



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DOUTORADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**LAURAMARIABRUNO**

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS ENZIMÁTICOS (LIPASES)  
PARA A APLICAÇÃO NA HIDRÓLISE E SÍNTESE DE ÉSTERES**

**RECIFE  
ABRIL 2003**

**LAURAMARIABRUNO**

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS ENZIMÁTICOS (LIPASES)  
PARA APLICAÇÃO NA HIDRÓLISE E SÍNTESE DE ÉSTERES**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas, Área de Concentração em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Henrique de Magalhães Melo  
(Departamento de Bioquímica; LIKA – UFPE)

**RECIFE  
ABRIL 2003**

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS ENZIMÁTICOS (LIPASES) PARA  
APLICAÇÃO NA HIDRÓLISE E SÍNTESE DE ÉSTERES**

**LAURA MARIA BRUNO**

COMISSÃO EXAMINADORA

**Membros titulares**

---

**Prof. Dr. Eduardo Henrique de Magalhães Melo**  
Departamento de Bioquímica; LIKA – UFPE (Orientador)

---

**Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho**  
Departamento de Bioquímica; LIKA – UFPE

---

**Profa. Dra. Maria do Carmo de Barros Pimentel**  
Departamento de Bioquímica; LIKA – UFPE

---

**Profa. Dra. Ana Lúcia Figueiredo Porto**  
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal – UFRPE

---

**Prof. Dra. Heizir Ferreira de Castro**  
Departamento de Engenharia Química – FAENQUIL

**Membros Suplementes**

---

**Prof. Dr. Luís Bezerra de Carvalho Júnior**  
Departamento de Bioquímica; LIKA – UFPE

---

**Profa. Dra. Márcia Maria Camargo de Morais**  
Departamento de Patologia – UPE

**Aos meus pais Maria Lúcia e Salvatore (*in memoriam*), minha tia Adair e meu irmão Salvatore, sempre presentes na minha vida, me incentivando e me apoiando em tudo que faço.**

**Dedico este trabalho.**

## SUMÁRIO

<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	i
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	iii
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	v
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	vii
<b>RESUMO</b> .....	viii
<b>ABSTRACT</b> .....	ix
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	01
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	03
2.1. Enzimas como catalisadores.....	03
2.2. Enzimas em meios não convencionais.....	08
2.3. Lipases.....	09
2.3.1. Estrutura e mecanismo de ação.....	10
2.3.2. Reações catalisadas por lipases.....	13
2.3.3. Especificidade de lipases.....	15
2.3.4. Fatores que interferem nas biotransformações com lipases.....	15
2.4. Enzimas imobilizadas.....	17
2.4.1. Métodos de imobilização.....	18
2.4.1.1. Adsorção.....	20
2.4.1.2. Ligação covalente.....	21
2.4.1.3. Aprisionamento.....	22
2.4.1.4. Encapsulação.....	22
2.4.1.5. Ligação cruzada.....	23
2.4.2. Fatores que interferem na imobilização de enzimas.....	24
2.5. Imobilização de lipases.....	25
2.6. Alguns suportes para imobilização de lipases.....	29
2.6.1. Nylon.....	29
2.6.2. Álcool polivinílico.....	31
2.6.3. Composto híbrido de polisiloxano-álcool polivinílico.....	32
2.7. Aplicações de lipases.....	33
<b>3. REFERÊNCIAS</b> .....	36
<b>4. CAPÍTULOS</b> .....	43

<b>CAPÍTULO I: : Variables that affect the immobilization of <i>Mucor miehei</i> lipase on nylon membrane.....</b>	<b>44</b>
<b>CAPÍTULO II: Caracterização de lipase de <i>Mucor miehei</i> imobilizada em partículas magnetizadas de polissiloxano-álcool polivinílico.....</b>	<b>60</b>
<b>CAPÍTULO III: Ester synthesis catalyzed by <i>Mucor miehei</i> lipase immobilized onto polysiloxane-polyvinyl alcohol magnetic particles.</b>	<b>75</b>
<b>5. CONCLUSÃO .....</b>	<b>95</b>

