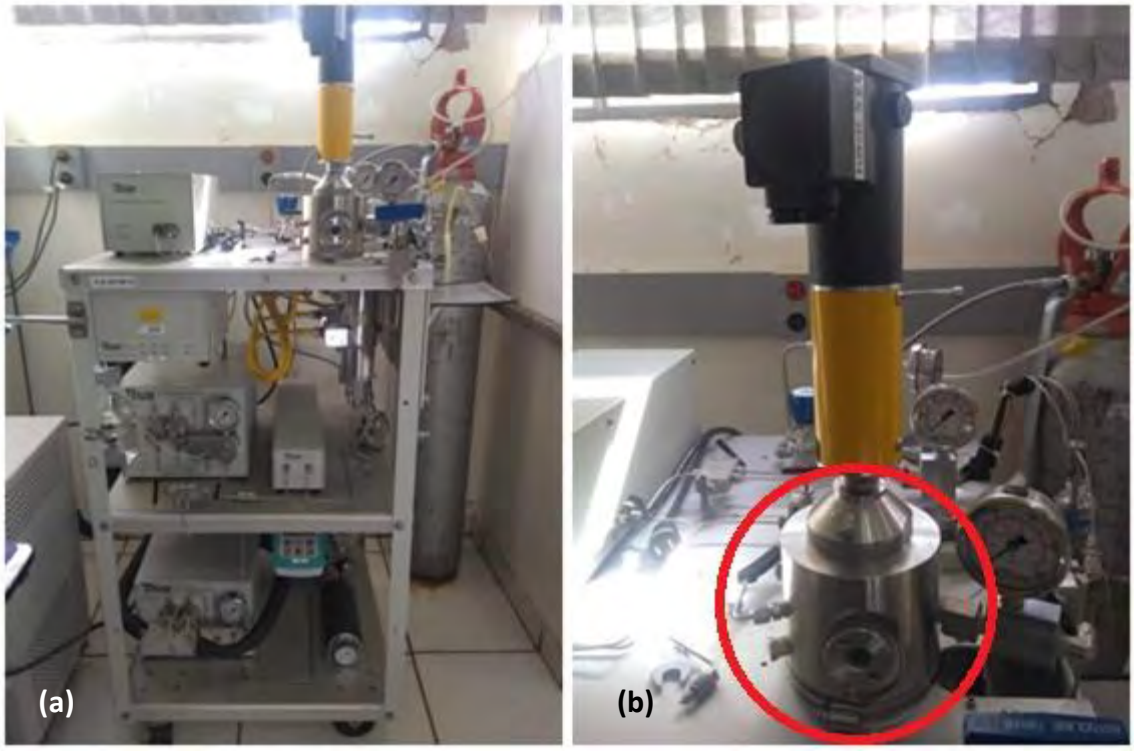
*planejamento utilizado para as lipases produzidas com o soro de leite de queijo minas frescal ou com soro de leite do tipo muçarela. pc – ponto central.

Fonte: Autoria própria

4.4. Método e equipamento para reação em meio supercrítico.

Os experimentos foram realizados usando uma unidade de extração e reação em meio supercrítico em escala laboratorial SFE-500 (Thar SCF Waters, Milford, USA) com uma célula de extração e uma autoclave ou câmara de reação. Esta unidade, presente no Laboratório de Tecnologia de Alta Pressão e Produtos Naturais (LTAPPN ZEA – USP) é basicamente constituída de um cilindro com CO_2, um banho de resfriamento (Thermo Fisher Scientific, Newington, EUA), um medidor de vazão, uma bomba de alta pressão, uma bomba de cossolvente, um frasco de vidro de para armazenar o cossolvente, válvulas de regulagem tipo agulha, um misturador de solvente, um trocador de calor, um extrator cilíndrico (~300 mL de capacidade), termostatos, um manômetro de tipo Bourdon, um regulador de contrapressão automatizado (ABPR), coletores e uma autoclave para reações ou formação de partículas em meio supercrítico. O sistema é automático e sua operação é feito por meio do software Thar SFC. A Figura 5a mostra a Unidade de Extração e Reação e a Figura 5b, a câmara onde ocorreu a reação de esterificação.

Figura 5 - Unidade de extração e reação em meio supercrítico (a); Câmara de reação (b).



Fonte: Autoria própria

Para reação em meio supercrítico a mistura dos reagentes foi introduzida no reator (autoclave) juntamente com a enzima. O sistema foi pressurizado com CO_2 em pressões fixas em 10, 20 e 30 MPa e temperaturas fixas em 30°C, 40°C e 50°C e promovida a agitação do sistema reacional de 200 rpm por 1 horas. Foi utilizado um delineamento fatorial fracionário 2^{4-1} para a avaliação das variáveis razão molar ácido:álcool, massa de lipases, temperatura e pressão. A Tabela 11 apresenta o planejamento experimental para a reação.

Tabela 11 - Planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} para reação de esterificação em meio supercrítico

Ensaio	Razão Molar (ácido:álcool)	Lipase (U/g)	Pressão (MPa)	Temperatura (°C)
1	1:1 (-1)	2,5 (-1)	10 (-1)	30 (-1)
2	1:3 (+1)	2,5 (-1)	10 (-1)	50 (+1)
3	1:1 (-1)	7,5 (+1)	10 (-1)	50 (+1)
4	1:3 (+1)	7,5 (+1)	10 (-1)	30 (-1)
5	1:1 (-1)	2,5 (-1)	30 (+1)	50 (+1)
6	1:3 (+1)	2,5 (-1)	30 (+1)	30 (-1)
7	1:1 (-1)	7,5 (+1)	30 (+1)	30 (-1)
8	1:3 (+1)	7,5 (+1)	30 (+1)	50 (+1)
9	1:2 (0)	5,0 (0)	20 (0)	40 (0)
10	1:2 (0)	5,0 (0)	20 (0)	40 (0)
11	1:2 (0)	5,0 (0)	20 (0)	40 (0)
12	1:2 (0)	5,0 (0)	20 (0)	40 (0)

pc – ponto central

Fonte: Autoria própria

Após a reação o sistema foi despressurizado de maneira lenta 1 MPa/min e o meio residual foi recolhido. A Figura 6 mostra o meio residual retirado do equipamento após a reação de esterificação. Nota-se que o aspecto viscoso e de coloração branca se deve ao fato do meio residual ser uma mistura dos reagentes (ácido oleico e metanol) com o dióxido de carbono. Conforme o CO2 se dissipa, a cor e textura da solução voltam ao normal, com coloração amarela pálida e aspecto viscoso.

Figura 6 - Produto da reação de esterificação em meio supercrítico utilizando lipase de *Geotrichum candidum* e soro de leite

Fonte: Autoria própria

Alíquotas de 1 mL de cada produto da reação de esterificação tanto em meio a pressão atmosférica quanto em ambiente pressurizado foram retiradas e adicionadas em Erlenmeyer contendo 10 mL de solução acetona:etanol (1:1) para que a reação parasse. A quantidade de ácido oleico residual foi mensurada por meio de titulação com solução da NaOH 0,1 mol/L e fenolftaleína como indicador. A partir da quantidade de ácidos graxos formado foi calculado estequiometricamente a porcentagem de conversão da reação (DOS SANTOS; REZENDE; MARTÍNEZ, 2016).

Os resultados obtidos em meio supercrítico foram comparados com a mesma reação realizada em meio com solvente orgânico (hexano) e em meio isento de solvente (*solvent free*).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Produção das lipases

A análise das condições de produção da lipase de *Geotrichum candidum* produzida com soro de leite minas frescal foi conduzida verificando-se a atividade ao longo de 96 horas com intervalo de medição de 24h. A Tabela 12 apresenta o planejamento experimental com os respectivos valores das atividades enzimática média no período de análise.

Tabela 12 – DCCR para avaliação da atividade enzimática ao longo de 96 horas para a lipase de *Geotrichum candidum* obtida de soro minas frescal.

				Atividade (U/mL)			
Ensaio	AMM (%m/v)	Soro (%m/v)	pH	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas
1	7,02 (-1)	56,07 (-1)	5,4 (-1)	13,95	18,98	18,69	16,91
2	12,98 (+1)	56,07 (-1)	5,4 (-1)	16,91	14,74	14,74	13,75
3	7,02 (-1)	73,93 (+1)	5,4 (-1)	12,57	18,69	19,48	19,77
4	12,98 (+1)	73,93 (+1)	5,4 (-1)	10,79	12,76	12,27	11,78
5	7,02 (-1)	56,07 (-1)	6,6 (+1)	13,06	11,38	10,49	10,20
6	12,98 (+1)	56,07 (-1)	6,6 (+1)	12,37	11,78	10,79	10,49
7	7,02 (-1)	73,93 (+1)	6,6 (+1)	17,11	10,79	10,30	9,80
8	12,98 (+1)	73,9% (+1)	6,6 (+1)	15,73	10,99	10,30	10,00
9 (pc)	10 (0)	65 (0)	6 (0)	12,37	12,17	12,37	12,37
10 (pc)	10 (0)	65 (0)	6 (0)	13,36	15,43	10,40	8,82
11 (pc)	10 (0)	65 (0)	6 (0)	16,61	13,26	11,48	9,80
12 (pc)	10 (0)	65 (0)	6 (0)	12,47	12,76	11,98	10,79
13	5 (-1,68)	65 (0)	6 (0)	14,94	10,30	10,30	9,80
14	15 (+1,68)	65 (0)	6 (0)	17,50	14,15	15,23	15,23
15	10 (0)	50 (-1,68)	6 (0)	18,69	15,43	17,70	15,23
16	10 (0)	80 (+1,68)	6 (0)	19,87	17,31	19,97	20,07
17	10 (0)	65 (0)	5 (-1,68)	14,74	16,22	12,67	12,76
18	10 (0)	65 (0)	7 (+1,68)	14,34	14,34	12,47	11,78

AMM – Água de maceração de milho; pc – ponto central

Fonte: Autoria própria

A atividade enzimática medida ao longo de 96 horas apresentou decréscimo na maioria dos ensaios, tendo seu máximo atingido nas primeiras 24 horas em condições AMM 10% (m/v), soro 80% (m/v) e pH 6. Os valores de atividade nessas condições, atingidas no ensaio 16, em 24 e 48 horas foram de

19,87 U/mL e 17,31 U/mL, respectivamente. Pode-se notar que uma maior porcentagem de água de maceração e de soro contribuem para uma maior atividade da lipase. Pode-se notar também que em alguns ensaios a atividade enzimática aumentou após o período de 48 horas, porém estes resultados foram descartados pelo fato da produtividade cair drasticamente após o período de 48 horas. A Tabela 13 mostra as produtividades ao longo de 96 horas e a Figura 7 apresenta o gráfico da produtividade dos ensaios 1, 3 e 16 em função do tempo de fermentação.

