



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102020015002-2 A2



(22) Data do Depósito: 23/07/2020

(43) Data da Publicação Nacional: 01/02/2022

(54) **Título:** PROCESSO DE PRODUÇÃO DE MICROESFERAS POROSAS À BASE DE POLIHIDROXIALCANOATOS (PHAS) PARA IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES E APLICAÇÕES

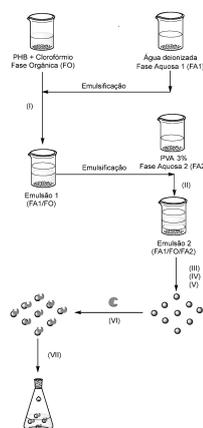
(51) **Int. Cl.:** B01J 13/12; C12N 11/04; C12N 9/96; C12P 7/62; C12P 7/64.

(52) **CPC:** B01J 13/12; C12N 11/04; C12N 9/96; C12P 7/62; C12P 7/64.

(71) **Depositante(es):** UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANA.

(72) **Inventor(es):** NADIA KRIEGER; JEFERSON LUIZ RICHTER; SÔNIA FARIA ZAWADZKI; ROBSON CARLOS ALNOCH; VIVIAN ROTUNO MOURE VALDAMERI; LEANDRO ALVES DOS SANTOS.

(57) **Resumo:** PROCESSO DE PRODUÇÃO DE MICROESFERAS POROSAS À BASE DE POLIHIDROXIALCANOATOS (PHAs) PARA IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES E APLICAÇÕES. A presente invenção se refere a um processo para obtenção de um biocatalisador heterogêneo contendo lipases. Neste processo, o suporte onde a lipase é imobilizada é preparado pela técnica de evaporação de solvente de dupla emulsão (DESE, em Inglês, double emulsion solvent evaporation), partir de Poli-3-hidroxi-butarato (PHB), que pode ser também aplicada a outros Polihidroxi-alcanoatos (PHAs) A técnica DESE leva à produção de microesferas com tamanho e com porosidade controlada. O objetivo da invenção é preparar um catalisador heterogêneo de baixo custo, atóxico e com alta eficiência catalítica. A lipase imobilizada pelo método proposto foi empregada na síntese ésteres de interesse industrial (oleato de etila), uma reação modelo que demonstra a possibilidade de utilização do biocatalisador imobilizado na síntese do biodiesel e de biolubrificantes. A lipase imobilizada nas microesferas porosas de diferentes tamanhos apresentou maior eficiência catalítica em relação à lipase imobilizada no suporte sem qualquer tratamento.



PROCESSO DE PRODUÇÃO DE MICROESFERAS POROSAS À BASE DE POLIHIDROXIALCANOATOS (PHAs) PARA IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES E APLICAÇÕES

Campo da Invenção

[001]. O presente pedido de Patente de Invenção se insere no campo da indústria biotecnológica, mais especificamente na área de imobilização enzimática e biocatálise, e descreve um processo de produção de microesferas porosas de polihidroxicanoatos (PHAs), principalmente poli-3-hidroxibutirato (PHB), para obtenção de um catalisador heterogêneo contendo lipases, com aplicação em síntese de ésteres industriais como biodiesel e biolubrificantes.

Fundamentos da Invenção e Descrição do Estado da Técnica

[002]. Lipases (triacilglicerol éster hidrolases, EC 3.1.1.3) são enzimas que atuam sobre ésteres carboxílicos, promovendo sua hidrólise em ambientes aquosos ou sua síntese em ambientes aquo-restritos e por isso são aplicadas nos mais diversos ramos do setor produtivo, como na indústria farmacêutica, na indústria alimentícia e na produção de biodiesel e biolubrificantes (JAEGER et al., 1999; LOURINHO; BRITO, 2015).

[003]. A produção enzimática de biodiesel, composto por ésteres como o oleato de etila, e outros ésteres similares, que são utilizados como biolubrificantes, é um processo ambientalmente recomendado porque utiliza condições brandas de temperatura e pressão e porque os ésteres são obtidos de fontes renováveis e são biodegradáveis.

