UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
Instituto de Química - Câmpus de Araraquara

VICTOR HUGO DE OLIVEIRA CAVALCANTI

Estudo da degradação de PET (polietileno tereftalato) via catálise enzimática

Araraquara
2024

VICTOR HUGO DE OLIVEIRA CAVALCANTI

Estudo da degradação de PET (polietileno tereftalato) via catálise enzimática

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Química, Araraquara, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química.

Área de Concentração: Química Orgânica

Orientador(a): Profa. Dra. Cíntia Duarte de Freitas Milagre

Araraquara

2024

C376e

Cavalcanti, Victor Hugo de Oliveira
Estudo da degradação de PET (polietileno tereftalato) via catálise enzimática / Victor Hugo de Oliveira Cavalcanti. -- Araraquara, 2024
84 p. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Química, Araraquara
Orientadora: Cíntia Duarte de Freitas Milagre

1. Plásticos. 2. Biodegradação. 3. Biocatálise. 4. Química Verde. 5. Enzimas. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Dados fornecidos pelo autor(a).

IMPACTO POTENCIAL DESTA PESQUISA

Mediante a emergência da necessidade de reduzir os danos gerados pela má gestão dos plásticos no meio ambiente, este trabalho teve como proposta estudar, alinhando-se aos Objetivos do Desenvolvimento Sustentável de 2030, a reciclagem do PET via biocatálise como estratégia para o fechamento do ciclo da economia circular do PET.

POTENTIAL IMPACT OF THIS RESEARCH

In view of the emerging need to reduce problems caused by the inadequate plastic waste management in the environment, this work focuses on the study, in alignment with the 2030 Sustainable Development Goals, of PET recycling through biocatalysis, as strategy for closing the circular economy cycle of PET.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: "Estudo da degradação de PET (polietileno tereftalato) via catálise enzimática"

AUTOR: VICTOR HUGO DE OLIVEIRA CAVALCANTI

ORIENTADORA: CÍNTIA DUARTE DE FREITAS MILAGRE

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Química, pela Comissão Examinadora:

gov.br Documento assinado digitalmente
CINTIA DUARTE DE FREITAS MILAGRE
Data: 20/12/2024 11:45:34-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Profa. Dra. CÍNTIA DUARTE DE FREITAS MILAGRE (Participaçao Virtual)
Departamento de Bioquímica e Química Orgânica / Instituto de Quimica - UNESP - Araraquara

Prof. Dr. RODRIGO OCTAVIO MENDONÇA ALVES DE SOUZA (Participaçao Virtual)
Departamento de Química Orgânica / Instituto de Química - UFRJ - Rio de Janeiro

Profa. Dra. DANIELLE BISCARO PEDROLLI (Participaçao Virtual)
Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara

Araraquara, 20 de dezembro de 2024

DADOS CURRICULARES

IDENTIFICAÇÃO

Nome: Victor Hugo de Oliveira Cavalcanti
Nome em citações bibliográficas: Cavalcanti, V. H. O.; Cavalcanti, Victor Hugo O.
Currículo Lattes https://lattes.cnpq.br/3213388797509719
ORCID https://orcid.org/0009-0005-3173-2954

ENDEREÇO PROFISSIONAL

UNESP – Instituto de Química. Rua Prof. Francisco Degni, nº 55. CEP - 14.800-900. Bairro Jardim Quitandinha - Araraquara - SP.

FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO

- Graduado em Bacharelado em Química pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) de 2018 a 2022.

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

- Capacitação de dois meses pela CAPES no programa CAPES-PrInt na University of Minnesota (USA) no grupo de pesquisa liderado pelo prof. Romas J. Kazlauskas com ênfase em biocatálise e engenharia de proteínas. (Anexo E1)
- Curso de curta duração M01 - Tópicos de fronteira na catálise. (Carga horária: 6h). Sociedade Brasileira de Química, SBQ, Brasil. 2024.

ATUAÇÃO PROFISSIONAL

- Estágio à docência (PAADES) 1° Semestre de 2024 na disciplina Métodos espectrométricos, disciplina obrigatória para o curso de Bacharel em Química, sob supervisão da Profa. Dra. Cintia Duarte Freitas Milagre.
- Professor de Física (Voluntário) no projeto CUCA – Curso Unificado do Campus de Araraquara – núcleo: Boa Esperança do Sul – março de 2023 a janeiro de 2024.
- Professor da área de Informática Aplicada e Química responsável pelas disciplinas de Química geral, Físico-química e Bioquímica – Grau Técnico Araraquara – fevereiro de 2022 a março de 2023.
- Professor de Química (Bolsista) no projeto CUCA – Curso Unificado do Campus de Araraquara – núcleo: Instituto de Química – agosto de 2018 a dezembro de 2021.

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Artigos completos publicados em periódicos

- MILAGRE, HUMBERTO M. S.; SILVA, DULCE HELENA S.; CAVALCANTI, VICTOR HUGO O.; GANEO NETO, LAERTE. Paths and synergies in accelerating the UN 17 SDGs through the lens of green chemistry: contributions from a Brazilian university and its Institute of Chemistry. PURE AND APPLIED CHEMISTRY, v. 96, n. 9 p. 1279-1290, 2024.

Apresentações de trabalhos e/ou palestras

- LOPES, THAYS A. N, CAVALCANTI, VICTOR HUGO O.; MILAGRE, CINTIA D. F. 47ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. (Poster). Título: From plastic to soap: a proposal for scientific divulgation about the science contribution for plastic waste management. 2024.
- CAVALCANTI, VICTOR HUGO O.; LOPES, THAYS A. N, MILAGRE, CINTIA D. F. 5° SiLaByB (Poster). Título: Improving PET degradation: The synergy of pretreatment and enzymatic catalysis. 2024
- LOPES, THAYS A. N. (apresentação oral); Coautor(es): CAVALCANTI, VICTOR HUGO O.; MILAGRE, CINTIA D. F. 31° Jornadas de Jovens Investigadores AUGM -UDELAR 2024 Montevideo, Uruguai. Título: Degradação de plásticos dos oceanos: pré-tratamento de PET. 2024

PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS CIENTÍFICOS

- 5° SiLaByB – Simpósio Latino-americano de Biocatálise e Biotransformações. 2024. Montevideo – Uruguai.
- 47ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química (RASBQ) "A centralidade da Química na educação do cidadão e na inovação científica e tecnológica". 2024. Águas de Lindóia – SP.
- 48ª Semana da Química: "A Química da Vida". 2018. Araraquara – SP.

COORIENTAÇÕES

Supervisão científica da aluna de iniciação científica Thays Andréa Nogueira Lopes, no período de 01 de setembro de 2023 a 31 de novembro de 2024.

Dedico este trabalho à minha irmã, Coicoi,

You're my wonderwall

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora, Profa. Dra. Cíntia Duarte de Freitas Milagre, pelo suporte, oportunidades e ensinamentos durante estes dois anos.

Ao Prof. Dr. Humberto Márcio dos Santos Milagre, pelas contribuições, histórias e apoio.

Ao Instituto de Química e à Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, pela infraestrutura para o desenvolvimento deste trabalho.

A CAPES, pela minha bolsa de mestrado, pela minha bolsa de capacitação no exterior e pela manutenção do portal de periódicos.

A Profa. Dra. Danielle Biscaro Pedrolli, pelas contribuições e por disponibilizar seu laboratório para a execução deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Romas J. Kazlauskas, por doar as enzimas sem as quais não seria possível realizar este trabalho e pela orientação durante a minha capacitação na University of Minnesota.

Aos amigos do grupo de pesquisa, Laíza, Laerte, Pedro, Leticia, Bruna, Maria Eduarda, e Larissa por todo apoio, parceria, momentos de café e risadas, e em especial, para Thays, obrigado por me aceitar e confiar em mim para acompanhar seu trabalho de IC e TCC.

Aos técnicos e funcionários do IQ, João, Juliana, Uenifer, Lidiane, Albertinho, Marquinhos, Rogério.

A minha irmã, por estar comigo em todos os momentos, pelo amor de irmãe e todo apoio o qual foram essenciais para estes anos de mestrado.

Ao Deh, minha figura paterna, por sempre estar ao meu lado, torcendo, sofrendo e sonhando junto comigo, por todo amor e apoio.

A minha mãe e ao meu pai, por todo incentivo e por sempre acreditarem em mim.

A minha tia Tetê, por todo amor, carinho e por ser um porto seguro.

A minha namorada Laura, por todo o amor, apoio e por caminhar junto comigo, tropeçando, rindo e deixando a vida mais colorida.

Ao meu melhor amigo, Wagner, por sempre me cobrar e me fazer lembrar de cuidar de mim mesmo, mas principalmente por dividir o peso do dia a dia.

Aos meus amigos químicos Welington, Márcio e Vitor, por me escutar e compartilhar vários momentos, bebidas e conquistas.

A República Quebra Tudo pelas conversas, diversões e momentos de debates aonde chegávamos em nenhuma conclusão, mas riamos bastante durante o processo.

As pessoas mais incríveis e de coração gigantesco que tive o prazer de conhecer, por fazerem parte da minha vida e por sempre desejarem meu sucesso e me incentivarem Rafaela, Natalia, Vitinho, Rafael (Coradi) e João (Goygoy).

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

“Eu sustento que a única finalidade da ciência está em aliviar a canseira da existência humana.”

- Bertolt Brecht

RESUMO

Os plásticos estão totalmente atrelados ao nosso cotidiano em razão da sua massiva expansão na metade do século XX. Esse processo ocorreu devido às suas características como baixo custo, leveza, transparência, estabilidade e maleabilidade, os tornando desejáveis para diversas aplicações. No entanto, sua alta resistência à degradação na natureza e sua produção contínua, equivalente a 400 milhões de toneladas ao ano, fazem com que o acúmulo de seus resíduos sejam prejudiciais ao meio ambiente. No que diz respeito aos plásticos à base de polietileno tereftalato (PET), os gerenciamentos de seus resíduos mais utilizados são aterros sanitários, incineração e reciclagem, mas esses não são recomendáveis, pelos gastos atrelados, impacto ambiental gerado e baixa qualidade de PET reciclado. Destes métodos, a reciclagem via biocatálise é considerada promissora do ponto de vista ambiental e econômico. Este método pode ser realizado pelas enzimas degradadoras de PET, que catalisam a hidrólise de ésteres. Entretanto, este método necessita de mais estudos para aumentar sua eficiência e, consequentemente, substituir os processos de reciclagens existentes. À vista disso, este trabalho teve como objetivo: produzir enzimas para o estudo de um processo biocatalítico para degradação de PET. O substrato, filme de PET amorfo, foi adquirido comercialmente, com as principais propriedades determinadas por DSC, sendo 1,11 % cristalino e com temperatura de transição vítrea de 72,62 °C. As enzimas utilizadas foram variantes da cutinase Leaf-Branch Compost Cutinase (LCC): ssLCC, LCC-F243T; LCC-H218SF243T; ssLCC-H218SF243T, em extratos enzimáticos brutos e purificados, das quais foram produzidas e estudadas quanto sua atividade enzimática com o monômero do PET, bis(2-hidroxietil) tereftalato, e sua capacidade de degradação do substrato PET. O melhor resultado obtido foi utilizando a variante enzimática LCC-F243T purificada à 55°C, possibilitando realizar comparações com a literatura quanto à biodegradação do PET, e quantificar seus produtos por HPLC. Como conclusão, foi possível observar a degradação de 74% do PET amorfo em 90 horas de reação em condições brandas, tendo ênfase no estudo da formação dos seus produtos que apresentou seletividade para a formação de TPA.

Palavras-chave; plásticos**;** biodegradação de PET; biocatálise; química verde; cutinases.

ABSTRACT

Plastics are totally integrated in our daily lives because of their massive expansion mid-20th century. This process occurred due to characteristics such as low cost, lightness, transparency, stability and malleability, making them desirable in various applications. However, their high resistance to degradation in nature and their continuous production, amounting to 400 million tons a year, cause an accumulation of residues which is harmful for the environment. Regarding polyethylene-terephthalate-based plastics (PET), the most employed waste management methods are landfills, incineration and recycling, which are not commendable considering costs, environmental impact and low quality of the recycled PET. Of those methods, recycling through biocatalysis is considered to be promising from the environmental and economical point of view. This method can be carried out through PET-degrading enzymes, which catalyze the hydrolysis of esters. This method, however, requires further study to increase its efficiency and, consequently, replace existing recycling processes. In light of this, the aim of this work is to produce enzymes for studying a biocatalytic process for PET degradation. The substrate, an amorphous PET film, was commercially obtained, its main properties determined by DSC, displaying 1,11% crystallinity and a glass transition temperature of 72.62 °C. The enzymes utilized were variants of Leaf-Branch Compost Cutinase (LCC): ssLCC, LCC-F243T; LCC-H218SF243T; ssLCC-H218SF243T, in a brute and purified enzyme extracts, having been produced and studied their enzymatic activity with the PET monomer Bis(2-Hydroxyethyl) terephthalate, and their ability to degrade the PET-substrate. The best result was achieved with the LCC-F243T enzyme purified at 55ºC, allowing comparisons with the literature on PET biodegradation and quantification of its products through HPCL. In conclusion, it was possible to observe the degradation of 74% of the amorphous PET in a 90-hour reaction under mild conditions, in which the enzyme showed selectivity for TPA conversion, showcased through the monitoring method developed through HPLC.

Key words: plastics; PET biodegradation; biocatalysis; green chemistry; cutinases.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Maiores produtores de resíduos plásticos do mundo em 2019.
Figura 2 – Projeção da produção de plásticos para 2050.
Figura 3 – Tipo de plásticos pela identificação RIC em relação a produção/lixo gerado 2015
Figura 4 – Tipos de reciclagem química do PET
Figura 5 – Resinas Semicristalinas
Figura 6 – Proposta de mecanismo dos sítios de PET hidrolases
Figura 7. a – Termogravimetria TG; análise térmica diferencial DTA, derivada da termogravimetria DTG **b.** Calorimetria exploratória diferencial DSC do PET
Figura 8 – Cromatograma dos produtos da pirólise do PET.
Figura 9 - Possíveis fragmentações para os produtos da pirólise do PET – Adaptado de Dziwiński, *et al*, 2018
Figura 10 – Sítio catalítico da enzima LCC e posições dos resíduos das variantes
Figura 11 – Perfil das análises no Nanodrop dos plasmídeos recuperados **a.** ssLCC; **b.** F243T; **c.** H218SF243T e **d.** ssH218SF243T
Figura 12 – Gel de agarose dos plasmídeos recuperados: **a.** ssLCC; **b.** F243T; **c.** H218SF243T e **d.** ssH218SF243T
Figura 13 – SDS-Page dos extratos enzimáticos livres de células: L - Benchmark protein Ladder; a - ssLCC; b – F243T; c – H218SF243T; d – ssH218SF243T
Figura 14 – Cromatograma das reações de biodegradação do PET com extratos enzimático
Figura 15 – SDS-Page - processo de purificação do extrato enzimático F243T
Figura 16 - SDS-Page – extrato enzimático e enzima purificada: **a.** F243T e **b.** H218SF243T

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – PETases e mutantes promissoras e seus estudos
Tabela 2 – Tempo de retenção dos compostos nas análises no HPLC
Tabela 3 – Parâmetros utilizados para a análise no Py-GC-MS
Tabela 4 – Descrição dos produtos da pirólise do PET.
Tabela 5 – Resultados das análises no Nanodrop da recuperação dos plásmídeos das mutantes adsorvidos no papel de filtro
Tabela 6 – Concentração de proteínas totais dos extratos enzimáticos
Tabela 7 – Reação de hidrólise de BHET – atividade enzimática dos extratos enzimáticos
Tabela 8 – Concentração de proteínas totais nas enzimática purificadas
Tabela 9 – Reação de hidrólise de BHET – atividade enzimática das enzimas purificadas
Tabela 10 – Reação de hidrólise de PET com enzimas purificadas, conversão e rendimento de despolimerização

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Rotas de reações de obtenção de PET a partir de TPA, EG e DMT.
Esquema 2. Produtos da degradação do PET por biocatálise
Esquema 3. Ciclo catalítico das PETases
Esquema 4. Reação de hidrólise de BHET – atividade enzimática
Esquema 5. Reação de hidrólise de PET

LISTA DE ABREVIATURAS

BHET – bis-2(hidroxietil) tereftalato

DMSO – dimetilsulfóxido

DNA – ácido desoxirribonucleico

DSC – do inglês *Differential Scanning Calorimetry* – Calorimetria de varredura diferencial

DTA - do inglês *Differential Thermal Analysis* – Análise térmica diferencial

DTG – do inglês *Derivate Thermogravimetry* – Termogravimetria derivada

EC Number – número relacionado à classificação enzimática conforme a *Enzyme Comission* (Comissão de Enzimas) regido pelo Comitê de Nomenclatura da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular

EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético

HPLC – do inglês *High pressure liquid chromatography* – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

IPTG – Isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo

IUBMB – do inglês International Union of Biochemistry and Molecular Biology – União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular

LB – do inglês *Luria-Bertani Broth* – meio de cultura Luria-Bertani

LCC – Leaf-branch compost cutinase

m/z – Razão massa carga

MHEmT – mono-(2-hidroxietil) metil tereftalato

MHET – ácido mono-(2-hidroxietil) tereftálico

PET – polietileno tereftalato

ppm – partes por milhão

Py-GC-MS – do inglês *Pyrolysis - Gas chromatography with mass* spectrometer – Cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas por pirólise

q.s.p – quantidade suficiente para

rpm – rotações por minuto

SDS – dodecilsulfato de sódio

SDS-page – Eletroforese em gel de acrilamida com dodecil-sulfato de sódio

SOC – do inglês *Super Optimal broth with Catabolyte repression*

TG - termogravimetria

TPA – ácido tereftálico

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 17

1.1. Plásticos 17

1.1.1. Produção e gestão dos plásticos 18

1.1.2. Tipos de plásticos 20

1.2. Polietileno tereftalato (PET) 21

1.2.1. Destinos do PET 22

1.2.1.1. Reciclagem do PET 23

1.3. Processo enzimático 27

1.3.1. Hidrolases de PET 28

1.3.2. Leaf-Branch compost cutinase – LCC 32

2. OBJETIVOS 33

2.1. Objetivo Geral 33

2.2. Objetivo Específicos 33

3. PARTE EXPERIMENTAL 34

3.1. Reagentes, plasmídeos e linhagem de Escherichia coli (*E. coli*) 34

3.2. Métodos de caracterização 34

3.2.1. Métodos cromatográficos 34

3.2.2. Análises térmicas 36

3.3. Enzimas 37

3.3.1. Transformação dos plasmídeos em células E. coli 37

3.3.2. Síntese das proteínas recombinantes 38

3.3.3. Tampões e meios de cultura 39

3.3.4. Purificação dos extratos enzimáticos 40

3.3.5. Armazenamento a longo prazo das variantes 40

3.4. Eletroforese em gel de agarose 41

3.5. Ensaio de Bradford 41

3.6. Eletroforese em gel de dodecilsulfato de sódio-poliacrilamida (SDS-PAGE) 42

3.6.1. Soluções SDS – PAGE 42

3.7. Procedimentos enzimáticos 43

3.7.1. Determinação da atividade enzimática 43

3.7.2. Reações de hidrólise enzimática 44

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 45

4.1. Caracterização do substrato PET 45

4.2. Cutinases 48

4.2.1. Recuperação dos plasmídeos 49

4.2.2. Transformação dos plasmídeos em E. coli BI21 DE3 pLysS 50

4.2.3. Síntese das variantes da enzima LCC 51

4.2.4. Avaliação da atividade enzimática dos extratos brutos 52

4.2.5. Reações de PET com extratos enzimáticos brutos 53

4.3. Purificação dos extratos enzimáticos 55

4.3.1. Atividade enzimática – extratos purificados 57

4.3.2. Reações de PET com extratos purificadas 57

5. CONCLUSÕES 60

6. REFERÊNCIAS 61

7. ANEXOS 65

1. INTRODUÇÃO

1.1. Plásticos

Os polímeros – macromoléculas formadas por ligações covalentes entre unidades químicas regularmente repetidas ao longa de sua cadeia – são usados, atualmente, em quase todas as diversas áreas do cotidiano. Em específico os termoplásticos – polímeros que necessitam de calor para torná-los moldáveis –, comumente chamados de plásticos, têm destaque quanto à sua utilização (Mano e Mendes, 1999).

Desde a sua primeira síntese em 1862 por Alexander Parkes, e com sua concretização no mercado, no setor de alimentos e bebidas na década de 1950, os plásticos se tornaram *commodities* devido a suas características de baixo custo, leveza, transparência, estabilidade à estresse térmico, químico e mecânico e de sua maleabilidade (Millican e Agarwal, 2021).

A utilização dos plásticos permitiu o desenvolvimento de diversas pesquisas e tecnologias das quais a sociedade se encontra dependente, como na microeletrônica, segurança alimentar e hídrica, saúde e segurança da população. Esse material pode ser diretamente aplicado aos setores de construção, elétrica, aplicações eletrônicas e de transporte, pois oferece versatilidade e reduções econômicas quando comparado com outros tipos de materiais (Klemes, Fan e Jiang, 2020).

Durante a pandemia do COVID-19 o plástico foi um aliado importante para a diminuição dos casos e para o tratamento da doença, através do uso de máscaras descartáveis, protetor facial, luvas, embalagens de produtos, sacolas, seringas, autotestes e outros objetos (Yuan *et al,* 2021). Ainda que tenha sido útil no contexto pandêmico, esse uso exacerbado foi nocivo, devido ao aumento significativo do valor de produção de plásticos, se tornando um ponto fora da curva e totalmente prejudicial quando observado na perspectiva de resíduos gerados neste mesmo intervalo de tempo (Rai *et al.*, 2023).

Deve-se destacar que o plástico devido às suas propriedades citadas anteriormente é altamente resistente à decomposição e na natureza leva cerca de 1000 anos para ser degradado, o que permite altos níveis de acumulação quando comparado a outros resíduos (Ritchie e Roser, 2018). Este acúmulo também está

associado ao uso deste material de forma indiscriminada e da sua contínua produção, juntamente com sua má gestão de descarte no meio ambiente, gerando diversos riscos para os seres vivos.

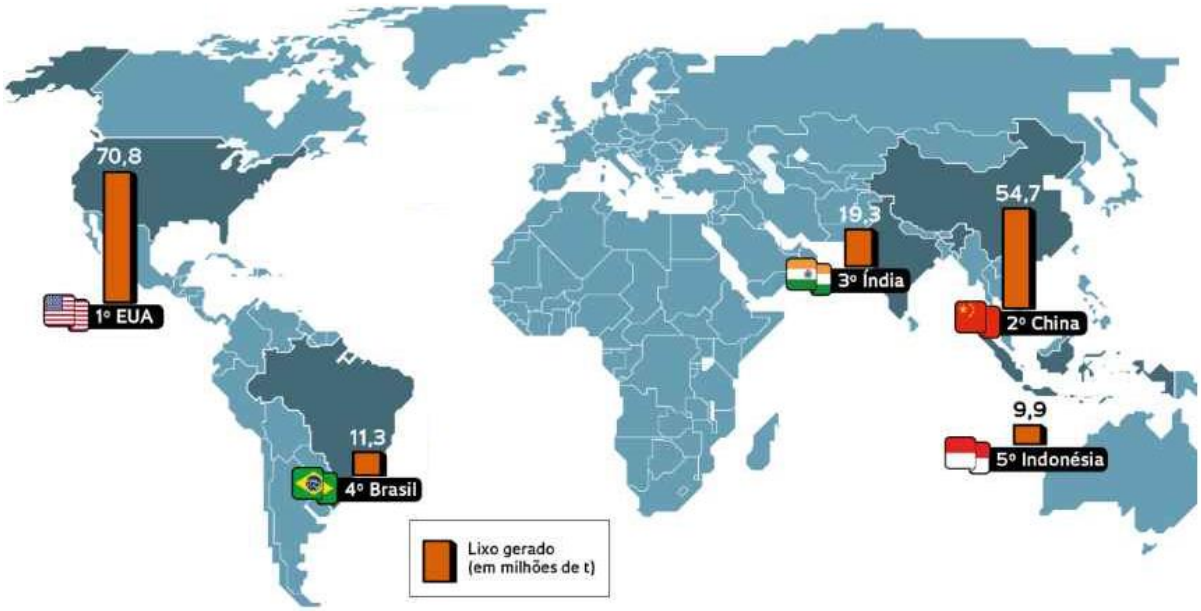
1.1.1. Produção e gestão dos plásticos

Em relação à produção, cerca de 9,2 bilhões de toneladas de plásticos foram produzidas entre 1950 e 2017, o que representa uma média de 400 milhões de toneladas por ano, com estimativa de aumento nessa produção para 2030, atingindo 550 milhões de toneladas (Atlas do plástico, 2021).

Como abordado anteriormente, durante a pandemia do COVID-19, a produção de plásticos foi intensificada mediante as necessidades da saúde e segurança da população. Somente durante os primeiros 7 meses de pandemia foi registrada uma produção equivalente a 530 milhões de toneladas, tornando-se um ponto fora da curva das projeções de produção de plástico, quando comparado com o cenário previsto para 2030 (Rai *et al.*, 2023).

Considerando os países que produziram lixo plástico em 2019 (Figura 1), o Brasil se encontra em 4° lugar com 11,3 milhões de toneladas descartadas ao ano (Atlas do plástico, 2021; Kaza *et al.*, 2018).

