



INPI
INSTITUTO
NACIONAL
DA PROPRIEDADE
INDUSTRIAL
Assinado
Digitalmente

REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO, INDÚSTRIA, COMÉRCIO E SERVIÇOS
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

CARTA PATENTE Nº BR 102020012831-0

O INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL concede a presente PATENTE DE INVENÇÃO, que outorga ao seu titular a propriedade da invenção caracterizada neste título, em todo o território nacional, garantindo os direitos dela decorrentes, previstos na legislação em vigor.

(21) Número do Depósito: BR 102020012831-0

(22) Data do Depósito: 23/06/2020

(43) Data da Publicação Nacional: 04/01/2022

(51) Classificação Internacional: C12N 11/06; C12N 9/14; C12P 7/62.

(54) Título: PROCESSO DE OBTENÇÃO DE BIODISSERTAÇÃO À BASE DE QUITOSANA E AMIDO PARA IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES E APLICAÇÃO EM SÍNTESE DE ÉSTERES

(73) Titular: UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ, Instituição de Ensino e Pesquisa. CGC/CPF: 75101873000190. Endereço: AVENIDA SETE DE SETEMBRO, 3165, CURITIBA, PR, BRASIL (BR), Brasileira; UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANA, Instituição de Ensino e Pesquisa. CGC/CPF: 75095679000149. Endereço: RUA JOÃO NEGRÃO, 280 2º ANDAR, CURITIBA, PR, BRASIL (BR), 80010-200, Brasileira

(72) Inventor: ROBSON CARLOS ALNOCH; NADIA KRIEGER; LEANDRO ALVES DOS SANTOS; ALESSANDRA MACHADO BARON.

Prazo de Validade: 20 (vinte) anos contados a partir de 23/06/2020, observadas as condições legais

Expedida em: 13/08/2024

Assinado digitalmente por:

Alexandre Dantas Rodrigues

Diretor de Patentes, Programas de Computador e Topografias de Circuitos Integrados

PATENTES
ICTs



PROCESSO DE OBTENÇÃO DE BIOSSUORTE À BASE DE QUITOSANA E AMIDO PARA IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES E APLICAÇÃO EM SÍNTESE DE ÉSTERES

Campo da Invenção

[001]. A presente solicitação de Patente de Invenção se insere mais especificamente no campo da indústria biotecnológica, na área de imobilização enzimática e biocatálise, e descreve um processo para obtenção de um biocatalisador heterogêneo contendo lipases, a partir de quitosana modificada com amido polialdeídico, com aplicação em síntese de ésteres.

Fundamentos da Invenção e Descrição do Estado da Técnica

[002]. As lipases constituem uma classe de biocatalisadores com excelente desempenho, atribuído principalmente à sua capacidade de catalisar vários tipos de reações em ambientes não-aquosos, como solventes orgânicos. Além disso, nestes ambientes, lipases podem catalisar a síntese de uma grande gama de produtos de interesse industrial, como os ésteres, em condições brandas de reação (JAEGER et al, 1999, VILLENEUVE et al, 2000).

[003]. Industrialmente, lipases são amplamente aplicadas nas áreas de biotecnologia, como por exemplo: a) na indústria óleo-química, para a hidrólise e interesterificação de óleos e gorduras e obtenção de biossurfactantes; b) na síntese de polímeros biodegradáveis; c) nas indústrias farmacêutica e química para a síntese de produtos de química fina e na produção de intermediários de produtos biologicamente ativos, como o flurbiprofeno e Baclofen;. d) na indústria de alimentos, para a maturação de queijos, na síntese de ésteres de aromas e na síntese do aspartame; e) na indústria de cosméticos,

para a síntese de ésteres de aroma, como cinamatos de alquila e palmitato de isopropila (emoliente em produtos para a pele e óleos para banho) e f) na produção de biodiesel.

