

LAÍZA ARAUJO DE ALMEIDA

**Intensificação de Processos a Serviço do Meio Ambiente:
Degradação Quimioenzimática de Polietileno tereftalato (PET)**
Hidrólise Enzimática de Intermediários de PET com Lipases Comerciais

Relatório de Pós-Doutorado realizado na Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Química, Campus de Araraquara.

Supervisor: Prof. Dr. Humberto Márcio Santos Milagre

Cossupervisora: Profa. Dra. Cíntia Duarte de Freitas Milagre

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

Projeto 408711/2022-1

ARARAQUARA

2025

RESUMO

O uso indiscriminado de plásticos e a má gestão de seus resíduos têm levado a uma crescente poluição ambiental, especialmente nos oceanos. O polietileno tereftalato (PET) é um dos polímeros mais utilizados globalmente, devido às suas propriedades mecânicas e térmicas, mas sua resistência à degradação natural o torna um dos principais poluentes plásticos. Este projeto teve como objetivo desenvolver um sistema prático e eficiente para a degradação enzimática de bis(2-hidroxietil) tereftalato (BHET), um intermediário de PET. Para isso, foram testadas diversas lipases comerciais, destacando-se a lipase de *Thermomyces lanuginosus* imobilizada em Immobead 150 (TIL-150), que demonstrou alta eficiência na hidrólise de BHET, com conversões superiores a 90% e seletividade para a formação do intermediário mono-(hidroxietil)tereftalato (MHET). O estudo também avaliou a reciclabilidade da TIL-150, que manteve sua atividade catalítica por 10 ciclos consecutivos, demonstrando sua viabilidade para aplicações em maiores escalas. Os resultados obtidos indicam que a utilização de lipases comerciais imobilizadas pode ser uma estratégia econômica para o desenvolvimento de protocolos biocatalíticos reciclagem enzimática de PET. A obtenção seletiva do intermediário MHET foi particularmente relevante, uma vez que este composto não está amplamente disponível comercialmente. Por fim, o protocolo desenvolvido tem potencial para aplicação em processos químicos de depolimerização do plástico PET, criando-se assim um sistema sequencial ou simultâneo de degradação quimioenzimática deste polímero.

Palavras-chave: Degradação de PET, intensificação de processos, biocatálise, lipases, hidrólise.

ABSTRACT

The indiscriminate use of plastics and poor waste management have led to increasing environmental pollution, especially in the oceans. Polyethylene terephthalate (PET) is one of the most widely used polymers globally due to its mechanical and thermal properties. However, its resistance to natural degradation makes it one of the main plastic pollutants. This project aimed to develop a practical and efficient system for the enzymatic degradation of bis(2-hydroxyethyl) terephthalate (BHET), a PET intermediate. Various commercial lipases were tested, with the immobilized *Thermomyces lanuginosus* lipase on Immobead 150 (TIL-150) standing out for its high efficiency in BHET hydrolysis, achieving conversions above 90% and selectivity for the formation of the mono-(2-hydroxyethyl) terephthalate (MHET) intermediate. The study also evaluated the recyclability of TIL-150, which maintained its catalytic activity for 10 consecutive cycles, demonstrating its feasibility for larger-scale applications. The results indicate that the use of immobilized commercial lipases can be a cost-effective strategy for developing biocatalytic protocols for enzymatic PET recycling. The selective production of the MHET intermediate was particularly relevant, as this compound is not widely available commercially. Finally, the developed protocol has potential for application in chemical processes of depolymerization of PET plastic, thus creating a sequential or simultaneous system of chemoenzymatic degradation of this polymer.

Key words: PET degradation, process intensification, biocatalysis, lipases, hydrolysis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Classificação dos polímeros, de acordo com suas propriedades termomecânicas:	8
Figura 2. Os 7 tipos de plástico de acordo com o sistema RIC.....	10
Figura 3. Estrutura química do PET.....	14
Figura 4. Atividade da <i>Ideonella sakaiensis</i> na degradação de PET.	17
Figura 5. Estrutura canônica da dobra da α/β hidrolase.....	18
Figura 6. Mecanismo geral da hidrólise catalisada por serina-hidrolases.	19
Figura 7. Modelos estruturais da TIL em suas conformações inativa (tampa fechada) e ativa (tampa aberta).	30
Figura 8. Hidrólise de triglicerídeos catalisada por lipases 1,3-regiosseletivas.	32
Figura 9. Hidrólise de BHET – Efeito da temperatura.....	33
Figura 10. Hidrólise de BHET – Monitoramento do tempo reacional sob condição otimizada.	34
Figura 11. Reciclo de TIL-150 – Hidrólises consecutivas de BHET.....	36
Figura 12. RMN de ^1H (600 MHz, DMSO-<i>d</i>6) do monoácido MHET.....	37
Figura 13. RMN de ^{13}C (150 MHz, DMSO-<i>d</i>6) do monoácido MHET.....	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Estabilidade de BHET em diferentes valores de pH.	27
Tabela 2 – Triagem de lipases comerciais para a hidrólise de BHET.	28
Tabela 3 – Hidrólise de BHET catalisada por TIL-150: Aumento da quantidade de enzima.	31

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3PET – bis(benzoyloxietil) tereftalato
AnL – Amano Lipase A de *Aspergillus niger*
BcL – lipase de *Burkholderia cepacia*
BHET – bis(2-hidroxietil)tereftalato
CaL-A-150 – lipase A de *Candida antarctica* imobilizada em Immobead 150
CaL-B – lipase B de *Candida antarctica*
CaL-B-150 – lipase B de *Candida antarctica* imobilizada em Immobead 150
CrL – lipase de *Candida rugosa*
CrL-150 – lipase de *Candida rugosa* imobilizada em Immobead 150
DMT –dimetil tereftalato
EG – etilenoglicol
LCC – cutinase de compostagem de folhas e galhos
MHET – mono-(hidroxietil)tereftalato
MjL – Amano lipase M de *Mucor javanicus*
PE – Polietileno
PEAD – Polietileno de Alta Densidade
PEBD – Polietileno de Baixa Densidade
PET – Polietileno Tereftalato
PfL – Amano Lipase de *Pseudomonas fluorescens*
PP – Polipropileno
PPL – lipase de pâncreas suíno
PS – Poliestireno
PVC – Policloreto de Vinila
RIC – Código de Identificação de Resinas
RmL-150 – lipase de *Rhizomucor miehei* imobilizada em Immobead 150
RnL – lipase de *Rhizopus niveus*
RoL-150 – lipase de *Rhizopus oryzae* Immobead 150
TIL-150 – lipase de *Thermomyces lanuginosus* imobilizada em Immobead 150
TPA – ácido tereftálico