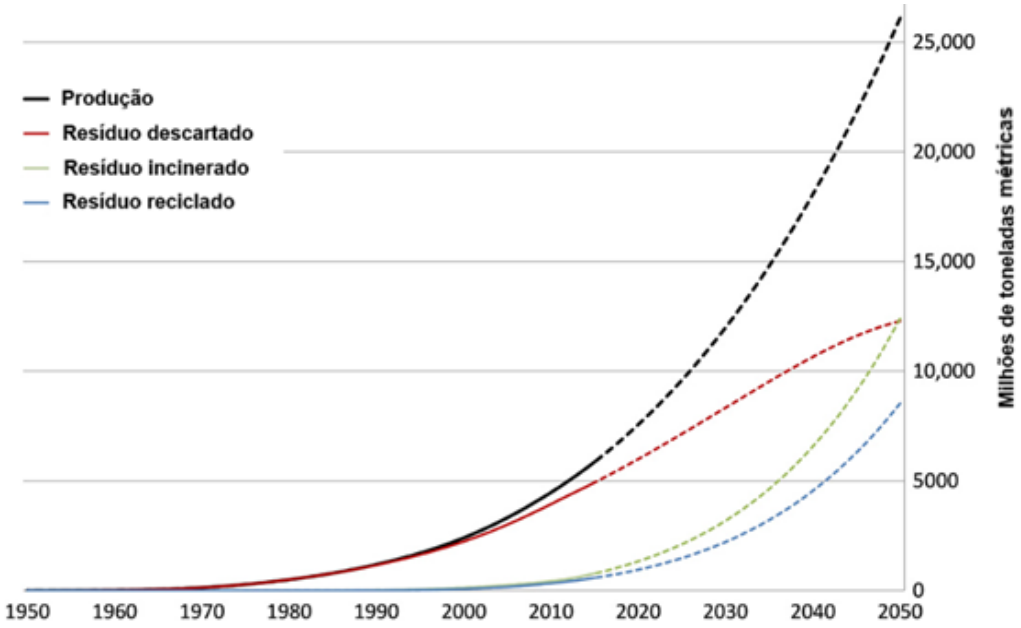
Figura 1 – Maiores produtores de resíduos plásticos do mundo em 2019.



Fonte: Adaptado FAPESP. Disponível em https://revistapesquisa.fapesp.br/planeta-plastico/

De acordo com o estudo estatístico sobre poluição plástica de Geyer *et al.* (2017), em relação aos valores totais de plástico produzido no mundo, somente 9% foi reciclado. Analisando as formas atuais de produção e procedimentos de gestão de resíduo em uma projeção para 2050 (Figura 2) nota-se uma produção total de 34 bilhões de toneladas de plásticos primários, fibras e aditivos, enquanto para resíduos espera-se 12 bilhões de toneladas descartados em aterros sanitários/meio ambiente, além de um aumento, significativamente baixo, da reciclagem para 26% em relação ao valor estimado da produção.

Figura 2 – Projeção da produção de plásticos para 2050.



Fonte: Traduzido de Geyer *et al* (2017).

Em relação aos diversos destinos dos resíduos plásticos, de acordo com o relatório do Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente (PNUMA) realizado em 2021, os plásticos representam 85% dos resíduos que chegam aos oceanos e espera-se que a poluição plástica neste meio dobre até 2040 (UNEP, 2021). Sendo os oceanos responsáveis pela absorção de um quarto das emissões antropogênicas dos gases de efeito estufa, a interferência de microplásticos no bombeamento biológico de carbono reduz a absorção de dióxido de carbono e fixação do carbono pelos fitoplânctons, que por sua vez reduzem o transporte do carbono na cadeia alimentar dos zooplânctons (Atlas do plástico, 2021; Araújo *et al.,*2020).

Esta má gestão de plásticos gerando acúmulo afeta o comportamento do ecossistema, prejudicando as formas de vida existentes. A ingestão de plásticos, microplásticos e constituintes tóxicos liberados durante sua decomposição parcial por animais, provoca alterações em suas atividades fisiológicas e em alguns casos a mortalidade por bloqueios em seus sistemas digestivo e respiratório (Araújo *et al.,*2020).

1.1.2. Tipos de plásticos

Além de se diferenciarem pela sua composição e estrutura, os plásticos podem ser classificados quanto à sua origem e biodegradabilidade. Estima-se que 90% dos plásticos são derivados de petróleo e não são biodegradáveis, sendo estes o polietileno tereftalato (PET ou PETE), polietileno de alta densidade (PEAD), policloreto de vinila (PVC), polietileno de baixa densidade (PEBD), polipropileno (PP), poliestireno (PS) entre outros (Klemes, Fan e Jiang, 2020).

Dentre os demais plásticos são possíveis citar os plásticos derivados de petróleo com aditivo biodegradável para facilitar a degradação deste material e por fim, os bioplásticos que são biodegradáveis como por exemplo o ácido polilático (PLA) e polihidroxialcanoatos (PHA) (Klemes, Fan e Jiang, 2020).

Produtos comercializados à base de termoplásticos são divididos pelo código de identificação de resina (RIC), criado pela de Sociedade Industrial de Plásticos em 1988, estando atualmente sob controle da Sociedade Americana de Testes e Materiais (ASTM). Este sistema de identificação, que auxilia a reciclagem, é composto por um código de 1 a 7 (Figura 3), sendo os números de 1 a 6 atribuídos aos plásticos mais utilizados como material principal do produto analisado, e o 7 para todos os outros polímeros ou misturas (ASTM, 2020). De acordo com a norma ASTM D7611/D7611M-21, para conter o código RIC o material plástico deve ser composto majoritariamente pelo seu polímero, podendo conter até 10% de outros polímeros. (Lopes, 2024).

Além disso, na figura vê-se a produção e lixo gerados em milhões de toneladas no ano de 2015 assim como os produtos mais comuns para cada tipo de resina (Atlas do plástico, 2021).

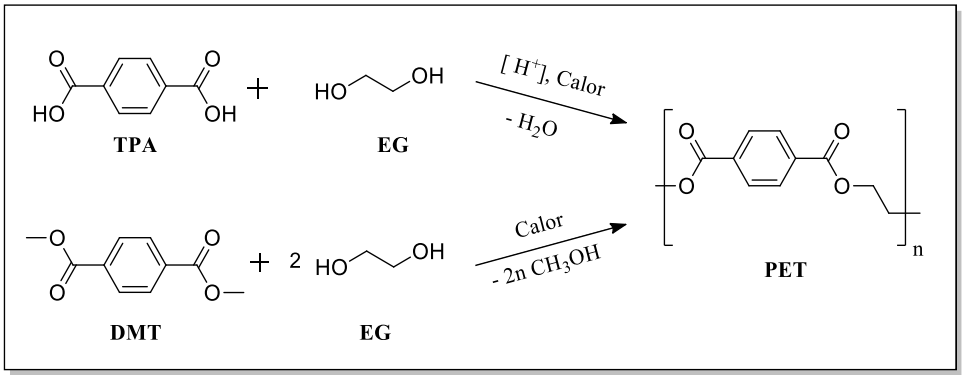
Figura 3 – Tipo de plásticos pela identificação RIC em relação a produção/lixo gerado 2015

Fonte: Adaptação de ATLAS DO PLÁSTICO (2021)

1.2. Polietileno tereftalato (PET)

Dentre os diversos produtos plásticos, destacam-se nesta pesquisa os plásticos à base de polietileno tereftalato (PET) – resina semicristalina com estrutura de poliésteres heterogêneos aromáticos, incolor, higroscópica e resistente a desgastes e trações – sintetizado através da policondensação (Esquema 1) dos monômeros ácido tereftálico (TPA) e etilenoglicol (EG) ou pela transesterificação do dimetil tereftalato (DMT) com EG (Koshti, Mheta e Samarth, 2018). Tais reagentes são oriundos de produtos do petróleo, material não renovável, mais específico, do etileno e do para-xileno, que passam por uma série de processos oxidativos e de purificação para chegar aos reagentes precursores do PET.

Esquema 1 – Rotas de reações de obtenção de PET a partir de TPA, EG e DMT.



Fonte: Próprio autor

Devido à sua estrutura e suas propriedades, o PET é amplamente utilizado nas indústrias de fibras têxteis, embalagens por injeção a sopro, filmes biorientados e polímeros de engenharia. No Brasil, esta aplicação iniciou-se no segmento têxtil, porém atualmente o maior uso deste material se encontra em embalagem para bebidas carbonatadas e água (Paoli, Spinacé e Romão, 2009).

1.2.1. Destinos do PET

Sendo responsável por cerca de 32 milhões de toneladas de resíduos da produção total em 2015, somente 28,4% do PET é reciclado em fibras, chapas, filmes e garrafas, e o restante é descartado, sendo destinado para aterros sanitários ou levado para incineração (Taniguchi *et al.*, 2019).

O PET destinado a aterros sanitários continua contribuindo para a poluição no meio ambiente, pois sua interação com os demais resíduos, devido às suas propriedades hidrofóbicas, permite a adsorção de poluentes em sua estrutura, como elementos potencialmente tóxicos e POPs (Poluentes orgânicos persistentes), sendo inseridos na cadeia alimentar quando ingeridos pelos animais (Araújo *et al.,*2020). Além disso devido à sua principal forma de utilização ser como garrafa, nota-se que a porcentagem de plásticos, em volume, é maior em relação a sua massa sendo uma problemática quanto à ocupação de espaço (Benyathiar *et al.,* 2022).

No caso de o destino ser a incineração, é evitada a utilização dos espaços dos aterros sanitários, e ainda é possível gerar energia mediante sua combustão. No entanto o plástico é um problema climático, sendo responsável pela produção de 1,7 bilhões de toneladas de gás carbônico equivalente ($GtCO_2e$), 11% relativo ao PET, e estudos estimam para 2050 um aumento nas emissões equivalentes à 15% do orçamento global de carbono para que a Terra permaneça abaixo de 1,5 graus (Cabernard *et al.*, 2022; UNEP, 2021).

Ambos os métodos citados geram e dependem de condições inviáveis ao meio ambiente e à economia da população, como, por exemplo, a necessidade de espaço e alto custo – no caso dos aterros – e emissão de gases tóxicos e cinzas – no caso das incinerações. Desta forma, um dos destinos que pode substituir os anteriores é a reciclagem deste material.

1.2.1.1. Reciclagem do PET

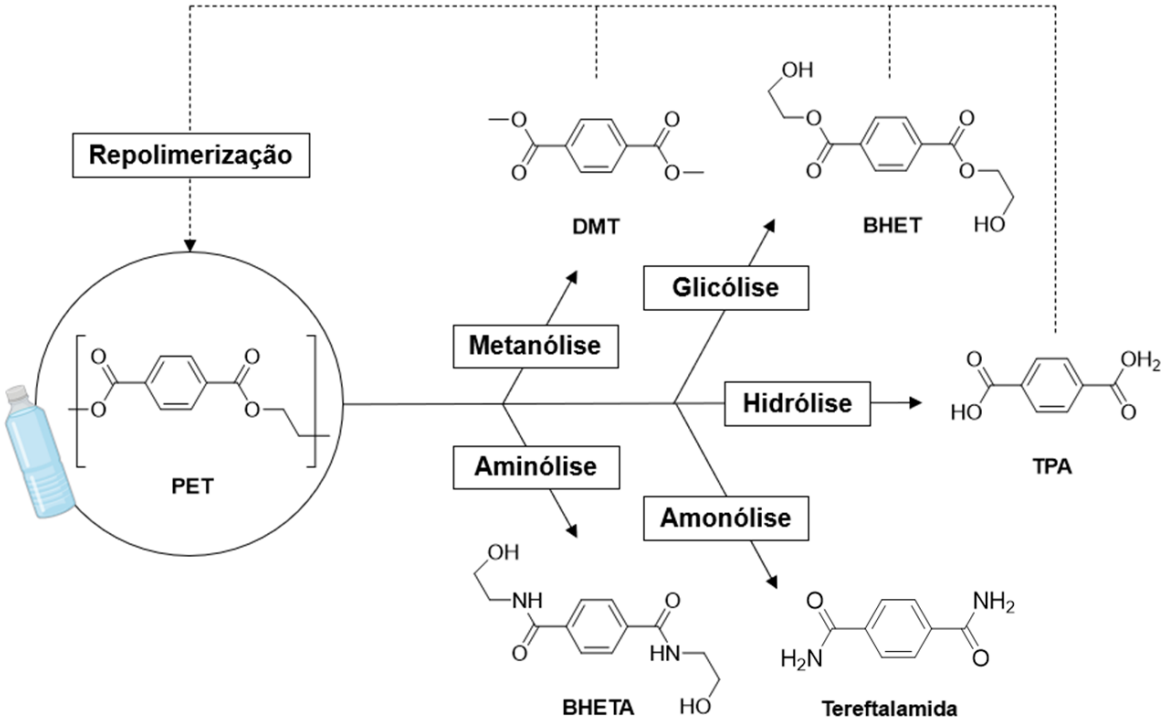
A reciclagem é considerada a melhor forma de gestão do PET, e, dentre as metodologias existentes as mais utilizadas são: a reciclagem mecânica – composta pelas etapas de triagem, lavagem, moagem e repassagem na extrusora para a formação de novas mercadorias a base de PET; a reciclagem química – degradação do PET em suas formas monoméricas, oligoméricas e outras formas envolvendo reagentes e/ou condições drásticas; e a reciclagem biológica – degradação do PET via enzimática em suas formas monoméricas e oligoméricas (Koshti, Mheta e Samarth, 2018; Khairul Anuar *et al.,* 2022)

A reciclagem mecânica ainda se divide em mais duas etapas, além das descritas no parágrafo anterior, sendo relativas à origem do resíduo, denominadas de reciclagem primária ou re-extrusão – a qual reutiliza os plásticos rejeitados do processo de produção, por apresentarem qualidades inferiores, sendo então triturados e adicionados novamente na formulação do plástico virgem –, e a reciclagem secundária – em que o foco se dá no plástico pós-consumo (PCR, do inglês "*Post-consumer recycled"*). Após sua extrusão, o PET, apesar de manter sua natureza química, tem a massa molecular de sua cadeia reduzida devido à sua propriedade hidroscópica que permite a ocorrência de hidrólise, sendo assim, é necessária a adição de mais um procedimento denominado de polimerização no estado sólido (SSP, do inglês "*solid state polymerization*") para a retirada dos produtos indesejáveis (Koshti, Mheta e Samarth, 2018).

Vale ressaltar que o PET PCR deve passar por processos de análises quanto ao teor de componentes orgânicos voláteis retirados pelo SSP e de subprodutos como o benzeno e o limoneno. O benzeno advém da degradação do PVC, devido à ineficiência da separação do PET/PVC durante a reciclagem, enquanto o limoneno residual se origina do contato prolongado com refrigerantes ou sucos de frutas (Benyathiar *et al.,* 2022). No Brasil, de acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa, desde 2020 a porcentagem permitida de PET PCR adicionado em embalagens de PET virgem é de no máximo 30%.

No caso da reciclagem química (Figura 4), esta pode ocorrer via metanólise, glicólise, hidrólise, amonólise e aminólise, as quais serão abordadas ao longo deste tópico de forma sucinta acerca de seus métodos, alternativas e eficiência/rendimento de acordo com os estudos de Benyathiar *et al.,* 2022, e de Ghosal e Nayak, 2022.

Figura 4 – Tipos de reciclagem química do PET



Fonte: Adaptação de Benyathiar *et al*., 2022

A despolimerização do PET via metanólise ocorre pela adição de metanol sob temperaturas próximas a 300°C sob pressão entre 1 e 4 MPa, formando os produtos dimetil tereftalato (DMT) e etilenoglicol (EG), podendo ser realizada posteriormente uma transesterificação para obtenção do bis(2-hidroxietil) tereftalato (BHET) ou uma hidrólise do DMT para obtenção do TPA e EG. Esta via apresenta uma eficiência >99% sem a presença de catalisadores. Porém, em presença de catalisadores como acetato de zinco, magnésio ou cobalto e dióxido de chumbo, a eficiência relatada máxima é de 98%, com ganho em termos de redução da temperatura e pressão do processo.

A glicólise é considerada como o método de reciclagem mais econômico e viável de ser realizado. Neste processo, o etilenoglicol em excesso participa de uma transesterificação direta formando o BHET, sob pressão atmosférica e temperatura entre 180-240°C, porém é necessária a utilização de catalisadores para contornar os problemas de cinética lenta e rendimentos moderados. Os procedimentos mais comuns são: (1) Glicólise catalisada: procedimento com utilização de metais (Zn, Mn, Co, Cu, Ni, Ti) em forma de sais, clusters e óxidos na escala nanométrica, com rendimentos máximos relatados de 60-90% ou com a utilização de líquidos iônicos apresentando rendimento relatado de 100%; (2) Glicólise assistida por solvente: a

utilização de solvente orgânico como o xileno aumenta a miscibilidade do PET no procedimento, apresentando rendimento máximo relatado de 80%; (3) Glicólise assistida por micro-ondas: utilização de radiações como fonte de energia externa diminuindo o tempo do processo, sendo relatado seu uso com rendimento, somente em glicólises catalisada apresentando valores de até 100%; (4) Glicólise supercrítica: método utilizando condições reacionais supercríticas do EG ocorrendo a 450°C, 15 Mpa e sem a utilização de catalisadores, apresentando rendimento máximo relatado de 93,5%.

A despolimerização via hidrólise é uma das rotas mais conhecidas, porém não utilizada com frequência devido à necessidade de purificação dos produtos obtidos e do valor do processo. Esta rota pode ocorrer em três condições: (1) Ácida: ocorrendo em temperaturas de 60-90°C com concentração em massa do ácido de no máximo 90%, sendo o ácido sulfúrico mais utilizado, obtendo como produtos o TPA e EG; (2) Básica: ocorrendo sob 1 a 2 MPa e em temperaturas próximas de 250°C com concentrações em massa da base de 4 a 20%, formando EG e o sal tereftalato dissódico, podendo ser tratado posteriormente com ácido sulfúrico para formação de TPA, outra alternativa dentro deste método é a utilização de solução aquosa de amônia; (3) Neutra: ocorre em temperaturas de 200 a 300°C, sob 1 a 4 MPa de pressão e utilizando vapor de água para a formação de TPA e EG com rendimentos máximos relatados de 90% de TPA e 60% de EG.

Amonólise, é a menos utilizada dentre as demais, ocorre pela reação entre a amônia anidra líquida e PET formando tereftalamida e EG, com temperatura entre 70 e 180°C sob pressão em torno de 2 MPa com ou sem a utilização de catalisadores no processo, apresentando rendimentos relatados maiores de 87%.

A despolimerização do PET via aminólise, mais utilizada para obtenção de fibras de PET, ocorre em solução aquosa contendo amina em excesso como etilenodiamina, etanolamina, morfolina etc., em temperaturas de 20 a 100°C, com ou sem presença de catalisador ou assistência por solvente ou por micro-ondas, formando os produtos bis(2-hidroxietil) tereftalatoamida (BHETA) e EG, sendo relatados rendimentos de até 90%.

Entretanto, a utilização dos métodos supracitados ainda está fora do ideal, uma vez que os produtos formados pela reciclagem do PET via mecânica são de baixa qualidade devido aos processos a que são submetidos. Quanto à via química, não são métodos economicamente e ecologicamente adequados devido à utilização

excessiva de reagentes químicos, sendo alguns destes tóxicos e/ou agressivos ao meio ambiente e pela liberação de poluentes e subprodutos indesejáveis (Khairul Anuar *et al.,* 2022)

1.2.1.2. Reciclagem enzimática do PET

Por fim, dos métodos de reciclagem, um dos que apresenta uma estratégia promissora, eficiente e ecologicamente adequada é a reciclagem via biocatálise, denominada de reciclagem biológica, e que pode ser definida como a utilização de componentes biologicamente ativos – enzimas – para catalisar transformações dos substratos de interesse (Tournier *et al.,* 2023).

Este tipo de processo é atrativo do ponto de vista ambiental e econômico pois as condições em que ocorre a catálise são adaptáveis e as enzimas são matérias-primas vindas de fontes renováveis, são atóxicas e biodegradáveis. Além disso, as enzimas podem catalisar as reações de forma potencialmente regio-, quimio- e estereosseletivas, em condições brandas de temperatura e pressão tornando, portanto, a reciclagem do PET viável para a recuperação de seus constituintes. Ademais, os produtos formados por esse método possuem as mesmas características do PET virgem (Tournier *et al.,* 2023; Khairul Anuar *et al.,* 2022).

Apesar de oferecer uma rota mais verde quanto às condições reacionais e gasto energético, além de ser vantajoso no que tange a pureza dos produtos obtidos, esta via apresenta baixa produção em relação à quantidade de PET residual, devido a alguns fatores, tais quais: o número de enzimas identificadas para esse processo e o seu acesso ainda é limitado; e a necessidade de mais estudos para sua otimização, sendo atualmente limitantes para a aplicação como única forma de resolução do problema ambiental gerado pelo acumulo de PET (Khairul Anuar *et al.,* 2022). Desta forma, este trabalho tem como destaque o estudo desta via, sendo nos próximos tópicos aprofundados os conceitos da degradação do PET por enzimas.

1.3. Processo enzimático

Os processos de biodegradação na natureza devem-se aos micro-organismos presentes no meio e, consequentemente, às suas enzimas. O PET era, desde sua primeira síntese, considerado como não biodegradável, até que cientistas observaram que certos micro-organismos desenvolveram vias bioquímicas que produziam enzimas que conseguiam se encaixar e decompor o PET, sendo a primeira realizada por uma cutinase de uma actinobactéria, *Thermobifida fusca,* apresentando despolimerização de 50% após 3 semanas com PET pós consumo de baixa orientação como substrato (Müller et al., 2005).

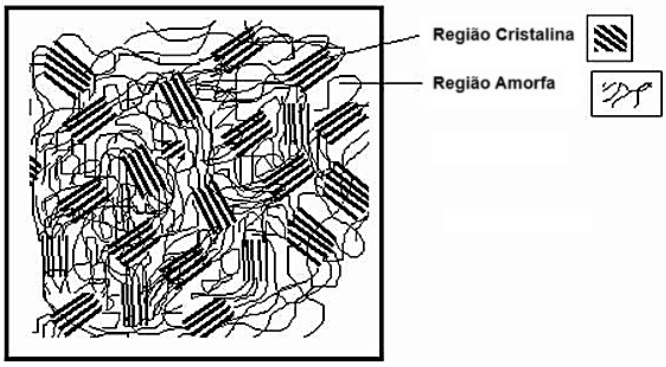
Ao longo das últimas duas décadas, diversas enzimas foram relatadas para a despolimerização do PET, podendo ser citadas as esterases (EC 3.1.1.1 e EC 3.1.1.2), lipases (EC 3.1.1.3), cutinases (EC 3.1.1.74) e as PETases (EC 3.1.1.101). O número EC acompanhado às enzimas supracitadas são as classificações de acordo com o Comitê de Nomenclatura da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (NC-IUBMB). As enzimas denominadas de PET hidrolases pertencem a um grupo contido nas hidrolases de ésteres carboxílicos pela classificação EC 3.1.1.x. (Tournier, Duquesne e Guillamot *et al*, 2023; Khairul Anuar *et al.,* 2022).

Para que uma enzima seja considerada uma hidrolase de PET, ela precisa apresentar uma termoestabilidade maior que 65°C e um sítio ativo capaz de acomodar mais de um monômero do PET. Estes dois parâmetros foram decididos para que haja diferenciação entre as enzimas existentes e as enzimas modificadoras de superfície de PET (Buchholz *et al.,* 2022).

Além disso, se faz necessário o entendimento dos parâmetros aos quais as enzimas estão submetidas em relação ao substrato, sendo estes a cristalinidade e a temperatura de transição vítrea, que podem ser tratados como fatores limitantes quanto aos avanços da degradação (Thomsen, Hunt e Meyer, 2022).

No caso da cristalinidade, o PET é uma resina semicristalina (Figura 5) que quando submetida ao processo biocatalítico apresenta uma relação direta de sua cristalinidade em relação às interações enzima-substrato. A maioria dos relatos na literatura reporta esta observação como um fator negativo. Já a temperatura de transição vítrea, fenômeno de relaxação/mobilidade da molécula, no caso do PET (70-80 °C) é um divisor em relação a termoestabilidade da enzima (Thomsen, Hunt e Meyer, 2022; Tournier, Duquesne e Guillamot *et al*, 2023).

Figura 5 – Resinas Semicristalinas



Fonte: Adaptação de BOYER (1975)

Atualmente os estudos deste processo têm sido direcionados para substratos amorfos ou de baixa cristalinidade e com procedimentos com temperaturas próximas à de transição vítrea (Tg) do PET, conforme apresentado na Tabela 1. Desta forma, os estudos desse processo são cruciais devido ao grande potencial que estas enzimas, PET hidrolases e seus derivados mutantes, apresentam para degradação de PET em escala industrial (Thomsen, Hunt e Meyer, 2022).

Tabela 1 – PETases e mutantes promissoras e seus estudos

Enzima	Condições	Referência
IsPETase	Filme X_c 1,9%; 30°C	Yoshida *et al.,* 2016
LCC-G	Filme X_c 7%; 75°C	Shirke *et al.,* 2018
HotPETase	Filme amorfo, Pó X_c 29,8%, garrafas X_c 39,9%; 60°C	Bell *et al.,* 2022
DuraPETase	Filme X_c 30%; 37°C	Yinglu *et al.,* 2021
FastPETase	Filme X_c 1,2-6,2% e garrafas X_c < 33,8%; 50°C	Lu *et al.,* 2022
TS-PETase	Filme amorfo; 58°C	Zhong *et al.*, 2021
ΔLCC	Filme amorfo e micro PET X_c 40%; 55 – 72°C	Pirillo *et al.*, 2023

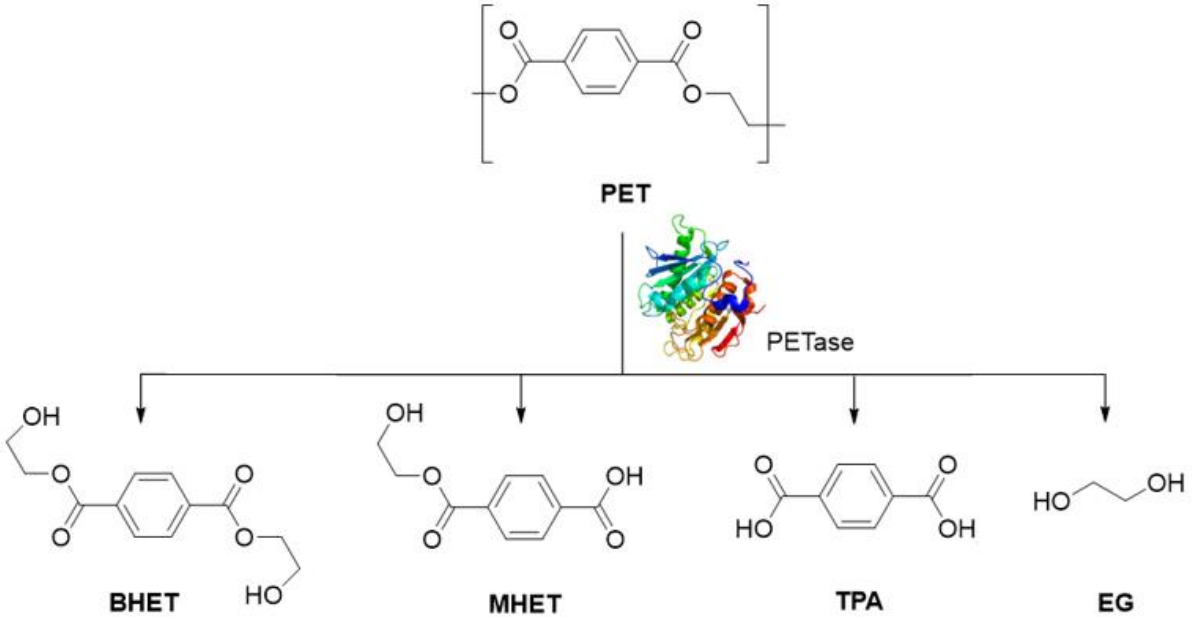
Fonte: Próprio autor

1.3.1. Hidrolases de PET

As PET hidrolases contidas na classificação EC 3.1.1.101 são denominadas de PETases, as quais são capazes de catalisar as reações de hidrólise e a sua reação inversa, as transesterificações. No caso das reações de hidrólise do PET, estas enzimas realizam a clivagem nos grupos funcionais ésteres formando os

intermediários da degradação, bis(2-hidroxietil) tereftalato (BHET) e mono(2-hidroxietil) tereftalato (MHET), além dos monômeros TPA e EG, sendo estes três últimos de maior acúmulo durante o processo de degradação do PET (Esquema 2) (Hayes e Luk, 2023).