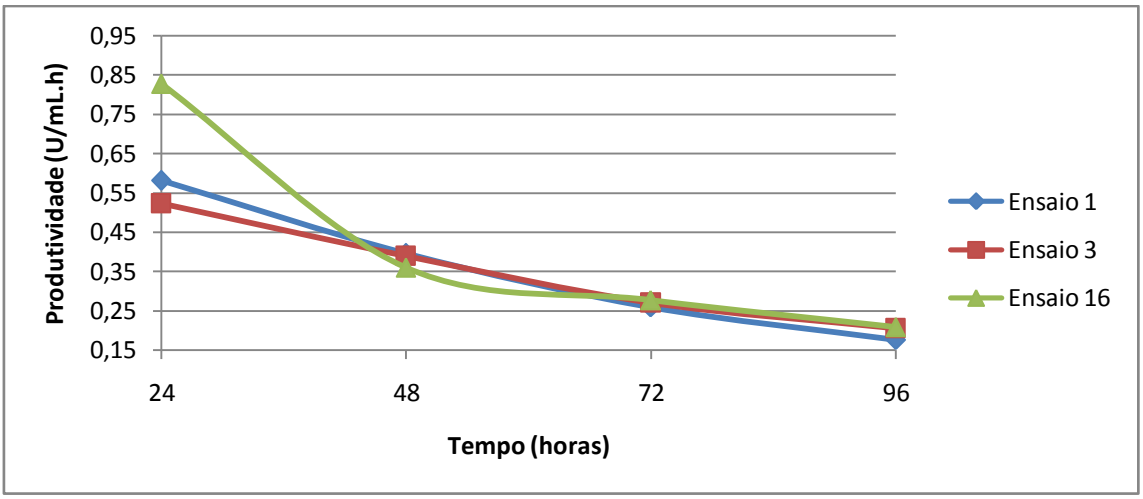
Tabela 13 - Produtividade da lipase de *Geotrichum candidum* obtida de soro de leite do tipo minas frescal ao longo de 96 horas.

				Produtividade (U/mL.h)			
Ensaio	AMM (%m/v)	Soro (%m/v)	pH	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas
1	7,02 (-1)	56,07 (-1)	5,4 (-1)	0,58	0,40	0,26	0,18
2	12,98 (+1)	56,07 (-1)	5,4 (-1)	0,70	0,31	0,20	0,14
3	7,02 (-1)	73,93 (+1)	5,4 (-1)	0,52	0,39	0,27	0,21
4	12,98 (+1)	73,93 (+1)	5,4 (-1)	0,45	0,27	0,17	0,12
5	7,02 (-1)	56,07 (-1)	6,6 (+1)	0,54	0,24	0,15	0,11
6	12,98 (+1)	56,07 (-1)	6,6 (+1)	0,52	0,25	0,15	0,11
7	7,02 (-1)	73,93 (+1)	6,6 (+1)	0,71	0,22	0,14	0,10
8	12,98 (+1)	73,93 (+1)	6,6 (+1)	0,66	0,23	0,14	0,10
9 (pc)	10 (0)	65 (0)	6 (0)	0,52	0,25	0,17	0,13
10 (pc)	10 (0)	65 (0)	6 (0)	0,56	0,32	0,14	0,09
11 (pc)	10 (0)	65 (0)	6 (0)	0,69	0,28	0,16	0,10
12 (pc)	10 (0)	65 (0)	6 (0)	0,52	0,27	0,17	0,11
13	5 (-1,68)	65 (0)	6 (0)	0,62	0,21	0,14	0,10
14	15 (+1,68)	65 (0)	6 (0)	0,73	0,29	0,21	0,16
15	10 (0)	50 (-1,68)	6 (0)	0,78	0,32	0,25	0,16
16	10 (0)	80 (+1,68)	6 (0)	0,83	0,36	0,28	0,21
17	10 (0)	65 (0)	5 (-1,68)	0,61	0,34	0,18	0,13
18	10 (0)	65 (0)	7 (+1,68)	0,60	0,30	0,17	0,12

AMM – Água de maceração de milho; pc – ponto central

Fonte: Autoria própria

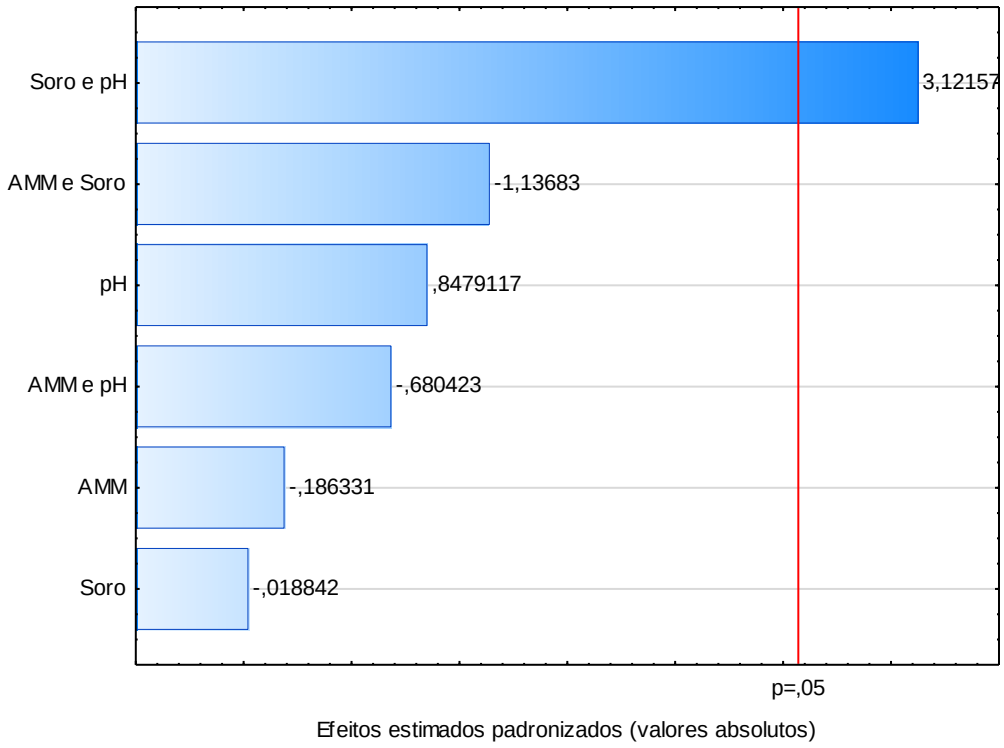
Figura 7 - Produtividade ao longo de 96 horas para a lipase obtida de soro de frescal.



Fonte: Autoria própria

Foi realizada uma análise do planejamento fatorial 2^3 utilizando os ensaios de 1 a 12 da Tabela 12 (8 ensaios caracterizando o fatorial completo 2^3 mais 4 pontos centrais) e a Figura 8 mostra o gráfico de Pareto para os efeitos padronizados estimados a 95% do limite de confiança para a lipase de *Geotrichum candidum*.

Figura 8 - Diagrama de Pareto para os efeitos estimados na produção de lipase com soro de Minas Frescal (fatorial 2^3).



Fonte: Autoria própria.

Pode-se notar pelo Diagrama de Pareto que apenas o efeito de interação entre o soro do leite e o pH foi estatisticamente significativo a 95% do limite de confiança a Eq. (1) apresenta o modelo de primeira ordem obtido pelos coeficientes de regressão do fatorial 2^3 e a Tabela 14 apresenta a ANOVA para esses coeficientes.

Atividade enzimática (U/mL) = 13,94* - 0,22.AMM – 0,02.Soro +1,01pH – 1,36.AMM.Soro – 0,81.AMM.pH + 3,73.Soro.pH* (1)

*estatisticamente significativo a 95 % de confiança

Tabela 14 - Análise de variância para a atividade enzimática da lipase de *Geotrichum candidum* obtida de soro de leite minas frescal (fatorial completo 2^3).

Fator	SQ	Graus de Liberdade	QM	F_{calc}	F_{tab}	p-valor
Regressão	34,94	6	5,82	2,45	4,95	0,15
resíduo	14,26	6	2,38			
Total	49,20					
R^2	0,71					

SQ – Soma dos quadrados; QM – Quadrado médio; F_{calc} – F calculado; F_{tab}-F tabelado

$R^2=SQ_R/SQ_r$; limite confiança de 95%

Fonte: Autoria própria.

Nota-se que conforme mostram a Tabela 14 da ANOVA do modelo de 1ª ordem, a Eq. (1) não foi estatisticamente significativa a 95% do limite de confiança.

Como o modelo de primeira ordem não foi estatisticamente significativo, dentro da faixa de valores utilizada, devido ao seu baixo ajuste e pelo F_{calc} ser menor que o F_{tab} foi realizado um DCCR para 3 variáveis (Tabela 12) para a resposta da atividade em 24 horas foi obtida os coeficientes de regressão, apresentados na Eq. (2)

Atividade enzimática (U/mL)= 13,84* + 0,25.AMM +0,28.AMM^2 + 0,13.Soro + 1,37x$Soro^2$ + 0,24.pH – 0,31.pH^2 – 0,68.AMM.Soro – 0,41.AMM.pH + 1,86.Soro.pH (2)

*estatisticamente significativo a 95 % de confiança

Conforme a análise de variância (ANOVA) (Tabela 15) da Eq. (2) verificou-se que a mesma não é estatisticamente significativa a 95% do limite de confiança, o valor de F calculado é menor que F tabelado e R^2 é baixo.

Tabela 15 - Análise de variância para a atividade da lipase obtida de soro de leite minas frescal (DCCR).

Fator	SQ	Graus de Liberdade	QM	F_{calc}	F_{tab}	p-valor
Regressão	63,13	9 (p-1)	7,01	1,46	4,95	0,29
resíduo	43,22	9 (n-p)	4,80			
Total	106,35					
R^2	0,59					

SQ – Soma dos quadrados; QM – Quadrado médio; F_{calc} – F calculado; F_{tab}-F tabelado

$R^2=SQ_R/SQ_r$; limite confiança de 95%

Fonte: Autoria própria.

Com relação a lipase de *Geotrichum candidum* obtida com soro da produção de queijo minas frescal, pode-se notar, pelo DCCR, que o ensaio 16 da Tabela 12, apresentou valores de atividade 19,87 U/mL em 24 horas. Nesse ensaio foi utilizado a maior concentração de soro de leite. E é importante notar também que, pelo fatorial completo 2^3, o efeito da interação entre a concentração de soro e o valor do pH apresentam efeito sinérgico aumentando a atividade enzimática.

Com relação à lipase produzida com soro de leite do tipo muçarela foi feito o acompanhamento da evolução da atividade enzimática também ao longo de 96 horas e verificou-se que a atividade decrescia com o aumento do tempo tendo seu máximo nas primeiras 48 horas de fermentação. Foram analisadas as condições de produção da lipase de *Geotrichum candidum* utilizando soro da produção de queijo tipo muçarela com relação a duas variáveis independentes: água de maceração de milho e soro de leite. A Tabela 16 apresenta os valores da atividade enzimática ao longo de 96 horas para a lipase produzida com soro de leite do tipo muçarela.

Tabela 16 – DCCR para avaliação da atividade enzimática ao longo de 96 horas para a lipase de *Geotrichum candidum* obtida de soro de leite tipo muçarela.