[004]. Nos processos de síntese enzimática do biodiesel e de biolubrificantes, lipases podem ser utilizadas na forma não imobilizada (livres); porém, a imobilização de lipases é importante para permitir a sua

reutilização em ciclos, reduzindo os custos de processos associados à enzima (VILLENEUVE et al., 2000).

[005]. A técnica de imobilização é baseada na ligação da enzima em suportes sólidos, com o intuito de torná-la insolúvel no meio reacional e possibilitar recuperação e reutilização do biocatalisador. Além disso, a imobilização, por vezes, pode conferir características interessantes para a enzima, como o aumento da atividade, termoestabilidade e estabilidade em solventes orgânicos (MATEO et al., 2007). O método de imobilização de lipases por adsorção física por interações hidrofóbicas é o mais utilizado, por ser facilmente reproduzido e mais barato quando comparado às técnicas como ligação covalente ou aprisionamento em membrana.

[006]. Além disso, suportes hidrofóbicos contribuem para a imobilização de lipases em sua conformação aberta, em que a “lid”, tampa hidrofóbica que recobre o sítio ativo da maioria das lipases, interage com o suporte e permite o livre acesso do substrato ao sítio ativo da enzima, conferindo maior atividade ao biocatalisador (MATEO et al., 2007; PERSSON et al., 2002).

[007]. Materiais comercialmente utilizados, como resinas poliacrílicas ou polipropileno, são suportes eficientes para imobilização de lipases, porque têm altas porosidade e área superficial, mas são de alto custo, além de não serem biodegradáveis. Assim, a prospecção de novos suportes biodegradáveis a partir de fontes renováveis para estas enzimas tem ganhado cada vez mais importância.

[008]. Neste contexto, merecem destaque os polihidroxialcanoatos (PHAs) e seus derivados, como o PHB, produzidos por microrganismos como polímeros de reserva energética.

[009]. Além de serem hidrofóbicos e biodegradáveis, os PHAs são insolúveis em muitos solventes orgânicos como etanol, metanol e *n*-hexano, que geralmente fazem parte do meio reacional na síntese de ésteres como o biodiesel e os biolubrificantes. Estas características tornam

os PHAs uma alternativa interessante para a imobilização de lipases (MENDES et al., 2012).

[0010]. Entretanto, os PHAs, particularmente o PHB, estão disponíveis comercialmente na forma de um pó fino, que são partículas com média de diâmetro de 75–90 μm , com elevada área superficial, $17,1 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$, porém predominantemente microporosas (3,1 nm), o que torna o PHB em pó inadequado para a imobilização de lipases.

[0011]. O PHB também está disponível comercialmente em granulometrias maiores que são utilizadas na produção de bioplásticos, mas as partículas não são porosas, o que torna difícil a sua aplicação para imobilização de enzimas, notadamente lipases.

[0012]. Quando utilizado na forma de pó, os PHAs, o PHB em particular, apesar de apresentarem eficiência na imobilização de lipases, são de difícil manuseio e tornam impossível a aplicação do biocatalisador heterogêneo em reatores para síntese de ésteres, pois as partículas finas do biocatalisador imobilizado aderem às paredes de biorreatores de leito agitado ou sofrem empacotamento indesejável no biorreator de colunas.

[0013]. Em ambos os casos dos biorreatores acima, há perdas consideráveis da enzima durante o processo.

[0014]. Se utilizados PHAs de granulometrias maiores, as partículas não são porosas, causando baixa eficiência de imobilização, porque possuem baixa área superficial.

[0015]. Assim, há necessidade de produzir microesferas porosas de PHAs que possibilitem seu uso para imobilização de enzimas, notadamente, lipases.

[0016]. As microesferas, além de terem o tamanho adequado, devem ter resistência mecânica, elevada área superficial e porosidade controlada para permitir a imobilização eficiente da enzima.