Esquema 2 – Produtos da degradação do PET por biocatálise



Fonte: Adaptação de Hayes e Luk, 2023

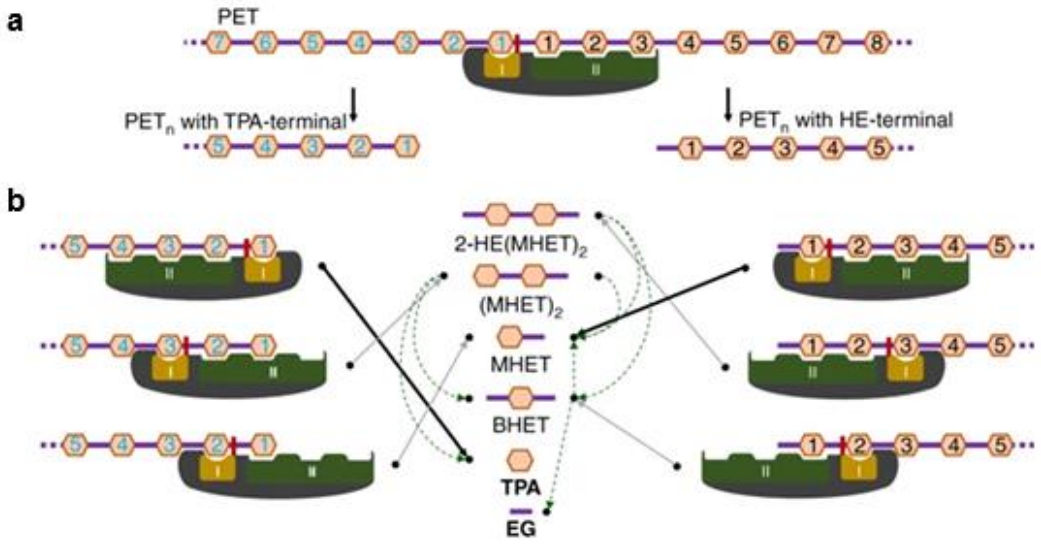
A *Is*PETase é uma enzima recém-descoberta, produzida pelo micro-organismo *Ideonella sakaiensis* a qual utiliza o PET como fonte de carbono e energia em seu metabolismo. Com os estudos acerca de sua estrutura, esta enzima foi responsável pela formulação da categoria das PETases, que tem como diferença em relação a outras hidrolases que utilizam PET como substrato, o tamanho e localização da sua cavidade de ligação, assim como a existência de dois sítios que mimetizam partes da cadeia polimérica do PET, formando um mecanismo de duas etapas específico para a degradação do PET. (Joo *et al.*, 2018)

1.3.1.1. Mecanismo de reação das PET hidrolases

De acordo com a proposta de Joo *et al.*, 2018, o mecanismo de reação das PET hidrolases podem ser divididas em dois momentos relacionados aos sítios da enzima. O primeiro momento (Figura 6a) denominado de corte, é responsável pela

acomodação inicial de quatro unidades constituintes do PET (MHET) nos sítios I e II, seguida pela primeira hidrólise que ocorre entre esses sítios formando duas cadeias de PET com extremidades diferentes, uma com TPA e a outra com EG. No segundo momento, denominado de digestão, ocorrem hidrólises sucessivas nas cadeias formadas do primeiro momento. Na cadeia com extremidade EG ocorre a acomodação dos grupos MHET seguida da hidrólise, liberando uma unidade do oligômero MHET e novamente uma cadeia com extremidade EG. O mesmo ocorre para a cadeia com extremidade TPA, liberando uma unidade monomérica de TPA e a cadeia com extremidade TPA. Ambas as digestões descritas ocorrem com a extremidade no sítio I, entretanto pode ocorrer com extremidade no sítio II, apesar de ser menos provável, levando a formação de outras formas oligoméricas que podem ser transformadas em MHET, TPA e EG (Figura 6b).

Figura 6 – Proposta de mecanismo dos sítios de PET hidrolases

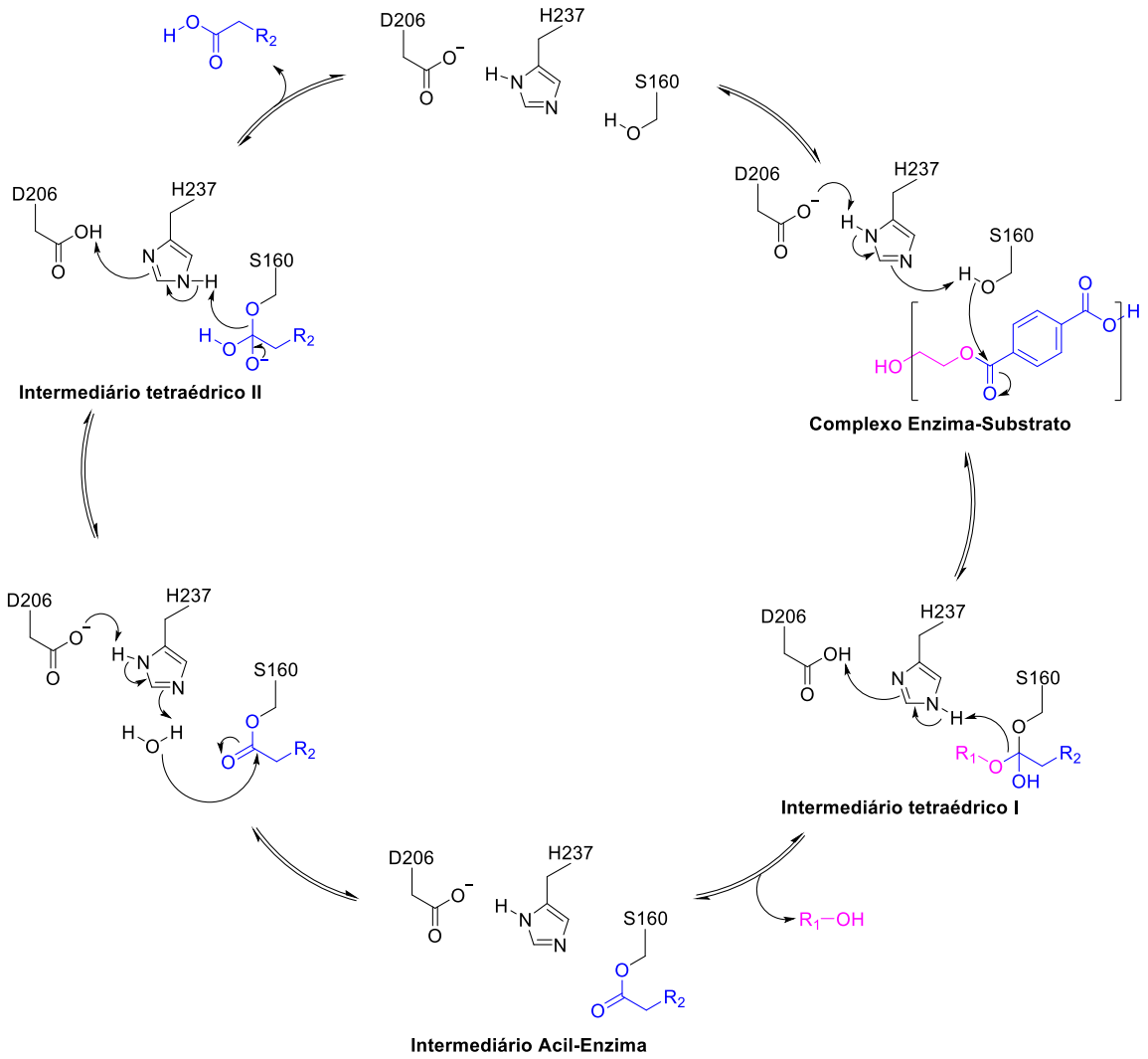


Fonte: Joo *et al.*, 2018

A hidrólise realizada entre os sítios I e II é promovida pelo ciclo catalítico da enzima a qual inicia-se com a entrada do substrato no túnel oxiânion do sítio ativo da enzima, onde em primeiro momento ocorre a estabilização do substrato com a ancoragem da carbonila, que sofrerá a hidrólise, pela interação de hidrogênios dos resíduos dos aminoácidos metionina e tirosina e com a formação de interações intermoleculares do tipo p-stacking com o resíduo de triptofano da enzima (Han *et al.,* 2017). Em seguida, o ciclo catalítico representado no (Esquema 3) se inicia com a ativação da serina do trio catalítico (Asp-His-Ser) através dos resíduos de aspartato

que devido ao seu caráter básico abstrai um próton da histidina. Essa, por sua vez retira um próton da serina que será o nucleófilo, realizando um ataque nucleofílico na carbonila do substrato e formando o primeiro intermediário tetraédrico, o qual será convertido em um intermediário acil-enzima com a saída do primeiro produto alcoólico. O intermediário acil-enzima é hidrolisado formando o segundo intermediário tetraédrico, no qual ocorre a restauração da carbonila do substrato seguido de sua saída como o segundo produto da reação e simultaneamente ocorrendo a restauração da tríade catalítica (Taniguchi *et al.*, 2019).

Esquema 3 – Ciclo catalítico das PETases



Fonte: Adaptação de Taniguchi *et al.*, 2019

1.3.2. Leaf-Branch compost cutinase – LCC

A LCC – *Leaf-Branch compost cutinase* é uma enzima contida no grupo das cutinases (EC 3.1.1.74) e recentemente das PETases (EC 3.1.1.101), devido se assemelhar quanto sua estrutura proteica com a *Is*PETase e ao mecanismo da tríade catalítica Asp-His-Ser. Esta enzima apresenta interações em sua superfície com mais de um monômero de PET e alta resistência a temperaturas acima de 60°C (Chen et al., 2013).

Desde 2005, houve trabalhos reportando hidrólise enzimática de PET por cutinase derivada do micro-organismo *Thermobifida fusca* como de Müller e seus colaboradores 2005 e Ronkvist e seus coladoradores, 2009, tais trabalhos retratam a atividade como promiscua e de interesse para a comunidade científica. A enzima LCC abordada neste trabalho, é uma enzima homóloga a cutinase estudada até então na comunidade científica e foi isolada por Sulaiman e seus colaboradores em 2012, a qual apresentou uma taxa de biodegradação 30 vezes maior do que outras enzimas já relatadas até então.

Após a descoberta da *Is*PETase, diversos estudos foram desenvolvidos, como de Shirke e seus colaboradores, 2018 e Pirillo e seus colaboradores 2023, na área de engenharia de proteínas com a enzima LCC com o intuito de promover mudanças quanto a sua estabilidade e seletividade para a biodegradação de PET. Muitos desses estudos tinham como base o design racional de proteínas com mudanças pontuais nos resíduos para se assemelhar a enzima *Is*PETase e gerar um processo de degradação mais eficiente.

Tais estudos são atrativos para a indústria uma vez que é possível obter, através de um processo com condições brandas, os monômeros do PET com qualidade igual aos utilizados para a produção de PET virgem. Desta forma este trabalho tem como objeto de estudo a degradação enzimática do PET utilizando variantes da enzima LCC.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Este trabalho teve como objetivo geral selecionar, produzir e testar enzimas para o desenvolvimento de um processo biocatalítico para degradação de polietileno tereftalato (PET).

2.2. Objetivo Específicos

1. Seleção de enzimas para degradação de PET;
2. Expressão gênica para a produção de PETases e avaliação de sua atividade enzimática;
3. Desenvolvimento de métodos analíticos para o monitoramento das reações de biodegradação;
4. Otimização das condições reacionais para a biodegradação dos polímeros.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Reagentes, plasmídeos e linhagem de Escherichia coli (*E. coli*)

Os reagentes, padrões analíticos, bis(2-hidroxietil) tereftalato (BHET) 85% e mono(2-hidroxietil) metil tereftalato (MHEmT) foram adquiridos junto à empresa TCI America® e o ácido tereftálico (TPA) pela empresa AmBeed®, os demais reagentes, assim como o substrato, filme de PET, utilizados para esta pesquisa foram adquiridos junto à empresa Sigma-Aldrich®.

Os plasmídeos foram doados pelo nosso colaborador internacional professor Romas J. Kazlauskas da *University of Minnesota*, contendo os genes que codificam as mutantes da cutinase LCC sendo estas: ssLCC (ss = ponte dissulfeto em D238C-S283C); F243T; H218S-F243T e ssH218S-F243T. Esses plasmídeos foram expressos em células de *E. coli* BL21(DE3)pLysS e armazenados a longo prazo em células de *E. coli* Top 10 doados pela professora Danielle Biscaro Pedrolli.

3.2. Métodos de caracterização

3.2.1. Métodos cromatográficos

3.2.1.1. Cromatografia liquida de alta eficiência (HPLC)

As análises por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) foram realizadas utilizando um HPLC da marca JASCO – formado pelos módulos PU-2089s Plus – Bomba quartenária, AS-2055 Plus – Injetor automático, CO-2065 Plus – Compartimento para coluna com aquecimento, MD-2018 Plus – Detector por absorção na região UV de arranjo de diodos e um LC-NetII/ADC – módulo de controle, localizado no Milagre Lab (Instituto de Química – UNESP Araraquara).

Para as análises utilizou-se como fase estacionária a coluna Luna C18(2) (5µ, 100A, 250 x 4.6mm) da marca Phenomenex. A fase móvel foi constituída por metanol grau HPLC e água Mili-Q com adição de 0,1% de ácido fórmico, sendo a condição de eluição (A) de 32 minutos com gradiente de 5% a 100% de metanol por 15 minutos, mantendo a 100% por 5 minutos e posteriormente a limpeza e recondicionamento da coluna na condição inicial. O controle de vazão foi ajustado à 1,0 $mL.min^{-1}$, a

temperatura da coluna foi de 35°C e o efluente foi monitorado durante 25 minutos em um comprimento de onda de 254 nm. A condição de eluição (B) de 28 minutos com 35% de metanol por 3 minutos, seguido de um gradiente de 35% a 50% de metanol por 7 minutos com aumento para 100% metanol em 3 minutos, mantendo por 2 minutos e, por fim, seguido da limpeza e recondicionamento da coluna na condição inicial. O controle de vazão foi ajustado à 0,8 $mL.min^{-1}$, a temperatura da coluna foi de 40°C e o efluente foi monitorado durante 25 minutos em um comprimento de onda de 254 nm. O tempo de retenção para os compostos analisados nas condições de eluição (A) e (B) estão contidos na tabela 2.

Tabela 2 - Tempo de retenção dos compostos nas análises no HPLC

Condição de eluição	**Composto**	**Tempo de retenção** (min)
A	TPA	12,813
	MHET	14,175
	BHET	14,913
B	TPA	11,142
	MHET	11,917
	BHET	12,542
	MHEmT	16,582

Fonte: Próprio autor

Para a avaliação da atividade enzimática e para a quantificação dos produtos obtidos via degradação do PET, foram construídas, dentro do grupo de pesquisa pela Dra. Laíza Araújo de Almeida, duas curvas de calibração com os padrões MHET (Anexo 1) e TPA (Anexo 2), para a condição cromatográficas B. Por meio destas curvas de calibração e da integração dos picos calculados pelo *software* ChromNAV (JASCO *Chromatography Data System*) obteve-se a área do pico referente de cada produto os quais foram interpolados nas curvas de calibração.

3.2.1.2. Cromatografia gasosa de pirólise acoplada ao espectrômetro de massas (Py-GC-MS)

As análises de cromatografia gasosa de pirólise acoplada ao espectrômetro de massas (Py-GC-MS) foram realizadas utilizando o pirolisador (EGA/PY-3030D, Frontier Laboratories, Japão) conectado a um cromatógrafo gasoso (GC-2010 plus, Shimadzu) equipado com um detector de espectrometria de massas (GCMS- 48

QP2020, Shimadzu). A coluna cromatográfica utilizada foi de capilar metálico revestida com 5% difenilmetil polissiloxano (Ultra ALLOY®-Frontier *Laboratories*). Aproximadamente 0,1 mg de amostra cortada do PET foram analisadas com os parâmetros ajustados de acordo com a tabela 2.

Tabela 3 - Parâmetros utilizados para a análise no Py-GC-MS

Pirolisador (Py)	
Temperatura do forno	650°C
Temperatura de interface	320°C
Modo/tempo de injeção	Single-shot/0,20min
Cromatógrafo gasoso (GC)	
Coluna	Rtx-5MS 30 m x 0.25 mm x 0.25 µm
Modo de injeção	Split
Razão split	50
Temperatura de injeção	300°C
Gás de corrida	He
Modo de controle de fluxo	Linear velocity
Velocidade linear	36.0 cm/sec
Temperatura do forno	40°C (2min) 20°C/min to 320°C (14
Espectrômetro de massas (MS)	
Modo de ionização	EI 70 eV
Temperatura do ionizador	250°C
Temperatura de interface	320°C
Modo de aquisição	Scan (35-700 *m/z*)
Tempo de recorte do	2 min

Fonte: Próprio autor

3.2.2. Análises térmicas

As curvas de análise termogravimétrica (TG) em conjunto à técnica de análise térmica diferencial (DTA) foram obtidas no equipamento do modelo SDT 2960 da marca TA Instruments sob atmosfera de ar seco com fluxo de 100 mL/min. Aproximadamente 7 mg de amostra foram condicionadas em cadinho de α-Al_2O_3 com volume de 90 µL. A faixa de temperatura foi de 30-700ºC com razão de aquecimento a 10 ºC/min.

As análises de calorimetria exploratória diferencial (DSC) foram obtidas no equipamento (Mettler-Toledo). Aproximadamente 2 mg de amostra foram condicionados em cadinhos de alumínio com tampa de capacidade de 40 µL. A faixa

de aquecimento foi de um intervalo de 30 a 280 °C a uma taxa de 5 °C/min em fluxo de N_2 a 100 mL/min.

As análises térmicas supracitadas foram realizadas para a caracterização do substrato, filme de PET, quanto sua pureza, determinada pelos eventos térmicos visualizados na derivada da análise termogravimétrica (DTG), temperatura de transição vítrea, temperatura de fusão e cristalização, indicada na DTA e cristalinidade do material calculada pela curva obtida por DSC pela equação 1.

$$Cristalinidade\ (Xc) = \frac{\Delta H_m - \Delta H_c}{\Delta H_m^0} . 100\% \qquad \textit{Equação 1}$$

Onde, ΔH_m é a entalpia de fusão, ΔH_c é a entalpia de cristalização e ΔH_m^0 é a entalpia de fusão do material 100% cristalino.

3.3. Enzimas

3.3.1. Transformação dos plasmídeos em células E. coli

Os plasmídeos que codificam as variantes da cutinase LCC foram recebidos adsorvidos em um papel de filtro Whatman®, desta forma, foi realizado um processo de recuperação destes plasmídeos pela imersão da região contendo o plasmídeo em 30 µL de água mili-Q autoclavada em um microtubo de 200 µL e incubado em temperatura ambiente por 15 minutos. Para confirmação da presença de DNA após a recuperação 2 µL da solução foi analisada por espectrofotometria, Nanodrop 2000 - ThermoFisher e eletroforese em gel de agarose.

Para a transformação, aproximadamente 100 ng dos plasmídeos foram adicionados a 50 µL de células *E. coli* BL21(DE3)pLysS eletrocompetentes frescas. As células foram mantidas em gelo por 1 minuto, em seguida foram transferidas para uma cuba de eletroporação fria e conectada em um aparelho de eletroporação ajustado para fornecer um pulso elétrico de capacitância de 25 µF, sob voltagem de 2,5 kV e resistência de 200 ohm, com o controlador de pulso: faixa baixa igual à 200 e faixa alta à 500, tempo de 5 milissegundos e com intensidade de campo igual à 12,5 kV/cm. Imediatamente após o pulso foi adicionado 1 mL de meio SOC na cuba em seguida as células foram transferidas para um microtubo de 1,5 mL e incubadas a 37 °C por 1 h, sob agitação orbital (220 rpm). Por fim, 50 µL e 100 µL foram inoculados

em placas de meio LB sólido contendo antibiótico de resistência da célula cloranfenicol (35 µg/mL) e do plasmídeo canamicina (50 µg/mL), as placas com as células e seus controles foram mantidas a 37 °C *overnight.*

3.3.1.1. Preparo de células BL21 (DE3) pLysS eletrocompetentes

As células eletrocompetentes frescas foram preparadas em um erlenmeyer de 500 mL contendo 100 mL de meio LB suplementado com antibiótico de resistência cloranfenicol 35 (µg/mL) o qual foi inoculado 1 mL de uma pré-cultura *overnight* de uma única colônia de *E. coli* BL21(DE3) pLysS e disposto em um shaker a 37 °C sob agitação orbital a 220 rpm até atingir uma OD_{600} de 0,5. Em seguida, as células foram resfriadas em banho de gelo por 30 minutos, colhidas e transferidas para tubos falcon de 50 mL previamente resfriados e levadas para a centrífuga fria em uma rotação de 4000 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspendido em 2 mL de glicerol 10% gelado, combinados em um único tubo falcon e adicionado glicerol 10% gelado para um volume final de 20 mL em seguida foi levado para a centrífuga nas mesmas condições anterior, este procedimento de lavagem da adição de glicerol e centrifugação foi realizado por quatro vezes. Após a quarta lavagem o pellet foi ressupenso em 400 µL de glicerol 10%, feito alíquotas com volume de 50 µL e estas foram armazenadas em um ultrafreezer a - 80°C.

3.3.2. Síntese das proteínas recombinantes

Para a síntese das proteínas, 7,5 mL de uma cultura overnight, de uma única colônia de *E. coli* BL21(DE3) pLysS contendo o plasmídeo de interesse, foram inoculados em um erlenmeyer de 1L contendo 250 mL de meio TB suplementado com antibiótico de resistência cloranfenicol (35 µg/mL) e canamicina (50 µg/mL) e disposto em um shaker a 37 °C sob agitação orbital a 220 rpm até atingir uma OD_{600} de 1. Em seguida, para a indução da expressão gênica foi adicionado IPTG (concentração final 0,75 mM) e mantido no shaker a 17 °C a 200 rpm por 20 horas.

Após a expressão, as células foram colhidas por centrifugação a 8000 rpm a 4 °C por 10 min. Os pellets celulares foram ressuspendidos em 20 mL de tampão de lise gelado. Em seguida, as células foram lisadas por sonicação (Bandelin Sonopuls HD2070), com 40% da potência máxima, em 9 ciclos de 30 s, em modo contínuo, com

pausas de 1 min entre os ciclos. Todos os procedimentos foram conduzidos em banho de gelo. A suspensão de células foi centrifugada a 12.000 rpm a 4 °C por 45 min para remover detritos celulares. O sobrenadante foi filtrado em um filtro 0,22 µm, em seguida foi adicionado glicerol para uma concentração final de 10% de glicerol, e, por fim, os extratos foram armazenados no freezer a -20 °C.

3.3.3. Tampões e meios de cultura

Tampão de lise
10 mM imidazol
50 mM NaH_2PO_4
300 mM NaCl
Ajuste de pH 7,2

Meio Luria-Broth (LB)
Triptona 10 g/L
Extrato de levedura 5 g/L
NaCl 5 g/L
Luria-Broth ágar: 15g de ágar para 1 L de LB líquido.

Meio Terrific Broth (TB)
Extrato de levedura 24g/L
Triptona 20 g/L
Glicerol 4 mL/L
100 mL de tampão fosfato (0.17 M KH_2PO_4, 0.72 M K_2HPO_4)

Meio SOC (*super optimal broth with catabolite repression*)
Triptona – 20 g/L
Extrato de levedura – 5 g/L
Cloreto de sódio – 10 mM
Cloreto de potássio – 2,5 mM
Cloreto de magnésio – 10 mM
Sulfato de magnésio – 10 mM
Glicose – 20 mM

3.3.4. Purificação dos extratos enzimáticos

Os extratos enzimáticos após serem filtrados em um filtro de 0,22 µm foram levados para um sistema de cromatografia líquida AKTA e carregados em uma coluna de agarose contendo Niquel (1 mL, HisTrap®HP) pré-equilibrada com tampão de lise (10 mL). A condição de eluição foi iniciada com a adição de tampão de lise (50 mL) seguido do tampão B (50 mM imidazol, 50 mM NaH_2PO_4, 300 mM NaCl, pH 7,2, 50 mL). As proteínas de interesse possuíam uma cauda de histidina, desta forma, foram eluídas com a adição do tampão de eluição (250 mM imidazol, 50 mM NaH_2PO_4, 300 mM NaCl, pH 7,2, 15 mL) e concentrada para aproximadamente 1 mL com um tubo de centrífuga de ultrafiltração Amicon (limite de PM de 15 kDa) em uma centrifuga fria 5000 rpm a 4 °C por 10 min.