			Atividade enzimática (U/mL)			
Ensaios	AMM (%m/v)	Soro (%m/v)	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas
1	6,4 (-1)	22,9 (-1)	10,10	9,31	8,32	7,83
2	13,6 (+1)	22,9 (-1)	11,28	10,49	9,80	9,80
3	6,4 (-1)	37,1 (+1)	11,19	10,20	10,00	9,41
4	13,6 (+1)	37,1 (+1)	16,71	17,80	15,83	15,33
5 (pc)	10 (0)	30 (0)	11,38	10,79	9,80	8,52
6 (pc)	10 (0)	30 (0)	9,51	9,31	8,42	7,83
7 (pc)	10 (0)	30 (0)	10,79	9,80	9,41	8,82
8 (pc)	10 (0)	30 (0)	11,78	10,79	9,80	9,41
9	5 (-1,41)	30 (0)	11,78	10,20	9,80	9,21
10	15 (+1,41)	30 (0)	10,49	9,80	9,41	7,83
11	10 (0)	20 (-1,41)	12,07	10,30	10,00	8,82
12	10 (0)	40 (+1,41)	8,82	8,82	7,83	6,55

Fonte: Autoria própria

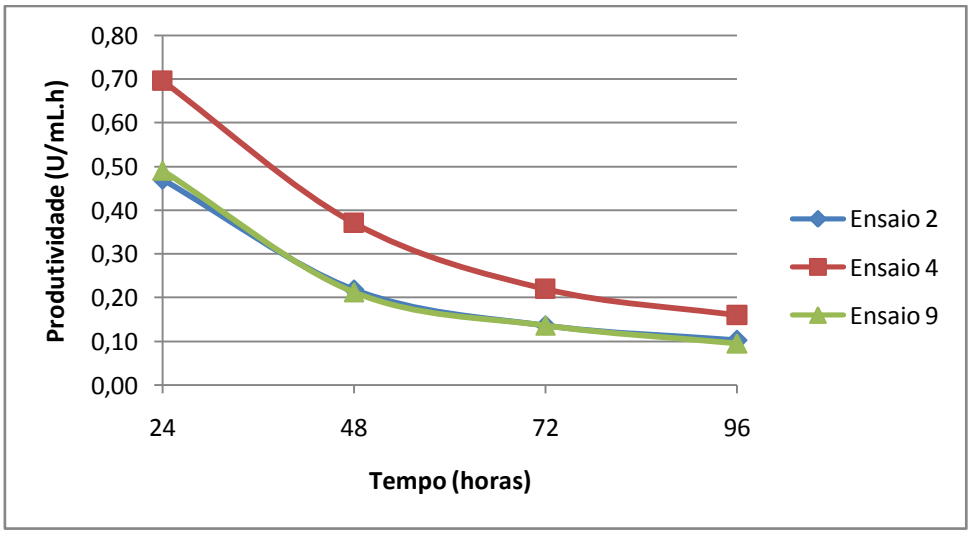
Ao longo das 96 horas de fermentação, a atividade enzimática máxima foi identificada nas condições de 13,6% (m/v) de água de maceração de milho e 37,1% (m/v) de soro de leite de muçarela. Nessa condição, equivalentes ao ensaio 4, a atividade enzimática apresentou valores de 16,71 U/mL e 17,80 U/mL em 24 e 48 horas, respectivamente. As atividades apresentadas no ensaio 4 após 72 horas de fermentação também apresentaram resultados significativos, porém, a produtividade cai consideravelmente após 48 horas e por esse motivo a fermentação foi interrompida em 48 horas. A Tabela 17 mostra as produtividades ao longo de 96 horas e a Figura 9 apresenta o gráfico da produtividade para os ensaios 2, 4 e 9 como representação da queda da produtividade em função do tempo

Tabela 17 - Produtividade da lipase obtida de soro de muçarela ao longo de 96 horas.

			Produtividade (U/mL.h)			
Ensaios	AMM (%m/v)	Soro (%m/v)	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas
1	6,4 (-1)	22,9 (-1)	0,42	0,19	0,12	0,08
2	13,6 (+1)	22,9 (-1)	0,47	0,22	0,14	0,10
3	6,4 (-1)	37,1 (+1)	0,47	0,21	0,14	0,10
4	13,6 (+1)	37,1 (+1)	0,70	0,37	0,22	0,16
5 (pc)	10 (0)	30 (0)	0,49	0,21	0,14	0,10
6 (pc)	10 (0)	30 (0)	0,44	0,20	0,13	0,08
7 (pc)	10 (0)	30 (0)	0,50	0,21	0,14	0,09
8 (pc)	10 (0)	30 (0)	0,37	0,18	0,11	0,07
9	5 (-1,41)	30 (0)	0,47	0,22	0,14	0,09
10	15 (+1,41)	30 (0)	0,40	0,19	0,12	0,08
11	10 (0)	20 (-1,41)	0,45	0,20	0,13	0,09
12	10 (0)	40 (+1,41)	0,49	0,22	0,14	0,10

Fonte: Autoria própria.

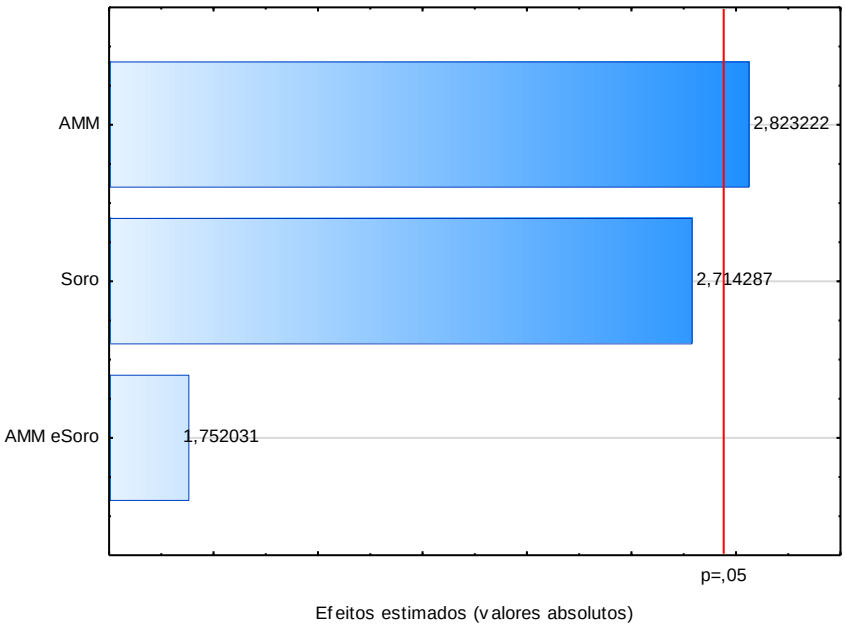
Figura 9 - Produtividade ao longo de 96 horas para a lipase obtida de soro de muçarela.



Fonte: Autoria própria.

Foi realizada a análise do planejamento fatorial completo de primeira ordem para 2 variáveis utilizando os ensaios de 1 a 8 da Tabela 16 (correspondendo ao fatorial completo 2^2 mais 4 pontos centrais) e a Figura 10 apresenta o Diagrama de Pareto para os efeitos padronizados com limite de confiança de 95%.

Figura 10 - Diagrama de Pareto para efeitos na produção da lipase obtida de soro de Leite de tipo muçarela (fatorial completo 2^2).



Fonte: Autoria própria.

Pode-se notar pelo Diagrama de Pareto que apenas o efeito da água de maceração foi estatisticamente significativo e a Eq. (3) apresenta o modelo de primeira ordem e a Tabela 18 apresenta a ANOVA para esses coeficientes.

Atividade enzimática (U/mL) = 10,61* + 3,84.AMM* + 3,69.Soro + 2,68.AMM.Soro (3)

*estatisticamente significativo a 95 % de confiança

Tabela 18 - Análise de variância da produção de lipase obtida de soro de queijo tipo muçarela (fatorial completo 2^2).

Fator	SQ	Graus de Liberdade	QM	F_{calc}	F_{tab}	p-valor
R	26,56	4	6,64	3,70	4,95	0,12
r	7,18	4	1,79			
Total	33,74					
R^2	0,79					

SQ – Soma dos quadrados; QM – Quadrado médio; F_{calc} – F calculado; F_{tab}-F tabelado

$R^2=SQ_R/SQ_r$; valores estatisticamente significativos a 95% de confiança

Fonte: Autoria própria.

Nota-se que conforme a Tabela 18 da ANOVA, que o modelo de primeira ordem (Eq. (3)) não foi estatisticamente significativa a 95% do limite de

confiança dentro da faixa utilizada. Foi então realizada a análise de modelo de segunda ordem para 2 variáveis. A partir do DCCR (Tabela 16) foi obtida os coeficientes de regressão, apresentados na Eq. (4)

$$\text{Atividade enzimática (U/mL)} = 10{,}86^{*} + 0{,}61.AMM + 0{,}52.AMM^2 + 0{,}24.Soro + 0{,}18.Soro^2 + 1{,}09.AMM.Soro \quad (4)$$

*estatisticamente significativo a 95 % de confiança

Conforme a análise de variância (ANOVA) (Tabela 19) da Eq. (4) verificou-se que a mesma não é estatisticamente significativa a 95% do limite de confiança, o valor de F calculado é menor que F tabelado e R^2 é baixo.

Tabela 19 - Análise de variância para a atividade da lipase obtida soro de leite do tipo muçarela (DCCR).

Fator	SQ	Graus de Liberdade	QM	F_{calc}	F_{tab}	p-valor
Regressão	9,94	6	1,66	0,31	4,95	0,91
resíduo	32,11	6	5,35			
Total	42,04					
R^2	0,24					

SQ – Soma dos quadrados; QM – Quadrado médio; F_{calc} – F calculado; F_{tab}-F tabelado

$R^2=SQ_R/SQ_r$; valores estatisticamente significativos a 95% de confiança

Fonte: Autoria própria.

Pode-se observar que para o soro de leite da produção de queijo minas frescal, a melhor atividade foi nas condições do ensaio 16 com AMM 10% (m/v), soro 80% (m/v) e pH 6. Nessas condições, os valores de atividade nessas condições, atingidas no ensaio 16, em 24 e 48 horas foram de 19,87 U/mL e 17,31 U/mL, respectivamente. Já para o soro de leite da produção de queijo tipo muçarela, o melhor resultado foi obtido no ensaio 4 com valor de atividade de 16,71 U/mL utilizando 13,6% de AMM e 37,1% de soro de leite de muçarela. Tais condições vão de encontro a proposta desta pesquisa, que foi utilizar resíduos da indústria de alimentos para produção de lipase não comercial de *Geotrichum candidum*.

Ribeiro et al. (2015) estudaram a produção de lipase de *Geotrichum candidum* em fermentação submersa utilizando água de maceração de milho na proporção de 6% m/v e óleo de milho na proporção de 0,5% m/v. A

atividade enzimática foi avaliada ao longo de 72 horas com uma atividade máxima igual a 30,39 U/mL nas primeiras 24 horas

Já De Morais et al. (2016) estudaram a influência da temperatura e do pH na atividade enzimática da *Candida rugosa* e do *Geotrichum candidum* utilizando melaço de soja como fonte de nitrogênio. O experimento foi conduzida em fermentação submersa e a maior atividade enzimática, com valor de 11,48 U/mL, foi atingida em pH 3 e temperatura igual a 30°C.

5.2. Reação de esterificação em pressão atmosférica

A reação de esterificação estudada foi a reação do ácido oleico com metanol utilizando as lipases produzidas em laboratório como catalisador. Inicialmente foram realizadas reações de esterificação em meio isento de solvente e utilizando hexano como solvente orgânico na pressão atmosférica.

A resposta obtida através da titulação com NaOH 0,1M foi o teor de ácido restante no meio reacional e por meio dessa resposta foi calculada estequiometricamente a quantidade e oleato de metila (ester) formado e o rendimento.

Foi realizado um planejamento fatorial completo para 3 variáveis para a avaliação da influência da razão molar ácido:álcool, da concentração de lipase no meio reacional e da temperatura no rendimento da reação de esterificação. A Tabela 20 mostra o planejamento experimental e o rendimento das reações de esterificação em meio isento de solvente utilizando a lipase produzida com soro de leite tipo minas frescal.

Pode-se notar que o rendimento foi maior nos ensaios que a proporção molar ácido:álcool era maior (ensaios 2, 4, 6 e 8) e comparando-se os resultados destes ensaios específicos, percebe-se que há uma um aumento no rendimento conforme se aumenta a temperatura e a concentração de lipase, sendo que o maior rendimento em meio isento de solvente utilizando lipase de soro de leite minas frescal foi com razão molar ácido:álcool 1:3, concentração de lipase 7,5 U/g de lipase liofilizada e temperatura de 50 °C, chegando a um rendimento de 12,65%. A Tabela 21 apresenta os efeitos da análise das variáveis neste experimento.