[0017]. Existem várias técnicas de preparação de microesferas de polímeros em geral, que podem ser adaptadas de acordo com a finalidade das partículas. Destacam-se entre as principais a extrusão, a

coacervação (fenômeno de separação de fases numa solução coloidal), *spray drying* e a técnica de evaporação de solvente de dupla emulsão (DESE, em Inglês, *double emulsion solvent evaporation*) (WAZARKAR et al., 2016)

[0018]. A técnica DESE é frequentemente utilizada para o preparo de microesferas por ser simples e barata. Ela se baseia na evaporação do solvente de um sistema formado por uma solução contendo o polímero que dará origem às microesferas solubilizado em um solvente orgânico e uma solução aquosa contendo um polímero de revestimento. A formação das microesferas pode ocorrer através da formação de emulsões simples (água/óleo) ou múltiplas emulsões (água/óleo/água), utilizando as mais diversas variações de solventes e fases aquosas.

[0019]. Em relação ao estado da técnica, existem alguns documentos com algumas similaridades ao presente pedido e que serão apresentados nesta seção.

[0020]. Recentemente, os PHAs, principalmente o PHB, têm sido relatados na literatura científica como suportes para imobilização de lipases na síntese de ésteres, sendo geralmente utilizado o biopolímero na forma de pó.

[0021]. No trabalho de Ramos et al, os autores propuseram um método de imobilização da lipase de *Geotrichum candidum* em partículas de poli-3-hidroxi-butirato (PHB) comercial. O biocatalisador preparado exibiu atividade de $404,4 \pm 2,3 \text{ U g}^{-1}$ na hidrólise de triglicerídeos do azeite de oliva a 37 °C em pH 7,0, um valor cerca de 12 vezes maior encontrado para a atividade de hidrólise utilizando a enzima livre, com uma porcentagem de atividade recuperada de cerca de 40% e um rendimento de imobilização de 59% (RAMOS et al., 2015).

[0022]. A lipase de *Thermomyces lanuginosus* (TLL) foi imobilizada por adsorção física em poli-3-hidroxi-butirato (PHB) comercial, o biocatalisador foi utilizado para catalisar a síntese de ésteres alquílicos por esterificação de ácido oleico e álcoois de cadeia curta (metanol e

etanol) em *n*-heptano. O biocatalisador preparado apresentou uma atividade de hidrólise em torno de 1300 U g⁻¹ de suporte (MIRANDA et al., 2014).

[0023]. Partículas de poli-3-hidroxibutirato (PHB) comercial foram usadas como suporte para imobilizar a lipase pancreática de porco (PPL). Os biocatalisadores preparados foram usados na síntese do éster de aroma butanoato de butila em *n*-heptano e na síntese de ésteres etílicos por transesterificação com etanol utilizando óleos extraídos de polpa e de sementes de macaúba em sistema livre de solvente. Na reação de esterificação, o valor de conversão em butirato de butila foi de 93% após 2 h de reação. E para as reações de transesterificação o biocatalisador preparado alcançou um rendimento de éster etílicos de 50% após 48 h de reação utilizando o óleo de sementes e 35% após 96 h de reação quando se utilizou o óleo da polpa. (SILVA et al., 2014).

[0024]. Em nenhum dos trabalhos mencionados utilizou-se a técnica DESE para a produção de microesferas porosas de PHAs, notadamente de PHB.

[0025]. A patente de invenção BR 102016021926-4 A2 de 2018, intitulada “Composições de nanoesferas de PHB/PCL contendo estatinas, processo de preparação e uso” descreve um método de liberação de fármaco constituído por partículas (micro e nano) de misturas de (poli-3-hidroxibutirato)/poli(e-caprolactona), sem guardar relação com este pedido, pois não se trata de um processo de imobilização enzimática.

[0026]. A patente de invenção BR 102016012991 -5 A2 de 2018, intitulada “PHB e blendas de PHB PPG, utilizadas como meio de liberação prolongada de Sinvastatina” descreve um método de liberação de fármaco constituído por poli-3-hidroxidobutirato (PHB), polipropilenoglicol (PPG). A presente invenção não apresenta semelhança com o pedido acima.