[004]. Porém, o uso de lipases na forma livre ou solúvel apresenta problemas como a baixa estabilidade operacional do biocatalisador, dificuldades na recuperação da enzima e dos produtos após processo, dificuldade de reuso da enzima, entre outros, que prejudicam a sua aplicação industrial. Em processos industriais, estas desvantagens podem ser minimizadas através de um processo de imobilização de lipases em um suporte, que pode permitir um aumento da atividade e estabilidade da enzima, além de permitir o seu reuso, reduzindo os custos do processo associados à enzima.

[005]. Diversas estratégias foram desenvolvidas nos últimos anos para imobilizar lipases, seja por adsorção, encapsulamento ou aprisionamento, ligação covalente da enzima no suporte (MATEO et al., 2010, 2006; SHELDON, 2007, RODRIGUES et al., 2019). Muitos materiais são utilizados para imobilizar enzimas covalentemente; dentre eles, polímeros sintéticos e polímeros naturais modificados. Um exemplo de material natural que pode ser usado na imobilização de lipases é a quitosana, um biopolímero derivado da quitina. A matéria-prima de produção da quitosana, a quitina, é encontrada em abundância na natureza, as principais fontes são carapaças de crustáceos (caranguejos, camarões e lagostas), o que proporciona alta disponibilidade de quitina, já que esta é um resíduo indesejável da indústria pesqueira.

[006]. Além disso, a quitosana é biocompatível, apresenta características mecânicas e físico-químicas especiais, como alta densidade de grupos amina em sua estrutura. Com isso, matrizes à base de quitosana podem ser modificadas quimicamente com reagentes reticulantes, cuja finalidade é facilitar a ligação enzima-suporte (RINAUDO et al., 2006, MITTAL et al., 2018). A reticulação, também

chamada de reação de entrecruzamento (crosslinking), é uma estratégia para ativar a superfície de materiais para imobilização enzimática via ligação covalente e, além disso, para reduzir a mobilidade da estrutura do polímero, melhorando as suas propriedades físico-químicas e estabilidade mecânica. Os agentes reticulantes mais conhecidos e encontrados na literatura são compostos químicos bi- ou poli-funcionais como o glutaraldeído, a epícloridrina, o glicidol e o tripolifosfato de sódio (MENDES et al., 2010).

[007]. Nestes trabalhos, o principal agente reticulante utilizado para promover a ligação covalente com a enzima é o glutaraldeído. No entanto, alguns estudos apontam as desvantagens da utilização do glutaraldeído devido à sua toxicidade; além disso, sendo uma molécula pequena, pode reagir com resíduos de aminoácidos do sítio ativo de algumas enzimas, como transaminases, levando à sua inativação (FERNADEZ-LAFUENTE et al., 1999; NADAR et al., 2016).

[008]. Outros agentes reticulantes compostos por moléculas maiores também vêm sendo estudados para imobilização covalente de enzimas. São exemplos os polialdeídos derivados de carboidratos como dextrana, alginato de sódio e alguns tipos de amido. As vantagens da utilização destes polialdeídos são atribuídas às suas características macromoleculares, quando comparados ao glutaraldeído. Assim sendo, agentes reticulantes macromoleculares não inativam enzimas quando utilizados no processo de imobilização covalente, pois não penetram no sítio ativo da enzima devido ao seu tamanho (MATEO et al., 2004, TACIAS-PASCACIO et al, 2019). Outra vantagem é atribuída à característica de "braço espaçador" presente nesta classe de agentes reticulantes. Por serem moléculas relativamente grandes, permitem um espaçamento maior entre o suporte e a enzima, diminuindo o impedimento estérico enzima-enzima e reduzindo interações diretas indesejáveis entre os grupos funcionais na superfície do suporte e a macromolécula

enzimática. Além disso, os carboidratos contêm muitos grupos hidroxila e têm uma forte capacidade de retenção de água, o que pode modificar o microambiente ao redor da enzima e manter a hidratação do biocatalisador necessária para a sua atividade catalítica (ZHANG et al, 2014).