## AGRADECIMENTOS

- À Deus;
- A toda minha família;
- Ao Prof. Dr. Eduardo Henrique de Magalhães Melo, pela orientação;
- Ao Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho, pela oportunidade, apoio e incentivo na realização deste trabalho;
- À Profa. Heizir Ferreira de Castro, do Departamento de Engenharia Química da Faculdade de Engenharia Química de Lorena, pelo incentivo, apoio, sugestões e oportunidade de colaboração científica;
- Ao Prof. Dr. Luís Bezerra de Carvalho Júnior, do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) pelas boas sugestões e incentivo;
- Ao Curso de Doutorado em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), pela oportunidade, e à secretária Adenilda pelo apoio;
- À Embrapa Agroindústria Tropical, pela liberação e incentivo na conclusão deste trabalho;
- Aos colegas de turma do Curso de Doutorado, em especial a Ana Catarina, Adriana Argolo e Eduardo Alécio, pela amizade, estímulo e companheirismo ao longo do Curso;
- Aos professores e funcionários do Departamento de Nutrição da UFPE, e em especial a Profa. Dra. Zelyta Pinheiro de Faro, pela amizade;

- Aos colegas do Setor de Biotecnologia do LIKA, e em especial a Cosme Rafael, Keila Moreira, Daniela, Monique, Alessandro, Giuliana e Neide, pela amizade e incentivo durante a realização deste trabalho;
- Aos colegas do Setor de Bioquímica do LIKA, e em especial a Luciana Alves, Givanildo, Jaqueline, Raquel Coelho e Simone, pela amizade e incentivo durante a realização deste trabalho;
- À Juliene Soares Coelho, aluna do curso de Ciências Biomédicas da UFPE, pela amizade, dedicação e colaboração durante a realização deste trabalho, e também a Patrícia Rocha e Juliana Santana, alunas do curso de Medicina da UFPE, por sua participação e interesse;
- Aos colegas da Embrapa Agroindústria Tropical, em especial, a Gustavo, Edy, Henriette, Deborah, Janice, Mosca, pelo apoio, incentivo e companheirismo;
- Aos colegas do Laboratório de Biocatálise da FAENQUIL, Érika, Larissa, Adriano, Michele, Fabrício e Daniele, e também a aluna Flávia, pelo bom convívio e aprendizado durante minha estadia em Lorena;
- Ao colega Gustavo Rocha, pelo apoio em Lorena;
- Aos funcionários do LIKA, especialmente Sr. Otaviano, Moisés, Vera e Cleide, por nos darem condições de trabalhar bem;
- A Suely Manzi, da Biblioteca da UFRPE, pelo auxílio e amizade;
- Ao CNPq, pelo suporte financeiro;
- A todos aqueles que conviveram comigo durante a realização deste trabalho e que contribuíram direta ou indiretamente, com sua amizade, incentivo, confiança, para que eu conseguisse finalizá-lo.



## LISTA DE TABELAS

### 2. REVISÃO DA LITERATURA

Tabela 1. Tabela 1: Classificação internacional de enzimas (LEHNINGER <i>et al.</i> , 1993).	7
Tabela 2. Tabela 2: Exemplos de lipases microbianas disponíveis comercialmente (JAEGER e REETZ, 1998).	10
Tabela 3. Tabela 3: Considerações fundamentais na seleção do suporte e método de imobilização (BICKERSTAFF, 1997).	20
Tabela 4. Tabela 4: Comparação de características de diferentes métodos de imobilização de enzimas (BAILEY e OLLIS, 1986).	24
Tabela 5. Tabela 5: Atividade retida após a imobilização de lipases de diversas origens em reações de hidrólise (MALCATA <i>et al.</i> , 1990).	28
Tabela 6. Tabela 6: Imobilização de lipases de diferentes fontes por diferentes métodos.	29