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	8
1.1 Plásticos: Classificação, Produção e Poluição.....	8
1.2 Processos de Reciclagem de Plástico.....	11
1.3 Polietileno tereftalato (PET).....	13
1.4 Degradação Enzimática de PET.....	15
2. OBJETIVOS	22
3. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA	22
4. MATERIAIS E MÉTODOS	23
4.1 Materiais.....	23
4.2 Avaliação da estabilidade de BHET – Auto-hidrólise.....	24
4.3 Procedimento de hidrólise enzimática de BHET	24
4.4 Otimização do protocolo de hidrólise enzimática de BHET.....	25
4.5 Reciclo do biocatalisador – Hidrólises consecutivas de BHET sob condição ótima 25	
4.6 Análises de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	25
4.7 Análises de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e Carbono (RMN de ¹ H e ¹³ C).....	26
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
5.1 Estabilidade de BHET – Auto-hidrólise	26
5.2 Triagem de lipases comerciais	27
5.3 Hidrólise de BHET catalisada pela enzima TIL-150 – Otimização do protocolo ..	29
5.3.1 Contextualização: A enzima TIL-150.....	29
5.3.2 Otimização do protocolo: Variação das condições reacionais	31
5.4 Reciclabilidade da TIL-150	35
5.5 Aumento de escala da hidrólise de BHET – Robustez do protocolo.....	36
5.6 Contextualização: O intermediário MHET	38
6. CONCLUSÕES	39
7. REFERÊNCIAS	39
8. ORIENTAÇÕES	43
9. DISCIPLINAS MINISTRADAS E/OU ATIVIDADES DE EXTENSÃO	43
10. COMENTÁRIOS DO ORIENTADOR	43
ANEXOS	45

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Plásticos: Classificação, Produção e Poluição

Desde sua introdução no início do século XX, o plástico – isto é, materiais poliméricos sintéticos ou semissintéticos – revolucionou todos os seguimentos industriais graças à sua versatilidade, durabilidade e baixo custo e se tornou parte integral da sociedade moderna.¹ No entanto, a durabilidade e a resistência à degradação dos plásticos levaram à sua acumulação como resíduos persistentes em aterros sanitários e no ambiente natural, representando uma ameaça aos ecossistemas e à saúde humana.² Compreender os processos de produção, os diferentes tipos de plásticos e a sua gestão de resíduos é fundamental para abordar o seu impacto como poluente e promover soluções sustentáveis.

Os materiais poliméricos podem ser classificados de diversas maneiras, considerando: (i) sua origem (naturais ou sintéticos), (ii) o método de polimerização utilizado na sua produção (polimerização em cadeia ou por etapas), (iii) a relação custo-desempenho (como plásticos de uso comum versus plásticos de alto desempenho) e (iv) suas propriedades físicas, especialmente as termomecânicas.³ No caso das propriedades físicas, é possível distinguir os polímeros em três categorias principais — termofixos, termoplásticos e elastômeros — com base em suas respostas ao estresse mecânico, comportamento térmico e estrutura química (Figura 1).

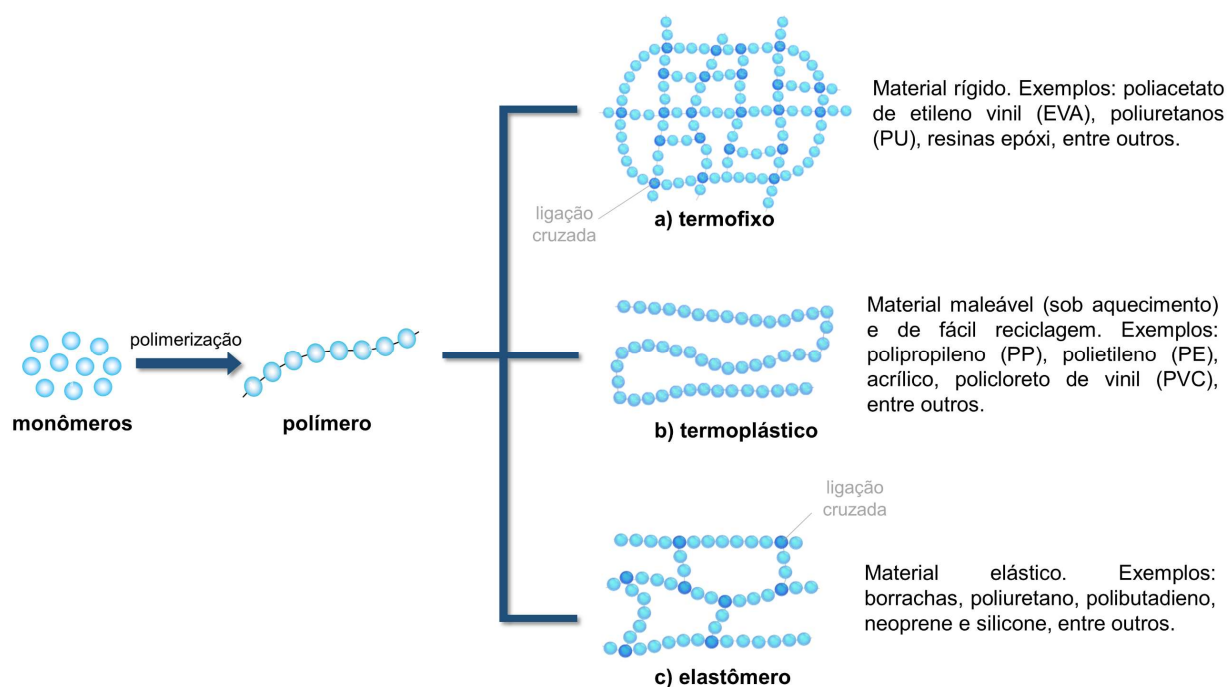


Figura 1. Classificação dos polímeros, de acordo com suas propriedades termomecânicas: a) termofixo, b) termoplástico e c) elastômero.