[009]. Até o momento, não foi reportado nenhum trabalho relatando o polialdeído derivado de amido (amido polialdeídico) como agente reticulante da quitosana para imobilização de lipases, que é o objetivo da presente invenção. A utilização de amido polialdeídico como agente reticulante da quitosana é muito eficaz para ligar covalentemente lipases no suporte, cujas principais vantagens são o baixo custo, facilidade operacional e compatibilidade ambiental. A inovação está na produção de um biossuporte construído especialmente para lipases, pois utiliza surfactantes para desagregação, tanto o amido quanto a quitosana são biopolímeros, empregado para imobilizar lipases e na utilização de condições mais brandas para geração do suporte e na redução das etapas para a obtenção do biocatalisador em relação aos processos semelhantes encontrados na literatura.

[0010]. Em relação ao estado da técnica, existem alguns documentos com algumas similaridades ao presente pedido e que serão apresentados nesta seção.

[0011]. O documento CN101343369 de 2008, intitulado "*Dialdehyde starch crosslinked chitosan magnetic microsphere and preparation thereof*" descreve a preparação de microesferas magnéticas de quitosana reticuladas com amido polialdeídico. A microesfera magnética de quitosana reticulada com amido polialdeídico é usada como transportador de drogas de liberação controlada. Tal documento não apresenta coincidência com a presente invenção, pois não se trata de um método de imobilização enzimática.

[0012]. A patente de invenção CN107988198 de 2018, intitulada "*Magnetic flexible carrier fe3o4-pda-das preparation method and application thereof*" descreve um método de preparação de um transportador a base de nanopartículas magnéticas de Fe_3O_4 revestidas com polidopamina (PDA) modificadas com amido polialdeídico. A invenção utiliza este transportador para imobilização de lipases; porém, o referido documento não apresenta conflito com a presente invenção porque utiliza nanopartículas magnéticas e não quitosana como suporte de imobilização.

[0013]. Outros trabalhos foram encontrados, porém, sem guardar relação com este pedido. Os autores propuseram um método de imobilização de lacases em nanopartículas magnéticas de Fe_3O_4 revestidas com polidopamina (PDA) modificadas com amido polialdeídico, no trabalho de Chen et al. (2018), intitulado "*Spacer arm-facilitated tethering of laccase on magnetic polydopamine nanoparticles for efficient biocatalytic water treatment*".

[0014]. A presente invenção não apresenta semelhança com os trabalhos acima.

[0015]. Apenas um estudo em que foi realizada a imobilização de uma xilanase em suportes à base de quitosana modificada com amido polialdeídico intitulado "*Immobilization of Aspergillus niger Xylanase on Chitosan Using Dialdehyde Starch as a Coupling Agent*" foi encontrado na literatura (Chen et al. 2010). No estudo, a produção das microesferas de quitosana modificadas, compreende as etapas de: (a) dissolver a quitosana em uma solução de ácido acético; (b) modificar as microesferas de quitosana com amido polialdeídico, e (c) imobilizar a xilanase.

[0016]. Uma comparação entre as condições otimizadas especificamente para lipases na presente invenção com as encontradas no documento de anterioridade citado no parágrafo [0015] está

mostrada na Tabela 1. De acordo com o referido documento de anterioridade, a concentração de ácido acético usada para dissolver a quitosana (2,5 g) foi de 8% (m/v) , o agente de precipitação utilizado foi o hexametáfosfato de sódio que tem um preço por mol de R\$13.000,00, as condições de reticulação foram de 70 °C utilizando amido polialdeídico comercial com grau de oxidação de 90%, durante 12 h. Na etapa de lavagem para a remoção do agente de reticulação, foi utilizada água quente, e na etapa de imobilização da xilanase, o processo foi conduzido a 30 °C, por 8 h, em tampão acetato pH 5,6. No presente pedido, utilizou-se menor concentração de ácido acético (2,6%, m/v) para dissolver uma quantidade maior de quitosana (4 g). Além disso, na etapa de precipitação foi utilizado NaOH, que tem um preço de R\$35,00 por mol, a temperatura durante o processo de reticulação foi de 40 °C durante 6 h, e o grau de oxidação do amido foi otimizado em 56% para imobilizar a lipase de maneira a manter a sua atividade catalítica. No processo de imobilização da lipase as condições foram de 25 °C, por 6 h, utilizando tampão bicarbonato pH 10 e o surfactante Triton X-100 (0,15% m/v). Ou seja, a presente invenção foi especificamente otimizada para lipases e compreende melhores condições operacionais, possibilita redução de custos na geração do suporte, e na produção do biocatalisador e contribui com o desenvolvimento da indústria biotecnológica.