[0027]. A patente de invenção US 2010/0189800 A1 de 2010, intitulada “*Continuous double emulsion process for making microparticles*” descreve um processo de preparação de microesferas de poli-3-

hidroxibutirato para encapsular moléculas bioativas, sem guardar relação com o presente pedido de patente.

[0028]. No presente pedido, utilizou-se a técnica DESE, que propicia a produção de microesferas porosas de PHAs de tamanho adequado, elevada área superficial para imobilização de lipases, podendo ser aplicada também para a imobilização de outras enzimas.

[0029]. Os biocatalisadores imobilizados poderão ser utilizados em biorreatores industriais propiciando melhores condições operacionais, possibilitando a redução de custos de processos enzimáticos relacionados aos custos da enzima, contribuindo com o desenvolvimento da indústria biotecnológica.

[0030]. Os biocatalisadores produzidos pela imobilização de lipases por adsorção hidrofóbica em microesferas porosas de PHAs produzidas pela técnica DESE poderão ser utilizados na indústria do biodiesel, de biolubrificantes e em outras aplicações industriais voltadas à síntese de ésteres.

Descrição da abordagem do problema técnico

[0031]. Analisando os trabalhos nos quais a utilização de PHAs é viável, mas que apresenta problemas de granulometria e porosidade, surgiu a ideia proposta no presente pedido de patente de invenção **“PROCESSO DE PRODUÇÃO DE MICROESFERAS POROSAS À BASE DE POLIHIDROXIALCANOATOS (PHAs) PARA IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES E APLICAÇÕES”**. A inovação está no melhoramento de suportes hidrofóbicos à base de PHAs, pela possibilidade de controlar experimentalmente as características morfológicas do biosuporte, como tamanho da microesfera, porosidade e área superficial, possibilitando a eficiente imobilização de lipases e a utilização do biocatalisador imobilizado, em processos industriais.

Descrição detalhada da Invenção

[0032]. A presente invenção descreve um processo de obtenção de microesferas de PHB com porosidade controlada para imobilização de lipases, compreendendo as etapas de: I) Preparação da emulsão 1; II) Preparação da emulsão 2; III) Evaporação do solvente; IV) Filtração; V) Secagem; VI) Imobilização da lipase; VII) Aplicação da lipase imobilizada na síntese de ésteres de interesse industrial.

[0033]. Com relação à etapa I, utilizou-se o polímero PHB comercial grau de pureza de 99,5%, teor de umidade abaixo de 0,3%, massa molar média de aproximadamente $600.000 \text{ g mol}^{-1}$.

[0034]. Ainda na etapa I, para a obtenção das microesferas de PHB, foi preparada uma solução a partir da dissolução de PHB em solvente orgânico, mantendo-se sob agitação até a completa homogeneização da mistura, resultando em uma solução com 1 a 5% (m/v) de PHB, sendo estes os componentes da fase orgânica (FO).

[0035]. A emulsão 1 foi preparada adicionando quantidades de agente formador de poros, um exemplo não limitativo é a água, e solventes miscíveis em água, podendo ser metanol ou etanol, dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilformamida (DMF), isopropanol sobre a fase orgânica; em seguida, esta emulsão foi homogeneizada em agitador mecânico com pás, com velocidade e tempo de agitação controlados (cisalhamento).

[0036]. A quantidade de agente formador de poros descrita em [0033] pode ser variada. A proporção de agente formador de poros e a velocidade de agitação influenciam na porosidade das microesferas.

[0037]. A homogeneização descrita em [0033] foi realizada com variação da velocidade de rotação e do tempo de cisalhamento para permitir a produção de diferentes tamanhos de poros.

[0038]. A emulsão 2 foi preparada adicionando-se a emulsão 1 sobre uma solução aquosa contendo um agente formador de camada de solvatação, tipicamente Poli(álcoolvinílico) (PVA), de 1 a 5% (m/v), etapa II.