3.3.5. Armazenamento a longo prazo das variantes

Para o armazenamento a longo prazo dos plasmídeos foi realizado uma transformação química em células *E. coli* TOP 10 utilizando aproximadamente 100 ng de plasmídeo que foi adicionado em 100 µL da célula quimicamente competente. A suspensão celular foi incubada em gelo por 30 minutos, em seguida, foi realizado um choque térmico da solução em um banho maria a 42°C por 30 segundo e imediatamente foi transferido para 2 minutos no gelo. Posteriormente, foi adicionado 250 µL de meio SOC e levado ao shaker para incubação por 1 hora a 37°C em 220 rpm. As células foram plaqueadas em meio LB ágar suplementado com canamicina (50 µg/mL). Uma única colônia de *E. coli* TOP 10 contendo o plasmídeo de interesse foi inoculada em 3 mL LB suplementado com canamicina (50 µg/mL) e mantida em shaker *overnight* a 37°C 200 rpm. Destes inóculos foram realizadas alíquotas de 0,5 mL e adicionado 0,5 mL de glicerol 50% para uma concentração final de 25% glicerol e armazenadas em um ultrafreezer a - 80 °C.

3.3.5.1. Preparo de *E.coli* OP 10 quimicamente competentes

As células *E. coli TOP 10* foram preparadas por uma cultura em um erlenmeyer de 500 mL contendo 100 mL de meio LB o qual foi inoculado 1 mL de uma pré-cultura *overnight* de uma única colônia de *E. coli TOP 10* e mantido em um shaker

a 37 °C sob agitação orbital a 220 rpm até atingir uma OD_{600} de 0,4. Em seguida, as células foram colhidas e transferidas para tubos falcon de 50 mL previamente resfriados e levadas para a centrífuga fria em uma rotação de 4000 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspendido gentilmente em 20 mL de $CaCl_2$ 0,1M previamente resfriado, em seguida, foi incubado no gelo por 20 min e centrifugado a 4000 rpm por 10 minutos a 4°C. Por fim, o pellet foi ressupenso em 2 mL $CaCl_2$ 0,1M com glicerol 10%, feito alíquotas com volume de 100 µL e estas foram armazenadas em um ultrafreezer a - 80°C.

3.4. Eletroforese em gel de agarose

Para verificar a recuperação do plasmídeo adsorvido no papel de filtro assim como confirmar a presença do plasmídeo após as transformações foi realizado uma eletroforese em gel de agarose em um sistema de cuba horizontal K33-10H Kasvi com fonte de eletroforese OWL EC300 da Thermo Scientific. Sendo as condições da eletroforese, tamanho do gel 10x10 (60mL TAE 1x, 1% agarose, 6 µL SYBR Safe Stain), tampão de corrida TAE 1x (40 mM Tris, 20 mM ácido acético, 1 mM EDTA, pH 8.3), tempo de corrida 40 minutos, voltagem 110 V e corrente 400 mA, após a corrida o gel foi revelado em um *Gel Doc XR+ Gel Documentation System da* Bio-rad.

3.5. Ensaio de Bradford

Para a quantificação de proteínas foi utilizado o ensaio de Bradford, o reagente utilizado na análise foi adquirido comercialmente. Para a curva analítica (Anexo 3) do ensaio de Bradford foi preparada uma solução 1 mg/mL de Soro Albumina Bovina (BSA) que foi diluída sucessivamente a 0,5, 0,250, 0,125, 0,062 e 0,031 mg/mL. 20 µL da solução de BSA foram adicionados a 980 µL de água Milli-Q e 1 mL de reagente de Bradford, que foram incubados em temperatura ambiente por 10 minutos. Após o período de incubação foi medida a absorbância em 595nm. As análises foram realizadas em triplicata. Para o branco, foi usado 1 mL do tampão de eluição (250 mM imidazol, 50 mM NaH_2PO_4, 300 mM NaCl, pH 7,2) e 1 mL de reagente de Bradford. Para quantificação das enzimas de interesse, foram utilizados 20 µL dos das enzimas purificadas.

3.6. Eletroforese em gel de dodecilsulfato de sódio-poliacrilamida (SDS-PAGE)

Para as análises em relação a presença da proteína após a expressão foi realizado um SDS-PAGE, as amostras foram preparadas com 5 µL da enzima de interesse tanto no caso dos extratos como a purificada, 15 µL de água Mili-Q e 5 µL de tampão de Laemmli 6x, homogeneizadas e incubadas em termomixer a 95°C. Posteriormente as amostras foram aplicadas no gel. A concentração do gel utilizado foi de 12% e o marcador de massa molecular utilizado foi o BenchMark™ Protein Ladder da Invitrogen.

As análises foram realizadas em uma cuba de eletroforese vertical Kasvi, com fonte de eletroforese OWL EC300 da Thermo Scientific. O tampão de corrida utilizado foi o Tris-Glicina 1X. Foi realizada uma pré-corrida a 75 V por 30 minutos para o empacotamento da amostra, seguida por uma corrida de 40 minutos a 200 V. Os géis foram corados com a solução corante, e descorados em solução descorante e registrado posteriormente por fotografia.

3.6.1. Soluções SDS – PAGE

Gel de resolução 12% (pH 8,8; 10 mL)
2 mL tampão de resolução 5x
4 mL acrilamida:bisacrilamida (30:0,8)
4 mL água Mili-Q
100 µL APS 10%
10 µL TEMED

Gel de empacotamento 12% (pH 6,8; 5 mL)
1 mL tampão de empacotamento 5x
900 µL acrilamida:bisacrilamida (30:0,8)
3,2 mL água
50 µL APS 10%
5 µL TEMED

Solução de APS 10% - 1 mL
100mg SDS em 1 mL de água Mili-Q

Tampão de corrida 10x – 500 mL
1,92 M de glicina (72,0672 g)
250 mM de Tris base (15,1425 g)
50 mL de SDS 10%

Tampão de Laemmli 5x
15 mL de Tris HCl pH 6,8
22,5 mL de glicerol
10 mL de SDS 10%
2,5 mL de β-Mercaptoetanol
Traços de azul de bromofenol

Solução Tris-HCl pH 6,8 - 100 mL
1 M de Tris base (12,114g)
Ajustar pH para 6,8 com HCl
Água Milli-Q q.s.p 100 mL

Solução Acrilamida: Bisacrilamida
15 g de acrilamida
0,4 g de bisacrilamidada
50 mL de água Mili-Q

Solução de SDS 10% - 100 mL
10 g SDS em 100 mL de água Mili-Q

Solução Tris-HCl pH 8,8 (Tampão de resolução 5x) – 50 mL
1,875 M Tris base (11,3568 g)
5 mL SDS 10%
Ajustar pH para 8,8 com HCl
Água Milli-Q q.s.p 50 mL

Solução Tris-HCl pH 6,8 (Tampão de empacotamento 5x) – 50 mL
1,875 M Tris base (11,3568 g)
5 mL SDS 10%
Ajustar pH para 6,8 com HCl
Água Milli-Q q.s.p 50 mL

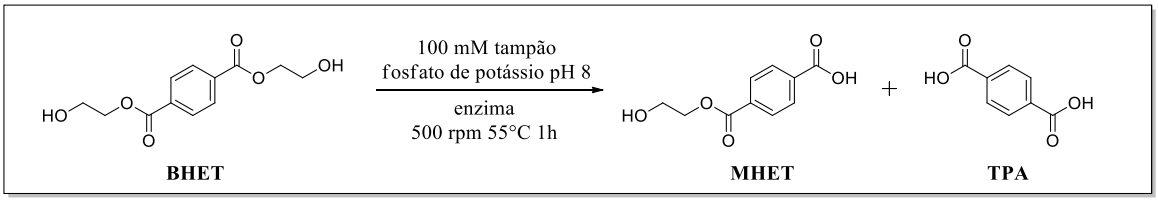
Solução corante – 200 mL
50% Metanol (100 mL)
40% Água Mili-Q (80 mL)
10% ácido acético glacial (20 mL)
0,5% coomassie blue brilliant R -250

Solução descorante – 200 mL
30% Metanol (60 mL)
63% Água Mili-Q (126 mL)
7% ácido acético glacial (14 mL)

3.7. Procedimentos enzimáticos

3.7.1. Determinação da atividade enzimática

Esquema 4 - Reação de hidrólise de BHET – atividade enzimática



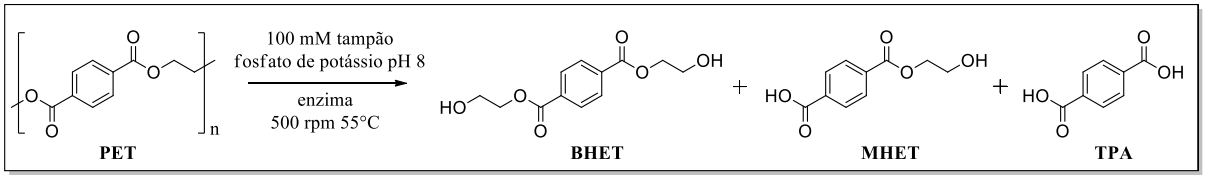
Fonte: Próprio autor

A reação para medir a atividade das enzimas foi baseada na metodologia de Shirke *et al.,* 2018. Foi adicionado 1 mg de BHET em um microtubo de 1,5 mL, a enzima de interesse, para os extratos enzimáticos foram adicionados 500 µL e para os ensaios com as enzimas purificadas foi adicionado volume de enzima suficiente para obter uma concentração final de 0,040 mg/mL e completado com tampão 100mM

de fosfato de potássio pH 8,0 para um volume final de 1 mL. O microtubo contendo a mistura reacional foi colocado no termomixer a 500 rpm e 55°C por 1 hora. Ao término do tempo o volume foi completado com o tampão para 1 mL e transferido para um tubo de centrífuga de 5 mL a reação interrompida com a adição de um excesso de 2 vezes de tampão 100 mM de fosfato de potássio pH 2,5 contendo 20% de DMSO (HPLC) obtendo um volume final 3 mL após homogeneizar o tubo foi centrifugado a 20.000 g durante 10 min. Para a análise dos produtos obtidos na reação, 300 µL do sobrenadante foram adicionados em um vial contendo 700 µL de metanol grau HPLC e levados para a análise no HPLC.

3.7.2. Reações de hidrólise enzimática

Esquema 5. Reação de hidrólise de PET



Fonte: Próprio autor

As reações de biodegradação de PET foram baseadas na metodologia de Pirillo *et al.,* 2023. Foi adicionado 7 mg de PET cortado em dimensões 0,5 cm x 0,5 cm x 250 mm em um microtubo de 1,5 mL, a enzima de interesse, para os extratos enzimáticos foram adicionados 200 e 500 µL e para os ensaios com as enzimas purificadas foi adicionado volume de enzima suficiente para obter uma concentração final de 0,040 mg/mL e completado com tampão 100 mM de fosfato de potássio pH 8,0 para um volume final de 1 mL. O microtubo contendo a mistura reacional foi colocado no termomixer a 500 rpm e 55°C por 1 hora.

Após 1 hora o volume foi completado com o tampão para 1 mL e transferido para um tubo de centrifuga de 5 mL e a reação interrompida com a adição de um excesso de 2 vezes de tampão 100 mM de fosfato de potássio pH 2,5 contendo 20% de DMSO (HPLC) obtendo um volume final 3 mL após homogeneizar o tubo foi centrifugado a 20.000 g durante 10 min. O sobrenadante foi analisado por HPLC e o PET remanescente foi lavado 3 vezes com água milli-Q e armazenado em placas de petri em temperatura ambiente por 3 dias para a análise de rendimento em massa.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

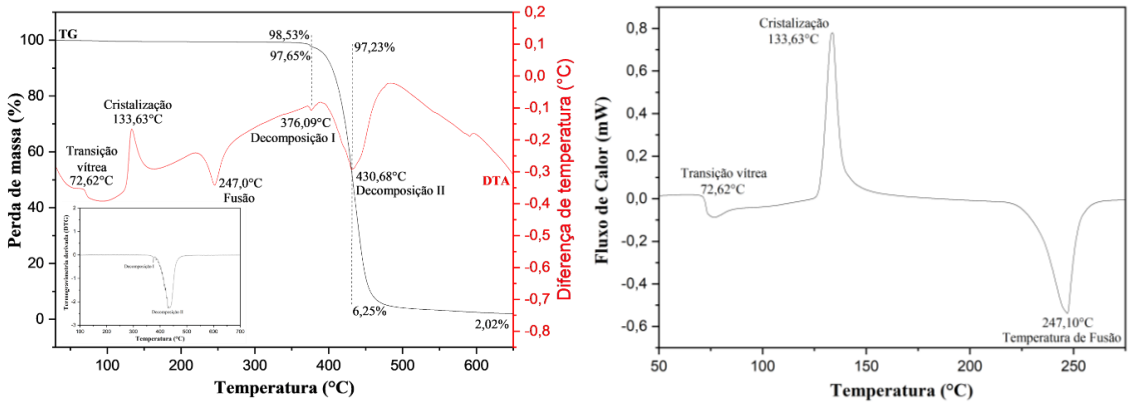
4.1. Caracterização do substrato PET

Diversos trabalhos na literatura quanto às reações de biodegradação do PET, relatam o substrato quanto sua transição vítrea e cristalinidade (Yoshida et al., 2016, Bell et al., 2022, Yinglu et al., 2021, Lu et al., 2022, Zhong et al., 2021), pois ambos os parâmetros são necessários em relação a interação enzima-substrato, agindo como limitantes da reação. Desta forma, o filme de PET foi adquirido pela Sigma-Aldrich para a execução deste trabalho, o qual possui em sua descrição ser um filme de baixa orientação, amorfo e transparente com espessura de 250 mm.

De acordo com a literatura, os materiais de PET comerciais amorfos apresentam temperatura de transição vítrea (Tg) em torno de 70 °C e temperatura de fusão (Tm) em torno de 250 °C (Demirel; Yara; Elçiçek, 2016). A partir dos resultados obtidos pelas análises térmicas (Figura 7) foi possível verificar a temperatura de transição vítrea do material sendo de 72,62 °C e a temperatura de fusão sendo de 247,10 °C (ΔH_m 6,50 J/g), estando de acordo com a literatura.

Além disso, devido o material ser de baixa orientação um pico exotérmico foi evidenciado referente a temperatura de cristalização (Tc) do material sendo de 133,63 °C (ΔH_c 4,94 J/g). A partir destas temperaturas de cristalização e de fusão e considerando o valor de entalpia do PET 100% cristalino como sendo ΔH_m = 140 J/g (Khanna e Kuhn,1997) foi possível calcular o grau de cristalinidade (Xc) do filme pela equação 1, obtendo um valor cristalinidade igual a 1,11%.

Figura 7. a. Termogravimetria TG; análise térmica diferencial DTA, derivada da termogravimetria DTG e **b.** calorimetria exploratória diferencial DSC do PET

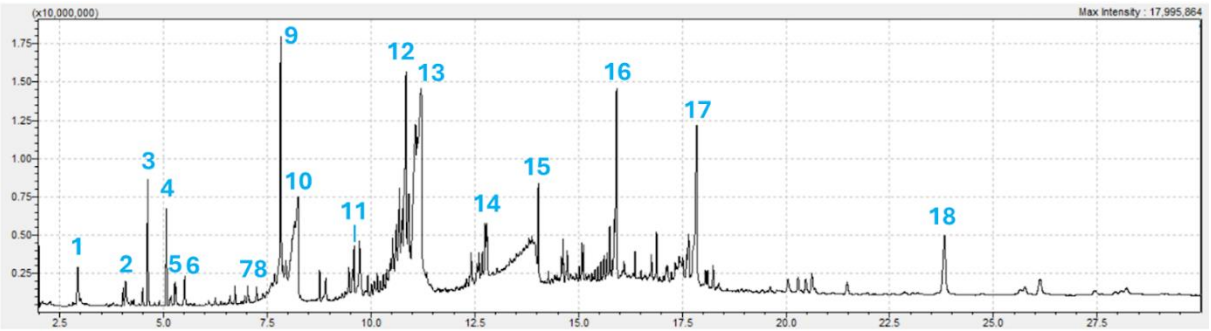


Fonte: Próprio autor

A escolha da utilização de um filme de PET comercial em vez de uma garrafa pós consumo, ocorreu com a intenção de diminuir a complexidade da matriz para as reações de degradação enzimática, como relatado no trabalho de Lopes, 2024 a qual realiza análises térmicas com o filme de PET deste trabalho e garrafas PET.

O filme utilizado neste trabalho apresentou duas decomposições térmicas durante a análise termogravimétrica (TG) sendo observadas como eventos distintos pela derivada DTG, foi realizada uma cromatografia gasosa de pirólise acoplada ao espectrômetro de massas (Py-GC-MS). O cromatograma (Figura 8) descreve os picos observados dos produtos da pirolise do PET.

Figura 8. Cromatograma dos produtos da pirolise do PET.

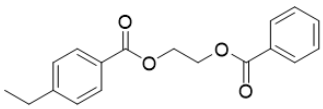
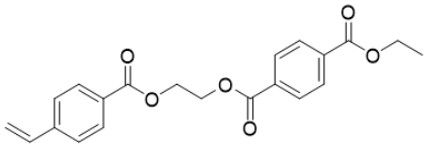
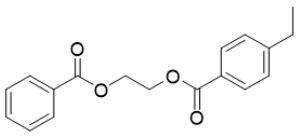


Fonte: Próprio autor

Os principais produtos estão descritos na Tabela 3. A análise destes produtos foi realizada em comparação com a literatura dos trabalhos de Dimitrov *et al.,* 2013 e Dziwiński; Iłowska; Gniady, 2018 em conjunto com os espectros de massa (Anexo 4 ao 21). Por meio desta análise foi possível verificar a pureza do PET.

Tabela 3 - Descrição dos produtos da pirolise do PET.

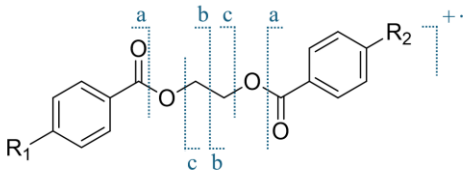
Num.	**RT (min)**	**Fragmentos**	**Massa molar**	***m/z***
1	2.940	Benzeno	78	78,77
2	4.093	Tolueno	92	92, 91, 65
3	4.623	Desconhecido	-	108,93,91,79,77,53,39
4	5.077	Desconhecido	-	108,93,91,79,77,53,39
5	5.280	Etilbenzeno	106	106,91
6	5.517	Estireno	104	104,103,78,51

7	7.027	Metilbenzaldeido	120	120, 91
8	7.243	Acetofenona	120	120, 105, 77
9	7.823	Benzoato de vinila	148	105, 77, 51
10	8.247	Ácido benzóico	122	122, 105, 77, 51
11	9.597	Metil 4-vinilbenzoato	174	174,131,103,77
12	10.843	Divinil tereftalato	218	218 175, 149, 104, 76
13	11.230	Monometil tereftalato	180	149,65
14	12.753	Monovinil ester difenilico	224	224,181,149
15	14.017	1,2-Etanodiol, dibenzoato	270	227, 105
16	15.950		298	298,297
17	17.863		368	368,367,325,104
18	23.837		298	298,297,149,105

Fonte: Próprio autor

Os picos característicos no processo de pirólise do PET puro, são o benzeno, ácido benzóico, benzoato de vinila, divinil tereftalato e monometil tereftalato, apontados nos trabalhos supracitados. Tais produtos apresentaram maior abundância durante a análise. Vale destacar que os dois picos marcados com desconhecidos, possuem fragmentações características dos possíveis caminhos de fragmentação analisados por Dziwiński; łowska; Gniady, 2018 (Figura 9).

Figura 9 - Possíveis fragmentações para os produtos da pirolise do PET



R1 e R2 são $-C_2H_5$; $-CH=CH_2$; $-COOCH_3$; $-COOCH=CH_2$.

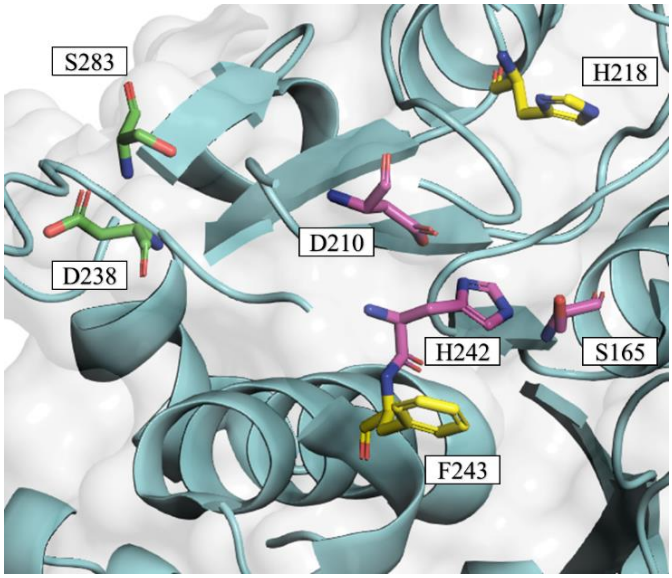
Fonte: Adaptado de Dziwiński, *et al*, 2018

Apesar da análise termogravimétrica apresentar no processo termo oxidativo do PET dois eventos, o qual não é visualizado na literatura, os valores de perda de massa resultam em 0,88%, comparado com o resultado obtido pela pirólise do PET. Dentre os picos analisados nenhum contaminante ou aditivo foi observado na amostra.

4.2. Cutinases

Como abordado ao longo deste trabalho, as enzimas utilizadas foram variantes da *Leaf-Branch Compost Cutinase* (ΔLCC). As modificações realizadas partiram de um estudo feito por Shirke e seus colaboradores em 2018, seguido com a parceria com o laboratório do professor Romas J. Kazluaskas. Recebemos os plasmídeos destas variantes que tiveram como base a LCC, sequência de DNA (Anexo 22a). Em todas as mutantes houve a remoção do sinal de secreção do N-terminal e adição de uma cauda de histidina no C-terminal sendo possível observar a sequência de aminoácido no Anexo 22b. Tais modificações foram realizadas visando um aumento no rendimento de expressão da enzima e para a purificação dela por afinidade por íons metálicos. Em relação às variantes, as mutações foram realizadas próximas ao sítio ativo da enzima (Figura 10) com o intuito de melhorar a enzima quanto a sua estabilidade quanto para a acomodação do substrato.

Figura 10 – Sítio catalítico da enzima LCC e posições dos resíduos das variantes



Fonte: Próprio autor

Para a ssLCC houve a adição de uma ponte dissulfeto nas posições D238C-S283C que, de acordo com a literatura, estas pontes tendem a estabilizar a enzima, pois, reduzem a entropia do estado desenovelado da proteína a tornado mais rígida na região onde é colocada (Gomes *et al.,* 2007). Nas posições 218 e 243 os aminoácidos da enzima selvagem, histidina e fenilalanina foram substituídos pelos aminoácidos serina e treonina, respectivamente. Estes aminoácidos são menores e não possuem anéis aromáticos, anel imidazol e benzeno em suas terminações. Tais modificações resultaram nas variantes F234T, H218SF243T e ssH218SF243T com o intuito de aumentar o sítio ativo e diminuir as interações de ancoragem do substrato próximos a tríade catalítica Aspartato-Histidina-Serina.

4.2.1. Recuperação dos plasmídeos

O processo de recuperação dos plasmídeos recebidos adsorvidos em papel de filtro foi verificado utilizando um Nanodrop 2000 com 2 µL da amostra pós processo. O branco foi o mesmo solvente utilizado, água milli-Q autoclavada e os resultados obtidos nessas análises foram compilados na Tabela 4.

Tabela 4 – Resultados das análises no nanodrop da recuperação dos plásmídeos das mutantes adsorvidos no papel de filtro

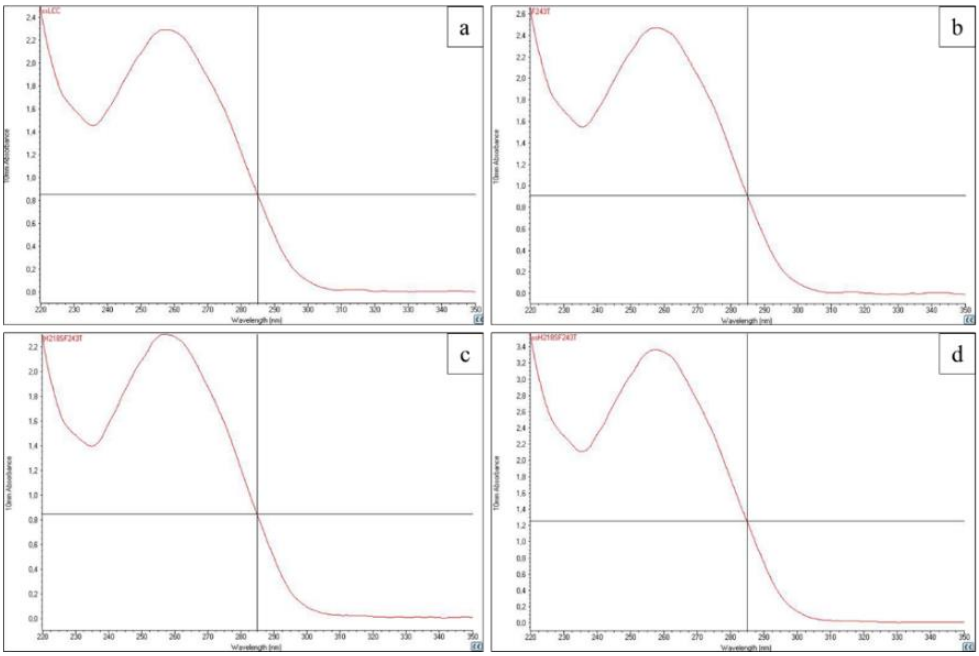
Amostra	Conc. ng/uL	A260	A280	260/280	260/230
Branco	0,3	0,005	0,005	1,00	0,94
ssLCC	113,7	2,275	1,225	1,86	1,42
F243T	122,7	2,453	1,316	1,86	1,44
H218SF243T	114,2	2,284	1,217	1,88	1,54
ssH218SF243T	166,7	3,334	1,780	1,87	1,45

Fonte: Próprio autor

De acordo com os resultados obtidos, a recuperação dos plasmídeos foi positiva para as quatro variantes. Por meio da análise de espectroscopia na faixa de comprimento de onda de 230, 260 e 280 nm é possível inferir por meio da razão 260/280 e 260/230 a pureza do DNA, que de acordo com a literatura se dá em torno de 1,8 e 2,0-2,2 respectivamente (Desjardins e Conklin, 2010). Apesar dos valores obtidos para a razão 260/280 estarem na faixa desejável o segundo parâmetro da razão 260/230 apresentou valores inferiores, o que indica uma concentração de

contaminantes que absorvem na região do 230 nm como carboidratos e fenóis. Os perfis das análises podem ser observados na Figura 11.