Tabela 1 – Comparação das condições empregadas em cada método

Condições	Protocolo para xilanases	Este pedido de patente
Massa de quitosana utilizada	2,5 g	4 g
Concentração de ácido acético utilizada para dissolver a quitosana	8% (m/v)	2,5% (m/v)
Agente de precipitação utilizado	Hexametáfosfato de sódio $\text{Na}_6(\text{PO}_3)_6$	Hidróxido de sódio (NaOH)

Preço por mol do agente de precipitação	13.325,00 R\$	35,00 R\$
Tipo de amido polialdeídico usado	Comercial	Não-comercial e com grau de oxidação otimizado
Grau de oxidação do amido polialdeídico utilizado	90%	56%
Quantidade de amido polialdeídico utilizada na reticulação	1 g	0,5 g
Tempo de reticulação com amido polialdeídico	12 h	6 h
Temperatura de reticulação com amido polialdeídico	70 °C	40 °C
Lavagem das microesferas após a reticulação	Água quente	Água fria

Descrição da abordagem do problema técnico

[0017]. Analisando os casos nos quais a utilização de amido polialdeídico como agente derivatizante é viável, surgiu a ideia proposta no presente pedido de patente de invenção “ **PROCESSO DE OBTENÇÃO DE BIODISSERTAÇÃO À BASE DE QUITOSANA E AMIDO PARA IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES E APLICAÇÃO EM SÍNTESE DE ÉSTERES**”. A inovação está no melhoramento do processo de produção e modificação de microesferas de quitosana com o agente derivatizante amido polialdeídico, na imobilização de lipases e na aplicação do biocatalisador na síntese de ésteres com aplicação industrial, como por exemplo, ésteres de aroma.

Descrição detalhada da Invenção

[0018]. A presente invenção descreve um processo de obtenção de microesferas de quitosana modificadas com amido polialdeídico para imobilização de lipases, compreendendo as etapas de: I) solubilização da quitosana em ácido acético; II) precipitação das microesferas em solução etanólica de NaOH; III) filtração; IV) secagem; V) preparação do amido polialdeídico; VI) adição do amido

polialdeídico na solução contendo as microesferas; VII) filtração e secagem; VIII) caracterização; IX) imobilização da lipase; X) aplicação da lipase imobilizada na síntese de ésteres com aplicação industrial.

[0019]. Com relação à etapa I, utilizou-se quitosana em pó com granulometria 60-100 mesh, massa molar média de 132 kD, com grau de desacetilação de 94,1%.

[0020]. Este biopolímero é solúvel em meio ácido diluído, formando um polímero catiônico, com a protonação do grupo amino, gerando o grupamento carregado $R-NH_3^+$.

[0021]. As microesferas de quitosana foram preparadas a partir da dissolução de 4 g de quitosana em 100 mL de uma solução aquosa de ácido acético 2,5% (v/v), mantendo-se sob agitação até a completa homogeneização da solução, resultando em uma solução viscosa com aproximadamente 4% (m/v) de quitosana.

[0022]. Em seguida, na etapa II, a solução de quitosana foi gotejada lentamente, com auxílio de bomba peristáltica, em uma solução de NaOH $1,0 \text{ mol L}^{-1}$, contendo 40% (v/v) de etanol, mantida em banho de gelo, sob agitação.