[0039]. A homogeneização descrita em [0036] foi realizada com variação da velocidade de rotação e do tempo de cisalhamento para permitir a produção de diferentes tamanhos de partículas.

[0040]. Ainda na etapa II, após a interrupção da homogeneização, adicionou-se o mesmo volume da emulsão em água para permitir a evaporação do solvente.

[0041]. Na etapa III, o solvente foi evaporado à temperatura ambiente em capela sob agitação por 24 h a 200 rpm.

[0042]. As microesferas foram removidas por filtração em papel de filtro qualitativo, secas em um dessecador a vácuo por 16 h e armazenadas em frascos de vidro à temperatura ambiente, etapas V e VI, respectivamente.

[0043]. Na referida etapa VII, para a imobilização da enzima foi utilizada uma lipase de metagenômica LipG9 como modelo (Alnoch et al, 2015) as microesferas de PHB foram umedecidas com uma solução de etanol (50% em água, v/v) por 30 min, depois lavadas com água destilada e filtradas. O objetivo deste procedimento foi excluir o ar contido nas partículas.

[0044]. Em seguida, em um frasco de Erlenmeyer de 25 mL, 0,15 g de microesferas, uma alíquota de extrato enzimático na proporção necessária para fornecer a quantidade desejada de proteína para cada experimento e 5 mL de tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, foram adicionados.

[0045]. Esta mistura foi incubada em um agitador orbital a 150 rpm a 4 °C por 24 h. Alíquotas de 400 µL do sobrenadante foram coletadas em diferentes momentos durante a imobilização para avaliar a atividade enzimática de hidrólise residual e o teor de proteínas. Após o procedimento, o derivado imobilizado foi removido da mistura por filtração em papel de filtro qualitativo, seco em um dessecador a vácuo por 16 h e armazenado a 4 °C.

[0046]. Para a determinação da atividade da lipase imobilizada utilizou-se o método da síntese do oleato de etila, um dos

ésteres que compõem o biodiesel, para verificar o desempenho do biocatalisador após o processo de imobilização.

[0047]. As reações foram realizadas em agitador orbital com frascos de Erlenmeyer de 25 mL contendo 5 mL de *n*-hexano, 100 mg da enzima imobilizada, 70 mmol L⁻¹ de ácido oleico e 210 mmol L⁻¹ de etanol, 40 °C, 200 rpm. Em intervalos fixos, alíquotas de 100 µL foram coletadas do meio de reação e analisadas quanto ao teor residual de ácidos graxos pelo método de Lowry-Tinsley. Uma unidade de atividade de esterificação (U) foi definida como a quantidade de enzima que promove o consumo de 1 µmol/min de ácido graxo nas condições do ensaio.

[0048]. O método de Lowry-Tinsley (1976) foi utilizado para quantificar o teor de ácido oleico durante as reações, a partir do qual foram determinadas as atividades de esterificação. Para isso, foram coletadas amostras (100 µL) do meio reacional que foram adicionadas em *ependorfs* contendo 1,15 mL de tolueno e o reativo de cor (250 µL). A mistura foi agitada em vórtex durante 40 s e a absorbância da fase orgânica lida em espectrofotômetro a 715 nm. A concentração de ácido oleico meio foi relacionada à absorbância através de curvas de calibração feitas individualmente com os referidos ácidos e obtidas nas mesmas condições do ensaio.

[0049]. A partir da variação do tempo e da força de cisalhamento das etapas I e II descritas no presente pedido de patente de invenção, foram obtidas microesferas pequenas ($\varnothing < 0,5$ mm), médias ($\varnothing > 0,5 < 0,8$ mm) e grandes ($\varnothing > 1,4$ mm) com áreas superficiais de 10,0 m² g⁻¹, 9,5 m² g⁻¹ e 8,4 m² g⁻¹, respectivamente. A área superficial do pó (sem tratamento) e do controle ($\varnothing < 0,5$ mm), produzido sob as mesmas condições das microesferas pequenas, mas sem agente formador de poros, foi de 11,7 m² g⁻¹, 8,4 m² g⁻¹, respectivamente.