Figura 11 – Perfil das análises no Nanodrop dos plasmídeos recuperados **a.** ssLCC; **b.** F243T; **c.** H218SF243T e **d.** ssH218SF243T



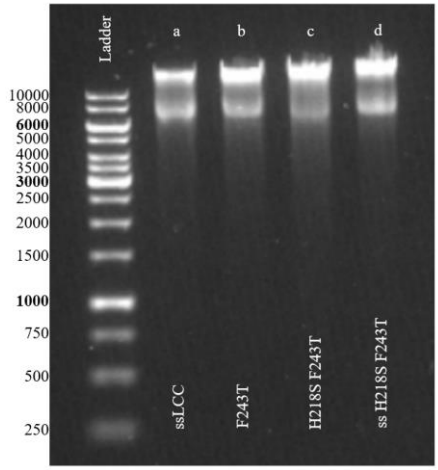
Fonte: Próprio autor

4.2.2. Transformação dos plasmídeos em E. coli Bl21 DE3 pLysS

Embora os valores na razão 260/230 dos plasmídeos analisados indicarem possíveis contaminantes, as transformações em células *E. coli Bl21 DE3 pLysS* por eletroporação foram prosseguidas. Após o crescimento das células em meio LB contendo os antibióticos de resistência do plasmídeo e da célula, foi realizado uma extração do DNA e realizada uma eletroforese em gel de agarose contendo quatro amostras relativas a cada variante.

Os plasmídeos ssLCC, F243T e ssH218SF243T foram construídos no vetor pET28a(+) (Anexo 23 ao 25) enquanto a H218SF243T foi construído em pET24a(+) (Anexo 26). Devido a sequência de DNA possuir 801 pares de base (bp) e os vetores possuírem 5245 bp e 5242 bp respectivamente, tais valores quando somados geram os resultados visualizados nas bandas entre 8000 e 6000 bp do gel de agarose da Figura 12, o que indica a presença do DNA pós transformação.

Figura 12 – Gel de agarose dos plasmídeos recuperados: **a.** ssLCC; **b.** F243T; **c.** H218SF243T e **d.** ssH218SF243T



Fonte: Próprio autor

Os plasmídeos ssLCC, F243T e ssH218SF243T foram construídos no vetor pET28a(+) (Anexo 23 ao 25) enquanto a H218SF243T foi construído em pET24a(+) (Anexo 26). Devido a sequência de DNA possuir 801 pares de base (bp) e os vetores possuírem 5245 bp e 5242 bp respectivamente, tais valores quando somados geram os resultados visualizados nas bandas entre 8000 e 6000 bp do gel de agarose da Figura 12, o que indica a presença do DNA pós transformação.

4.2.3. Síntese das variantes da enzima LCC

Os plasmídeos de interesse foram expressos e as células foram lisadas e centrifugadas, obtendo um extrato enzimático livre de resíduos celulares. A este extrato bruto foi adicionado glicerol 20% em volumes iguais até uma concentração final de 10% de glicerol e volume final de 40 mL. Os extratos brutos foram quantificados em proteínas totais por ensaio de Bradford e disposto na Tabela 5.

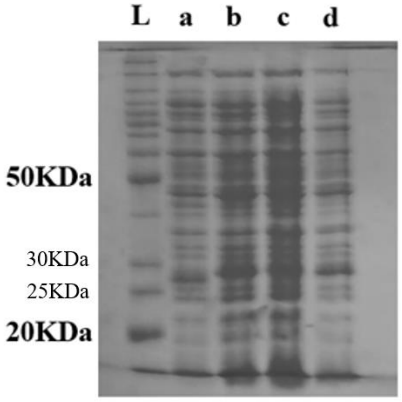
Tabela 5 – Concentração de proteínas totais dos extratos enzimáticos

Extrato Enzimático bruto	**Concentração** mg/mL
ssLCC	1,02
F243T	2,47
H218SF243T	2,84
ssH218SF243T	1,11

Fonte: Próprio autor

Para a confirmação da presença da enzima de interesse nos extratos foi realizado uma análise de eletroforese em gel de poliacrilamida (Figura 13), sendo possível observar uma banda de maior intensidade entre a região de 30KDa e 25KDa, referente as enzimas alvo que apresentam um valor próximo a 28 KDa.

Figura 13 – SDS-Page dos extratos enzimáticos livres de células: L - Benchmark protein Ladder; a - ssLCC; b – F243T; c – H218SF243T; d – ssH218SF243T



Fonte: Próprio autor

4.2.4. Avaliação da atividade enzimática dos extratos brutos

As quatro enzimas foram avaliadas utilizando como substrato o padrão BHET. Foi monitorada a conversão do substrato para TPA e MHET, os resultados podem ser observados na Tabela 6. A atividade enzimática foi definida em $U/mg_{proteína}$ pela massa de enzima de um volume fixo de 500 µL utilizada na degradação do substrato BHET e formação de MHET por minuto. As porcentagens de compostos foram determinadas pela integração da área dos picos dos cromatogramas gerados nas análises destas reações.

Tabela 6 - Reação de hidrólise de BHET – atividade enzimática dos extratos enzimáticos

Extrato enzimático	**Atividade** U/mg	**Compostos** (%)			
		TPA	**MHET**	**BHET**	**Outros**
Branco	-	-	14.9	84.8	0.3
ssLCC	0.082	7.0	67.9	6.3	18.8
F243T	0.014	42.2	36.9	0.9	20.0
H218SF243T	0.005	46.3	24.0	1,9	27.8
ssH218SF243T	0.039	26.4	42.2	1,9	29.5

Fonte: Próprio autor

A atividade enzimática dos extratos brutos com o substrato BHET apresentaram conversões para os produtos TPA e MHET, as quais indicaram uma segunda confirmação da presença das enzimas de interesse assim como sua atividade. Entretanto houve a formação de subprodutos podendo ser verificados nos cromatogramas presentes nos anexos 27 a 32 onde é possível observar as reações: branco, de cada enzima e os padrões externos relativos ao TPA e BHET.

A enzima ssLCC apresentou uma conversão maior para MHET, enquanto as demais variantes apresentaram uma seletividade maior para a formação de TPA. Estas atividades foram verificadas somente pela conversão indicada pelo HPLC sem uma curva de calibração ou padrão interno pois se tratava de reações preliminares, uma vez que o interesse era o estudo da degradação do PET. Desta forma, foram realizadas reações de biodegradação com o PET para a visualização do perfil dos produtos para um aprofundamento dos métodos de monitoramento e quantificação.

4.2.5. Reações de PET com extratos enzimáticos brutos

As reações foram conduzidas com volumes diferentes de extrato enzimático bruto, 200 µL e 500 µL; com agitação 500 rpm e sem agitação nas temperaturas de 55°C e 70°C. Incialmente as reações ocorreram com temperatura mais alta, 70°C, pois de acordo com Thomsen, Hunt e Meyer, 2022, a condição de temperatura da reação quando próxima a temperatura de transição vítrea do material facilita as interações entre as cadeias poliméricas do substrato e a enzima. Como nesse trabalho as enzimas utilizadas são termoestáveis, foi possível realizar a reação na temperatura proposta a qual foi conduzida em um período de 5 dias com 200 µL de extrato sob agitação de 500 rpm, entretanto os resultados obtidos foram menores que 3% de biodegradação do polímero.

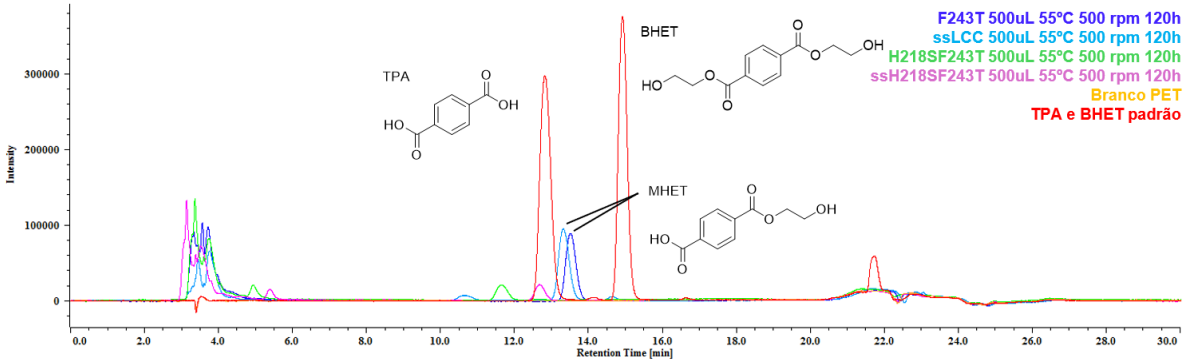
Esta mesma situação foi observada por Pirillo e seus colaboradores, 2023, a qual realizaram reações em 72°C e não obtiveram resultados melhores quanto em 55°C. Em uma segunda rodada as reações foram conduzidas com 200 µL de extrato em 55°C, agitação de 500 rpm, pelo mesmo período das reações anteriores e não houve diferença no resultado em relação a primeira rodada.

Sendo assim, foram conduzidos experimentos de forma simultânea em condições: de agitação 500 rpm e sem agitação, 55°C com e sem aumento do volume

de extrato enzimático para 500 µL. Os experimentos sem agitação foram realizados a fim de comparação com a literatura.

A Figura 14 apresenta os resultados obtidos nas reações com os extratos nas condições reacionais de 55°C, 500 rpm, 500 µL em 120h em comparação com os padrões dos monômeros TPA e BHET em concentração de 100ppm. As demais reações citadas estão apresentadas nos Anexos 33 a 36, divididos pela enzima utilizada. Foi possível evidenciar a formação de monômeros como TPA e MHET porém o rendimento da despolimerização foi menor que 5%, o que difere da literatura para a enzima selvagem e entre outras mutantes.

Figura 14 – Cromatograma das reações de biodegradação do PET com extratos enzimático



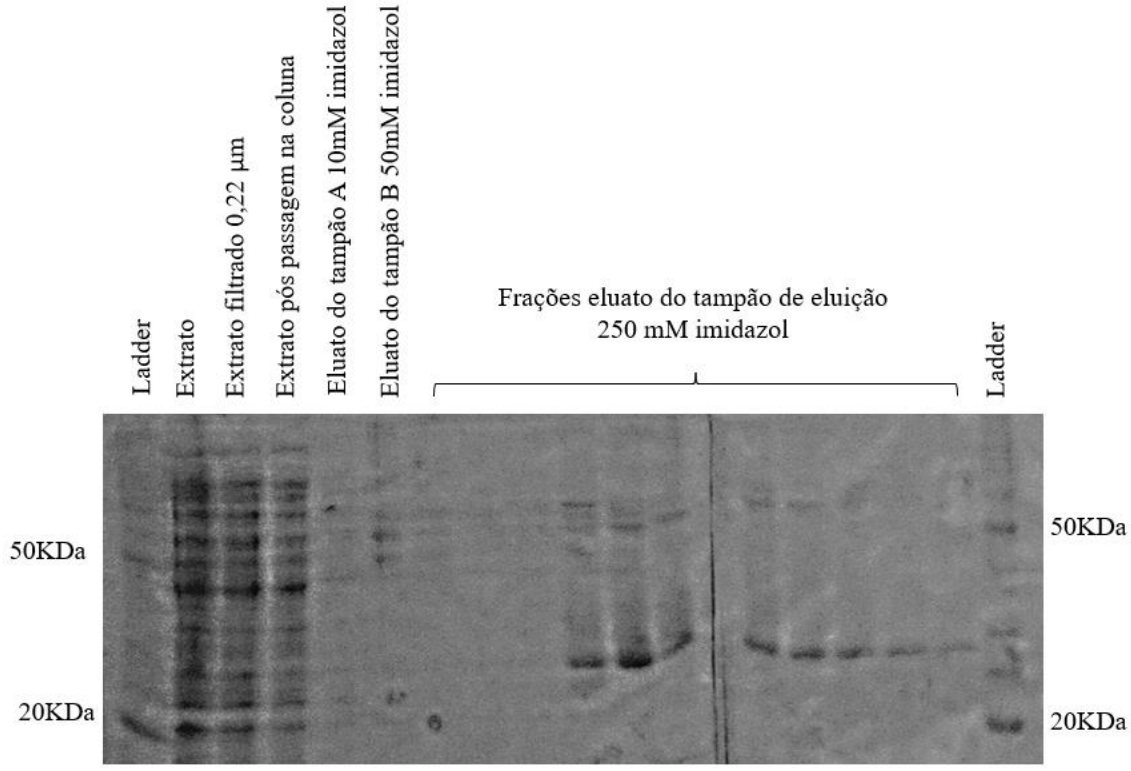
Fonte: Próprio autor

A realização de reações com extratos enzimáticos é atrativa do ponto de vista econômico e pela diminuição de operações unitárias. Entretanto, os resultados abaixo do esperado, obtidos com as reações utilizando os extratos enzimáticos levaram às hipóteses de que poderia estar acontecendo inibição por competição com outras proteínas presentes no extrato ou por restrição ao acesso das variantes enzimáticas ao substrato. Desta forma, foi realizado um processo de purificação das enzimas a fim de avaliar as hipóteses levantadas. O método de purificação escolhido foi por afinidade à íons metálicos, devido a todas as variantes possuírem cauda de histidina em sua estrutura.

4.3. Purificação dos extratos enzimáticos

A eficiência da purificação das enzimas foi verificada por meio de uma eletroforese em gel de poliacrilamida com as frações obtidas a partir da eluição com tampão. Esta seleção das amostras está atrelada ao aumento da concentração de imidazol, o qual interage com os íons metálicos presentes na coluna tomando o espaço da enzima que por sua vez é liberada nas frações. Desta forma, pela técnica de SDS-Page (Figura 15) foi possível avaliar o processo em cada etapa, selecionar as frações com a enzima LCC-F243T e rever a necessidade de outra purificação no extrato para o aumento de rendimento.

Figura 15 – SDS-Page - processo de purificação do extrato enzimático F243T



Fonte: Próprio autor

Nas frações iniciais, no que diz respeito ao extrato, foi possível observar uma diminuição da intensidade da banda da enzima LCC-F243T. Consequentemente, foram observadas frações contendo a enzima em aproximadamente 28KDa de forma mais pura. Sendo assim, as frações foram combinadas e passadas por um processo

de concentração. Esta técnica foi aplicada com as demais variantes, as quais foram quantificadas por ensaio de Bradford (Tabela 7).

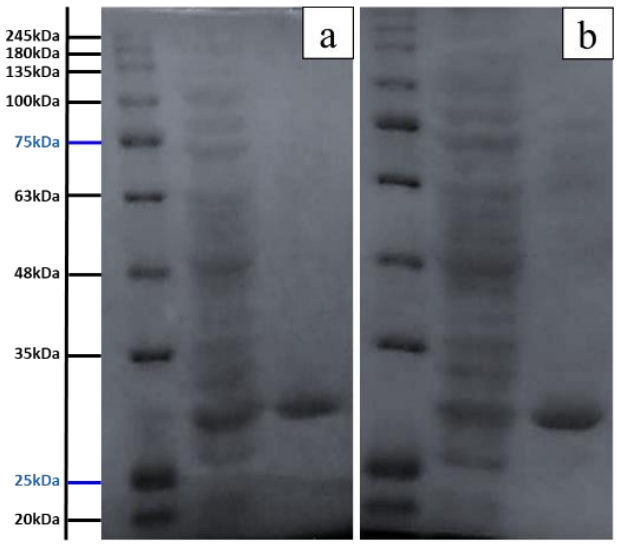
Tabela 7 – Concentração de proteínas totais nas enzimática purificadas

Extrato enzimático	**Concentração** mg/mL
ssLCC	0,121
F243T	0,665
H218SF243T	1,886
ssH218SF243T	1,012

Fonte: Próprio autor

De acordo com os resultados do ensaio de Bradford o uso da ssLCC foi descontinuado por dificuldade no processo de concentração da enzima. Desta forma, decidiu-se continuar o estudo de degradação somente com as enzimas F243T e H218SF243T por motivo de comparação com trabalhos existentes na literatura e com a discussão da influência da dupla modificação na enzima selvagem LCC. Comparando o extrato enzimático bruto e o extrato enzimático purificado em uma eletroforese em gel de poliacrilamida (Figura 16) foi possível observar, qualitativamente, a eficiência da purificação realizada com as enzimas F243T e H218SF243T.

Figura 16 – SDS-Page – extrato enzimático e enzima purificada: **a.** F243T e **b.** H218SF243T



Fonte: Próprio autor

4.3.1. Atividade enzimática – extratos purificados

O ensaio de atividade enzimática foi realizado com modificações da metodologia anteriormente aplicada com os extratos enzimáticos. Para isso foi definida a concentração das enzimas em 0,040 mg/mL como descrito no trabalho de Pirillo e seus colaboradores 2023, seguindo o procedimento reacional e de extração de Shirk e seus colaboradores 2018, como descrito no Esquema 4. A atividade enzimática foi definida em $U/mg_{proteína}$ pela massa de enzima utilizada na degradação do substrato BHET e formação de MHET por minuto (Tabela 8).

Tabela 8 - Reação de hidrólise de BHET – atividade enzimática das enzimas purificadas

Extrato enzimático purificado	**Atividade** U/mg	**Compostos** (%) **TPA**	**MHET**	**BHET**
F243T	1,011	6,0	67,6	26,4
H218S F243T	0,832	5,3	56,6	38,1

Fonte: Próprio autor

Ainda no que se diz respeito a Tabela 8, a conversão foi definida em MHET pois para esta reação a quantidade de TPA formado estava abaixo da curva de quantificação. Entretanto, é possível observar a tendência da seletividade das enzimas para a formação de MHET quando o substrato é o BHET, a qual na tabela foi indicada fora dos parênteses e dentro dos parentes a conversão total do processo. Todos os cromatogramas utilizados para esta análise podem ser observados do anexo 37 a 43, os quais apresentam os padrões utilizados com presença de padrão interno para o cálculo das conversões, os padrões externos e das reações.

4.3.2. Reações de PET com extratos purificadas

As reações foram realizadas de acordo com a metodologia proposta por Pirillo e seus colaboradores, 2023. A enzima selvagem LCC, de acordo com a literatura, apresenta altos rendimentos com a biodegradação do PET. Porém ela apresenta uma cinética muito baixa e ao logo de vários dias a enzima interrompe a reação. Segundo os resultados descritos por Pirillo, a enzima selvagem apresenta um rendimento de despolimerização de 64% em 90 horas. Desta forma, as mutantes discutidas neste

trabalho focam no rendimento e produtos formados na despolimerização do PET dentro das condições reacionais da metodologia de Pirillo.

Na tabela 9 são apresentados os resultados relativos as variantes enzimáticas: LCC-F243T e LCC-H218SF243T aplicadas na biodegradação do PET. O monitoramento por HPLC das reações indicou a formação somente dos produtos TPA e MHET após as 90 horas, podendo ser visualizada nos cromatogramas dos anexos 44 a 47. O produto majoritário foi TPA e devido a baixa formação de MHET não foi possível quantificá-lo pela curva analítica de MHET.

Tabela 9 - Reação de hidrólise de PET com enzimas purificadas, conversão e rendimento de despolimerização

Enzima	**Tempo** (Horas)	**Conversão TPA** (mg)	**Rendimento despolimerização em massa** (%)
F243T	48	0,70	14
F243T	90	4,89	74
H218S F243T	48	0,30	11
H218S F243T	90	1,95	60

Fonte: Próprio autor

A mutante LCC-F243T apresentou um aumento de 15,62% na despolimerização de PET em 90 horas em relação à enzima selvagem. Entretanto no trabalho de Pirillo e seus colaboradores (2023) a mesma enzima apresentou um aumento de 39,06%, também em relação a enzima selvagem, com rendimento de despolimerização de 89% em 90 horas. Tal disparidade pode ser explicada pela atividade enzimática das enzimas utilizadas no trabalho de Pirillo e neste trabalho.

Em Pirillo e seus colaboradores (2023), a atividade enzimática é determinada pela degradação de nanopartículas de PET e do acetato de 4-nitrofenila indicando a formação de produtos aromáticos totais no primeiro caso. Desta forma, apesar da enzima, substrato e condições experimentais serem as mesmas, o valor de atividade infere na concentração a ser utilizada nas reações, devido a proposta deste trabalho em usar o HPLC para a determinação da atividade, tal diferença na despolimerização foi evidenciada.

Em relação à enzima com a dupla mutação, LCC-H218SF243T, o rendimento foi 7% menor que a da enzima selvagem, entretanto a alteração do resíduo de histidina para serina não desestabilizou ou tornou disfuncional o desempenho da enzima. Apesar de não ser seletiva para a formação de TPA como a F243T, a enzima H218SF243T apresentou rendimento de despolimerização em massa de 60% em 90 horas indicando a formação de oligômeros como produtos da biodegradação do PET.

5. CONCLUSÕES

Dentro dos desafios da reciclagem dos plásticos, em específico na reciclagem do plástico polietileno tereftalato (PET), este trabalho teve como proposta estudar mais uma possibilidade para proporcionar o fechamento do ciclo da economia circular do PET, através do estudo aprofundado da tecnologia de biocatálise – degradação enzimática de PET, que vá ao encontro da sustentabilidade, possibilitando o "*upcycle*" dos resíduos de PET pós-consumo para PET reciclados de alta qualidade, assim como favorecer a compensação da pegada de carbono e a diminuição do gasto energético do processo.

Neste trabalho foi possível produzir as enzimas PET hidrolases: ssLCC (ss = ponte dissulfeto em D238C-S283C); F243T; H218S-F243T e ssH218S-F243T, sendo estas as mutantes da cutinase LCC, o que viabilizou o estudo da degradação de PET via catálise enzimática. Quanto ao substrato utilizado para este estudo, foi realizado uma caracterização do filme de PET, obtendo as propriedades de Tg 72,62°C e Xc 1,11%. Apesar das mutantes utilizadas serem termoestáveis em temperaturas acima da transição vítrea do substrato, foi evidenciado um rendimento de despolimerização menor nestas temperaturas.

Outro ponto de destaque foi a utilização das enzimas em extrato enzimático. Apesar de ser atrativo em relação ao custo do processo quando comparado com a enzima purificada, a interação enzima-substrato para esta reação foi prejudicada gerando degradações menores que 5%. Portanto, optou-se por trabalhar com a enzima pura.

Ainda que a conversão obtida pela mutante com melhor desempenho observado neste trabalho, aumento de 15,62% em relação a enzima selvagem, não tenha atingido os mesmos valores da literatura, a contribuição deste trabalho frente ao estudo de degradação de PET para a literatura se dá pelo monitoramento das reações destacando a seletividade da enzima e a determinação dos produtos específicos gerados na degradação do PET.

6. REFERÊNCIAS

American Society for Testing and Materials. (ASTM). 2020. ASTM International Plastics Committee Revises Resin ID Code, More Updates Coming. Disponível em: https://newsroom.astm.org/astm-international-plastics-committee-revises-resin-id-code-more-updates-coming. Acessado em setembro, 2023.

ARAÚJO, A. P. C.; MELO, N. F. S.; JUNIOR, A. G. O.; RODRIGUES F. P.; FERNANDES, T.; VIEIRA, J. E. A.; ROCHA, T. L.; MALAFAIA, G.; How much are microplastics harmful to the health of amphibians? A study with pristine polyethylene microplastics and Physalaemus cuvieri. **Journal of Hazardous Materials**. v. 382, 2020.

ATLAS DO PLÁSTICO. Fatos e números sobre o mundo dos polímeros sintéticos. Fundação Heinrich Böll. 2020. Disponível em: br.boell.org/pt- br/2020/11/29/atlas-do-plastico/. Acessado em setembro, 2023.

BELL, E.L., SMITHSON, R., KILBRIDE, S. et al. Directed evolution of an efficient and thermostable PET depolymerase. **Nature Catalysis**, v. 5, p. 673–681, 2022.

BENYATHIAR, P.; KUMAR, P.; CARPENTER, G.; BRACE, J.; MISHRA, D. K. Polyethylene Terephthalate (PET) Bottle-to-Bottle Recycling for the Beverage Industry: A Review. **Polymers**, v. 14, n. 12, p. 2366, 2022.

BUCHHOLZ, P. C. F.; FEUERRIEGEL, G.; ZHANG, H.; PEREZ-GARCIA, P.; NOVER, L.; CHOW, J.; STREIT, W. R.; PLEISS, J. Plastics Degradation by Hydrolytic Enzymes: The Plastics-active Enzymes Database - PAZy. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**. v. 90, p. 1443−1456, 2022.

CABERNARD, L., PFISTER, S., OBERSCHELP, C.; HELLWEG, S. Growing environmental footprint of plastics driven by coal combustion. **Nature Sustainability**, v. 5, p. 139–148, 2022.

CHEN S., SU L. CHEN J.WU J., Cutinase: Characteristics, preparation, and application, **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 8, p. 1754-1767, 2013

CIOLA, R. Fundamentos da Cromatografia a Líquido de Alto Desempenho- HPLC. Editora Edgard Blucher Ltda, 2003.

CUI Y.; CHEN Y.; LIU X.; DONG S.; TIAN Y.; QIAO Y., et al. Computational redesign of a PETase for plastic biodegradation under ambient condition by the GRAPE strategy**. ACS Catalysis,** v. 11, n.3, p. 1340–1350, 2021.

DE PAOLI, M.-A.; SPINACÉ, M. A. S.; ROMÃO, W. Poli(Tereftalato de Etileno), PET: Uma Revisão Sobre os Processos de Síntese, Mecanismos de Degradação e sua Reciclagem. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v.19, n. 2, p. 121-132, 2009.