Tabela 20 - Planejamento experimental 2^3 da reação de esterificação em meio isento de solvente orgânico utilizando lipase de soro de minas frescal.

Ensaio	Razão Molar (ácido:álcool)	Lipase (U/g)	Temperatura (°C)	Rendimento (%)
1	1:1 (-1)	2,5 (-1)	30 (-1)	3,89
2	1:3 (+1)	2,5 (-1)	30 (-1)	11,49
3	1:1 (-1)	7,5 (+1)	30 (-1)	2,03
4	1:3 (+1)	7,5 (+1)	30 (-1)	11,20
5	1:1 (-1)	2,5 (-1)	50 (+1)	2,50
6	1:3 (+1)	2,5 (-1)	50 (+1)	11,72
7	1:1 (-1)	7,5 (+1)	50 (+1)	1,57
8	1:3 (+1)	7,5 (+1)	50 (+1)	12,65
9	1:2 (0)	5,0 (0)	40 (0)	7,74
10	1:2 (0)	5,0 (0)	40 (0)	4,57
11	1:2 (0)	5,0 (0)	40 (0)	4,72
12	1:2 (0)	5,0 (0)	40 (0)	3,99

Fonte: Autoria própria.

Tabela 21 - Efeitos estimados das variáveis na reação de esterificação em meio isento de solvente utilizando lipase obtida de soro de minas frescal.

					Estimativa por intervalo (95%)	
Fatores	Efeito	Erro padrão	t(7)	p-valor	Limite inferior	Limite superior
Média *	6,51	0,55	11,90	0,00	5,10	7,91
Razão molar*	9,27	1,34	6,92	0,00	5,83	12,71
Lipase	-0,54	1,34	-0,40	0,71	-3,98	2,91
Temperatura	-0,04	1,34	-0,03	0,98	-3,49	3,40
Razão molar e Lipase	0,86	1,34	0,64	0,55	-2,59	4,30
Razão molar e temperatura	0,88	1,34	0,66	0,54	-2,56	4,33
Lipase e temperatura	0,54	1,34	0,40	0,71	-2,91	3,98

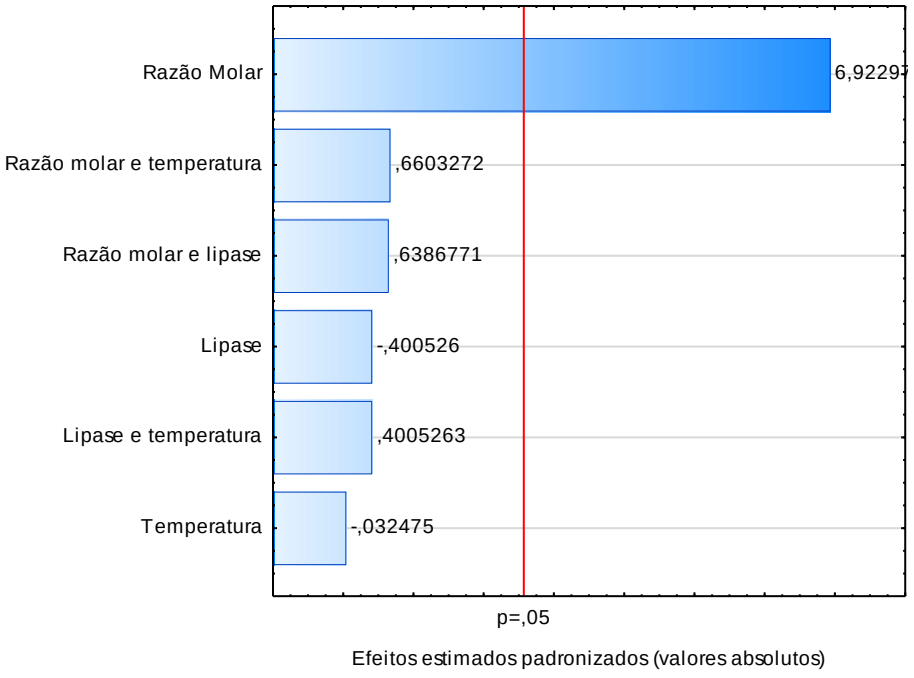
R^2=0,91 * valores estatisticamente significativos a 95% de confiança

Pode-se notar que a razão molar foi o efeito estatisticamente significativo dentre as variáveis analisadas nos experimentos e a Figura 11 mostra o Diagrama de Pareto para os efeitos estimados na reação de esterificação utilizando a lipase produzida com soro de leite do tipo Minas Frescal.

Foi utilizado a lipase produzida com soro de leite proveniente da produção de queijo do Tipo muçarela para a reação de esterificação em meio isento de solvente para a comparação com a mesma reação utilizando a lipase

de soro minas frescal. A Tabela 22 mostra o planejamento experimental utilizado para a reação em meio isento de solvente.

Figura 11 - Diagrama de Pareto dos efeitos na reação de esterificação em meio isento de solvente utilizando lipase obtida de soro de leite minas frescal.



Fonte: Autoria própria.

Tabela 22 - Planejamento experimental2^3 da reação de esterificação em meio isento de solvente orgânico utilizando lipase produzida com soro queijo muçarela.

Ensaio	Razão Molar (ácido:álcool)	Lipase (U/g)	Temperatura (°C)	Rendimento (%)
1	1:1 (-1)	2,5 (-1)	30 (-1)	3,08
2	1:3 (+1)	2,5 (-1)	30 (-1)	9,75
3	1:1 (-1)	7,5 (+1)	30 (-1)	1,72
4	1:3 (+1)	7,5 (+1)	30 (-1)	10,51
5	1:1 (-1)	2,5 (-1)	50 (+1)	1,03
6	1:3 (+1)	2,5 (-1)	50 (+1)	10,33
7	1:1 (-1)	7,5 (+1)	50 (+1)	0,49
8	1:3 (+1)	7,5 (+1)	50 (+1)	8,71
9	1:2 (0)	5,0 (0)	40 (0)	7,58
10	1:2 (0)	5,0 (0)	40 (0)	5,46
11	1:2 (0)	5,0 (0)	40 (0)	5,42
12	1:2 (0)	5,0 (0)	40 (0)	5,57

Fonte: Autoria própria.

Nota-se que, da mesma maneira que ocorreu com a reação utilizando lipase de soro de leite minas frescal, a lipase produzida com soro de leite do Tipo muçarela promoveu um aumento do rendimento em condições em que a razão molar ácido:álcool era maior (1:3). E dentre esses resultados os ensaios que tiveram o maior rendimento foram o ensaio 4 e 6, que tiveram rendimento de 10,51% e 10,33%, respectivamente Os resultados da análise dos efeitos estimados para a reação de esterificação utilizando a lipase produzida com soro de muçarela em meio isento de solvente estão presentes na Tabela 23 e verifica-se que a razão molar foi o único efeito significativo encontrado na análise. A Figura 12 apresenta o Diagrama de Pareto para os efeitos estimados nessa reação de esterificação.

Tabela 23 - Efeitos estimados das variáveis na reação de esterificação em meio isento de solvente utilizando Lipase SM.

					Estimativa por intervalo (95%)	
Fatores	Efeito	Erro padrão	t(7)	p-valor	Limite inferior	Limite superior
Média *	5,80	0,28	20,43	0,00	5,07	6,53
Razão molar*	8,25	0,70	11,85	0,00	6,46	10,03
Lipase	-0,69	0,70	-0,99	0,37	-2,48	1,10
Temperatura	-1,13	0,70	-1,62	0,17	-2,91	0,66
Razão molar e lipase	0,26	0,70	0,37	0,73	-1,53	2,04
Razão molar e temperatura	0,52	0,70	0,74	0,49	-1,27	2,31
Lipase e temperatura	-0,39	0,70	-0,56	0,60	-2,18	1,40

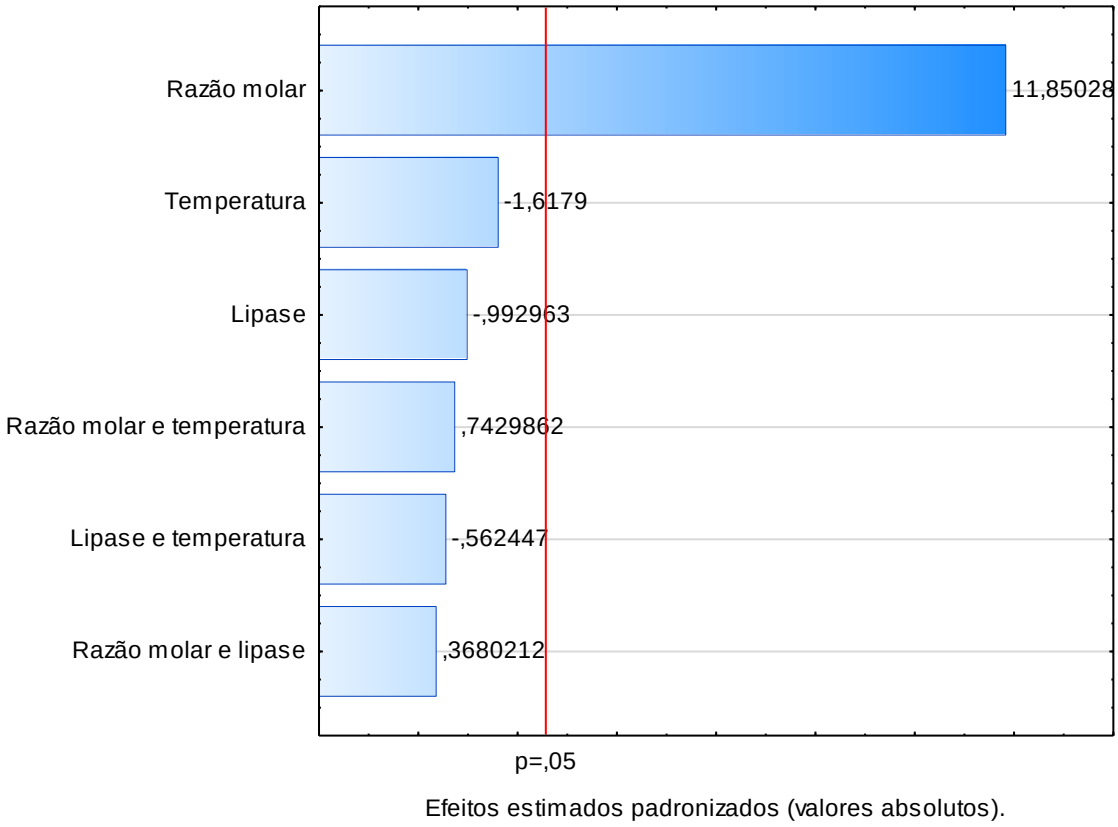
R^2=0,97

* valores estatisticamente significativos a 95% de confiança

Fonte: Autoria própria.

Comparando-se o rendimento da reação de esterificação utilizando as lipases produzidas com os dois diferentes tipos de soro de leite, nota-se que a lipase produzida com soro de leite tipo minas frescal teve um rendimento levemente superior ao da lipase produzida com soro de leite de muçarela e que em ambas as reações, a razão molar teve efeito positivo fazendo com que houvesse um aumento no rendimento à medida que se aumentava a razão molar ácido:álcool.

Figura 12 - Diagrama de Pareto dos efeitos padronizados estimados das variáveis na reação de esterificação em meio isento de solvente utilizando lipase obtida de soro de muçarela.



Fonte: Autoria própria.