[0050]. O diâmetro das microesferas foi determinado por granulometria. A porosidade, o volume total de poros e a área superficial foram determinados pela adsorção de N₂ utilizando os métodos de BET e

BJH (S. Brunauer, P.H. Emmett, E. Teller 1938; E.P. Barrett, L.G. Joyner, P.P. Halenda, 1951).

[0051]. As microesferas pequenas, médias e grandes apresentaram tamanho máximo de macroporos de 119 nm, 167 nm e 212 nm, respectivamente, enquanto o pó de PHB comercial apresentou um tamanho máximo de poros de 138 nm (Tabela 1).

[0052]. **Tabela 1.** Estratégia de variação da força de cisalhamento aplicada à técnica de dupla emulsão e evaporação do solvente (DESE) para a obtenção de partículas com tamanho crescente e poros controlados.

Microesferas de PHB	Produção				Caracterização			
	Emulsão 1		Emulsão 2		Diâmetro	Área superficial	Volume total de poros	Tamanho dos macroporos
	Velocidade (rpm)	Tempo (min)	Velocidade (rpm)	Tempo (min)				
PHB pó	x	x	x	x	x	11,7	0,018	138
Controle	1000	1	1000	4	<0,5	8,4	0,010	90
Pequenas	5000	2	1000	4	<0,5	10,0	0,016	119
Médias	4000	2	500	3	> 0,5 <0,8	9,5	0,013	167
Grandes	3000	2	250	3	> 1,4	8,4	0,012	212

[0053]. A vantagem das microesferas pequenas, médias e grandes de PHB produzidas pela estratégia de variação da força de cisalhamento mostrada no presente pedido de patente em relação ao PHB comercial é que estas são muito maiores do que as partículas do pó comercial de PHB, mas mantêm a área superficial elevada e apresenta maior diâmetro de macroporos.

[0054]. Os resultados mostraram que as eficiências de imobilização foram de 99% para PHB em pó, 52% para o controle (microesferas sem agente formador de poros), 55% para microesferas pequenas, 83% para microesferas médias e 76% para microesferas

grandes e atividades de esterificação foram 20, 10, 15, 22 e 20 U por g de suporte, respectivamente.

[0055]. Para a enzima imobilizada em partículas médias com tamanhos de 0,5 a 0,8 mm de diâmetro e área superficial de $9,5 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ a atividade enzimática foi de 22 U g^{-1} . Este valor significa que $22 \text{ } \mu\text{mol}$ do éster foram formados por min por 1 g do suporte contendo as lipases. Para o processo onde se utilizou as lipases imobilizadas em partículas de PHB sem o agente formador de poros, a atividade foi de 10 U g^{-1} . Ou seja, após a imobilização, a atividade da lipase aumentou aproximadamente 2 vezes quando comparada com a atividade da lipase imobilizada no suporte de PHB sem a formação dos poros.

[0056]. As microesferas de PHB podem ser utilizadas em biorreatores de síntese de ésteres como biodiesel e biolubrificantes, minimizando as perdas durante o processo acarretadas por empacotamento excessivo, no caso de biorreatores de leito empacotado, ou de massa de lipase imobilizada, no caso de biorreatores de leito agitado.

[0057]. Diante dos resultados obtidos, pode-se considerar que o processo para obtenção das microesferas porosas de diferentes tamanhos e porosidade pela técnica DESE possibilitou a imobilização da lipase LipG9 empregando o bio suporte (PHB), que pode ser estendido aos PHAs de modo geral, descrito nesta patente.

[0058]. O processo é vantajoso no que diz respeito às condições operacionais, citadas em [0024], à utilização de água como agente formador de poros e à eficiência catalítica na síntese de ésteres, com aplicação na síntese enzimática do biodiesel e biolubrificantes [0026].