DEMIREL B., YARA S. A., ELÇIÇEK H., Crystallization behavior of PET materials, **BAÜ Fen Bil. Enst. Dergisi Cilt** v. 13, n. 1, p. 26-35, 2011.

DESJARDINS P, CONKLIN D. NanoDrop microvolume quantitation of nucleic acids. **Journal of Visualized Experiments (JoVE).** v. 22, n. 45, p. 2565. 2010

FAPESP; VASCONCELOS, Y. **Revista Pesquisa FAPESP: Planeta plástico**. São Paulo, n. 281, 2019.

GEYER, R.; JAMBECK, J. R.; LAW, K. L. Production, use, and fate of all plastics ever made. **Science Advances**. v. 3, n. 7, e1700782, 2017.

GHOSAL K. E NAYAK C. Recent advances in chemical recycling of polyethylene terephthalate waste into value added products for sustainable coating solutions – hope vs. hype, **Journal Materials Advances**. v. 3", n. 4", p. 1974-1992, 2022

GOMES E., GUEZ M. A. U., MARTIN N. E SILVA R. Enzimas termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial. **Quimica Nova**, v. 30, n. 1,p. 136-145, 2007

HAN, X.; LIU, W.; HUANG, JW; MA, J.; ZHENG, Y.; KO, TP.; XU, L.; CHENG, YS.; CHEN CC.; GUO, RT. Structural insight into catalytic mechanism of PET hydrolase. **Nature Communications**. v. 8, n. 1, p. 2106, 2017.

HAYES, H. C.; LUK, L. Y. P.; Investigating the effects of cyclic topology on the performance of a plastic degrading enzyme for polyethylene terephthalate degradation. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, p. 1267, 2023.

JOO, S.; CHO, IN.; SEO, H.; SON, H.; SAGONG, HY.; SHIN, T.; CHOI, SO.; YOUNG.; LEE, SANG Y.; KIM, KJ. Structural insight into molecular mechanism of poly(ethylene terephthalate) degradation. **Nature Communications**. v. 9, n. 382, 2018.

KAZA, S.; YAO, L. C.; BHADA-TATA, P.; VAN WOERDEN, F. What a Waste 2.0: A Global Snapshot of Solid Waste Management to 2050. **Urban Development World Bank**. 2018. Disponível em: http://hdl.handle.net/10986/30317. Acessado em setembro, 2023.

KHANNA, Y.P. AND KUHN, W.P. Measurement of crystalline index in nylons by DSC: Complexities and recommendations. **Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics**. 35: p. 2219-2231. 1997

KLEMEŠ J. J.; FAN, Y. V.; JIANG, P. Plastics: friends or foes? The circularity and plastic waste footprint, **Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects,** v. 43 n. 13, p. 1549-1565, 2021.

KOSHTI, R.; MEHTA, L.; SAMARTH, N.; Biological Recycling of Polyethylene Terephthalate: A Mini-Review. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 26, p. 3520, 2018.

LOPES, T. A.N. **Degradação enzimática de polietileno tereftalato (PET): o efeito do pré-tratamento com solventes mais verdes**. Trabalho de conclusão de curso

(Bacharel em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, p. 45. 2024.

LU, H.; DIAZ, D.J.; CZARNECKI, N.J. et al. Machine learning-aided engineering of hydrolases for PET depolymerization. **Nature** v. 604, p. 662–667, 2022.

MANO, E. B.; MENDES, L. C. Introdução a polímeros, 1999. Editora. Edgard Blucher Ltda – São Paulo.

MILLICAN, J. M; AGARWAL, S. Plastic Pollution: A Material Problem? **Macromolecules**, v. 54 n. 10, p. 4455-4469, 2021.

MÜLLER, R. J.; SCHRADER, H.; PROFE, J.; DRESLER, K.; DECKWER, W. D. Enzymatic Degradation of Poly(Ethylene Terephthalate): Rapid Hydrolyse Using a Hydrolase from T. Fusca. **Macromolecular Rapid Communications** v. 26, p. 1400−1405, 2005.

PIRILLO, V., ORLANDO, M., BATTAGLIA, C., POLLEGIONI, L. AND MOLLA, G. Efficient polyethylene terephthalate degradation at moderate temperature: a protein engineering study of LC-cutinase highlights the key role of residue 243. **The FEBS Journal**, 2023, 290: 3185-3202. doi.org/10.1111/febs.16736

QI X.; MA Y.; CHANG H.; LI B.; DING M.; YUAN, Y. Evaluation of PET Degradation Using Artificial Microbial Consortia. **Frontiers in Microbiology.** v. 12, 2021.

RAI, P. K.; SONNE, C.; SONG, H.; KIM, K.-H., Plastic wastes in the time of COVID-19: Their environmental hazards and implications for sustainable energy resilience and circular bio-economies, **Science of The Total Environment**, v. 858, n. 2, p. 159880, 2023.

RITCHIE, H.; ROSER, M. Plastic Pollution, OurWorldInData.org, 2018. Disponível em: https://ourworldindata.org/plastic-pollution. Acessado em setembro, 2022.

RONKVIST A. M, XIE W., LU W., GROSS R. A. Cutinase-Catalyzed Hydrolysis of Poly(ethylene terephthalate) **Macromolecules.** v. 42 n. 14, p. 5128-5138, 2009.

SHI, L.; LIU, H.; GAO, S.; WENG, Y.; ZHU, L. Enhanced Extracellular Production of IsPETase in Escherichia coli via Engineering of the pelB Signal Peptide, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 69, n. 7, p. 2245-2252, 2021.

SHIRKE AN, WHITE C, ENGLAENDER JA, ZWARYCZ A, BUTTERFOSS GL, LINHARDT RJ, GROSS RA. Stabilizing Leaf and Branch Compost Cutinase (LCC) with Glycosylation: Mechanism and Effect on PET Hydrolysis. **Biochemistry.** 2018, 57(7):1190-1200. doi: 10.1021/acs.biochem.7b01189.

SON, H. F., CHO, I. J, JOO, S., SEO, H., ET AL. Rational Protein Engineering of Thermo-Stable PETase from Ideonella sakaiensis for Highly Efficient PET Degradation. **ACS Catalysis**, v. 9, p. 3519–3526, 2019.

SULAIMAN S, YAMATO S, KANAYA E, KIM JJ, KOGA Y, TAKANO K, KANAYA S. Isolation of a novel cutinase homolog with polyethylene terephthalate-degrading activity from leaf-branch compost by using a metagenomic approach. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 78 n.5, p. 1556-62. 2012

TANIGUCHI, I.; YOSHIDA, S.; HIRAGA, K.; MIYAMOTO, K.; KIMURA, Y.; ODA, K.; Biodegradation of PET: current status and application aspects. **ACS Catalysis**, v. 9, p. 4089, 2019.

THOMSEN T. B.; HUNT C. J,; MEYER A. S. Influence of substrate crystallinity and glass transition temperature on enzymatic degradation of polyethylene terephthalate (PET), **New Biotechnology**, v. 69, p. 28-35, 2022.

TOURNIER, V.; DUQUESNE, S.; GUILLAMOT, F.; et al. Enzymes' Power for Plastics Degradation. Chemical Reviews, v. 123, n. 9, p. 5612-5701, 2023.

United Nations Environment Programme (UNEP). 2021. Disponível em: <www.unep.org/pt-br/noticias-e-reportagens/comunicado-de-imprensa/relatorio-da-onu-sobre-poluicao-plastica-alerta-sobre> Acessado em setembro, 2023.

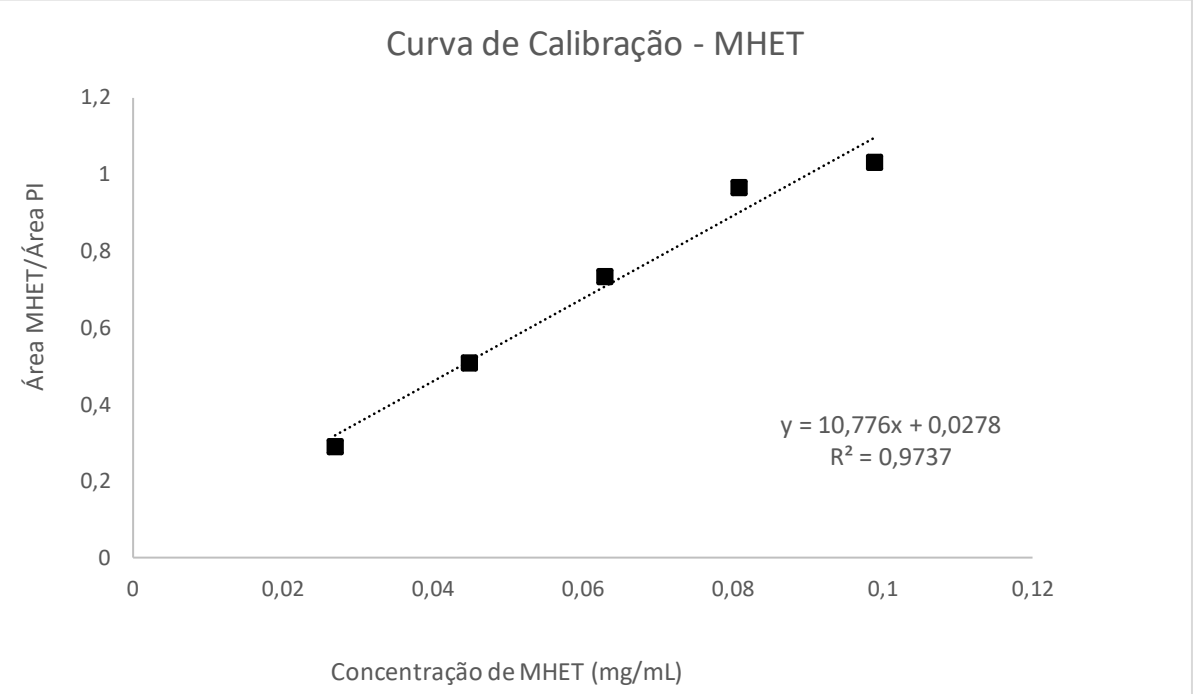
YOSHIDA S.; HIRAGA K.; TAKEHANA T.; TANIGUCHI I.; YAMAJI H.; MAEDA Y.; et al. A bacterium that degrades and assimilates poly(ethylene terephthalate). **Science** v. 351 n. 6278, p. 1196–1199, 2016.

YUAN, X.; WANG, X.; SARKAR, B.; OK, Y. S. The COVID-19 pandemic necessitates a shift to a plastic circular economy. **Nature Reviews Earth & Environment**, v. 2, p. 659–660 2021.

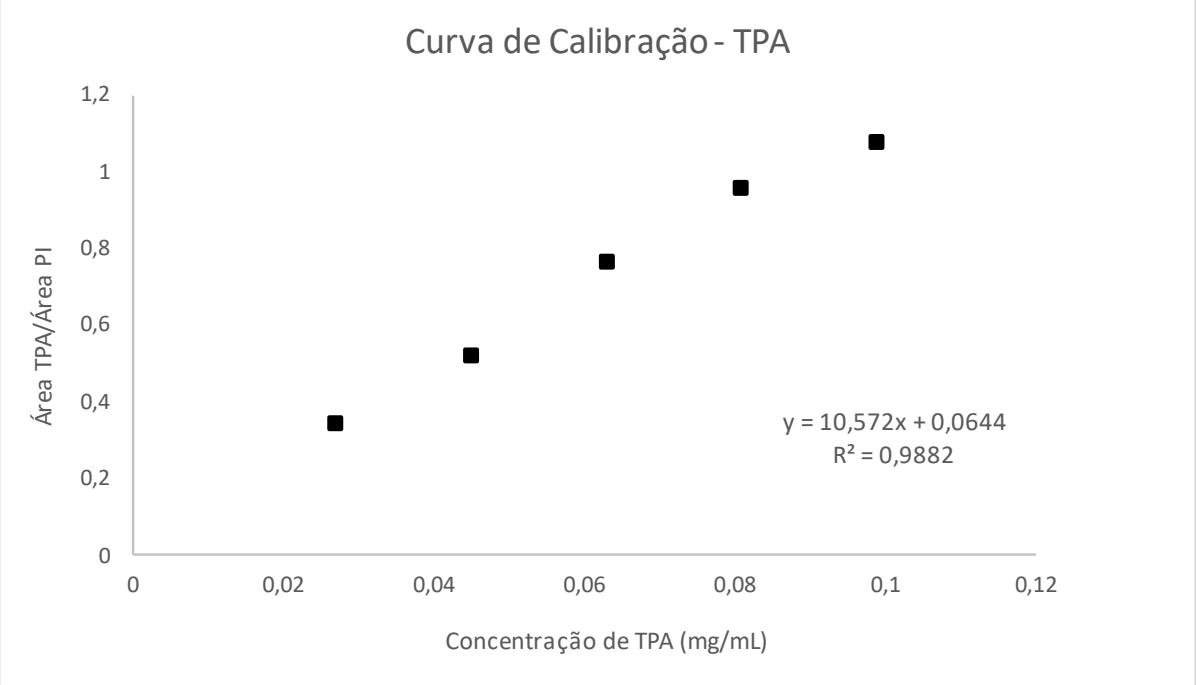
ZHONG-JOHNSON, E.Z.L.; VOIGT, C.A.; SINSKEY, A.J. An absorbance method for analysis of enzymatic degradation kinetics of poly(ethylene terephthalate) films. **Science Reports**, v. 11, p. 928, 2021.

7. ANEXOS

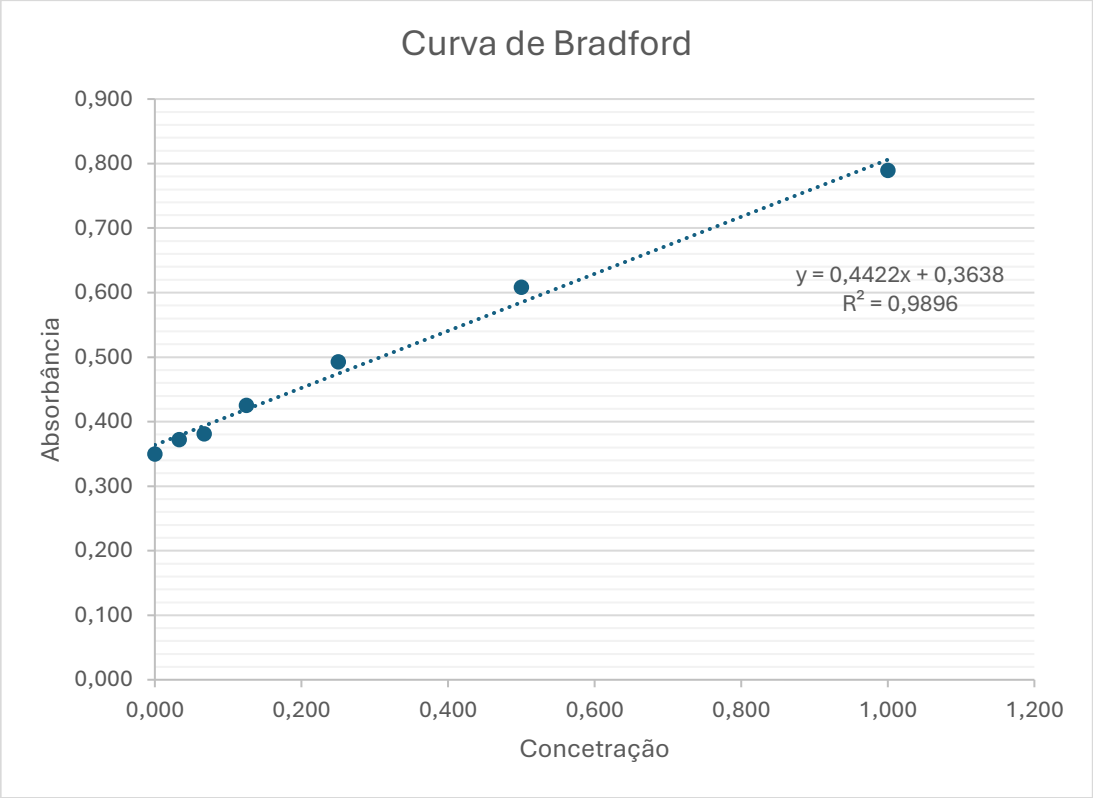
Anexo 1. Curva de Calibração do padrão de MHET no HPLC



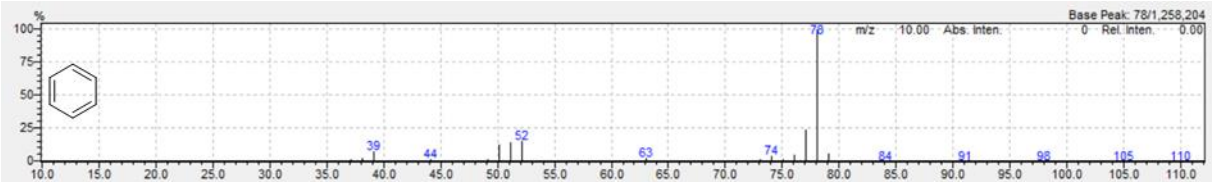
Anexo 2. Curva de Calibração do padrão de TPA no HPLC



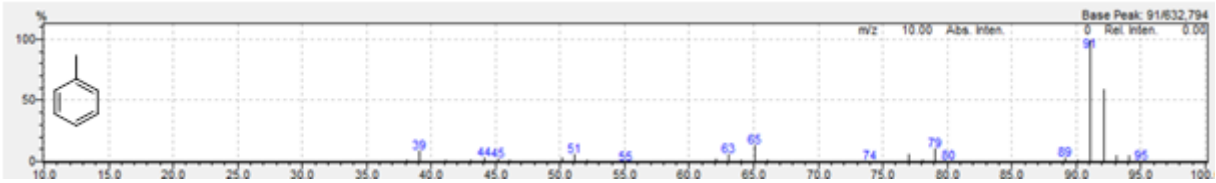
Anexo 3. Curva de calibração com padrão BSA para o ensaio de Bradford



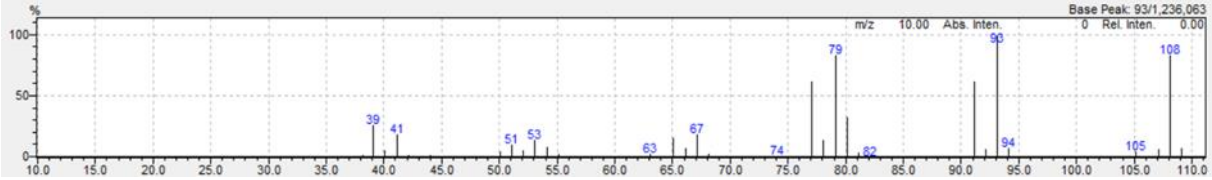
Anexo 4. Espectro de massas do composto **1** (Tabela 3)



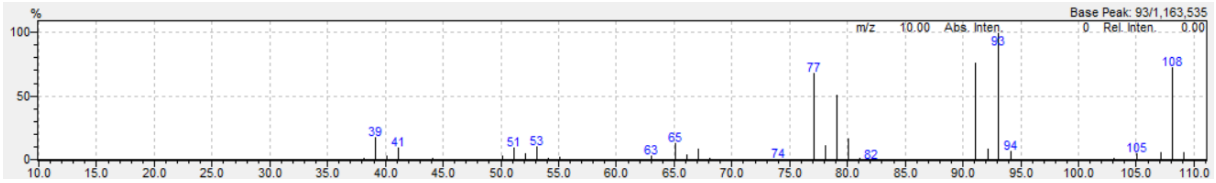
Anexo 5. Espectro de massas do composto **2** (Tabela 3)



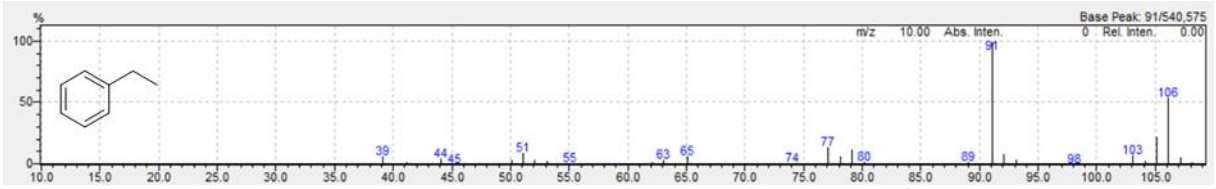
Anexo 6. Espectro de massas do composto **3** (Tabela 3)



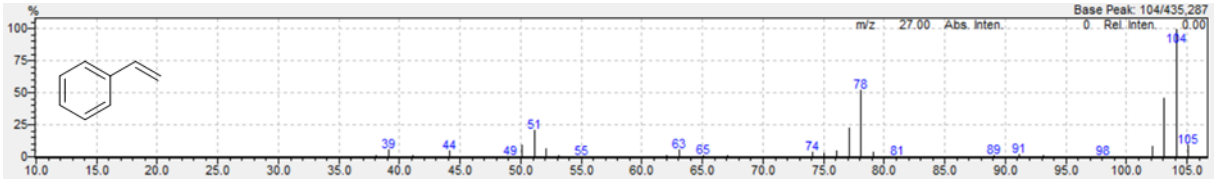
Anexo 7. Espectro de massas do composto **4** (Tabela 3)



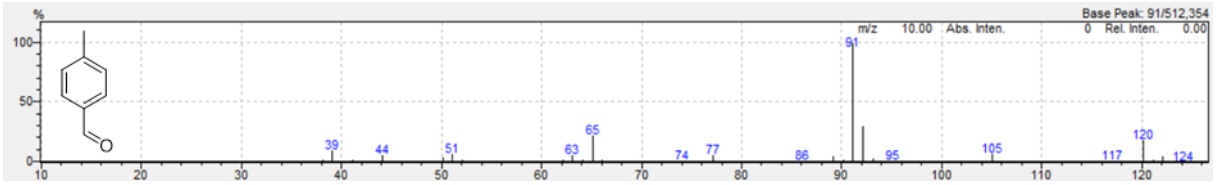
Anexo 8. Espectro de massas do composto **5** (Tabela 3)



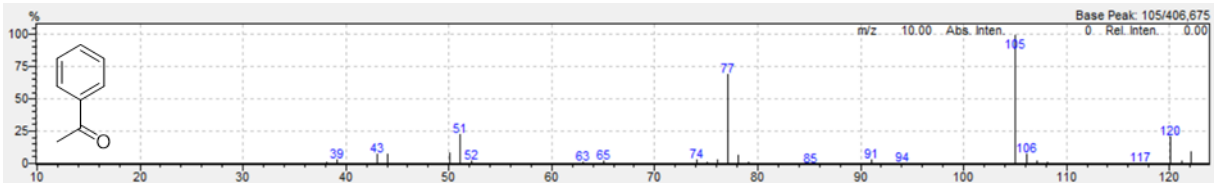
Anexo 9. Espectro de massas do composto **6** (Tabela 3)



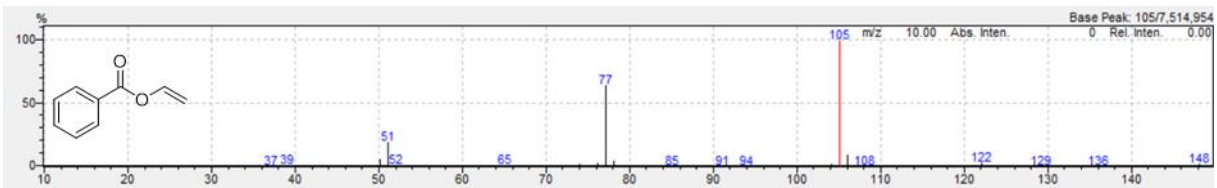
Anexo 10. Espectro de massas do composto **7** (Tabela 3)



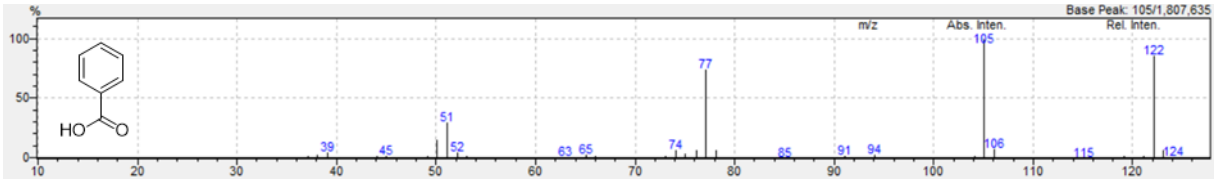
Anexo 11. Espectro de massas do composto **8** (Tabela 3)



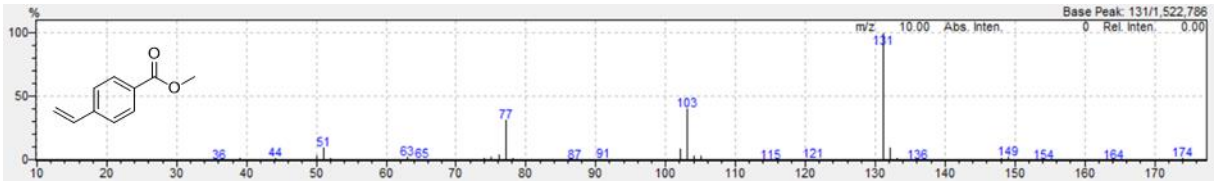
Anexo 12. Espectro de massas do composto **9** (Tabela 3)



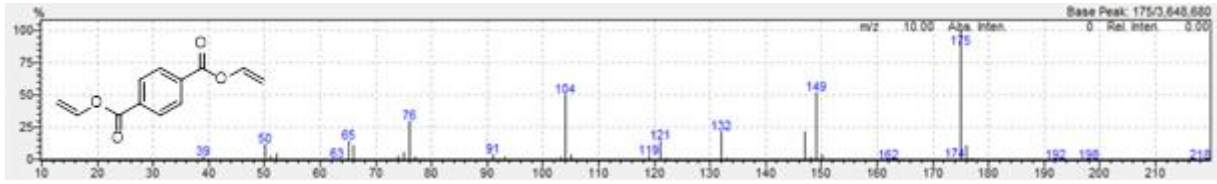
Anexo 13. Espectro de massas do composto **10** (Tabela 3)