[0023]. As microesferas gelificadas foram deixadas em contato com esta solução por 30 min, filtradas, lavadas com água destilada até pH 7,0, secas à temperatura ambiente e armazenadas na geladeira, que correspondem às etapas III e IV respectivamente.

[0024]. Com relação à etapa V, para a preparação do amido polialdeídico via reação de clivagem oxidativa: inicialmente, uma suspensão foi preparada pela adição de 6,0 g de amido e 100 mL de água ultrapura, em um balão reacional de 250 mL.

[0025]. Em seguida, foram adicionados 2,45 g de periodato de sódio e o pH foi ajustado em 3,0 com adição de solução de HCl ($0,2 \text{ mol L}^{-1}$), mantendo-se sob agitação magnética a $25 \text{ }^\circ\text{C}$, na ausência de luz, por 6 h. Ao final da reação, a mistura foi filtrada a vácuo e lavada cinco

vezes com 100 mL de água ultrapura e, depois disso, com 50 mL de álcool isopropílico. O sólido obtido foi seco em estufa a 35 °C até massa constante.

[0026]. Na referida etapa VI, foi preparada uma suspensão aquosa de amido polialdeído (AP) gelificado, com diferentes graus de oxidação e número de mols de grupos aldeído. Em seguida, foi adicionado cerca de 1,0 g de microesferas secas de quitosana a 25 mL de cada uma das suspensões de AP sob agitação constante, a 40 °C, por 6 h, na ausência de luz.

[0027]. O produto da reação de reticulação foi submetido à filtração a vácuo; em seguida, foi lavado com água ultrapura para obter microesferas de quitosana modificada com grupos aldeído, denotadas como QTS/API, QTS/APII, QTS/APIII, QTS/APIV e QTS/APV (Etapa VII).

[0028]. Os materiais poliméricos preparados à base de quitosana, antes e após cada etapa de ativação, foram caracterizados utilizando-se as técnicas de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), na etapa VIII, para verificação dos grupos funcionais presentes no suporte.

[0029]. Na referida etapa IX, para a imobilização da lipase, o suporte foi lavado três vezes com tampão Tris-HCl 0,05 mol L⁻¹, pH 8,5, para remover as impurezas solúveis. Em seguida, o suporte foi recuperado por filtração a vácuo em papel filtro, sendo 100 mg suspensos em 3,0 mL de tampão Tris-HCl 0,05 mol L⁻¹, pH 10. Em seguida, foram adicionados 2,0 mL solução contendo a lipase de *Pseudomonas fluorescens*. Esta mistura foi incubada em agitador orbital a 25 °C, 150 rpm por 6 h. Após o processo, a lipase imobilizada nos suportes com diferentes graus de oxidação foi removida da mistura por filtração em papel de filtro, e, em seguida, os preparados enzimáticos foram tratados com uma solução de NaBH₄ (1,0 mg mL⁻¹) por 30 min, filtrados a vácuo novamente e secos em dessecador por 16 h e armazenada a 4 °C.

[0030]. Para comparar a lipase imobilizada preparada anteriormente no parágrafo [0029], o mesmo método de imobilização utilizando somente a quitosana não modificada quimicamente, também foi realizado, conforme a etapa IX.

[0031]. A etapa de aplicação das enzimas imobilizadas em reações é referida neste documento como etapa X. Neste pedido de patente foi avaliado o desempenho do biocatalisador na hidrólise da tricaprilina (atividade enzimática) e na síntese do cinamato de isoamila, um éster de aroma.

[0032]. Para a determinação da atividade enzimática das enzimas imobilizadas utilizou-se o método da hidrólise da tricaprilina em *n*-hexano para verificar se o biocatalisador tinha eficiência catalítica após o processo.

[0033]. Para o ensaio, foram adicionados 5 mL de meio reacional em um Erlenmeyer de 25 mL contendo 100 mg da enzima imobilizada. O meio reacional foi constituído por, 4,9 mL de *n*-hexano 70 mmol L⁻¹ de tricaprilina e 0,1 mL (2% v/v) de água destilada. A reação foi realizada sob agitação de 160 rpm, a 40 °C e, em intervalos fixos, alíquotas de 100 µL foram coletadas do meio reacional e analisadas quanto ao teor de ácido graxo residual através método de Lowry-Tinsley. Uma unidade de atividade enzimática (U) é definida a produção de 1 µmol de ácidos graxos por minuto nas condições do ensaio.