Fonte: De autoria própria.

Os *termofixos* (Figura 1a) são as redes tridimensionais mais robustas e rígidas, com elevado grau de ligações covalentes entre si, que se tornam materiais infusíveis e insolúveis devido a um processo de cura irreversível que os fixa em uma estrutura permanentemente reticulada.⁴ Por isso, os termofixos não podem ser facilmente reciclados, o que os torna resistentes termicamente, mecanicamente e quimicamente.³ Os *termoplásticos* (Figura 1b) são materiais compostos por redes densas de cadeias poliméricas unidas por ligações não covalentes.⁴ Devido à presença predominante de ligações secundárias fracas entre as cadeias, essas interações intermoleculares se enfraquecem com o aquecimento, permitindo o processamento facilitado dos termoplásticos, incluindo sua remodelagem e reciclagem.⁴ Já os *elastômeros* (Figura 1c), também conhecidos como borrachas, não devem ser considerados plásticos no sentido estrito, pois representam uma classe muito especial de materiais poliméricos.³ Possuem grande quantidade de ramificações e ligações cruzadas, formando cadeias mecanicamente entrelaçadas que funcionam como molas moleculares, permitindo que o material se estique antes de sofrer danos estruturais permanentes.⁴

Grande parte dos plásticos, nomeadamente mais de 85%, enquadram-se em sete categorias definidas pela Sociedade da Indústria de Plásticos em 1988, em um sistema conhecido como Código de Identificação de Resinas (RIC).³ O sistema foi criado usando números de 1 a 7 para identificar a resina plástica utilizada em um artigo fabricado, facilitando assim a triagem desses materiais para a reciclagem. Os números de 1 a 6 foram atribuídos aos plásticos mais comuns utilizados como material predominante na composição, e o número 7 para categorizar todos os outros tipos de polímeros ou a mistura deles para combinações multimateriais (Figura 2).

						
PET	PEAD	PVC	PEBD	PP	PS	OUTROS
Polietileno Tereftalato	Polietileno de Alta Densidade	Policloreto de Vinila	Polietileno de Baixa Densidade	Polipropileno	Poliestireno	Outros tipos de plásticos ou misturas
						
Reciclável? Sim	Reciclável? Sim	Reciclável? Raramente	Reciclável? Sim, mas incomum	Reciclável? Sim	Reciclável? Raramente	Reciclável? Raramente

Figura 2. Os 7 tipos de plástico de acordo com o sistema RIC.

Fonte: Adaptado de Ocean Material (2024) (<https://oceanmaterial.com/what-plastics-can-be-recycled/>)

A produção de plásticos, especialmente os termoplásticos, envolve processos complexos de alto consumo energético, que se iniciam com a extração da matéria-prima – majoritariamente combustíveis fósseis, como petróleo bruto, gás natural e carvão.⁵ Esses recursos não renováveis passam por uma série de processos químicos e físicos, como polimerização, composição (adição de enchimentos, reforços e estabilizantes), moldagem e extrusão, para produzir diferentes tipos de plásticos com aplicações específicas.^{1,5}

A demanda por esses produtos, principalmente no setor de embalagens, aumentou drasticamente nas últimas décadas, com cerca de 400 milhões de toneladas de plástico sendo produzidas anualmente.^{1,2} Considerando que 90% dos plásticos produzidos utilizam matérias-primas virgens de combustíveis fósseis, os plásticos representam 8–9% da produção global de petróleo e gás.⁶ É projetado que a produção de plástico irá dobrar em 2040, acarretando em um crescimento de 9% para 20% no consumo global de petróleo.⁶ Entretanto, a gestão de resíduos plásticos não acompanha a alta velocidade de produção e consumo desses materiais.

A elevada estabilidade química da estrutura macromolecular que torna os plásticos tão valiosos em diferentes aplicações constitui também um obstáculo à sua degradação ou reciclagem.³ Apenas cerca de 9% dos resíduos plásticos são reciclados, sendo o restante incinerado, depositado em aterros ou acumulado no meio ambiente.⁷ Estimativas apontam que 8,3 bilhões de toneladas de plásticos virgens foram produzidos até hoje, dos quais 4,9 bilhões de toneladas acabaram em aterros sanitários ou no meio ambiente.⁶ Como consequência, a poluição plástica está emergindo como um dos grandes desafios da atualidade.

A poluição plástica afeta de forma profunda os ecossistemas terrestres e aquáticos. Nos oceanos, a presença de plástico representa uma ameaça constante à vida marinha. Animais marinhos de diversas espécies se enredam em resíduos plásticos, sofrendo ferimentos, sufocamento e até a morte.¹ Além disso, a ingestão de microplásticos, partículas de plástico menores que 5 milímetros, causa danos internos, obstruções e contamina a cadeia alimentar marinha.¹ Em ambientes terrestres, os microplásticos se infiltram no solo e na água doce, transportando uma variedade de contaminantes, como pesticidas e metais pesados, causando desequilíbrios ecológicos. A poluição plástica também altera a estrutura e o funcionamento dos ecossistemas. A formação de ilhas de plástico nos oceanos, por exemplo, destrói habitats e prejudica a biodiversidade. Além disso, o plástico pode liberar substâncias tóxicas ao se degradar, contaminando o solo e a água.¹

Para enfrentar os impactos da poluição plástica, são necessários ações coordenadas em diferentes níveis, como reduzir ou eliminar o uso de plásticos desnecessários, estabelecer limites globais para a produção de plástico virgem, criar padrões globais alinhados para que os plásticos de uso comum sejam, por design, praticamente recuperáveis e recicláveis, e desenvolver e ampliar as tecnologias de processamento e reciclagem de plásticos.⁸

1.2 Processos de Reciclagem de Plástico

As tecnologias de reciclagem podem ser divididas em quatro subcategorias (reciclagem primária, secundária, terciária e quaternária), diferenciadas pela natureza dos processos empregados e pela natureza dos produtos finais.³ A reciclagem primária ocorre dentro da própria indústria, onde os resíduos poliméricos pós-industriais gerados durante a fabricação de plásticos são reutilizados no processo de produção ao serem misturados ao polímero virgem.⁹ Esse processo garante a alta qualidade do plástico reciclado e é eficiente em termos de custos. No entanto, a reciclagem primária é limitada pela necessidade de resíduos não contaminados e pelo número reduzido de ciclos de reutilização para cada material.