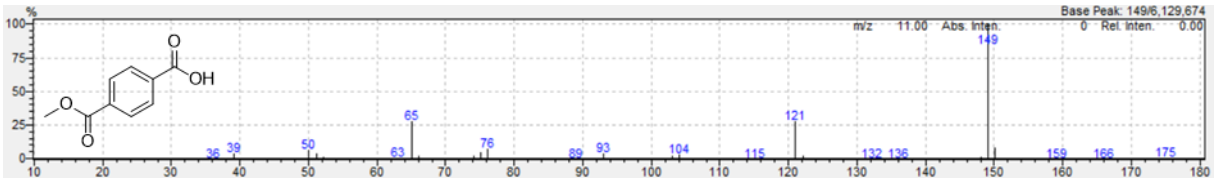
Anexo 14. Espectro de massas do composto **11** (Tabela 3)



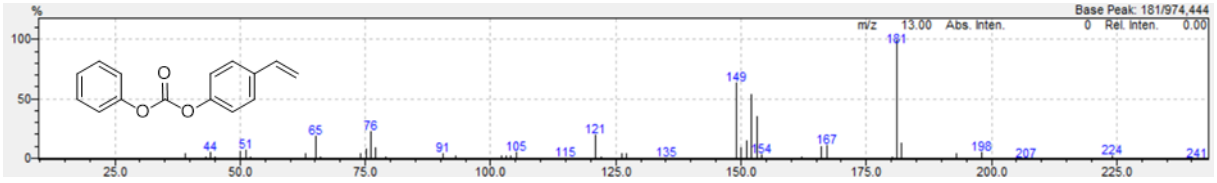
Anexo 15. Espectro de massas do composto **12** (Tabela 3)



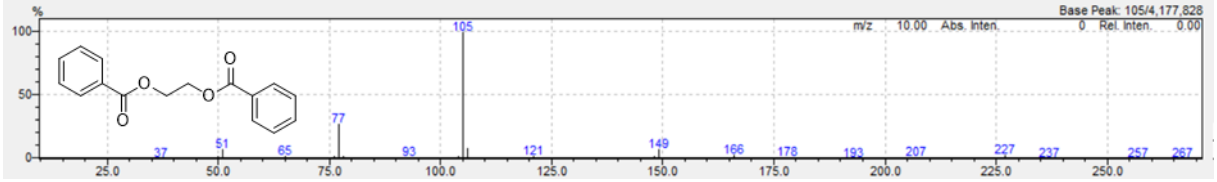
Anexo 16. Espectro de massas do composto **13** (Tabela 3)



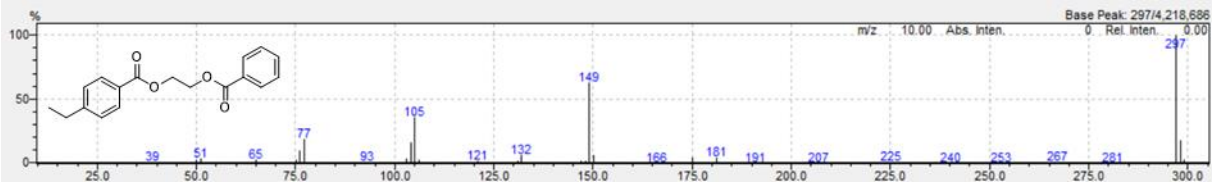
Anexo 17. Espectro de massas do composto **14** (Tabela 3)



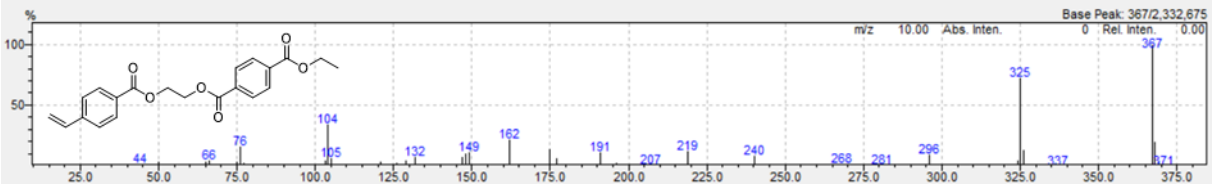
Anexo 18. Espectro de massas do composto **15** (Tabela 3)



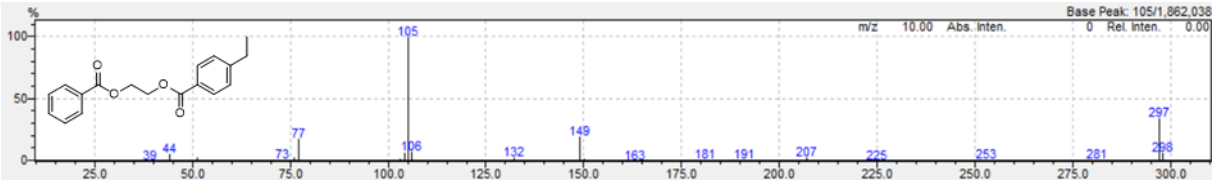
Anexo 19. Espectro de massas do composto **16** (Tabela 3)



Anexo 20. Espectro de massas do composto **17** (Tabela 3)



Anexo 21. Espectro de massas do composto **18** (Tabela 3)



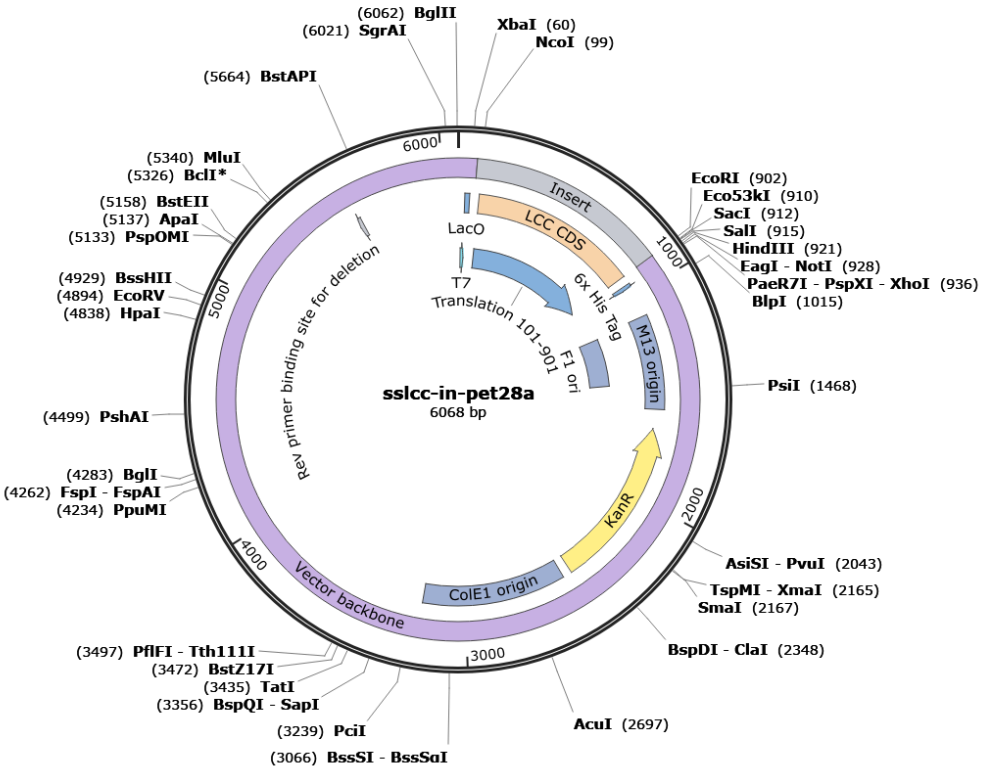
Anexo 22a. Sequência de aminoácido – LCC

MGSNPYQRGPNPTRSALTADGPFSVATYTVSRLSVSGFGGGVIYYPTGTSLTFGGIA
MSPGYTADASSLAWLGRRLASHGFVVLVINTNSRFDYPDSRASQLSAALNYLRTSS
PSAVRARLDANRLAVAGHSMGGGGTLRIAEQNPSLKAAVPLTPWHTDKTFNTSVPV
LIVGAEADTVAPVSQHAIPFYQNLPSTTPKVYVELDNASHFAPNSNNAAISVYTISWM
KLWVDNDTRYRQFLCNVNDPALSDFRTNNRHCQHHHHHH

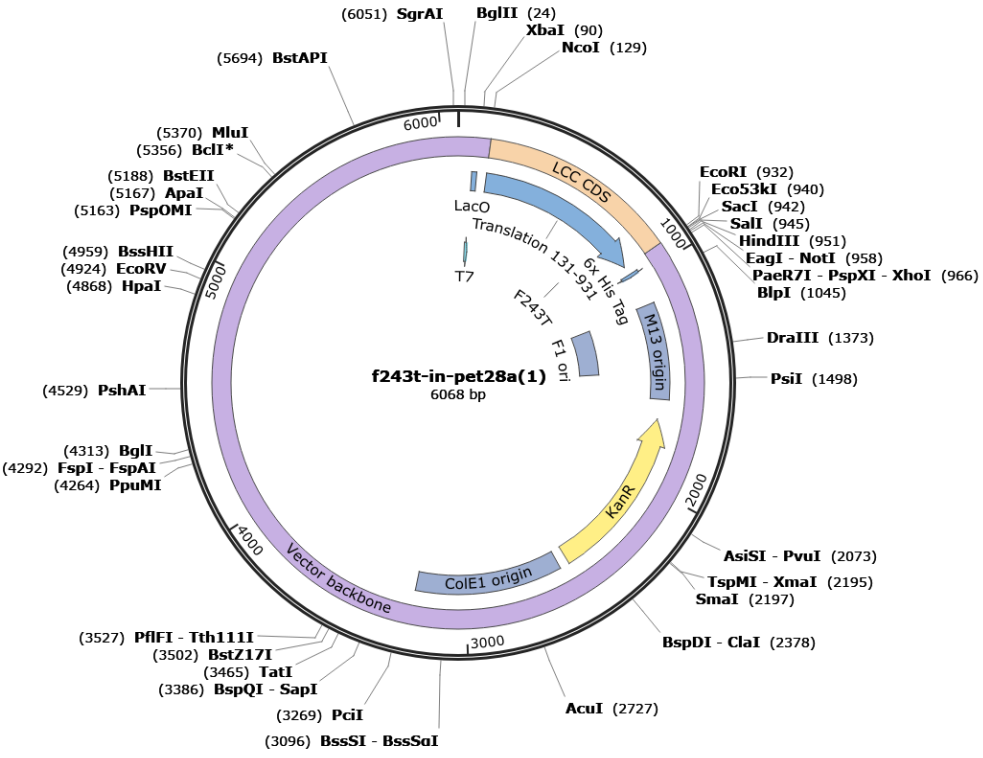
Anexo 22b. Sequência de DNA – LCC (Otimizada para expressão em *E. coli*)

ATGGGCAGCAACCCGTATCAGCGCGGCCCGAACCCGACCCGCAGCGCGCTGA
CCGCGGATGGCCCGTTTAGCGTGGCGACCTATACCGTGAGCCGCCTGAGCGTG
AGCGGCTTTGGCGGCGGCGTGATTTATTATCCGACCGGCACCAGCCTGACCTTT
GGCGGCATTGCGATGAGCCCGGGCTATACCGCGGATGCGAGCAGCCTGGCGTG
GCTGGGCCGCCGCCTGGCGAGCCATGGCTTTGTGGTGCTGGTGATTAACACCA
ACAGCCGCTTTGATTATCCGGATAGCCGCGCGAGCCAGCTGAGCGCGGCGCTG
AACTATCTGCGCACCAGCAGCCCGAGCGCGGTGCGCGCGCGCCTGGATGCGA
ACCGCCTGGCGGTGGCGGGCCATAGCATGGGCGGCGGCGGCACCCTGCGCAT
TGCGGAACAGAACCCGAGCCTGAAAGCGGCGGTGCCGCTGACCCCGTGGCAT
ACCGATAAAACCTTTAACACCAGCGTGCCGGTGCTGATTGTGGGCGCGGAAGC
GGATACCGTGGCGCCGGTGAGCCAGCATGCGATTCCGTTTTATCAGAACCTGCC
GAGCACCACCCCGAAAGTGTATGTGGAACTGGATAACGCGAGCCATTTTGCGCC
GAACAGCAACAACGCGGCGATTAGCGTGTATACCATTAGCTGGATGAAACTGTG
GGTGGATAACGATACCCGCTATCGCCAGTTTCTGTGCAACGTGAACGATCCGGC
GCTGAGCGATTTTCGCACCAACAACCGCCATTGCCAGCATCATCATCATCATCAT

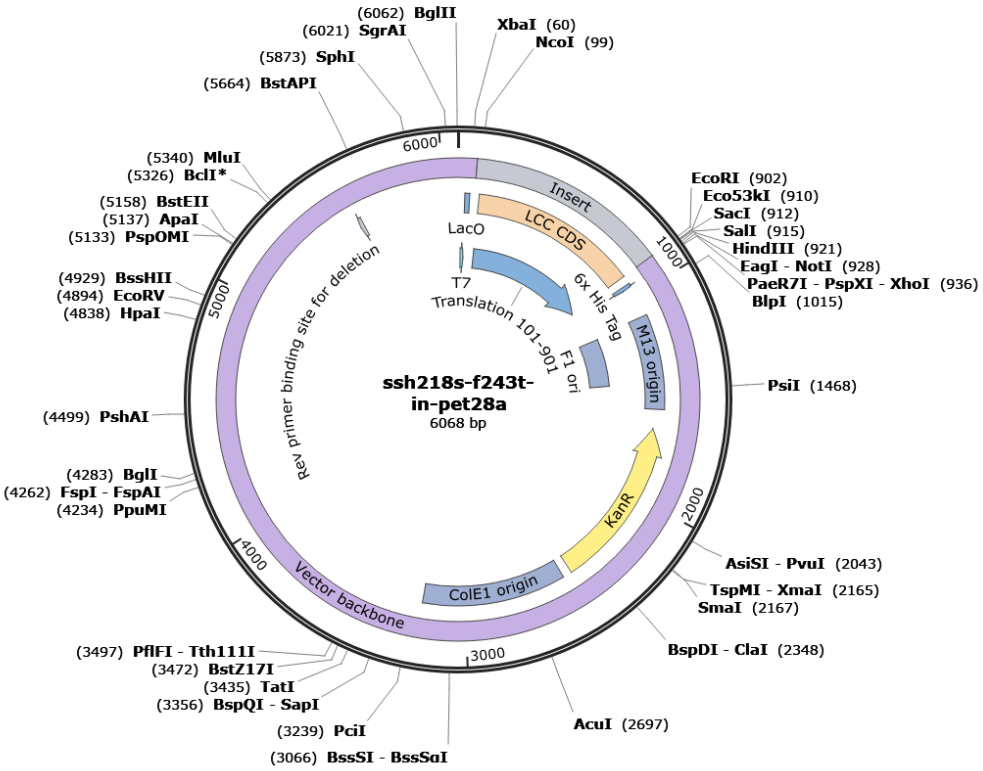
Anexo 23. ssLCC em vetor pET28a(+)



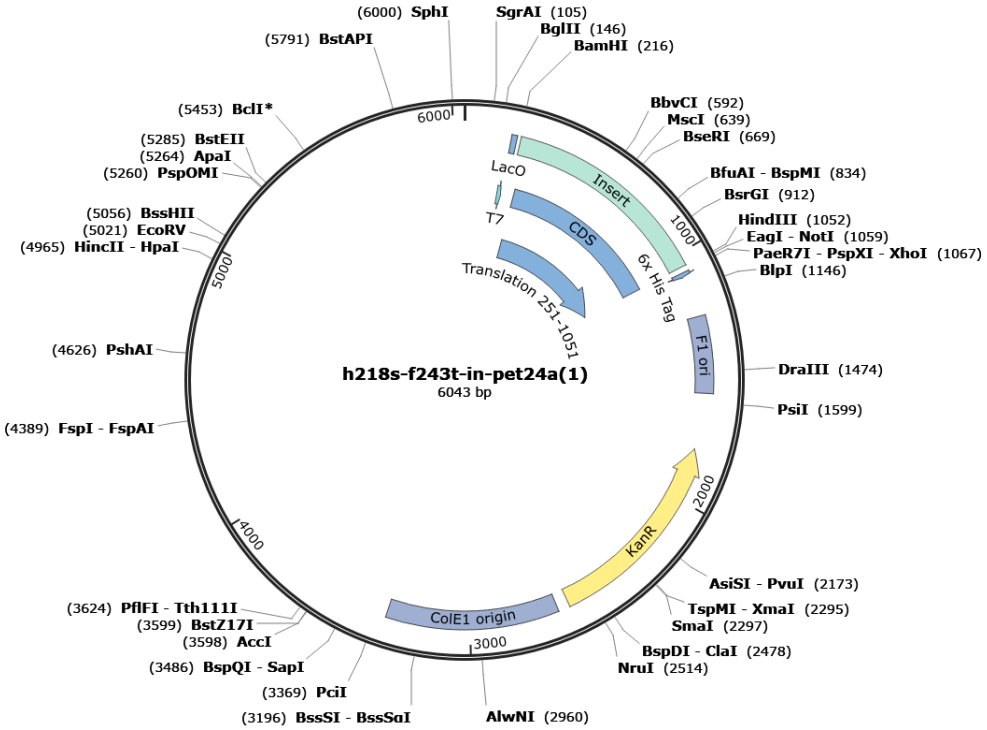
Anexo 24. F243T em vetor pET28a(+)



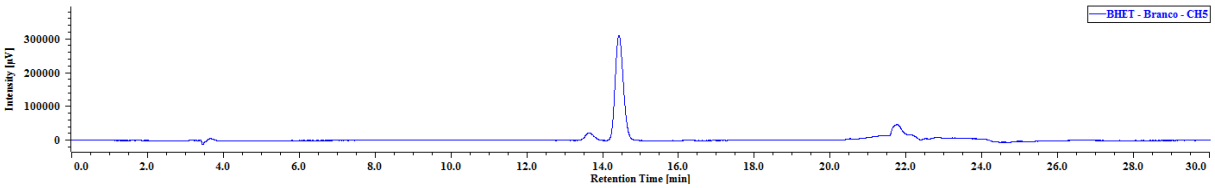
Anexo 25. ssH218SF243T em vetor pET28a(+)



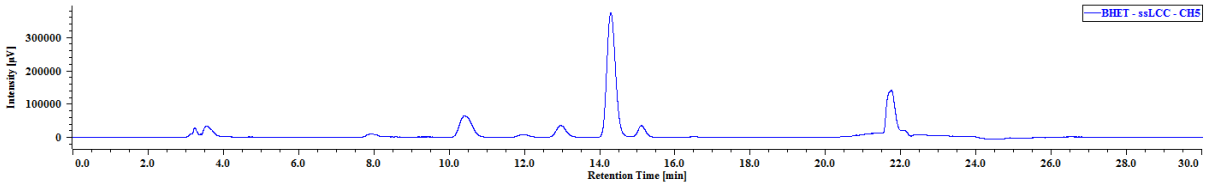
Anexo 26. H218SF243T em vetor pET24a(+)



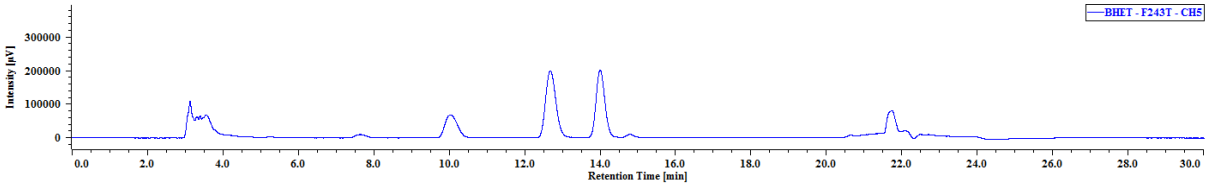
Anexo 27. Cromatograma da reação para determinação de atividade enzimática com o composto BHET - controle “branco”



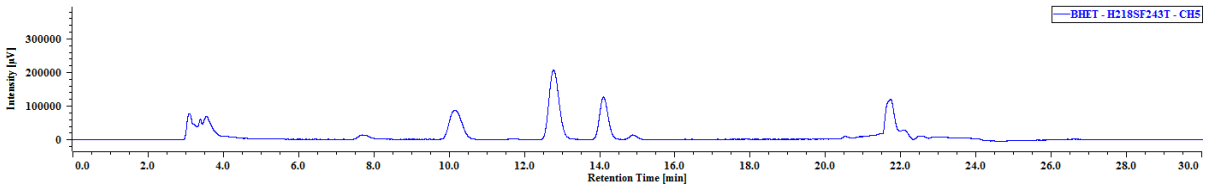
Anexo 28. Cromatograma da reação para determinação de atividade enzimática com o composto BHET – extrato ssLCC



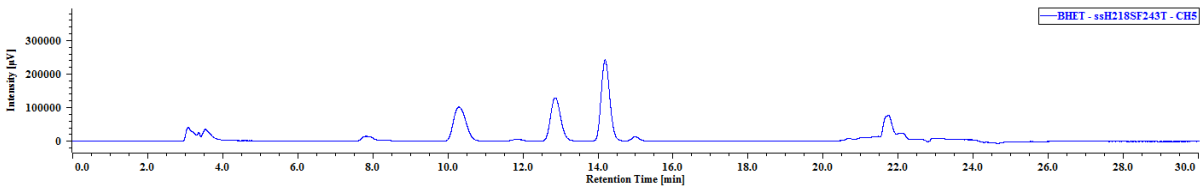
Anexo 29. Cromatograma da reação para determinação de atividade enzimática com o composto BHET – extrato F243T



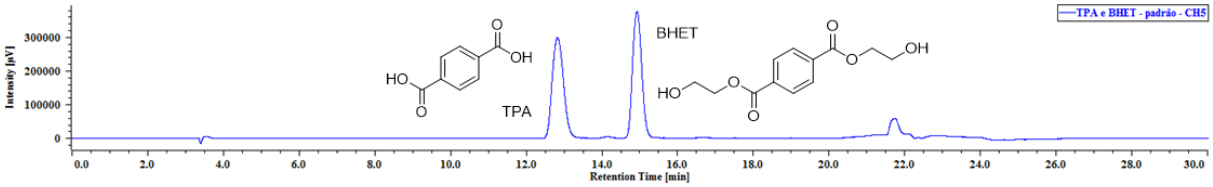
Anexo 30. Cromatograma da reação para determinação de atividade enzimática com o composto BHET – extrato H218SF243T



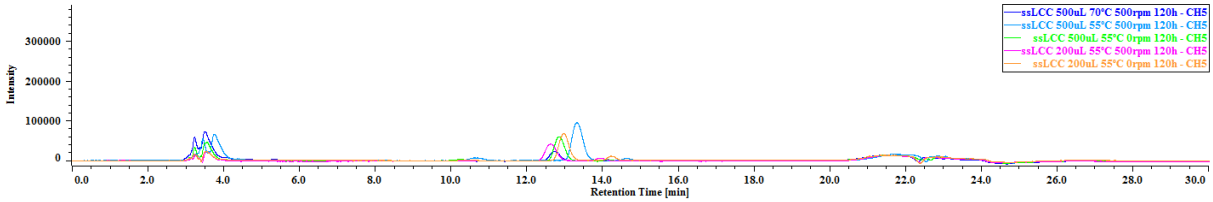
Anexo 31. Cromatograma da reação para determinação de atividade enzimática com o composto BHET – extrato ssH218SF243T



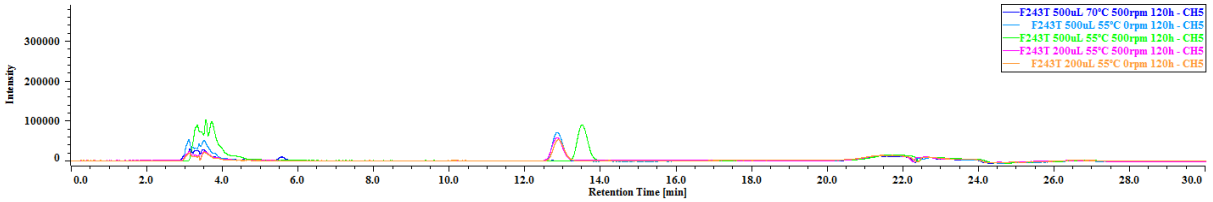
Anexo 32. Cromatograma dos padrões de TPA e BHET na condição de eluição (A) para os extratos enzimáticos



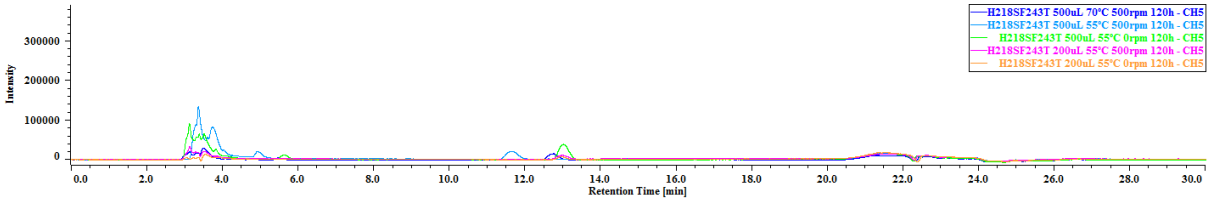
Anexo 33. Cromatograma da reação de biodegradação de PET com extrato da variante ssLCC



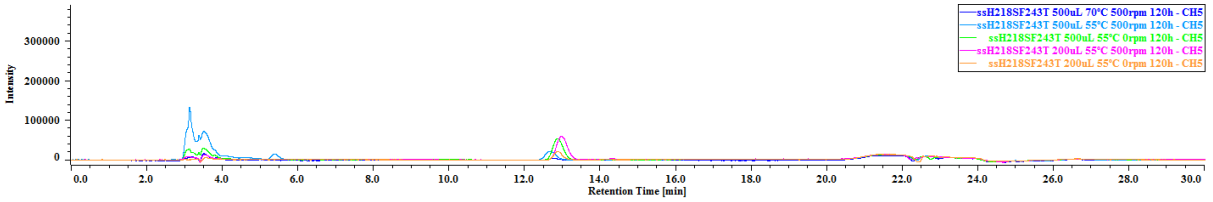
Anexo 34. Cromatograma da reação de biodegradação de PET com extrato da F243T