[0034]. Para avaliar o desempenho do biocatalisador na reação de síntese do éster de aroma cinamato de isoamila, as reações foram realizadas em agitador orbital com Erlenmeyers de 25 mL, contendo 3,5 mL *n*-hexano e 1,5 mL de dimetil sulfóxido (DMSO) como cossolvente, 100 mg da enzima imobilizada, 5,0 mmol de ácido cinâmico e 5,0 mmol de álcool isoamílico a 40 °C e 160 rpm. Em intervalos fixos, alíquotas de 100 µL foram coletadas do meio reacional e analisadas

quanto ao teor de ácido cinâmico residual através método de Lowry-Tinsley.

[0035]. O método de Lowry-Tinsley (1976) foi utilizado para quantificar o teor de ácido octanoico durante as reações de hidrólise da tricaprilina, e na determinação do teor residual de ácido cinâmico, a partir do qual foram determinadas as conversões em éster. Para isso, foram coletadas amostras (100 µL) do meio reacional de síntese cinamato de isoamila, que foram adicionadas em *eppendorfs* contendo 1,15 mL de tolueno e o reativo de cor (250 µL), que consiste em uma solução aquosa de acetato de cobre II (5% m/v), com pH (6,0-6,2) corrigido previamente com piridina. 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 octanóico (para a reação de hidrólise) e cinâmico (para a reação de síntese) no meio, foi relacionada à absorbância através de curvas de calibração feitas individualmente com os referidos ácidos, e obtidas nas mesmas condições do ensaio.

[0036]. Tanto o a dosagem da atividade enzimática (hidrólise da tricaprilina em meio orgânico, descrita anteriormente) quanto a síntese de éster após a imobilização enzimática são etapas importantes, pois demonstra se a enzima está ativa no suporte após o processo de imobilização.

[0037]. Os resultados mostraram (conforme Tabela 2) que o melhor grau de oxidação do amido polialdeídico foi de 56%, correspondente ao suporte QS/APIII, pois foi encontrada a maior atividade da lipase imobilizada ($156 \pm 3 \text{ U g}^{-1}$). Graus de oxidação maiores promoveram a perda da atividade de até 55%.

Tabela – 2 Efeito do grau de oxidação do amido polialdeídico na atividade da lipase de *pseudomonas fluorescens* imobilizada

Suporte	Grau de oxidação do amido (%)	Atividade (U g^{-1}) ^e
---------	-------------------------------	--

QTS	**	5 ± 2
QTS/API	16	103 ± 2
QTS/APII	30	106 ± 6
QTS/APIII	56	156 ± 3
QTS/APIV	77	98 ± 1
QTS/APV	>99	86 ± 2

[0038]. Os resultados mostraram que para a enzima imobilizada somente em quitosana (sem modificação), a atividade enzimática foi de 5 ± 2 U g⁻¹. Este valor significa que 5 µmol do éster foram hidrolisados por min e por 1 g do suporte contendo as lipases. Para o processo onde se utilizou as lipases imobilizadas em quitosana modificada com amido polialdeídico com grau de oxidação de 56% (QTS/APIII), proposto como inovador, a atividade de hidrólise contra a tricaprilina foi de 156 ± 3 U g⁻¹. Ou seja, após a imobilização em QTS/APIII, a lipase aumentou a sua atividade em aproximadamente 29 vezes, quando comparada com a atividade da lipase imobilizada no suporte quitosana sem modificação química.

[0039]. Para a reação para obtenção do cinamato de isoamila, o valor de conversão em éster foi 67% em 6 h de reação. E para a enzima imobilizada apenas em quitosana, sem qualquer modificação, a conversão foi menor que 2,5 %.