Foram realizados ensaios nas mesmas condições dos ensaios anteriores com a adição de hexano na proporção 10% v/v em relação ao álcool. A Tabela 24 mostra o planejamento experimental para a reação de esterificação do ácido oleico com o metanol utilizando a lipase produzida com soro de leite minas frescal como catalisador, assim como o rendimento da reação.

Pode-se notar que o rendimento da reação de esterificação aumentou em condições em que a razão molar ácido:álcool era maior e, portanto, pode-se concluir que o hexano não teve interferência direta no rendimento da reação.

Tabela 24 - Planejamento experimental da reação de esterificação em meio contendo hexano utilizando lipase obtida de soro minas frescal.

Ensaio	Razão Molar (ácido:álcool)	Lipase (U/g)	Temperatura (°C)	Rendimento (%)
1	1:1 (-1)	2,5 (-1)	30 (-1)	1,96
2	1:3 (+1)	2,5 (-1)	30 (-1)	10,04
3	1:1 (-1)	7,5 (+1)	30 (-1)	1,55
4	1:3 (+1)	7,5 (+1)	30 (-1)	11,20
5	1:1 (-1)	2,5 (-1)	50 (+1)	1,34
6	1:3 (+1)	2,5 (-1)	50 (+1)	10,39
7	1:1 (-1)	7,5 (+1)	50 (+1)	1,69
8	1:3 (+1)	7,5 (+1)	50 (+1)	9,69
9	1:2 (0)	5,0 (0)	40 (0)	7,08
10	1:2 (0)	5,0 (0)	40 (0)	5,34
11	1:2 (0)	5,0 (0)	40 (0)	5,73
12	1:2 (0)	5,0 (0)	40 (0)	4,92

Fonte: Autoria própria

O maior rendimento (11,20%) foi alcançado nas condições experimentais de razão molar ácido:álcool 1:3, concentração de lipase 7,5 $U/g_{lipase\ liofilizada}$ e temperatura de 30°C. Foi feita a analise dos efeitos estimados das variáveis para a reação de esterificação em meio contendo hexano e a Tabela 25 mostra que a razão molar foi o efeito significativo apontado pelos resultados.

Tabela 25 - Efeitos estimados para a reação de esterificação em meio contendo hexano utilizando lipase obtida de soro minas frescal.

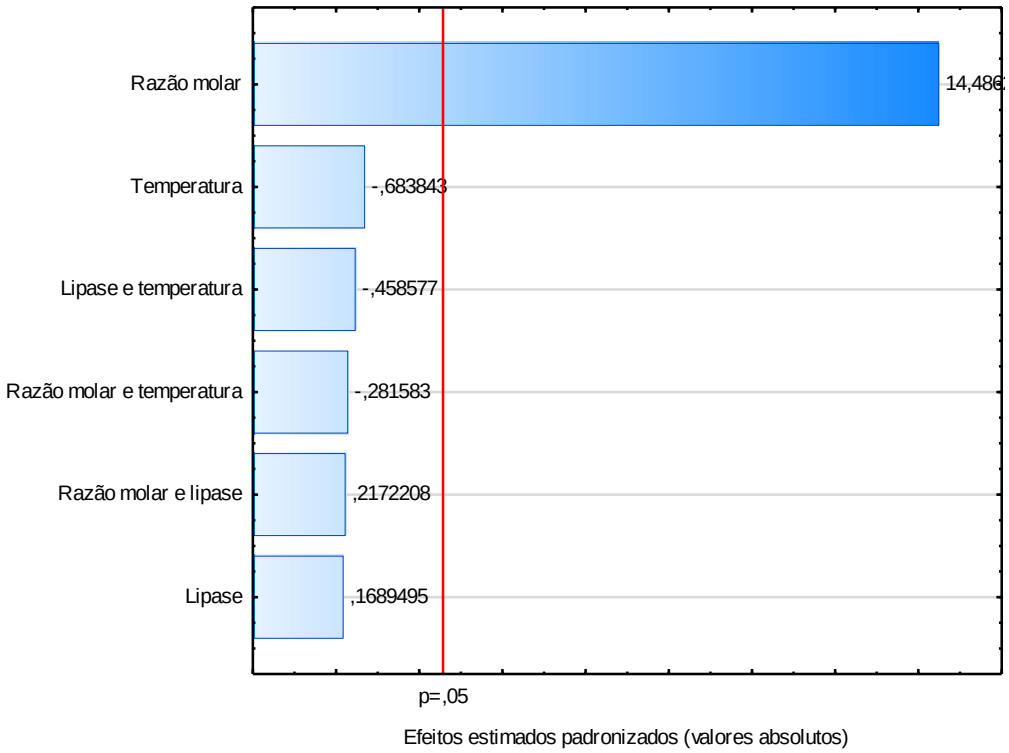
					Estimativa por intervalo (95%)	
Fatores	Efeito	Erro padrão	t(7)	p-valor	Limite inferior	Limite superior
Média *	5,91	0,25	24,11	0,00	5,28	6,54
Razão molar*	8,70	0,60	14,49	0,00	7,16	10,24
Lipase	0,10	0,60	0,17	0,87	-1,44	1,65
Temperatura	-0,41	0,60	-0,68	0,52	-1,95	1,13
Razão molar e lipase	0,13	0,60	0,22	0,84	-1,41	1,67
Razão molar e temperatura	-0,17	0,60	-0,28	0,79	-1,71	1,37
Lipase e temperatura	-0,28	0,60	-0,46	0,67	-1,82	1,27

R^2=0,98; * valores estatisticamente significativos a 95% de confiança

Fonte: Autoria própria.

Nota-se que a única variável estatisticamente significativa foi a razão molar ácido:álcool e que essa variável tem efeito positivo, mostrando que um aumento da razão molar promove um aumento do rendimento da reação de esterificação utilizando a lipase de soro de leite minas frescal na presença de hexano como solvente orgânico. A Figura 13 apresenta o gráfico de Pareto para os resultados dos ensaios analisados.

Figura 13 - Diagrama de Pareto dos efeitos padronizados estimados das variáveis na reação de esterificação em meio contendo hexano utilizando lipase obtida de soro de leite minas frescal.



Fonte: Autoria própria.

Utilizou-se também a lipase produzida com soro de leite da produção do queijo tipo muçarela nas mesmas condições anteriormente descritas para a realização da reação de esterificação do ácido oléico com o metanol na presença de hexano para que se pudesse comparar as respostas com àquelas obtidas com a lipase produzida com soro de leite da produção de queijo minas fresca. A Tabela 26 apresenta o planejamento e o rendimento utilizando a lipase de soro de muçarela como catalisador.

Tabela 26 - Planejamento experimental da reação de esterificação em meio hexano utilizando lipase obtida de soro de muçarela.

Ensaio	Razão Molar (ácido:álcool)	Lipase (U/g)	Temperatura (°C)	Rendimento (%)
1	1:1 (-1)	2,5 (-1)	30 (-1)	1,84
2	1:3 (+1)	2,5 (-1)	30 (-1)	10,10
3	1:1 (-1)	7,5 (+1)	30 (-1)	1,65
4	1:3 (+1)	7,5 (+1)	30 (-1)	9,17
5	1:1 (-1)	2,5 (-1)	50 (+1)	0,85
6	1:3 (+1)	2,5 (-1)	50 (+1)	7,72
7	1:1 (-1)	7,5 (+1)	50 (+1)	0,56
8	1:3 (+1)	7,5 (+1)	50 (+1)	6,22
9	1:2 (0)	5,0 (0)	40 (0)	6,42
10	1:2 (0)	5,0 (0)	40 (0)	5,65
11	1:2 (0)	5,0 (0)	40 (0)	6,46
12	1:2 (0)	5,0 (0)	40 (0)	6,42

Fonte: Autoria própria.

Com a utilização do hexano como co-solvente no meio reacional pode-se notar que, utilizando a lipase produzida com soro de leite da produção do queijo tipo muçarela, houve um maior rendimento em ensaios nos quais a razão molar ácido:álcool é maior tendo o maior rendimento no ensaio 2, que em condições de razão molar ácido:álcool 1:3, concentração de lipase 2,5 U/g de lipase liofilizada e temperatura a 30°C, teve rendimento de 10,10%.

A Tabela 27 mostra os efeitos estimados para esse experimento enquanto que a Figura 14 apresenta o Diagrama de Pareto correspondente.

Tabela 27 - Efeitos estimados para as variáveis na reação de esterificação contendo hexano utilizando lipase obtida de soro de minas frescal.

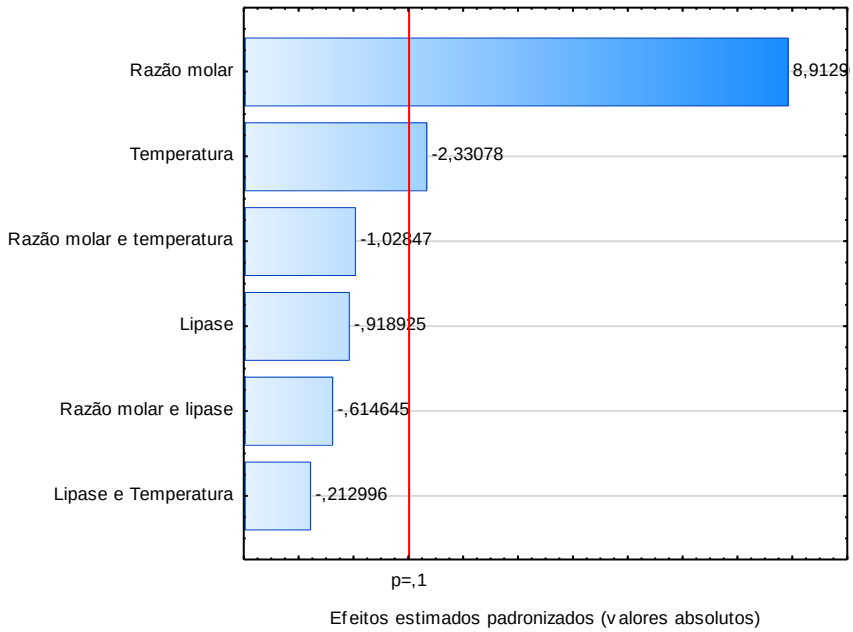
					Estimativa por intervalo (90%)	
Fatores	Efeito	Erro padrão	t(7)	p-valor	Limite inferior	Limite superior
Média *	5,26	0,32	16,22	0,00	4,60	5,91
Razão molar*	7,08	0,79	8,91	0,00	5,48	8,68
Lipase	-0,73	0,79	-0,92	0,40	-2,33	0,87
Temperatura*	-1,85	0,79	-2,33	0,07	-3,45	-0,25
Razão molar e lipase	-0,49	0,79	-0,61	0,57	-2,09	1,11
Razão molar e temperatura	-0,82	0,79	-1,03	0,35	-2,42	0,78
Lipase e temperatura	-0,17	0,79	-0,21	0,84	-1,77	1,43

R^2=0,90

* valores estatisticamente significativos a 90% de confiança

Fonte: Autoria própria.

Figura 14 - Diagrama de Pareto dos efeitos padronizados estimados das variáveis na reação de esterificação em meio contendo hexano lipase obtida de soro de muçarela.



Fonte: Autoria própria.

A análise dos efeitos mostrou que a razão molar e a temperatura são os efeitos estatisticamente significativos para as condições testadas com 90% de confiança e que o efeito com relação a razão molar é positivo, promovendo um aumento do rendimento conforme aumenta-se a razão molar ácido:álcool e o efeito com relação a temperatura é negativo, em que percebe-se um aumento no rendimento conforme a temperatura é menor.