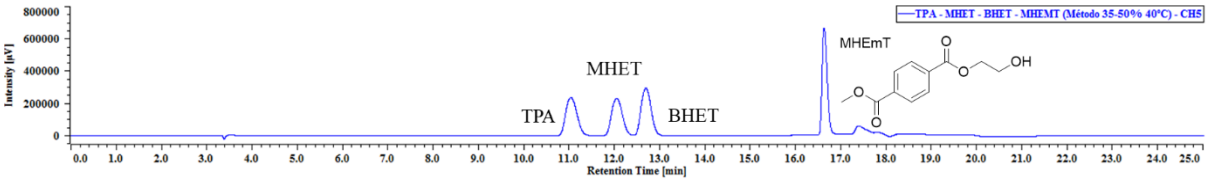
Anexo 35. Cromatograma da reação de biodegradação de PET com extrato da H218SF243T



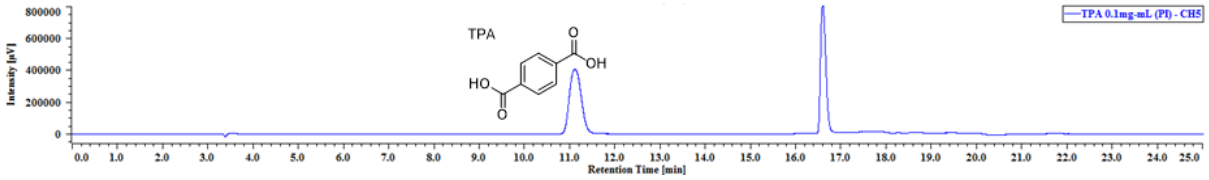
Anexo 36. Cromatograma da reação de biodegradação de PET com extrato da ssH218SF243T



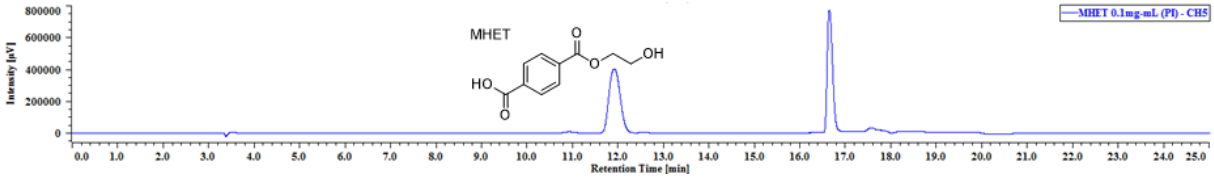
Anexo 37. Cromatograma dos padrões de TPA, MHET e BHET com padrão interno MHEmT na condição de eluição (B)



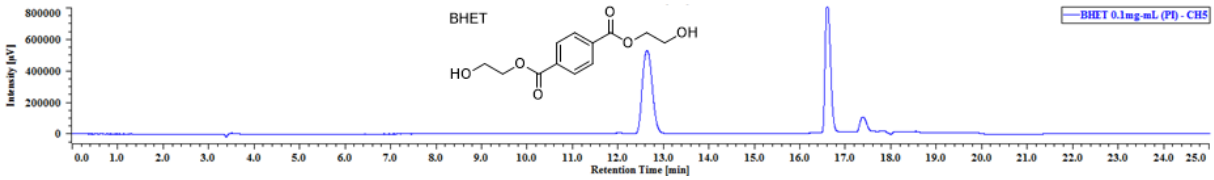
Anexo 38. Cromatograma do padrão de TPA c/ padrão interno MHEmT na condição de eluição (B)



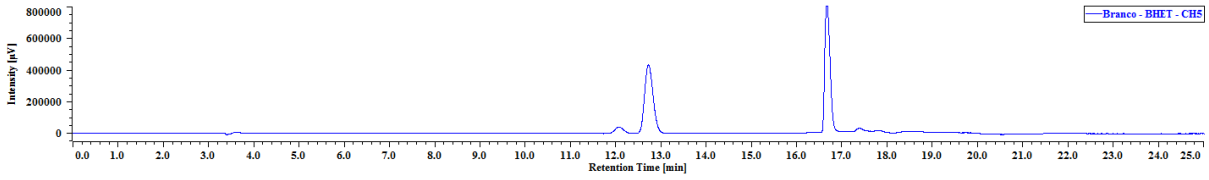
Anexo 39. Cromatograma do padrão de MHET c/ padrão interno MHEmT na condição de eluição (B)



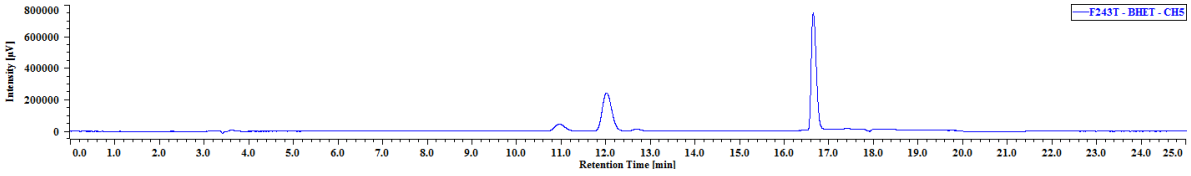
Anexo 40. Cromatograma do padrão de BHET c/ padrão interno MHEmT na condição de eluição (B)



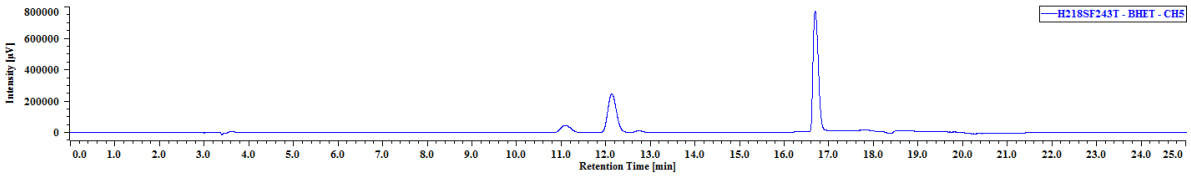
Anexo 41. Cromatograma da reação para determinação de atividade enzimática com o composto BHET c/ padrão interno MHEmT na condição de eluição (B) – controle enzima purificada.



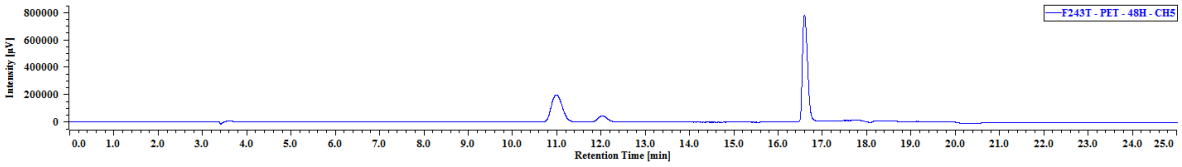
Anexo 42. Cromatograma da reação para determinação de atividade enzimática com o composto BHET c/ padrão interno MHEmT na condição de eluição (B) – enzima purificada F243T.



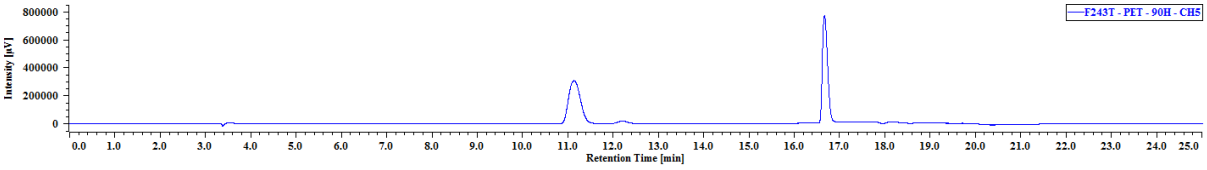
Anexo 43. Cromatograma da reação para determinação de atividade enzimática com o composto BHET c/ padrão interno MHEmT na condição de eluição (B) – enzima purificada H218SF243T.



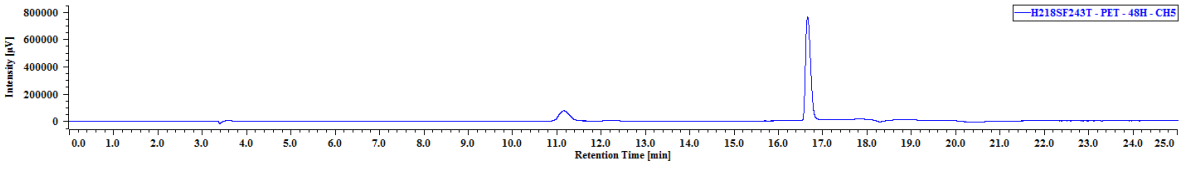
Anexo 44. Cromatograma da reação de biodegradação de PET 48h c/ padrão interno MHEmT na condição de eluição (B) – enzima purificada F243T.



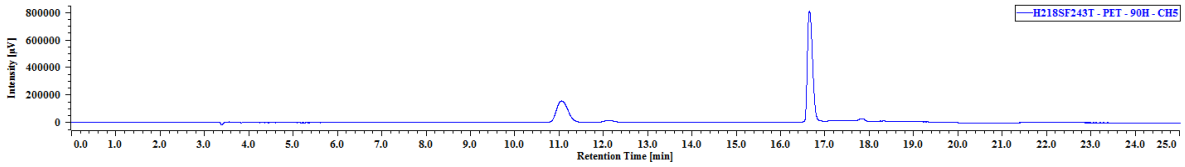
Anexo 45. Cromatograma da reação de biodegradação de PET 90h c/ padrão interno MHEmT na condição de eluição (B) – enzima purificada F243T.



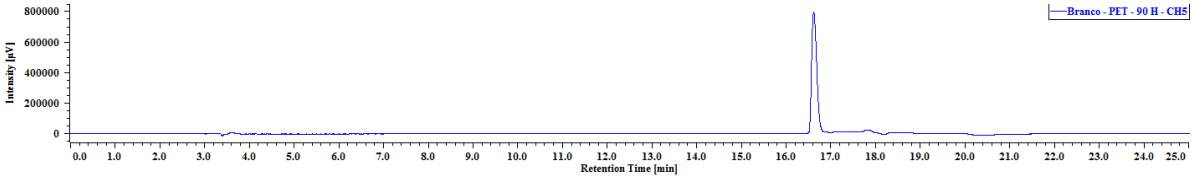
Anexo 46. Cromatograma da reação de biodegradação de PET 48h c/ padrão interno MHEmT na condição de eluição (B) – enzima purificada H218SF243T.



Anexo 47. Cromatograma da reação de biodegradação de PET 90h c/ padrão interno MHEmT na condição de eluição (B) – enzima purificada H218SF243T.



Anexo 48. Cromatograma do experimento controle – sem enzima - reação de biodegradação de PET 90h c/ padrão interno MHEmT na condição de eluição (B)



Anexo E1. Relatório das atividades de capacitação CAPES – PrInt

Período do relatório: setembro a outubro de 2024

1. Resumo das atividades realizadas no período deste relatório

No período de 7 semanas, a que se relatório, foram realizadas atividades experimentais no laboratório e atividades didáticas. As atividades experimentais tiveram como alvo a enzima hidroxinitrila liase.

Em relação às atividades didáticas, cursei os tópicos *BIOC 4351/5351 (001) da disciplina Protein Engineering (Fall 2024*) ministrada pelo Prof. Dr. Romas J. Kazlauskas na *University of Minnesota* (Tabela 1). Esta disciplina contribuiu com conhecimentos sobre enzimas, com ênfase nos objetivos ao projetar variantes enzimáticas e suas aplicações, os quais foram uma complementação teórica da minha formação iniciada no mestrado.

Em relação à pesquisa, sob a coorientação do Dr. Sharak Sharad, foram projetados os primers utilizados nas reações de PCR para a obtenção das variantes enzimáticas da HNL1, da enzima hidroxinitrila liase. Foram realizadas a expressão dos genes das variantes, a purificação das enzimas produzidas e análise da atividade enzimática com o substrato 2-nitro-1-feniletanol.

Tabela 1 - Tópicos da disciplina BIOC 4351/5351 realizados durante o período de capacitação

Semana 1: Estabelecendo metas e produzindo proteínas variantes
Semana 2: Lógica da engenharia de proteínas
Semana 3: Medindo a estabilidade das proteínas
Semana 4: Engenharia da estabilidade das proteínas
Semana 5: Medindo e melhorando a ligação
Semana 6: Medindo as taxas de reação.
Semana 7: Projetando enzimas mais rápidas
Semana 8: Engenharia de enzimas mais rápidas

2. Objetivo

Esta capacitação teve como objetivo geral aprender e aperfeiçoar uma técnica voltada à biocatálise, por meio da consolidação de parcerias internacionais com o intuito de aprimorar a qualidade da produção acadêmica. Para atingir este objetivo foi realizado o estudo de engenharia de proteínas e de reações de PCR - Reação em Cadeia da Polimerase.

3. Justificativa

Muitas aplicações de enzimas para síntese de produtos farmacêuticos e na química orgânica são limitadas pela baixa atividade catalítica das enzimas. Entretanto, através da engenharia de proteínas, é possível melhorar a capacidade catalítica, criando oportunidades para as aplicações das enzimas em contextos industriais e em problemas ambientais, pautando-se em princípios da química verde.

Nesta pesquisa, foi utilizado como base a enzima HNL1, uma hidroxinitrila liase ancestral da superfamília α/β-hidrolase, que realiza clivagem de hidroxinitrilas e hidrolise de ésteres. Como esta enzima possui característica de ser promiscua, o objetivo desta capacitação foi aumentar a capacidade da HNL1 para catalisar a reação de Henry (nitroaldol), reação de formação de ligação C-C, sendo útil para a síntese enantiosseletiva de intermediários farmacêuticos.

4. Descrição das atividades de pesquisa desenvolvidas no período

4.1. Mutagênese sítio dirigida

Foram sintetizadas três variantes da HNL1, obtidas por duas substituições de aminoácidos nas posições 152 e 156. Neste relatório será abordada somente a variante enzimática HNL1-L152F. Esta substituição foi realizada pelo método Q5 de mutagênese dirigida por sítio (New England BioLabs, Inc.), de acordo com as instruções do fabricante.

A Tabela 2 lista os pares de primers utilizados para a etapa de reação em cadeia da polimerase (PCR) da mutagênese sítio dirigida. O procedimento do método Q5 para reação em cadeia da polimerase (volume total de 50 µL) foi realizado com a

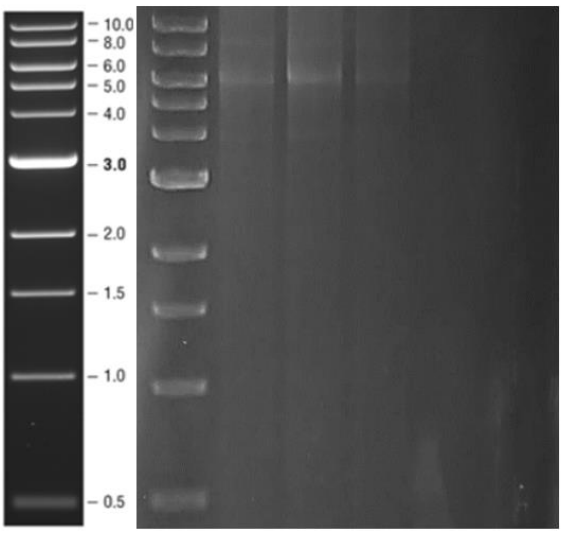
adição de 500 ng do DNA molde (HNL1), 0,5 µM de cada primer, 10mM de dNTPs 10 µL do tampão Q5, 10 µL de Q5 High GC Enchancer e 0,5 µL da Q5 DNA polymerase (0,02 U/µL). O Equipamento utilizado para a reação de PCR foi o PTC-200 Peltier Thermal Cycle e o programa de temperatura foi: desnaturação inicial a 98°C por 30 segundos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 98°C por 10 segundos, anelamento a 52°C por 30 segundos, e extensão a 72°C por 30 segundos. Por fim, concluiu-se com uma extensão de 2 minutos a 72°C, seguida de resfriamento para 4°C para armazenamento.

Tabela 2 – primers usados na PCR

Primers	Sequência 5'-3'	GC (%)	Temp. de fusão (°C)
L152F-F	atgaaacttggctttaaa**TTT**atgcgg	33,33%	55,7
L156F-R	ccgcatcaatttaaagccaagtttc	40%	56,1

A reação foi analisada em um gel de agarose a 1% (Figura 1) para confirmar a presença do produto linear de PCR na região de 6kb. O produto da reação foi então tratado com a mistura de enzimas Quinase-Ligase-DPNL (KLD) em uma reação de 10 µL contendo 1 µL da mistura KLD, 5 µL do tampão KLD, 2 µL do produto de PCR e 2 µL de água livre de nucleases para promover a remoção o DNA molde (HNL1) e recircularização do produto linear de PCR para uma transformação mais eficiente.

Figura 1 – Análise do produto de PCR em gel de agarose 1%



Após o tratamento do produto linear, células de *E. coli* DH5α foram transformadas com os plasmídeos da mutante HNL1-L152F via choque térmico,

plaqueadas em meio de cultura LB sólido suplementado com carbenicilina (100 µg/mL) e incubadas durante a noite a 37°C, controles foram realizados com canamicina (50 µg/mL) e sem antibiótico de resistência. O DNA foi extraído pelo mini-prep (Monarch Kit) e sequenciado antes da etapa de expressão.

4.2. Expressão proteica e purificação

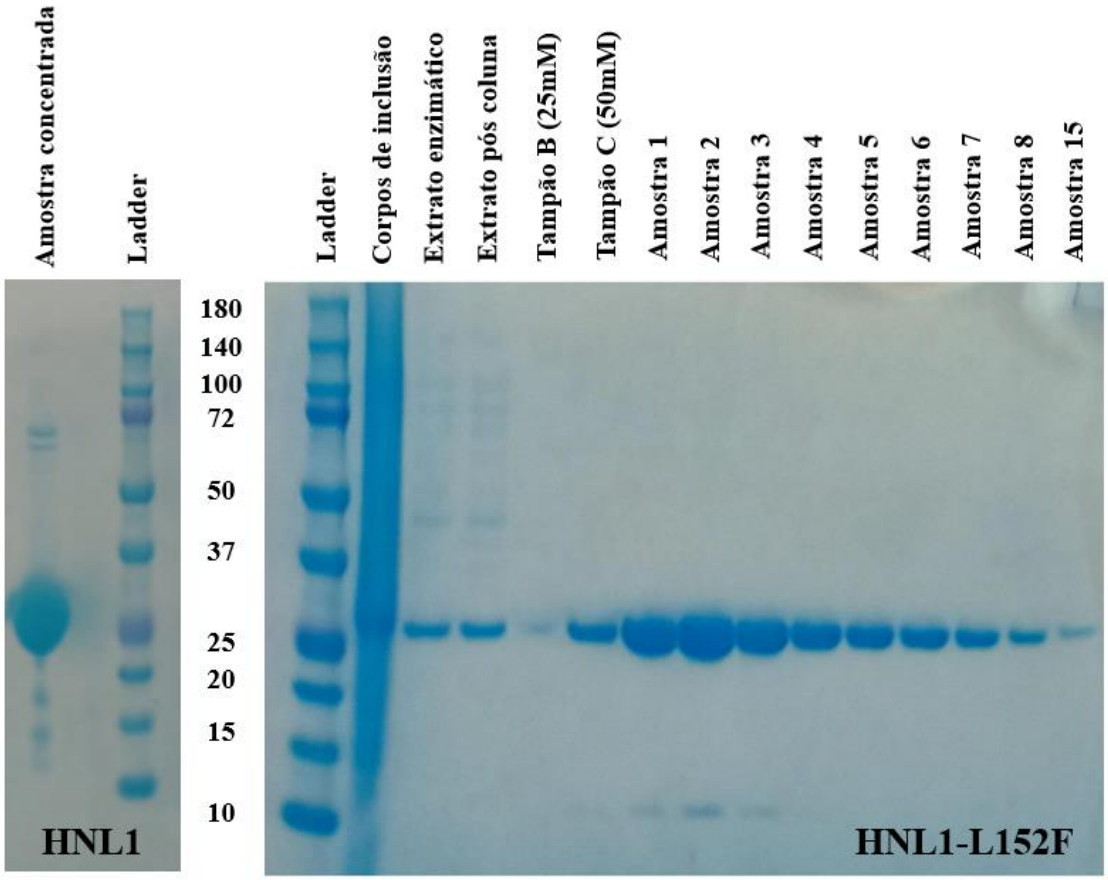
Após a confirmação do DNA, as enzimas HNL1 e sua variante HNL1-L152F foram expressas em *E. coli* BL21, e a purificação por cromatografia de afinidade com Ni gerou proteína de alta pureza. Para a expressão foi utilizado meio de cultura LB contendo carbenicilina (100 µg/mL, 5 mL) no qual foi inoculado com uma única colônia bacteriana de uma placa de ágar e incubado em um agitador orbital a 37 ˚C e 200 rpm por 15 horas para criar uma pré-cultura.

Em um erlenmeyer de 1 L com meio de cultura TB suplementado com carbenicilina (250 mL) foi inoculado com essa pré-cultura e incubada em um shaker a 37 ˚C e 250 rpm até que a OD_{600} atingisse 1.0, sendo então transferida para 17 ˚C e 180 rpm por 1 hora para esfriar. Foi adicionado Isopropil β-D-1-tiolagalactopiranosídeo (IPTG, 0,1 mM de concentração final) para induzir a expressão gênica, e a incubação continuou por 20 horas. As células foram colhidas por centrifugação (8000 rpm, 10 minutos a 4 ˚C), ressuspensas em tampão de lise (20 mM de imidazol, 50 mM de NaH_2PO_4, 300 mM de NaCl, pH 7.2, 20 mL) e rompidas por sonicação (400 W, 40% de amplitude por 5 minutos). O tubo foi centrifugado (4 ˚C, 12.000 rpm, 45 minutos) e o sobrenadante foi filtrado em um filtro de 0,22 µm.

Para a etapa de purificação o sobrenadante foi carregado em uma coluna contendo resina NiNTA (1 mL, Qiagen) previamente equilibrada com tampão de lise (10 mL). A coluna foi lavada com tampão de lise (50 mL) seguida de tampão B (25mM de imidazol, 50 mM de NaH_2PO_4, 300 mM de NaCl, pH 7.2, 20 mL) e seguida de tampão C (50mM de imidazol, 50 mM de NaH_2PO_4, 300 mM de NaCl, pH 7.2, 50 mL). A proteína com cauda de histidina foi eluida com tampão de eluição (125 mM de imidazol, 50 mM de NaH_2PO_4, 300 mM de NaCl, pH 7.2, 15 mL) e concentrada para 1 mL usando um tubo de ultrafiltração Amicon (corte de 10 kDa). O tampão de eluição contendo imidazol foi trocado por cinco adições sucessivas de tampão BES (5 mM de *N,N*-bis(2-hidroxietil)-2-aminoetanosulfônico, pH 7.0, 10 mL) seguido de concentração para 1 mL por ultrafiltração.

As frações do processo de purificação foram quantificadas por nanodrop configurado para Absorbância em 260 nm calibrado com uma curva de BSA 1mg/mL. Seguido de confirmação por SDS-PAGE que indicou um peso molecular de ~30 kDa, em concordância com o peso calculado de 31,1 kDa. A Figura 2 mostra o gel SDS-PAGE da HNL1 e da sua variante HNL1-L152F

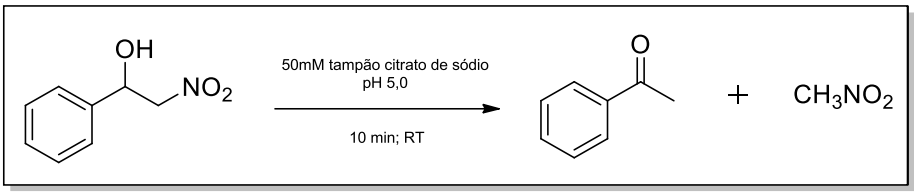
Figura 2 – SDS-PAGE – HNL1 e HNL1-L152F



4.3. Ensaio de atividade enzimática

Para o ensaio das enzimas HNL1 e sua variante HNL1-L152F foi realizado uma hidrólise do substrato 2-nitro-1-feniletanol (2-NPE), verificando a formação de benzaldeído (ε280 nm = 1352 $cm^{-1}M^{-1}$) a 280 nm. A mistura reacional (100 µL) em uma placa de microtitulação UV de 96 poços ($l_{poço}$ 0,29 cm) continha 10 µL de enzima (200-300 µM), tampão citrato de sódio (50 mM, pH 5,0), 0,1 –5 mM de 2-NPE (Esquema 1).

Esquema 1 – Atividade enzimática pela hidrólise do 2-nitro-1-feniletanol (2-NPE)



A inclinação do aumento na absorbância em função do tempo foi medida em triplicata, ajustada a uma linha usando regressão linear e corrigida para a hidrólise espontânea do substrato com reações em branco sem a enzima. Sendo determinado a atividade das enzimas e relatado em U/mg pela massa de enzima utilizada na hidrólise de 5mM de substrato 2-NPE e formação de benzaldeído por segundo. Obtendo um valor de 0,002426 U/mg para a enzima HNL1 e 0,000628 U/mg para a variante L152F-HNL1.

5. Conclusão

Durante o período de 45 dias, foi possível cumprir com os objetivos propostos nessa capacitação, aprendizagem e aperfeiçoamento da técnica, PCR, de encontro a área de biocatálise, assim como o fortalecimento da parceria com o Prof. Dr. Romas J. Kazlauskas e a com a University of Minnesota. Quanto à pesquisa foi possível cumprir parcialmente com os objetivos propostos, devido ao tempo disponível para a execução do trabalho, no que se diz respeito as reações, seria necessário maior tempo para execução e estudo das mesmas. Apesar disso, as técnicas e métodos executados durante esse período promoveram um aperfeiçoamento que vai de encontro ao projeto de mestrado auxiliando no desenvolvimento deste.

6. Referência

Jones, B. J.; Evans, III, R. L.; Mylrea, N. J.; Chaudhury, D.; Luo, C.; Guan, B.; Pierce, C. T.; Gordon, W. R.; Wilmot, C. M.; Kazlauskas, R. J. Larger active site in an ancestral hydroxynitrile lyase increases catalytically promiscuous esterase activity**.** **PLOS ONE.** v. 15, n. 6, e0235341. 2020