[0040]. Diante dos resultados obtidos, pode-se considerar que o processo otimizado para obtenção da lipase imobilizada empregando o bio suporte (QTS/APIII), descrito nesta patente, é vantajoso no que diz respeito às condições operacionais, citadas no parágrafo [0016], à utilização de reagentes menos tóxicos, destacados no parágrafo [007], e à eficiência catalítica citada no parágrafo [0038].

[0041]. O processo empregando o bio suporte (QTS/APIII) foi especificamente otimizado para obtenção de lipases imobilizadas e mostra que o grau de oxidação do agente de reticulação tem importância na manutenção da atividade catalítica.

Descrição das Figuras

[0042]. O processo proposto neste pedido de patente de invenção será descrito através do fluxograma (Figura 1).

Figura 1: Método proposto neste pedido de patente.

[0043]. As etapas do processo de obtenção do bio suporte de quitosana modificadas com amido polialdeídico para imobilização de lipases, para ser aplicado em reações biocatalisadas, estão descritas a seguir:

[0044]. (I) preparação das microesferas de quitosana, através das etapas de gelificação e precipitação, respectivamente, seguido de secagem.

[0045]. (II) preparação do amido modificado através da reação de clivagem oxidativa usando periodato de sódio.

[0046]. (III) etapa de ativação das microesferas de quitosana com o amido polialdeídico para obtenção do bio suporte contendo grupamentos ativos para ligação da enzima.

[0047]. (IV) imobilização da lipase covalentemente no bio suporte.

[0048]. (V) etapa de aplicação do biocatalisador heterogêneo obtido, em reações conduzidas em solventes orgânicos para obtenção de ésteres de interesse industrial.

Referências

CAO, L. **Carrier-bound immobilized enzymes. Principles, Application and Design** 2005, Wiley-VCH, ISBN 978-1-61583-208-8, Weinheim

CHEN, Chao.; SUN, Wen.; LV, H.; LI, H.; WANG, Y.; WANG, P.; Spacer arm-facilitated tethering of laccase on magnetic polydopamine nanoparticles for efficient biocatalytic water treatment. **Chemical Engineering Journal**, v. 350, p. 949-959, 2018.

CHEN, H.; LIU, L.; LV, S.; LIU, X.; WANG, M.; SONG, A.; JIA, X.; Immobilization of *Aspergillus niger* Xylanase on Chitosan Using Dialdehyde Starch as a Coupling Agent. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 162, n. 1, p.24-32, 2009.

FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; RODRIGUEZ, V.; MATEO, C.; PENZOL, G.; HERNÁNDEZ-JUSTIZ, O.; IRAZOQUI, G.; VILLARINO, A.; OVSEJEVI, K.; BATISTA, F.; GUISÁN, J. M.; Stabilization of multimeric enzymes via immobilization and post-immobilization techniques. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 7, n. 1-4, p.181-189, 1999.

JAEGER, K .E.; DIJKSTRA, B. W.; REETZ, M. T.; Bacterial Biocatalist: molecular biology, three dimensional structures and biotechnological applications of lipases. **Annual Reviews Microbiology**, v. 53, p. 315-351, 1999

LOWRY, R. R.; TINSLEY, I. J.; Rapid colorimetric determination of free fatty acids. **Journal of The American Oil Chemists' Society**, v. 53, n. 7, p. 470-472, 1976.

MATEO, C.; PALOMO, J.M.; VAN LANGEN, L. M.; VAN RANTWIJK, F.; SHELDON, R. A.; A new, mild cross-linking methodology to prepare cross-linked enzyme aggregates. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 86, n. 3, p.273-276, 2004.

MENDES, A. A.; CASTRO, H. F.; RODRIGUES, D. S.; ADRIANO, W. S.; TARDIOLI, P. W.; MAMMARELLA, E. J.; GIORDANO, R.C.; GIORDANO, R. L. C.; Multipoint covalent immobilization of lipase on chitosan hybrid hydrogels: influence of the polyelectrolyte complex type and chemical modification on the catalytic properties of the biocatalysts. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 38, n. 8, p.1055-1066, 2011.