A reciclagem secundária envolve a reutilização de resíduos plásticos pós-consumo, que são geralmente contaminados. Nesse processo, também chamado de reciclagem mecânica, os resíduos plásticos inicialmente passam por etapas de coleta, triagem e limpeza, e posteriormente por processos de fusão mecânica, produzindo novos plásticos com propriedades menos exigentes. Consequentemente, os polímeros reciclados dessa forma são usados em aplicações de menor qualidade e, eventualmente, acabam em aterros sanitários.⁷ A reciclagem secundária é frequentemente considerada uma forma de "reciclagem em cascata" (*downcycling*), com o

número de ciclos de reprocessamento dependendo da evolução das propriedades do polímero. No caso específico do PET, as variações no peso molecular durante o reprocessamento mecânico podem ser mitigadas, especialmente por meio da pós-polimerização em estado sólido e/ou da adição de extensores de cadeia.³

Na reciclagem terciária, empregam-se processos (termo)químicos ou (bio)catalíticos para degradar resíduos poliméricos de maneira altamente seletiva, fragmentando a estrutura macromolecular em produtos de menor massa molecular com valor agregado.³ Esses produtos incluem monômeros, oligômeros e matérias-primas moleculares, como gás de síntese (CO e H₂), que podem ser utilizados no desenvolvimento de novos materiais.³ Os processos mais comuns envolvem hidrólise, seja com catalisadores químicos ou enzimas, pirólise e gaseificação. Entre as abordagens de reciclagem terciária, a despolimerização de resíduos plásticos para regenerar os monômeros originais, que podem ser facilmente repolimerizados para formar o mesmo polímero, destaca-se como a mais promissora e desejada.³

A reciclagem quaternária foca na recuperação de energia a partir dos resíduos plásticos pós-consumo. Esse processo, feito por incineração ou pirólise, geralmente é aplicado quando a coleta, triagem e separação dos resíduos plásticos são desafiadoras ou economicamente inviáveis.⁹ Essa opção aproveita o alto valor calorífico dos resíduos plásticos para produzir dióxido de carbono e energia na forma de vapor.³ No entanto, a incineração de resíduos causa sérios problemas ambientais e contribui para as emissões de gases de efeito estufa, pois gera vários poluentes perigosos e compostos orgânicos voláteis, exigindo limpeza posterior dos incineradores.³

Independentemente do tipo de processo, a reciclagem de plásticos é um processo essencial para a sustentabilidade ambiental e a conservação de recursos. Os diferentes métodos e processos de reciclagem apresentam vantagens e desvantagens, e a escolha da melhor abordagem depende de diversos fatores, como o tipo de plástico, o nível de contaminação e as aplicações desejadas. Entretanto, esta área enfrenta uma série de desafios complexos que limitam sua eficácia e abrangência.

Uma dificuldade inicial está na etapa de coleta e triagem, agravada pela contaminação com rótulos, revestimentos e restos de alimentos. Outro obstáculo é a complexidade e a diversidade das composições plásticas, exacerbadas pelos aditivos químicos adicionados para versatilidade, o que torna difícil a reciclagem em larga escala sem comprometer a qualidade do material reciclado, afetando seu valor de mercado e limitando as possibilidades de reaproveitamento.¹⁰ Vale também ressaltar a dificuldade em competir com a produção de plástico virgem derivado de combustíveis fósseis, que ainda é mais barata e abundante,

desincentivando investimentos em infraestrutura de reciclagem, especialmente em países de baixa renda.¹⁰ Além disso, a falta de padronização global nas políticas de reciclagem e os impactos ambientais e sociais do processo, como a liberação de microplásticos e substâncias tóxicas, exigem atenção e soluções inovadoras.

A pesquisa e o desenvolvimento de novas tecnologias de reciclagem, mais eficientes e sustentáveis, são cruciais para enfrentar os desafios da poluição por plásticos e promover a economia circular. Nesse contexto, a reciclagem de plásticos utilizando enzimas ou microrganismos surge como uma alternativa ambientalmente amigável na reciclagem terciária, com o objetivo de gerar produtos finais de alta pureza, como monômeros, oligômeros e outros produtos de alto valor agregado.¹¹ Até o momento, uma variedade de espécies microbianas e fúngicas com atividade enzimática sobre diversos polímeros, incluindo PP, PE e, especialmente, PET, foi identificada.¹² No entanto, ainda há uma lacuna nos dados de pesquisa que evidenciem os benefícios dessa abordagem devido à sua novidade, e sua viabilidade em larga escala ainda precisa ser comprovada na indústria.¹²

1.3 Polietileno tereftalato (PET)

O polietileno tereftalato (PET) é um dos termoplásticos mais abundantes e produzidos em massa. Devido às suas excelentes propriedades mecânicas, estabilidade térmica, impermeabilidade para líquidos e gases e transparência, é amplamente utilizado para fibras têxteis, garrafas de bebidas e embalagens para alimentos.¹³ O PET é uma resina semicristalina, incolor e higroscópica, sintetizada por policondensação de ácido tereftálico (TPA) e etilenoglicol (EG), formando um polímero de poliésteres aromáticos (Figura 3).¹⁴ A transesterificação de EG com dimetiltereftalato (DMT) foi amplamente utilizada até a década de 1960, mas as baixas velocidades de reação e a alta corrosividade tornaram esse processo obsoleto.³