Comparando-se apenas a influência do hexano nas reações, nota-se que tanto para as reações catalisadas com lipase de soro de leite minas frescal quanto para a lipase de soro de leite tipo muçarela não houve diferença significativa em relação aos catalisadores utilizados e nota-se também que a utilização do hexano como co-solvente não demonstrou efeito positivo no rendimento das reações de esterificação, portanto a utilização deste co-solvente orgânico poderia ser mantido na menor concentração nas condições deste estudo. A Tabela 28 mostra as equações obtidas para os modelos de primeira ordem das condições de meio isento de solvente e com solvente orgânico hexano tanto para a lipase obtida de soro de minas frescal quanto para a lipase obtida de soro de muçarela, enquanto que a Tabela 29 apresenta as análises de variância (ANOVA) para as mesmas condições

Tabela 28 - Equações para cada tipo de reação de esterificação em pressão atmosférica.

Fonte da lipase e meio reacional	Equação***
Soro minas frescal em meio isento de solvente	$Y(\%) = 6{,}51^{**} + 4{,}63.\ X_1 - 0{,}27.\ X_2 - 0{,}02\ X_3 + 0{,}43.\ X_1.\ X_2 + 0{,}44.\ X_1.\ X_3 + 0{,}27.\ X_2.\ X_3$
Soro muçarela em meio isento de solvente	$Y(\%) = 5{,}80^{**} + 4{,}12.\ X_1 - 0{,}35.\ X_2 - 0{,}56\ X_3 + 0{,}13.\ X_1.\ X_2 + 0{,}26.\ X_1.\ X_3 - 0{,}20.\ X_2.\ X_3$
Soro frescal com hexano	$Y(\%) = 5{,}91^{**} + 4{,}35.\ X_1 + 0{,}05.\ X_2 - 0{,}21\ X_3 + 0{,}07.\ X_1.\ X_2 - 0{,}08.\ X_1.\ X_3 - 0{,}14.\ X_2.\ X_3$
Soro muçarela com hexano	$Y(\%) = 5{,}26^{*} + 3{,}54.\ X_1 - 0{,}36.\ X_2 - 0{,}93\ X_3 - 0{,}24.\ X_1.\ X_2 - 0{,}41.\ X_1.\ X_3 - 0{,}08.\ X_2.\ X_3$

*estatisticamente significativo a *90% e **95% do limite de confiança.
***Y – Rendimento; X_1 – Razão Molar (M/M); X_2 – Lipase($U/g_{lipase\ liofilizada}$); X_3 – Temperatura(°C);
Fonte: Autoria própria.

Tabela 29 - Análise de variância para as reações de esterificação em pressão atmosférica.

Fator	SQ	Graus de Liberdade	QM	F_{calc}	F_{tab}	p-valor
*Soro minas frescal em meio isento de solvente***						
R	176,03	6 (p-1)	29,34	8,18	4,95	0,02
r	17,93	5 (n-p)	3,59			
Total	193,95					
R^2	0,91					
*Soro de muçarela em meio isento de solvente***						
R	140,43	6 (p-1)	23,40	24,17	4,95	0,00
r	4,84	5 (n-p)	0,97			
Total	145,27					
R^2	0,97					
*Soro de frescal com hexano***						
R	151,96	6 (p-1)	25,33	35,11	4,95	0,00
r	3,61	5 (n-p)	0,72			
Total	155,56					
R^2	0,98					
*Soro de muçarela com hexano**						
R	109,92	6 (p-1)	18,32	14,53	4,95	0,00
r	6,30	5 (n-p)	1,26			
Total	116,22					
R^2	0,95					

R – Regressão; r – resíduo; SQ – Soma dos quadrados; QM – Quadrado médio; F_{calc} – F calculado; F_{tab}-F tabelado; p-número de parâmetros da equação; n-número de ensaios do fatorial mais pontos centrais; $R^2=SQ_R/SQ_r$ valores estatisticamente significativos a *90% e **95% de confiança

Fonte: Autoria própria.

5.3. Reação de esterificação em meio utilizando dióxido de carbono supercrítico (SC-CO_2) como solvente.

A reação de esterificação foi realizada em meio utilizando dióxido de carbono supercrítico como solvente para a comparação com a reação realizada com os meios isento de solvente orgânico e contendo hexano como solvente. Foram feitos experimentos em que foi analisado a influência da razão molar ácido:álcool, a concentração de lipase utilizada, a pressão e a temperatura do meio utilizando a lipase produzida com soro de leite minas fresca ou a lipase produzida com soro de leite muçarela como catalisadores. A resposta obtida para análise foi a concentração residual de ácido oleico no meio reacional por titulação com NaOH 0,1M e o rendimento foi calculado por estequiometria.

A Tabela 30 apresenta o planejamento experimental fatorial fracionário 2^{4-1} para a reação de esterificação em meio com dióxido de carbono supercrítico como solvente e utilizando lipase produzida com soro de leite da produção do queijo minas frescal como catalisador.

Tabela 30 - Planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} para a reação de esterificação em meio SC-CO_2 utilizando lipase do soro do leite minas frescal.

Ensaio	Razão Molar (ácido:álcool)	Lipase (U/g)	Pressão (MPa)	Temperatura (°C)	Rendimento (%)
1	1:1 (-1)	2,5 (-1)	10 (-1)	30 (-1)	12,16
2	1:3 (+1)	2,5 (-1)	10 (-1)	50 (+1)	37,73
3	1:1 (-1)	7,5 (+1)	10 (-1)	50 (+1)	17,45
4	1:3 (+1)	7,5 (+1)	10 (-1)	30 (-1)	33,12
5	1:1 (-1)	2,5 (-1)	30 (+1)	50 (+1)	13,18
6	1:3 (+1)	2,5 (-1)	30 (+1)	30 (-1)	32,91
7	1:1 (-1)	7,5 (+1)	30 (+1)	30 (-1)	15,57
8	1:3 (+1)	7,5 (+1)	30 (+1)	50 (+1)	37,31
9	1:2 (0)	5,0 (0)	20 (0)	40 (0)	23,03
10	1:2 (0)	5,0 (0)	20 (0)	40 (0)	25,32
11	1:2 (0)	5,0 (0)	20 (0)	40 (0)	27,98
12	1:2 (0)	5,0 (0)	20 (0)	40 (0)	26,65

Fonte: Autoria própria.

Nota-se que, igualmente encontrado nos ensaios em ambiente não pressurizado, nas condições em que a razão molar ácido:álcool 1:3 houve um maior rendimento, sendo que o maior rendimento ocorreu no ensaio 8, em que houve um rendimento de 37,31% em meio com razão molar 1:3, concentração

de lipase de 7,5 U/g de lipase liofilizada, pressão de 30 MPa e temperatura igual a 50°C.

A Tabela 31 apresenta os efeitos estimados das variáveis para a reação de esterificação utilizando SC-CO_2 como solvente e lipase de soro da produção de queijo minas frescal como catalisador.

Tabela 31 - Efeitos estimados das variáveis para a reação de esterificação em meio SC-CO_2 utilizando lipase obtida de soro de minas frescal

					Estimativa por intervalo (90%)	
Fatores	Efeito	Erro padrão	t(7)	p-valor	Limite inferior	Limite superior
Média*	25,20	0,57	44,02	0,00	24,12	26,29
Razão molar*	20,68	1,40	14,75	0,00	18,02	23,34
Lipase	1,87	1,40	1,33	0,22	-0,79	4,53
Pressão	-0,37	1,40	-0,26	0,80	-3,03	2,29
Temperatura*	2,98	1,40	2,12	0,07	0,32	5,63

R^2=0,97

* valores estatisticamente significativos a 90% do limite de confiança

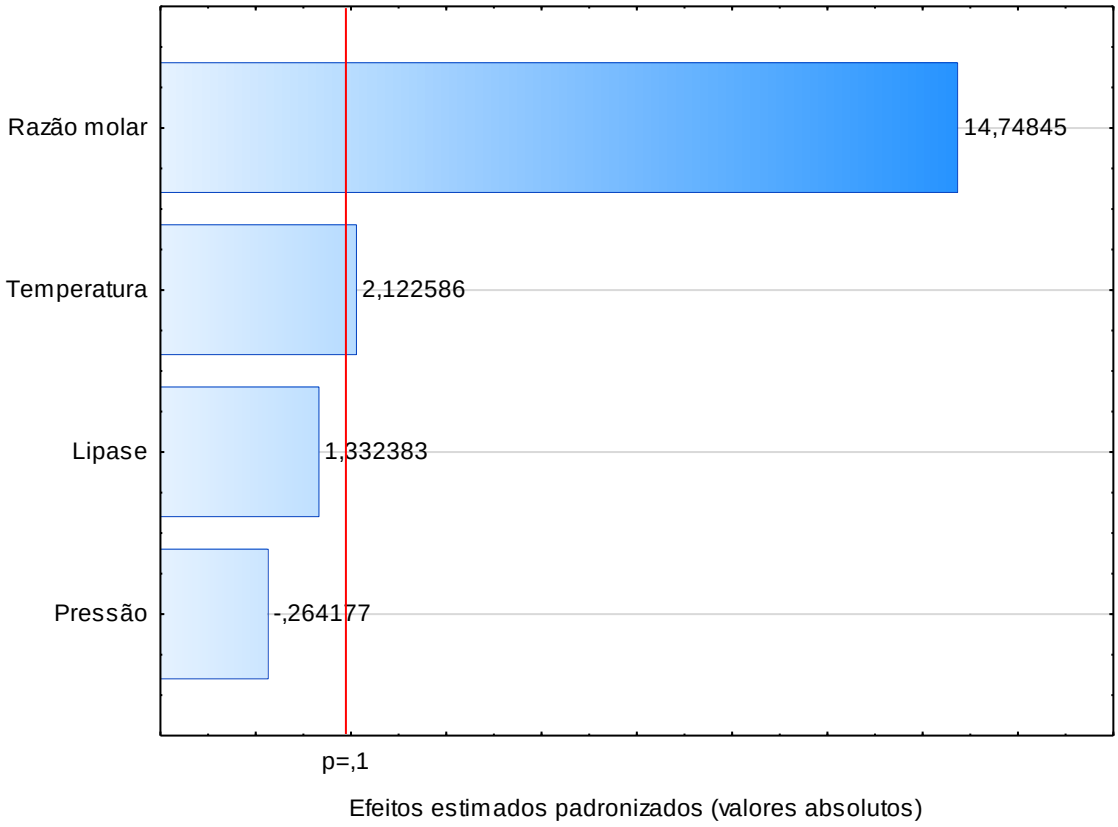
Fonte: Autoria própria

Pode-se notar que com o aumento da razão molar ácido:álcool e da temperatura há um aumento no rendimento da reação de esterificação, o que configura um efeito positivo para essas variáveis. A Figura 15 apresenta o Diagrama de Pareto que demonstra esses efeitos

Foi analisado também como a lipase de *Geotrichum candidum* produzida com soro de leite de muçarela é afetada pela razão molar, quantidade de lipase, pressão e temperatura utilizando dióxido de carbono supercrítico como solvente na reação de esterificação.

A Tabela 32 apresenta o planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} para a reação de esterificação em meio SC-CO_2 utilizando lipase produzida com soro de queijo muçarela e o rendimento da reação.

Figura 15 - Diagrama de Pareto para os efeitos padronizados estimados na reação de esterificação em meio SC-CO_2 utilizando lipase produzida com soro de leite minas frescal.



Fonte: Autoria própria.

Tabela 32 - Planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} para a reação de esterificação em meio SC-CO_2 utilizando lipase de soro de queijo tipo muçarela.