### **CAPÍTULO I: Variables that affect the immobilization of *Mucor miehei* lipase on nylon membrane**

Tabela 1. Table 1: Experimental range and levels of the independent process variables according to the 2 <sup>3</sup> full factorial design.	53
Tabela 2. Table 2: Experimental design and results according to the 2 <sup>3</sup> full factorial design	54
Tabela 3. Table 3: Estimated effects, standard errors and Student's <i>t</i> test for protein retention and lipase activity using the 2 <sup>3</sup> full factorial design	55
Tabela 4. Table 4: Analysis of variance (ANOVA) for the model regression representing the activity of the immobilized lipase on nylon	56

## **CAPÍTULO II: Caracterização de lipase de *Mucor miehei* imobilizada em partículas magnetizadas de polisiloxano-álcool polivinílico**

Tabela 1. Valores de  $K_m$  aparente e  $V_{max}$  aparente para lipase de *Mucor miehei* livre e imobilizada, empregando  $p$ -nitrofenilpalmitato como substrato, a 30°C e pH 8,0 72

## **CAPÍTULO III: Ester synthesis catalyzed by *Mucor miehei* lipase immobilized onto polysiloxane-polyvinyl alcohol magnetic particles**

Tabela 1. Table 1: Partition coefficients matrix/heptane of reactants estimated according equation (2) at initial bulk concentration of 100mM in heptane, 37°C and 150rpm. 88

Tabela 2. Table 2: Butyl butyrate synthesis (37°C/24 hours) for substrates containing different molar ratio of reactants: butyric acid (BA) and butanol (ButOH) 89

Tabela 3. Table 3: Influence of butanol structure on ester synthesis performed at 37°C for 24 hours. 90

## LISTA DE FIGURAS

### 2. REVISÃO DA LITERATURA

Figura 1. Modelo chave-fechadura (VOET e VOET, 1995).	5
Figura 2. Mecanismo do encaixe induzido (FABER, 1997).	5
Figura 3. Mecanismo catalítico de lipases baseado na “tríade catalítica” de serina (nucleófilo), histidina e aspartato ou glutamato (SCHMID e VERGER, 1998).	12
Figura 4. Reações catalisadas por lipases.	14
Figura 5. Métodos de imobilização de lipases (BICKERSTAFF, 1997).	19
Figura 6. Estrutura química do nylon (SOLOMONS, 1996).	30
Figura 7. Ligação covalente de enzimas ao nylon. O método envolve a clivagem da ligação peptídica e o acoplamento através do grupo amina liberado (HORNBY e GOLDSTEIN, 1976).	30
Figura 8. Reação do glutaraldeído com álcool polivinílico via mecanismo acetal sob catálise ácida (CARVALHO Jr. <i>et al.</i> , 1996).	31
Figura 9. Representação de um polialcoxisiloxano funcionalizado. R1 = grupo alquil; R2 = grupo alquil, fluoroalquil, aril ou vinil (GILL e BALLESTEROS, 2000).	33

### **CAPÍTULO I: Variables that affect the immobilization of *Mucor miehei* lipase on nylon membrane**

Figura 1. Figure 1: Response surface described by the model $\hat{y}$ that represents lipase activity.	57
Figura 2. Figure 2: Effect of the repeated use on the residual activity of lipase immobilized on nylon membrane.	58
Figura 3. Figure 3: Effect of repeated use on the residual activity of lipase immobilized on nylon membrane treated with HCl (g) and coated with PVA (●).	59

## **CAPÍTULO II: Caracterização de lipase de *Mucor miehei* imobilizada em partículas magnetizadas de polisiloxano-álcool polivinílico**