Descrição das Figuras

[0059]. A Figura 1 representa o fluxograma processo do proposto neste pedido de patente de invenção. Figura 1: Método proposto neste pedido de patente.

[0060]. As etapas do processo de obtenção do biossuporte de PHB para imobilização de lipases, para ser aplicado em reações biocatalisadas, estão descritas a seguir:

[0061]. (I) Preparação da emulsão 1.

[0062]. (II) Preparação da emulsão 2.

[0063]. (III) Evaporação do solvente.

[0064]. (IV) Filtração.

[0065]. (V) Secagem.

[0066]. (IV) Imobilização da lipase no biossuporte.

[0067]. (V) Etapa de aplicação do biocatalisador heterogêneo obtido em reações para obtenção do oleato de etila.

REIVINDICAÇÕES

1. PROCESSO DE PRODUÇÃO DE MICROESFERAS POROSAS À BASE DE POLIHIDROXIALCANOATOS (PHAs) PARA IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES E APLICAÇÕES **caracterizado por** realizar um procedimento de preparação de microesferas de PHAs, preferencialmente poli-3-hidroxi-butirato (PHB), com tamanho e porosidade controladas pela técnica de evaporação de solvente de dupla emulsão (DESE, em Inglês, double emulsion solvent evaporation), a partir da variação estratégica da força de cisalhamento.

2. PROCESSO DE PRODUÇÃO DE MICROESFERAS POROSAS À BASE DE POLIHIDROXIALCANOATOS (PHAs) PARA IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES E APLICAÇÕES de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pela** produção de microesferas de PHAs de diferentes tamanhos e com porosidade controlada para imobilização de lipases por adsorção, sendo obtido um biocatalisador imobilizado em suporte biodegradável e biorrenovável para utilização em síntese de ésteres de interesse industrial.

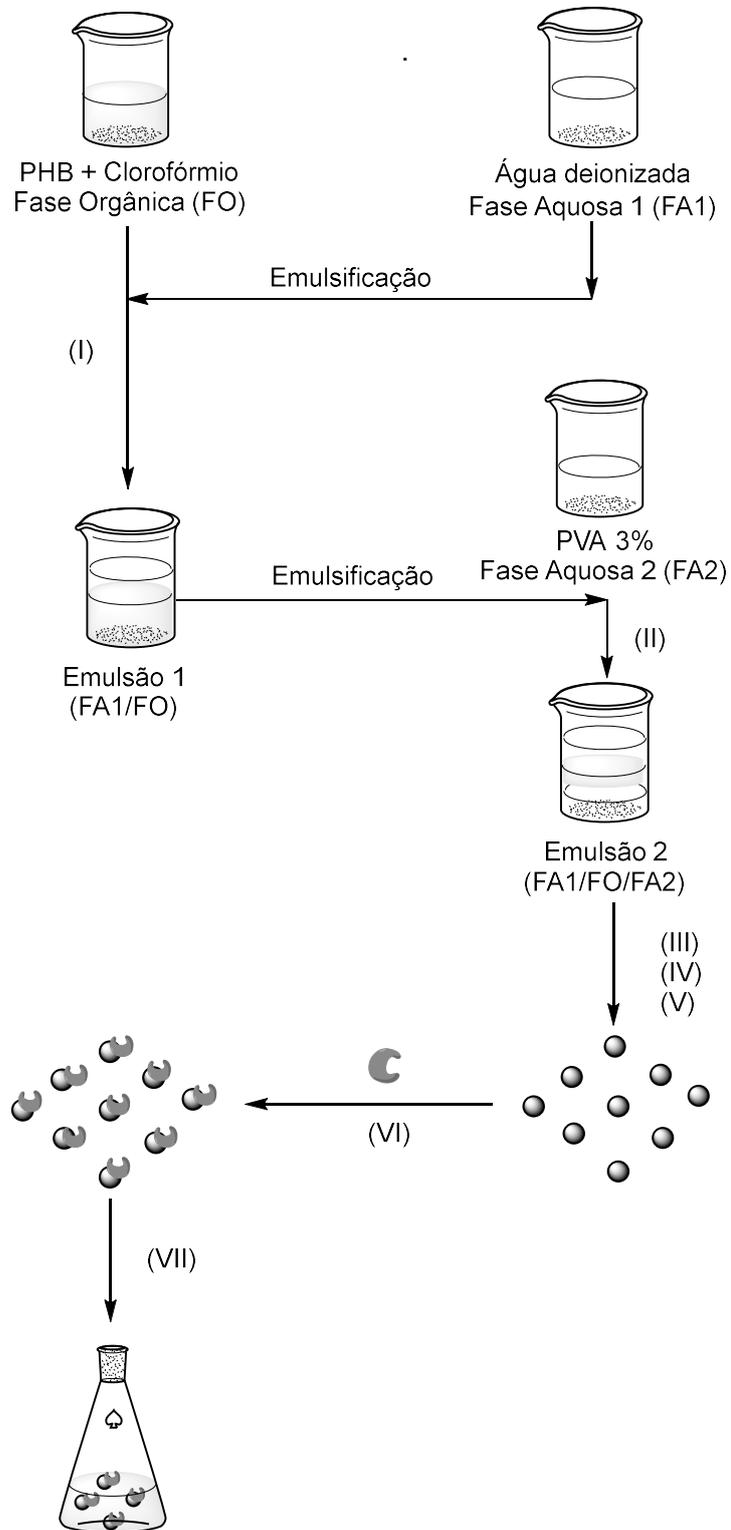
3. PROCESSO DE PRODUÇÃO DE MICROESFERAS POROSAS À BASE DE POLIHIDROXIALCANOATOS (PHAs) PARA IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES E APLICAÇÕES de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** utilizar materiais biopoliméricos, preferencialmente, poli-3-hidroxi-butirato (PHB).