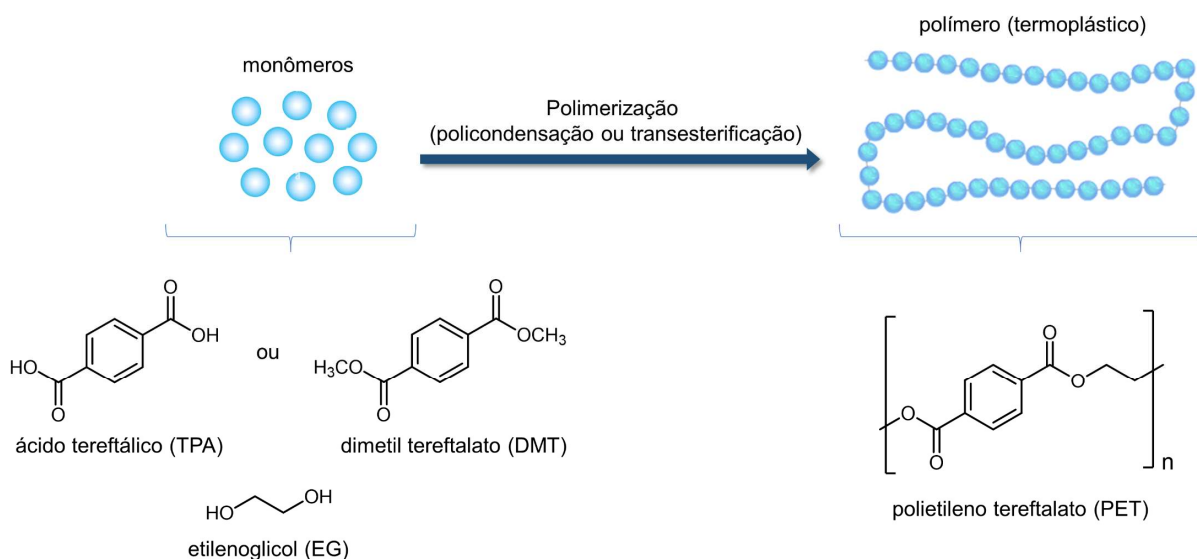


Figura 3. Estrutura química do PET.
Fonte: De autoria própria.

A alta demanda por plásticos à base de PET, principalmente nas indústrias de embalagens, levou à produção total de cerca de 19 milhões de toneladas em 2015, de um total de 270 milhões de toneladas de produção total de plástico. Da produção total de PET, cerca de 60% é destinada a fibras sintéticas, enquanto a produção de garrafas corresponde a cerca de 30%.³ Em consequência ao ritmo acelerado de produção e consumo, o PET é um dos principais componentes dos resíduos plásticos encontrados no ambiente, juntamente com o PE, PP e PS.¹⁵

O PET é o plástico mais reciclado no mundo, identificado pelo código RIC 1. Cerca de 28% da produção total de PET é reciclado em fibras, chapas, filmes e garrafas e peças automotivas, enquanto o restante é descartado em aterros sanitários ou passam por incineração.¹⁶

Diversos métodos de reciclagem são praticados para o gerenciamento de resíduos de PET, como reciclagem térmica, mecânica e química.¹⁴ A reciclagem mecânica é um dos métodos mais utilizados, e envolve a triagem e separação de resíduos de PET, seguida de lavagem, moagem e esmagamento para reduzir o tamanho das partículas. Finalmente, a reextrusão e o reproprocessamento são feitos para a produção de novos produtos à base de PET.¹⁶ No entanto, a heterogeneidade dos resíduos, juntamente com a presença de contaminantes, dificulta o processamento mecânico. Além disso, os produtos formados a partir de resíduos de PET reciclados mecanicamente são de baixa qualidade devido ao estresse mecânico e foto-oxidação causados pelo calor de fusão. Assim, este método de reciclagem é geralmente praticado para a produção de plásticos de baixa qualidade.¹⁶

A reciclagem química envolve a degradação do PET em suas formas monoméricas, oligoméricas e outras formas químicas usando vários processos envolvendo diferentes produtos químicos. Alguns dos métodos de reciclagem química de PET são: (i) glicólise, que envolve a transesterificação do PET com um excesso etileno glicol (EG) para obter bis(2-hidroxietil) tereftalato (BHET); (ii) alcoolólise, que envolve a transesterificação do PET com um álcool – geralmente metanol – para obter DMT e EG; e (iii) hidrólise ácida ou básica, que envolve a clivagem do PET para obter TPA e EG.¹⁷ Apesar da eficiência da degradação, esses métodos geralmente demandam altas temperaturas, geram subprodutos indesejados e efluentes, não sendo considerados ecologicamente corretos.¹⁴

A reciclagem biológica/enzimática, isto é, utilização de microrganismos ou enzimas como catalisadores para a degradação de PET, é apontada como estratégia promissora e sustentável para o gerenciamento de resíduos de PET. Esta abordagem oferece vantagens, como condições suaves de pH, temperatura relativamente baixa, e uso de produtos químicos mais seguros. Além disso, o catalisador biológico apresenta uma seletividade muito alta, direcionando-se especificamente às ligações éster do polímero, facilitando assim a recuperação dos monômeros de PET (TA e EG).³