Ensaio	Razão Molar (ácido:álcool)	Lipase (U/g)	Pressão (MPa)	Temperatura (°C)	Rendimento (%)
1	1:1 (-1)	2,5 (-1)	10 (-1)	30 (-1)	10,11
2	1:3 (+1)	2,5 (-1)	10 (-1)	50 (+1)	39,41
3	1:1 (-1)	7,5 (+1)	10 (-1)	50 (+1)	18,13
4	1:3 (+1)	7,5 (+1)	10 (-1)	30 (-1)	35,64
5	1:1 (-1)	2,5 (-1)	30 (+1)	50 (+1)	21,89
6	1:3 (+1)	2,5 (-1)	30 (+1)	30 (-1)	24,96
7	1:1 (-1)	7,5 (+1)	30 (+1)	30 (-1)	19,84
8	1:3 (+1)	7,5 (+1)	30 (+1)	50 (+1)	20,77
9	1:2 (0)	5,0 (0)	20 (0)	40 (0)	24,36
10	1:2 (0)	5,0 (0)	20 (0)	40 (0)	23,22
11	1:2 (0)	5,0 (0)	20 (0)	40 (0)	23,60
12	1:2 (0)	5,0 (0)	20 (0)	40 (0)	24,17

Fonte: Autoria própria.

Pode-se verificar que em condições em que a razão molar ácido:álcool é de 1:3 apresenta os maiores valores de rendimento, sendo que o maior rendimento, com valor de 39,41%, ocorreu em condições onde a razão molar é de 1:3, a concentração de lipase é de 2,5 U/g de lipase liofilizada, a pressão é de 10MPa e a temperatura é de 50°C. A Tabela 33 apresenta os efeitos estimados das variáveis para a reação de esterificação em meio SC-CO_2 utilizando a lipase produzida com soro de leite da produção de queijo muçarela.

Tabela 33 - Efeitos estimados para a reação de esterificação em meio SC-CO_2 utilizando a lipase obtida de soro de muçarela.

					Estimativa por intervalo (95%)	
Fatores	Efeito	Erro padrão	t(7)	p-valor	Limite inferior	Limite superior
Média*	23,84	1,79	13,35	0,00	19,62	28,06
Razão molar*	12,70	4,37	2,90	0,02	2,36	23,04
Lipase	-0,50	4,37	-0,11	0,91	-10,84	9,85
Pressão	-3,96	4,37	-0,90	0,40	-14,30	6,39
Temperatura	2,41	4,37	0,55	0,60	-7,93	12,76

R^2=0,58

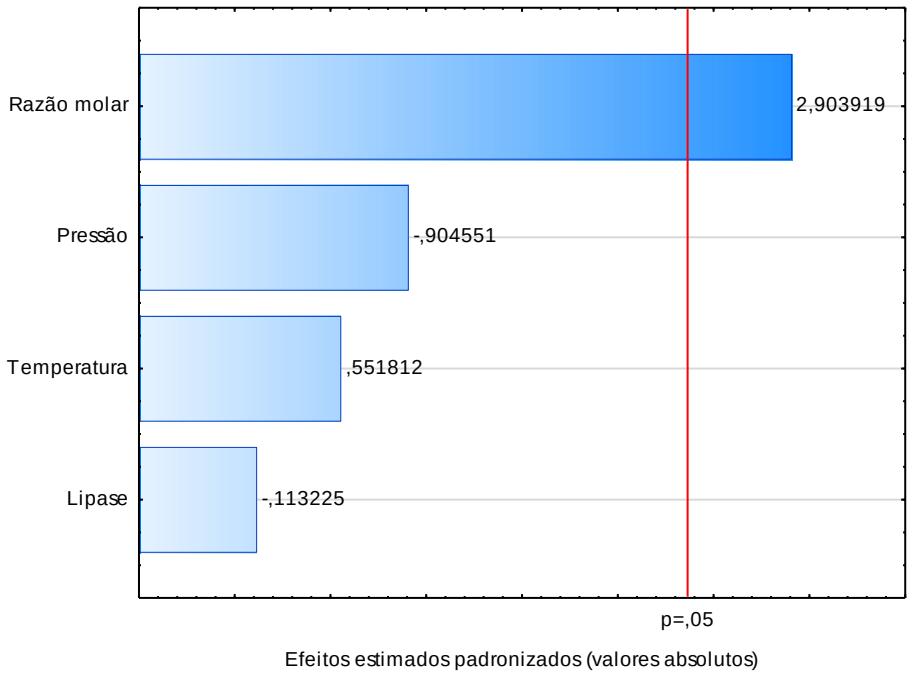
* valores estatisticamente significativos a 95% de confiança

Fonte: Autoria própria.

Nota-se que a razão molar ácido:álcool foi o único efeito estatisticamente significativo e demonstra um efeito positivo pois com o aumento da razão molar houve também um aumento do rendimento da reação.

A Figura 16 apresenta o Diagrama de Pareto que mostra esses efeitos graficamente.

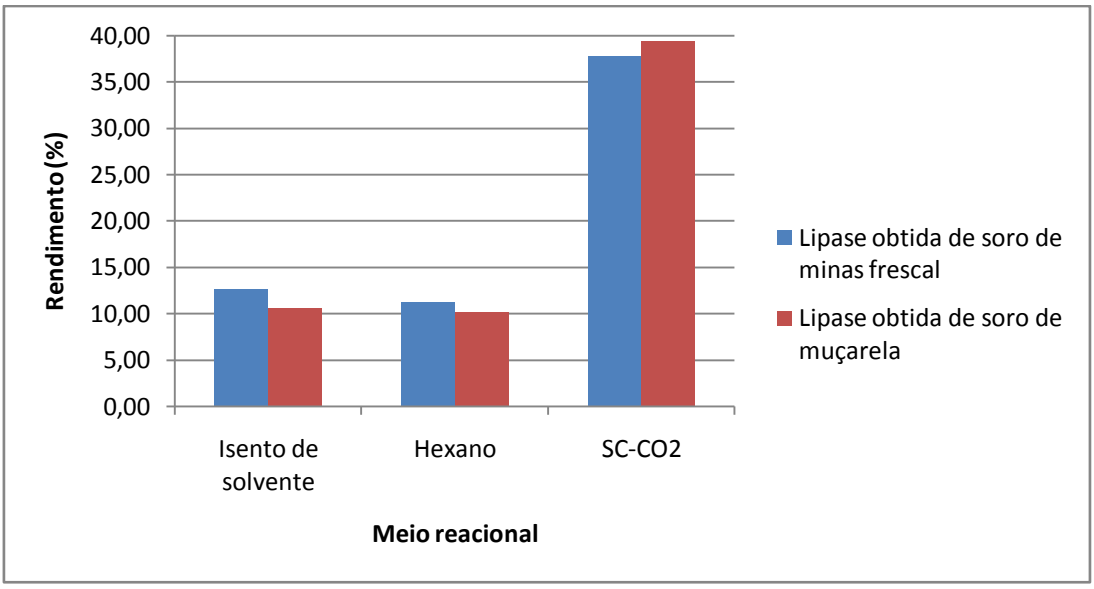
Figura 16 - Diagrama de Pareto dos efeitos padronizados estimados das variáveis na reação de esterificação em meio SC-CO_2 utilizando lipase obtida de soro de muçarela.



Fonte: Autoria própria.

Por meio dos experimentos, pode-se notar, de forma geral, que a utilização do dióxido de carbono supercrítico como solvente teve um efeito bastante significativo no rendimento da reação de esterificação do ácido oleico com o metanol. Com relação à lipase produzida com soro de leite do tipo minas frescal os rendimentos foram de 12,65 % em meio isento de solvente, 11,20% em meio com hexano como solvente orgânico e de 37,73% em meio utilizando dióxido de carbono supercrítico como solvente. Já a lipase produzida com soro de leite do tipo muçarela, os rendimentos foram de 10,51% em meio isento de solvente, 10,10% em meio utilizando hexano como solvente e 39,41% em meio com dióxido de carbono supercrítico. O que mostra que o dióxido de carbono supercrítico influencia positivamente no rendimento da reação de esterificação. A Figura 17 apresenta um gráfico com os rendimentos das duas lipases nos três meios reacionais estudados.

Figura 17 - Gráfico de comparação de rendimentos.



Fonte: Autoria própria.

Nota-se também que para as pressões de 10, 20 e 30 MPa utilizadas nos ensaios não houve efeito significativo, mas a mudança de pressão ambiente (0,101 MPa) para ambientes pressurizados fez com que o rendimento aumentasse.

O maior rendimento pode ser explicado pelo fato que conforme se diminuem a viscosidade e a densidade do SC-CO^2 ocorre um aumento no coeficiente de difusão do substrato no meio reacional. Além do fato que altas pressões promovem uma melhor distribuição desse substrato no meio, fazendo com que haja uma maior interação entre esse substrato e os sítios da lipase, aumentando assim a conversão da reação de esterificação (ESCANDELL et al., 2015; DOS SANTOS et al., 2016)

Rosa et al. (2017) estudaram a reação de esterificação do acetato de vinila com o geraniol na síntese do acetato de geranila na presença de solvente orgânico hexano utilizando a lipase de *Candida rugosa* (NRRL Y-17506) como catalisador. As variáveis analisadas foram a temperatura, concentração mássica de lipase e a razão molar acetato de vinila:geraniol. Os autores detectaram um aumento na conversão do processo com a temperatura de 45°C em relação a 30°C, também demonstraram que a formação de acetato de geranila aumenta conforme o tempo de relação se prolonga.

Em outro estudo Escandell et al. (2015) estudaram a síntese de acetato de butila utilizando lipase de *Candida antartica* em meios reacionais com dois solventes diferentes: solvente orgânico hexano e dióxido de carbono supercrítico. Os autores descreveram um aumento na produção do acetato em condições supercríticas de 76,2% quando a pressão se encontrava em 12 MPa, mostrando que a condição supercrítica é favorável à reação de produção do acetato de butila.

Já Dos Santos et al. (2016) estudaram a síntese do acetato de eugenila em meio SC-CO_2 supercrítico como solvente utilizando dois tipos de enzimas comerciais como catalisadores: Lipozyme 435 e Novozym 435. Foi estudada a reação de esterificação do anidrido acético com o eugenol em diferentes condições concentração mássica de enzima (1-10% m/m), razão molar de substrato (1:1 e 1:5), diferentes temperaturas (40-60°C) e pressões (10-30MPa). O estudo demonstrou que em pressões menores e temperaturas mais elevadas houve um maior rendimento da reação sendo que a temperatura e pressão ótimas foram identificadas em 50 e 60°C a 10MPa.

A razão molar foi a única variável com efeito significativo em todas as reações de esterificação estudadas neste estudo. Isto pode ser justificado pelo fato de uma maior quantidade de álcool, que é o substrato limitante da reação, favorecer a reação no sentido de formação de éster, aumentando assim o rendimento das reações.

Este resultado corrobora com Anschau et al. (2011) que encontraram uma conversão de 94% na síntese do butirato de isoamila com razão molar ácido:álcool de 1:3 em reação catalisada com Lipozyme TL IM. A razão molar se mostrou efetiva também no trabalho desenvolvido por Macedo, Pastore & Rodrigues (2004), que realizaram a síntese do butirato de isoamila com lipase de *Rhizopus sp*. como catalisador e obtiveram 75% de conversão com razão molar ácido:álcool igual a 1:1,5.

6. CONCLUSÕES

A produção da lipase de *Geotrichum candidum* se mostrou eficaz quando se utiliza soro de leite da produção de queijo nos dois casos estudados, sendo que a lipase produzida com soro de leite de minas frescal apresentou 19,87U/mL em 24 horas (produtividade igual 0,83U/mL.h), enquanto que a lipase produzida com soro de leite muçarela apresentou atividade de 16,71U/mL em 24 horas de fermentação (produtividade igual 0,70U/mL.h).