4. PROCESSO DE PRODUÇÃO DE MICROESFERAS POROSAS À BASE DE POLIHIDROXIALCANOATOS (PHAs) PARA IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES E APLICAÇÕES de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** utilizar a técnica de emulsificação/evaporação (DESE) e por utilizar preferencialmente água como o agente para formação de poros no suporte.

5. PROCESSO DE PRODUÇÃO DE MICROESFERAS POROSAS À BASE DE POLIHIDROXIALCANOATOS (PHAs) PARA IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES E APLICAÇÕES de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** utilizar preferencialmente lipases imobilizadas em microesferas porosas de PHB em reações de síntese de ésteres de interesse industrial (como biodiesel e biolubrificantes) em solventes orgânicos.

FIGURA

Figura 1



RESUMO**PROCESSO DE PRODUÇÃO DE MICROESFERAS POROSAS À BASE DE
POLIHIDROXIALCANOATOS (PHAs) PARA IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES E
APLICAÇÕES**

A presente invenção se refere a um processo para obtenção de um biocatalisador heterogêneo contendo lipases. Neste processo, o suporte onde a lipase é imobilizada é preparado pela técnica de evaporação de solvente de dupla emulsão (DESE, em Inglês, *double emulsion solvent evaporation*), partir de Poli-3-hidroxi-butirato (PHB), que pode ser também aplicada a outros Polihidroxi-alcanoatos (PHAs) A técnica DESE leva à produção de microesferas com tamanho e com porosidade controlada. O objetivo da invenção é preparar um catalisador heterogêneo de baixo custo, atóxico e com alta eficiência catalítica. A lipase imobilizada pelo método proposto foi empregada na síntese ésteres de interesse industrial (oleato de etila), uma reação modelo que demonstra a possibilidade de utilização do biocatalisador imobilizado na síntese do biodiesel e de biolubrificantes. A lipase imobilizada nas microesferas porosas de diferentes tamanhos apresentou maior eficiência catalítica em relação à lipase imobilizada no suporte sem qualquer tratamento.