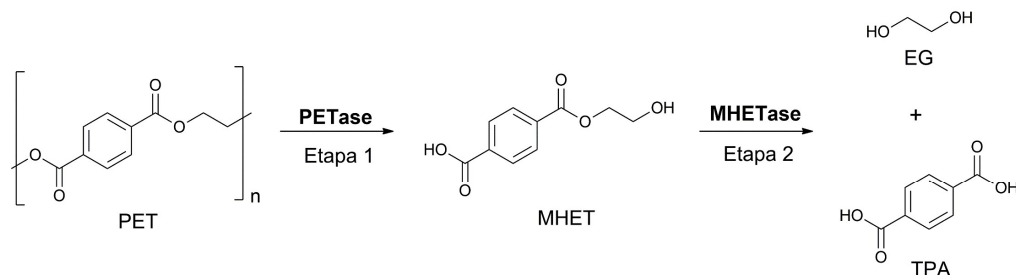
1.4 Degradação Enzimática de PET

As enzimas são classificadas pela *International Union of Biochemistry and Molecular Biology* (IUBMB) (<https://enzyme.expasy.org>) de acordo com as reações que catalisam naturalmente, e são divididas em 7 classes: oxidoredutases (1), transferases (2), hidrolases (3), liases (4), isomerases (5), ligases (6) e translocases (7). As hidrolases, como o nome sugere, são enzimas responsáveis por catalisar reações de hidrólise. Como os monômeros de PET estão ligados por ligações éster, essas ligações podem ser hidrolisadas por muitas enzimas hidrolíticas, como cutinases, lipases, esterases e PETases.³ As PET hidrolases foram classificadas como carboxilesterases (EC 3.1.1.1, hidrolases de éster carboxílico, e EC 3.1.1.2, arilesterase), cutinases (EC 3.1.1.74) e lipases (EC 3.1.1.3, triacilglicerol lipase).

Em 2005, Müller et al. demonstraram pela primeira vez que o PET pode ser degradado por uma poliéster hidrolase de uma espécie de *Thermobifida* (TfH).¹⁸ Utilizando uma amostra de PET prensada a quente, proveniente de garrafa de bebida com 10% de cristalinidade, o estudo mostrou uma perda de peso em torno de 50% após três semanas de incubação a 55 °C com o microrganismo. Essa descoberta inicial desencadeou estudos extensivos sobre as cutinases relacionadas de *T. fusca* e outras espécies de *Thermobifida*.¹⁹

Em 2016, um candidato promissor para a degradação de PET, com atividade superior em relação às outras enzimas, foi descoberto. Yoshida et al. relataram a bactéria Gram-negativa *Ideonella sakaiensis* 201-F6, que pode usar efetivamente o PET como fonte de carbono, utilizando duas enzimas chamadas PETase e MHETase (Figura 4).¹⁹ A bactéria *I. sakaiensis*, isolada inicialmente em amostras ambientais coletadas em instalações de reciclagem de PET, secreta IsPETase para atuar na superfície do polímero, clivando as ligações éster presentes no esqueleto polimérico e liberando principalmente mono-(hidroxietil) tereftalato (MHET) (Figura 4a, etapa 1). Em seguida, o MHET é transportado para o periplasma do microrganismo e hidrolisado pela IsMHETase em EG e TPA, que são subsequentemente absorvidos pelo citoplasma e direcionados a diferentes rotas catabólicas para fornecer carbono e energia à célula (Figura 4a, etapa 2).¹⁷ Desde sua descoberta em 2016, a PETase tem despertado crescente interesse por sua capacidade de degradar PET em temperaturas moderadas. Essa descoberta levou à criação de uma nova classe de hidrolases de PET (EC 3.1.1.101), destinada a reconhecer e classificar a atividade catalítica da IsPETase.³

A) Esquema reacional da degradação de plástico PET pela bactéria *Ideonella sakaiensis*



B) Representação do processamento de plástico PET na bactéria *Ideonella sakaiensis*:

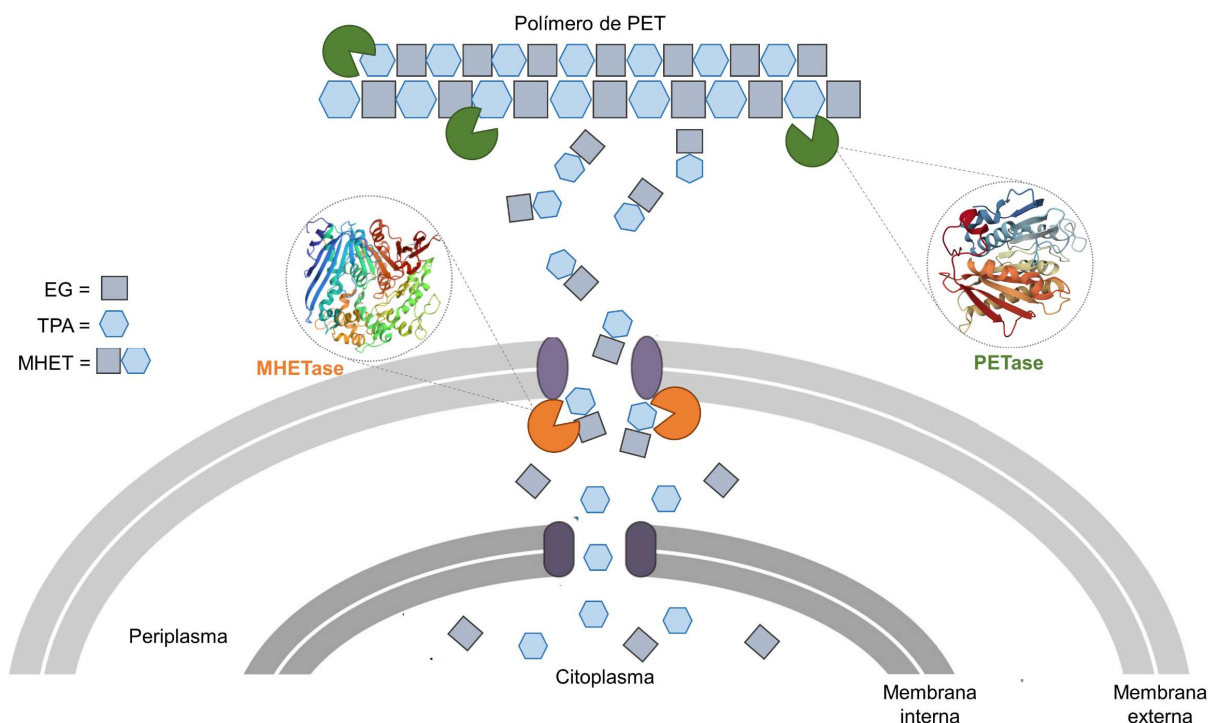


Figura 4. Atividade da *Ideonella sakaiensis* na degradação de PET.