Ambas as lipases se mostraram pouco eficientes na reação de esterificação em meio isento de solvente ou com hexano como solvente em pressão atmosférica. A lipase produzida com soro de leite da produção de queijo minas frescal apresentou rendimentos de 12,65% em meio isento de solvente e 11,20% em meio utilizando hexano, já a lipase produzida com soro de leite da produção de queijo tipo muçarela apresentou rendimento de 10,51% em meio isento de solvente e 10,10% em meio com hexano.

Na reação de esterificação em meio utilizando dióxido de carbono supercrítico as lipases produzidas tanto com soro de leite do tipo minas frescal quanto com o soro de leite do tipo muçarela apresentaram resultados semelhantes entre si, mas melhores que os apresentados nos outros meios reacionais utilizados. A lipase de soro de queijo minas frescal teve um rendimento de 37,73% enquanto que a lipase de soro de muçarela teve rendimento de 39,41%.

Interessante observar que houve um aumento no rendimento da reação de esterificação em meio utilizando dióxido de carbono supercrítico como solvente em comparação com a reação de esterificação em meio isento de solvente ou com solvente orgânico hexano o que mostra que a utilização do dióxido de carbono supercrítico como solvente e meio reacional favoreceu a reação de esterificação e se apresentou promissor para a lipase de *Geotrichum candidum*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANGAJALA, G.; PAVAN, P.; SUBASHINI, R. Lipases: An overview of its current challenges and prospectives in the revolution of biocatalAngajala, G., Pavan, P., & Subashini, R. (2016). Lipases: An overview of its current challenges and prospectives in the revolution of biocatalysis. Biocatalysis a. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 7, p. 257–270, 2016.

ANSCHAU, A.; ARAGÃO, V. C.; PORCIUNCULA, B. D. A.; KALIL, S. J.; BURKERT, C. A. V.; BURKERT, J. F. M. Enzymatic synthesis optimization of isoamyl butyrate. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 11, p. 2148–2156, 2011.

BOTHA, A.; BOTES, A. Geotrichum. **Encyclopedia of Food Microbiology**, v. 2, p. 88–93, 2014. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123847300001464>.

BURKERT, J. F. de M.; MALDONADO, R. R.; MAUGERI FILHO, F.; RODRIGUES, M. I. Comparison of lipase production by Geotrichum candidum in stirring and airlift fermenters. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 80, n. 1, p. 61–67, 2005.

COLLA, L. M.; LAZZAROTTO, A.; BENEDETTI, S.; APARECIDA, R.; LIMA, M. De; OLIVEIRA, C.; ELITA, T.; ALBERTO, J.; COSTA, V. Surface response methodology for the optimization of lipase production under submerged fermentation by filamentous fungi. v. 7, p. 1–7, 2016.

CORNELIO-SANTIAGO, H. P.; BERNARDO, C.; ALBERTINA, N.; OLIVEIRA, D. The Journal of Supercritical Fluids Supercritical CO 2 extraction of oil from green co ff ee beans : Solubility , triacylglycerol composition , thermophysical properties and thermodynamic modelling. v. 128, n. March, p. 386–394, 2017.

COSTA, V. E. U.; DE AMORIM, H. L. N. O emprego de lipases como agentes de resolução cinética de enantiômeros em síntese orgânica: Aspectos gerais sobre a influência do solvente. **Quimica Nova**, v. 22, n. 6, p. 863–873, 1999.

DA SILVA, R. P. F. F.; ROCHA-SANTOS, T. A. P.; DUARTE, A. C. Supercritical fluid extraction of bioactive compounds. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 76, p. 40–51, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2015.11.013>.

DE MORAIS, W. G.; KAMIMURA, E. S.; RIBEIRO, E. J.; PESSELA, B. C.; CARDOSO, V. L.; DE RESENDE, M. M. 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.

DIAZ, G. GERUZA DIAS INFLUÊNCIA DO USO DE Geotrichum candidum NAS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E SENSORIAIS DO QUEIJO TIPO CAMEMBERT Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa , como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e T. 2007.

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**, v. 107, p. 170–178, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.supflu.2015.08.011>.

DOS SANTOS, P.; ZABOT, G. L.; MEIRELES, M. A. A.; MAZUTTI, M. A.; MARTÍNEZ, J. Synthesis of eugenyl acetate by enzymatic reactions in supercritical carbon dioxide. **Biochemical Engineering Journal**, v. 114, p. 1–9, 2016.

ESCANDELL, J.; WURM, D. J.; BELLEVILLE, M. P.; SANCHEZ, J.; HARASEK, M.; PAOLUCCI-JEANJEAN, D. Enzymatic synthesis of butyl acetate in a packed bed reactor under liquid and supercritical conditions. **Catalysis Today**, v. 255, p. 3–9, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cattod.2015.01.048>.

FONSECA, J. M.; TELEKEN, J. G.; DE CINQUE ALMEIDA, V.; DA SILVA, C. Biodiesel from waste frying oils: Methods of production and purification. **Energy Conversion and Management**, v. 184, n. February, p. 205–218, 2019.

JACQUES, N.; MALLET, S.; LAAGHOUITI, F.; TINSLEY, C. R.; CASAREGOLA, S. Specific populations of the yeast Geotrichum candidum revealed by molecular typing. n. December 2016, p. 165–178, 2017.

JAVED, S.; AZEEM, F.; HUSSAIN, S.; RASUL, I.; SIDDIQUE, M. H.; RIAZ, M.; AFZAL, M.; KOUSER, A.; NADEEM, H. Bacterial lipases: A review on purification and characterization. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 132, p. 23–34, 2018.

LAGUERRE, M.; NLANDU MPUTU, M.; BRÏYS, B.; LOPEZ, M.; VILLENEUVE, P.; DUBREUCQ, E. Regioselectivity and fatty acid specificity of crude lipase extracts from Pseudozyma tsukubaensis, Geotrichum candidum, and Candida rugosa. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 119, n. 8, p. 1–10, 2017.

LIMA, U. de A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia industrial**. [s.l: s.n.]

MACEDO, G. A.; PASTORE, G. M.; RODRIGUES, M. I. Optimising the synthesis of isoamyl butyrate using Rhizopus sp. lipase with a central composite rotatable design. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 6, p. 687–693, 2004.

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

MALDONADO, R. R.; AGUIAR-OLIVEIRA, E.; FOGAÇA, F. M.; RAMOS, G. G.; MACEDO, G. A.; RODRIGUES, M. I. Evaluation of partial purification and immobilization of lipase from Geotrichum candidum. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, n. 3, p. 321–326, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2015.05.005>.

MALDONADO, R. R.; BURKERT, J. F. M.; MAZUTTI, M. A.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M. I. Evaluation of lipase production by Geotrichum candidum in shaken flasks and bench-scale stirred bioreactor using different impellers. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 1, n. 2, p. 147–151, 2012.

MALDONADO, R. R.; LOPES, D. B.; AGUIAR-OLIVEIRA, E.; KAMIMURA, E. S.; MACEDO, G. A. A Review on Geotrichum Lipases: Production, Purification, Immobilization and Applications. **Chemical and Biochemical Engineering Quarterly Journal**, v. 30, n. 4, p. 439–454, 2016. Disponível em: <http://silverstripe.fkit.hr/cabeq/assets/Uploads/06-4-16.pdf>.

MATSUDA, T.; HARADA, T.; NAKAMURA, K. Biocatalysis in Supercritical CO2. **Current Organic Chemistry**, v. 9, n. 3, p. 299–315, 2005. Disponível em: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1385-2728&volume=9&issue=3&spage=299>.

MELGOSA, R.; TERESA SANZ, M.; SOLAESA, Á. G.; DE PAZ, E.; BELTRÁN, S.; LAMAS, D. L. Supercritical carbon dioxide as solvent in the lipase-catalyzed ethanolysis of fish oil: Kinetic study. **Journal of CO2 Utilization**, v. 17, p. 170–179, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcou.2016.11.011>.

MELQUIDES, S. aparecido; AGUIAR-OLIVEIRA, E.; SILVA, G. S.; MALDONADO, R. R. Lipase production by Geotrichum candidum on semi-solid fermentation. p. 2–5, 2016.

MOAZENI, F.; CHEN, Y. C.; ZHANG, G. Enzymatic transesterification for biodiesel production from used cooking oil, a review. **Journal of Cleaner Production**, v. 216, p. 117–128, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.01.181>.

MUHAMMAD, A.; ALI, S.; BOKHARI, I.; ALI, N.; MUKHTAR, H.; NAWAZ, A. L. I.; IMRAN, M.; MUHAMMAD, A.; AL, E. T. Purification and Characterization of Extracellular Lipase By Geotrichum Candidum of Dairy Origin. **Pakistan Journal of Botany**, v. 49, n. 1572, p. 757–761, 2017.

ORLANDELLI, R. C.; SPECIAN, V.; FELBER, A. C.; PAMPHILE, J. A. Enzimas de interesse industrial: Produção por fungos e aplicações. **Revista Saúde E Biologia**, v. 5, p. 43–47, 2010.

PENG, Y.; SUN, L.; SHI, W.; LONG, J. Investigation of enzymatic activity , stability and structure changes of pectinase treated in supercritical carbon dioxide. **Journal of Cleaner Production**, v. 125, p. 331–340, 2016.

RATTRAY, F. P.; HANSEN, C. Secondary Cultures. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 1, n. 1996, p. 275–281, 1999.

RIBEIRO, E.; SILVA, G.; KAMIMURA, E. S.; AGUIAR OLIVEIRA, E.; RESENDE MALDONADO, R. PRODUÇÃO DE LIPASE DE Geotrichum candidum POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA UTILIZANDO SUBPRODUTOS DO PROCESSAMENTO DO MILHO. 2015. Disponível em: <http://proceedings.galoa.com.br/proceedings/10/papers/31570>.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos: uma estratégia seqüêncial de planejamentos.** [s.l: s.n.]

ROSA, B. H.; SILVA, G. S.; CONCEIÇÃO, G. J. A.; CARVALHO, R. A.; AGUIAR-OLIVEIRA, E.; MALDONADO, R. R.; KAMIMURA, E. S. Application of partially concentrated Candida rugosa lipase in the enzymatic synthesis of geranyl acetate in organic solvent. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 12, n. September, p. 90–95, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2017.09.005>.

SAITO, M. History of supercritical fluid chromatography: Instrumental development. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 115, n. 6, p. 590–599, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2012.12.008>.

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. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 107, p. 170–178, 2015.

SILVA, G. de S. GUILHERME DE SOUSA SILVA Imobilização de lipase em matriz polimérica para produção de bioaroma Pirassununga GUILHERME DE SOUSA SILVA Imobilização de lipase em matriz polimérica para produção de bioaroma Versão corrigida Pirassununga. 2012.

TOMMASO, G.; DE MORAES, B. S.; MACEDO, G. C.; SILVA, G. S.; KAMIMURA, E. S. Production of Lipase from Candida rugosa Using Cheese Whey through Experimental Design and Surface Response Methodology. **Food and Bioprocess Technology**, v. 4, n. 8, p. 1473–1481, 2011.

WEN, D.; JIANG, H.; ZHANG, K. Supercritical fluids technology for clean biofuel production. **Progress in Natural Science**, v. 19, n. 3, p. 273–284, 2009.
ZHU, J.; LU, K.; XU, X.; WANG, X.; SHI, J. Purification and characterization of a novel glutamate dehydrogenase from Geotrichum candidum with higher alcohol and amino acid activity. **AMB Express**, 2017.