- Figura 1. Figura 1: Estabilidade operacional de lipase de *Mucor miehei* imobilizada em partículas magnetizadas de polisiloxano-álcool polivinílico. A reação foi conduzida a 30 °C e pH 8,0, empregando p-nitrofenilpalmitato como substrato. 70
- Figura 2. Figura 2: Influência da concentração de substrato sobre a atividade de lipase de *Mucor miehei* livre (n) e imobilizada (o) em partículas magnetizadas de polisiloxano-álcool polivinílico. A reação foi conduzida a 30°C e pH 8,0, empregando p-nitrofenilpalmitato como substrato, com concentrações variando de 100 a 1000µM. 71
- Figura 3. Figura 3: Influência da temperatura sobre a atividade de lipase de *Mucor miehei* livre (n) e imobilizada (o) em partículas magnetizadas de polisiloxano-álcool polivinílico. A mistura de reação do método do pNPP foi incubada em temperaturas na faixa de 30 a 65 °C, usando tampão Tris-HCl, pH 8,0, 50mM. 73
- Figura 4. Figura 4: Influência do pH sobre a atividade de lipase de *Mucor miehei* livre (n) e imobilizada (o) em partículas magnetizadas de polisiloxano-álcool polivinílico. O tampão da mistura de reação do ensaio com pNPP variou numa faixa de pH de 5,0-9,0. Os tampões empregados foram citrato-fosfato (pH 5,0-6,0, 50mM), fosfato (pH 7,0-8,0, 50mM) e Tris-HCl (pH 9,0, 50mM). 74

## **CAPÍTULO III: Ester synthesis catalyzed by *Mucor miehei* lipase immobilized onto polysiloxane-polyvinyl alcohol magnetic particles**

- Figura 1. Figure 1: Effect of immobilized lipase contents on the butyl butyrate synthesis at 37°C for 24h. Molar ratio between butyric acid and butanol of 2 was used for enzyme contents of 5, 10, 25 and 50 mg/mL. 91
- Figura 2. Figure 2: Influence of butyric acid (BA):butanol (ButOH) molar ratio on butyl butyrate yield. Molar ratio of 2:1( $\sigma$ ), 1:1( $\lambda$ ); 0.5:1( $\nu$ ) were used at 37°C and 25mg/mL of POS-PVA lipase. 92
- Figura 3. Figure 3: Effect of acid chain length on ester synthesis catalyzed by POS-PVA lipase. Reactions were carried out at 37°C for 24 h, using n-butanol. Butyric acid (C4); caprylic acid (C8); lauric acid (C12); palmitic acid (C16). 93
- Figura 4. Figure 4: Effect of alcohol chain length on ester synthesis catalyzed by POS-PVA lipase. Reactions were performed at 37°C for 24 h, using caprylic acid as acyl donor. 94

**LISTA DE ABREVIATURAS**

PVA	Álcool polivinílico
POS-PVA	Polisiloxano-álcool polivinílico
pNPP	p-nitrofenilpalmitato
PEI	polietilenoimina
BSA	Albumina de soro bovino
mM	Milimolar
$\mu$ M	Micromolar
mL	Mililitro
nm	Nanômetro
TEOS	tetraetilortosilicato
$K_m$	Constante de Michaelis-Menten
$V_{max}$	Velocidade máxima
BA	Ácido butírico
ButOH	Butanol
POS-PVA- lipase	Lipase imobilizada em polisiloxano-álcool polivinílico
STY-DVB-lipase	Lipase imobilizada em polímero de estireno divinilbenzeno
CPS-lipase	Lipase imobilizada em sílica de porosidade controlada
n-ButOH	n-butanol
sec-ButOH	Álcool sec-butílico
tert-ButOH	Álcool tert-butílico