A) Esquema reacional da degradação de PET pela *I. sakaiensis*. **B)** Representação do processamento de PET na bactéria *I. sakaiensis* (Adaptado de Carr, Clarke & Dobson, 2020)²⁰.

As enzimas envolvidas na degradação do PET pertencem à subclasse das esterases e são caracterizadas pela presença de uma tríade catalítica típica das α/β -hidrolases.³ As α/β -hidrolases constituem uma família de enzimas caracterizada por uma dobra comum e um sítio ativo similar.²¹ O domínio central das α/β -hidrolases é composto por 8 fitas β que formam uma folha β central paralela, exceto pela segunda fita, que é antiparalela (Figura 5, setas cinzas).²¹ A folha β central que é cercada por α -hélices e alças que conectam as fitas β (Figura 5, cilindros azuis). A atividade das α/β -hidrolases surge de uma tríade catalítica composta por um nucleófilo (serina, aspartato ou cisteína), uma histidina e um ácido catalítico (ácido aspártico ou glutâmico), que estão localizados em regiões de alça (Figura 5, esferas vermelhas), além de dois ou três aminoácidos que formam a cavidade oxiânion – região responsável por estabilizar

os intermediários formados durante o ciclo catalítico.^{21,22} O nucleófilo está sempre localizado em uma alça muito apertada após a fita $\beta 5$, conhecida como "cotovelo nucleofílico", enquanto o resíduo ácido geralmente está localizado após a fita $\beta 7$. O resíduo de histidina é absolutamente conservado e está localizado em uma alça variável após a última fita β .²²

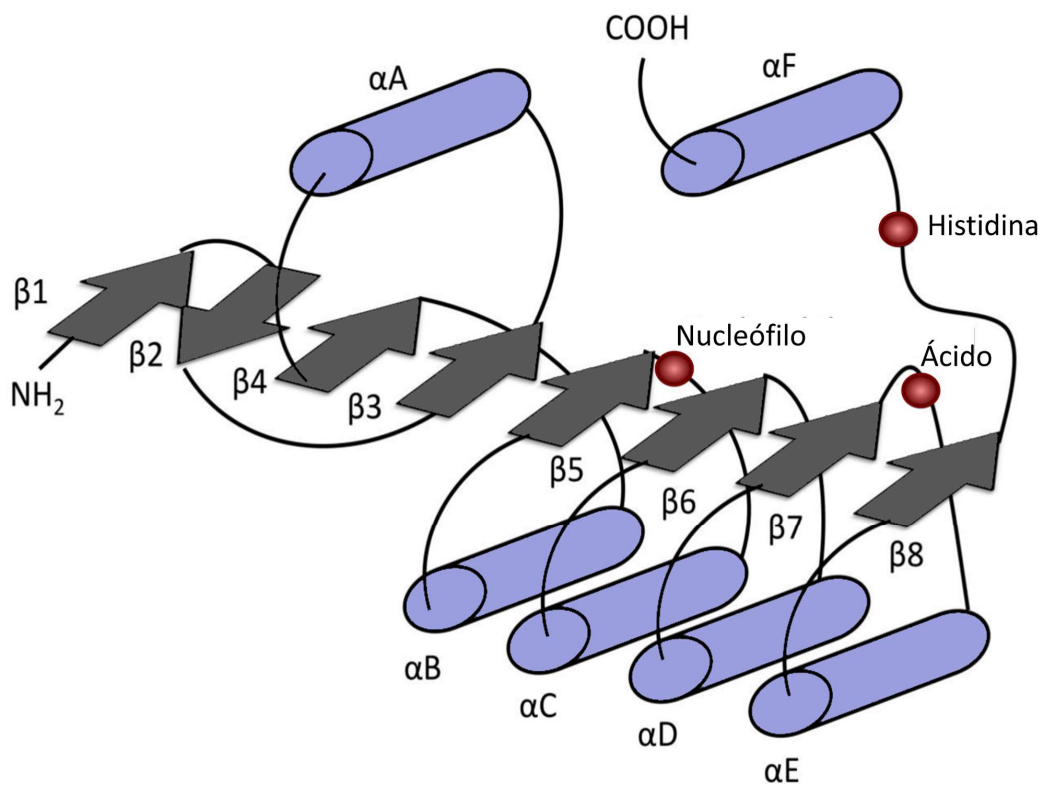


Figura 5. Estrutura canônica da dobra da α/β hidrolase.

Folhas β representadas como setas cinzas, α -hélices denotadas como cilindros azuis, tríade catalítica altamente conservada, contendo uma histidina, um ácido e um nucleófilo, representada por esferas vermelhas. (Adaptado de Brown e colaboradores, 2013)²²

As α/β -hidrolases podem conter módulos adicionais, como uma tampa, uma capa ou domínios N- ou C-terminais, que contribuem para a diversidade estrutural e funcional da família. Além disso, as α/β -hidrolases podem ser classificadas de acordo com seu tipo de cavidade oxiânion. As cavidades oxiânion são classificadas em três tipos principais, com base no tamanho e na sequência de aminoácidos que as compõem: GX, GGGX e Y. Cavidades GX são as menores e mais restritas, caracterizadas pela presença de um resíduo de glicina (G) seguido por qualquer outro aminoácido (X). Cavidades GGGX contêm três resíduos de glicina (GGG) consecutivos, seguidos por qualquer outro aminoácido (X), o que confere maior flexibilidade à cavidade, permitindo a acomodação de substratos maiores e mais complexos. Já cavidades Y são caracterizadas pela presença de um resíduo volumoso, geralmente tirosina ou aspartato. As PETases e MHETases, por exemplo, são α/β -hidrolases de domínio central, com cavidades oxiânions do tipo GX e GGGX, respectivamente.²¹