MENDES, A. A.; OLIVEIRA, P. C.; CASTRO, H. F.; GIORDANO, R. L. C.; Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. **Química Nova**, v. 34, n. 5, p. 831-840, 2011.

MITTAL, H.; RAY, S. S.; KAITH, B. S.; BHATIA, J. K.; SHARMA, J.; ALHASSAN, S. M.; Recent progress in the structural modification of chitosan for applications in diversified biomedical fields. **European Polymer Journal**, v. 109, p.402-434, 2018.

NADAR, S. S.; MULEY, A. B.; LADOLE, M. R.; JOSHI, P. U.; Macromolecular cross-linked enzyme aggregates (M-CLEAs) of α -amylase. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 84, p.69-78, 2016.

RINAUDO, M.; New way to crosslink chitosan in aqueous solution. **European Polymer Journal**, v. 46, n. 7, p.1537-1544, 2010.

RINAUDO, M.; Chitin and chitosan: properties and applications. **Progress in Polymer Science**, v. 31, p. 603-632, 2006.

RODRIGUES, R. C.; VIRGEN-ORTÍZ, J. J.; SANTOS, J. C.S.; BERENGUER-MURCIA, A.; ALCANTARA, A. R; BARBOSA, O; ORTIZ, C; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; Immobilization of lipases on hydrophobic supports: immobilization mechanism, advantages, problems, and solutions. **Biotechnology Advances**, v. 37, n. 5, p.746-770, 2019.

SHELDON, R. A.; VAN PELT, S.; Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p.6223-6235, 2013.

TACIAS-PASCACIO, V. G.; ORTIZ, C.; RUEDA, N.; Dextran Aldehyde in Biocatalysis: More Than a Mere Immobilization System. **Catalysts**, v. 9, n. 7, p.622-665, 2019.

VILLENEUVE, P; MUDERHWA, J. M; GRAILLE, J.; HAAS, M. J.; Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 9, n. 4-6, p. 113-148, 2000.

ZHANG, D; LI, Y; PENG, L; CHEN, N.; Lipase immobilization on magnetic microspheres via spacer arms: Effect of steric hindrance on the activity. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 19, n. 5, p.838-843, 2014.

REIVINDICAÇÕES

1. PROCESSO DE OBTENÇÃO DE BIOSSUPORTE À BASE DE QUITOSANA E AMIDO PARA IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES E APLICAÇÃO EM SÍNTESE DE ÉSTERES caracterizado por se constituir de microesferas de quitosana com amido polialdeídico, na proporção (1:0,5) (m/m), e na lipase de *Pseudomonas fluorescens*, com concentração em proteína de (20 mg/g de suporte) e especificamente otimizado para utilização em solventes orgânicos e permitir manutenção da atividade catalítica da lipase, sendo realizado pelas seguintes etapas:

- a) dissolução da quitosana, 4 g de quitosana dissolvidas com ácido acético 2,5% (v/v);
- b) oxidação do amido polialdeídico, otimizado em 56%;
- c) processo de reticulação, temperatura de 40 °C e tempo de 6 h;
- d) processo de imobilização, com solução de imobilização contendo tampão bicarbonato 0,05 M, pH 10 e surfactante Triton X-100 (0,15%), temperatura de 25 °C e tempo de 6 h.

2. PROCESSO DE OBTENÇÃO DE BIOSSUPORTE À BASE DE QUITOSANA E AMIDO PARA IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES E APLICAÇÃO EM SÍNTESE DE ÉSTERES, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por utilizar lipases imobilizadas em bioossuporte à base de quitosana e amido para síntese de ésteres de interesse industrial, ésteres do biodiesel (oleatos de alquila), ésteres de aroma (cinamatos de alquila), resolução cinética de racematos, em solventes orgânicos (isooctano, *n*-heptano, *n*-hexano, éter etílico, éter diisopropílico).

FIGURAS

Figura 1