## RESUMO

Lipase comercial de *Mucor miehei* foi imobilizada em diferentes suportes, nylon, nylon-álcool polivinílico (nylon-PVA) e partículas de polisiloxano-álcool polivinílico magnetizadas (POS-PVA) e testados em relação à atividade hidrolítica. O sistema imobilizado que apresentou maior estabilidade operacional, no caso, lipase-POS-PVA foi caracterizado em relação aos parâmetros  $K_m$  e  $V_{max}$  aparentes, temperatura ótima e pH ótimo, usando *p*-nitrofenil palmitato como substrato. A lipase imobilizada em POS-PVA apresentou um  $K_m$  aparente de 228,3 $\mu$ M e  $V_{max}$  aparente de 36,06 $\mu$ mol.min<sup>-1</sup> por miligrama de proteína, a 30°C e pH 8,0. A temperatura ótima e o pH ótimo foram respectivamente 45°C e pH = 8,0. Houve uma retenção de 69,1% de atividade após a imobilização, que permitiu o uso da enzima por um total de sete ensaios. Lipase-POS-PVA também foi empregada na síntese de ésteres. Os efeitos da razão molar ácido/álcool, da concentração de enzima imobilizada, do tamanho da cadeia carbônica dos reagentes e da estrutura do álcool sobre a formação de produto foram determinados. A síntese de butirato de butila foi maximizada para substratos contendo ácido orgânico em excesso e uma concentração de biocatalisador de 25mg/mL. A seletividade do biocatalisador em relação ao tamanho da cadeia carbônica foi diferente considerando ácidos orgânicos e álcoois. A maior concentração de produto foi obtida com ácidos orgânicos com oito e dez carbonos, enquanto que o aumento no tamanho da cadeia carbônica do álcool, de quatro para oito carbonos, provocou uma redução na síntese. O maior rendimento foi determinado para a síntese de caprilato de butila (12 carbonos). A síntese também foi influenciada pela estrutura do álcool, com a atividade máxima ocorrendo para álcool primário.

**Palavras chave:** Lipase, *Mucor miehei*, imobilização, esterificação, sol-gel, nylon.

e-mail: [lmbruno@cnpat.embrapa.br](mailto:lmbruno@cnpat.embrapa.br)

## ABSTRACT

A commercial lipase from *Mucor miehei* was immobilized onto different supports, nylon, nylon-polyvinyl alcohol (nylon-PVA) and polysiloxane-polyvinyl alcohol magnetic particles (POS-PVA), and were tested for hydrolytic activity. Lipase-POS/PVA was the immobilized system with higher operational stability, so their apparent  $K_m$  and  $V_{max}$ , optimum temperature and optimum pH were determined, employing  $p$ -nitrofenilpalmitate as substrate. Lipase-POS-PVA exhibited  $K_m$  and  $V_{max}$  values of 228.3 $\mu$ M and 36.06 $\mu$ mol.min<sup>-1</sup> per milligram of protein, respectively, at 30°C and pH 8.0. Optimum temperature and pH were 45°C and pH = 8.0, respectively. The immobilized system was able to perform seven hydrolysis assays, with a residual activity of 69.1% after immobilization. Ester synthesis catalyzed by lipase-POS-PVA was also investigated. The effects of organic acid/alcohol molar ratio, enzyme concentration, carbon chain length of the reactants and the alcohol structure were determined on the reaction rate. Ester synthesis was maximized for substrates containing organic acid in excess and biocatalyst concentration of 25mg/mL. The biocatalyst selectivity for the carbon chain length was found to be different concerning the organic acids and alcohols. The highest reaction rates were achieved for organic acids with 8 or 10 carbons, while the increasing of the length of the alcohol carbon chain from 4 to 8 carbons reduced the esterification yields. Optimal reaction rate was determined for the synthesis of butyl caprylate (12 carbons). The rate of synthesis was also dependent on the alcohol structure, with maximum activity occurring for primary alcohol.

**Key words:** , Lipase, *Mucor miehei*, immobilization, esterification, sol-gel, nylon.

e-mail: [lmbruno@cnpq.embrapa.br](mailto:lmbruno@cnpq.embrapa.br)