As hidrolases com atividade para degradação de PET possuem tríade catalítica composta por serina (Ser), ácido aspártico (Asp) e histidina (His), que se liga ao resíduo ácido por meio de uma ligação de hidrogênio.²³ O arranjo de ligações de hidrogênio dentro da tríade possibilita o transporte de prótons necessário para o aumento da nucleofilicidade da serina, resíduo que promove um ataque nucleofílico ao carbono carbonílico presente nas ligações éster do PET (Figura 6, etapa 1).^{3,23} Nesta primeira etapa, ocorre a formação do primeiro intermediário tetraédrico e, após liberação de um álcool, forma-se um complexo acil-enzima covalente (Figura 6, etapa 2). Na etapa subsequente, uma molécula de água promove um ataque nucleofílico ao complexo acil-enzima, completando a clivagem da ligação éster e formando um segundo intermediário tetraédrico (Figura 6, etapa 3).³ Em seguida, o produto da reação de hidrólise é liberado, regenerando a enzima livre (Figura 6, etapa 4). O sítio ativo também inclui uma cavidade oxianion composta por doadores de ligação de hidrogênio, que estabilizam os intermediários tetraédricos.²⁴

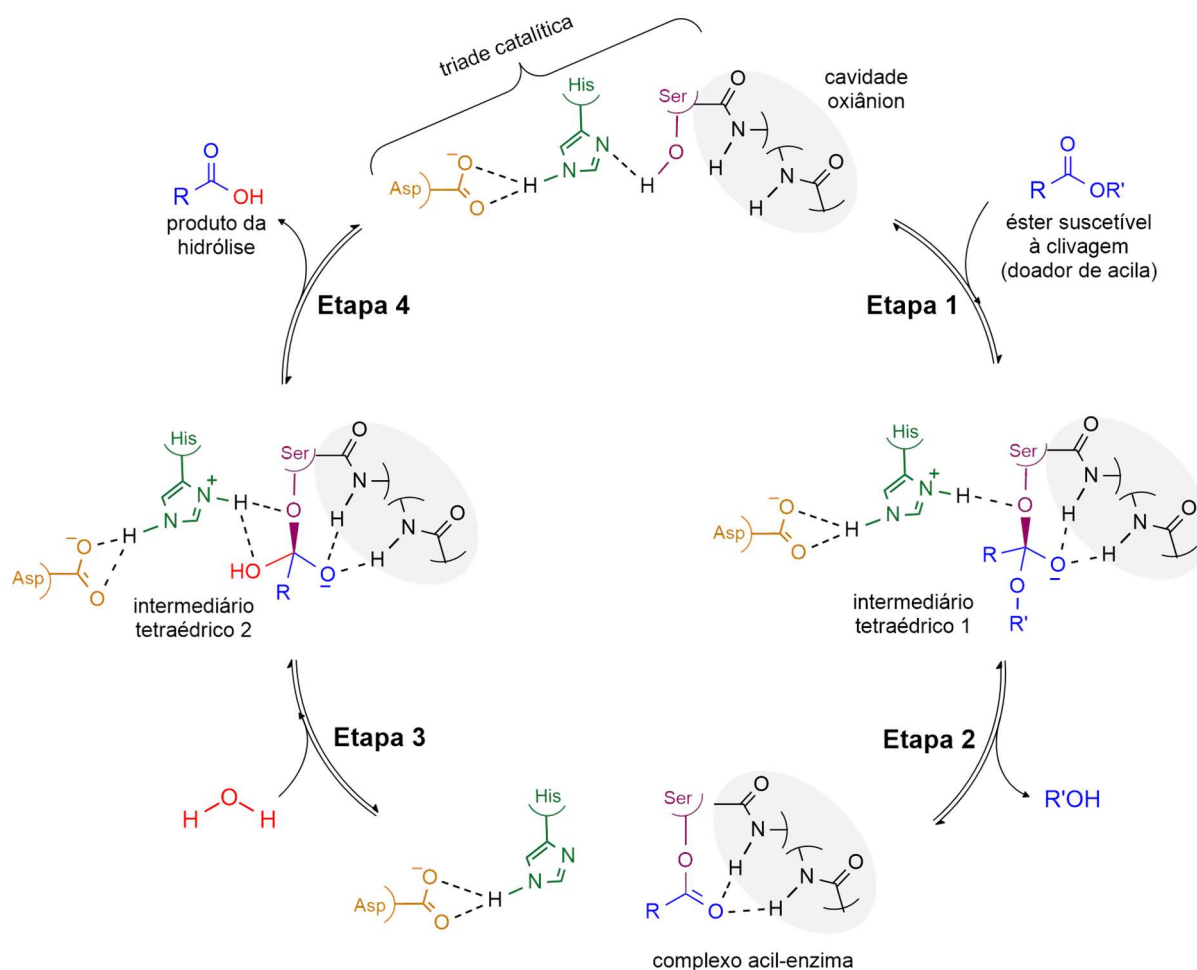


Figura 6. Mecanismo geral da hidrólise catalisada por serina-hidrolases.
Fonte: De autoria própria.

Até o momento, pesquisadores isolaram e identificaram uma variedade de enzimas com atividade de degradação de PET, incluindo enzimas mesofílicas, ativas a moderadas temperaturas, como a *p*-nitrobenzil esterase BsEstB da bactéria *Bacillus subtilis*²⁵, capaz de degradar fibras de PET após 8 dias de incubação a 30 °C, e a lipase B de *Candida antarctica* (CALB), que reagiu com PET amorfo para produzir BHET após 7 dias a 37 °C²⁶. Além disso, várias cutinases, enzimas ativas em altas temperaturas (55–70 °C), têm mostrado grande potencial. As cutinases operam em temperaturas próximas à temperatura de transição vítrea do PET (T_g , 70 °C), o que maximiza a mobilidade das cadeias do polímero, facilitando sua degradação. Com base nessas características, as cutinases demonstram ser mais eficazes do que esterases e lipases na degradação de PET amorfo ou PET de baixa cristalinidade.²⁷ Isso impulsionou a busca por PET hidrolases termoestáveis, seja por meio da engenharia de proteínas ou da descoberta de novas enzimas.²⁸

O exemplo mais avançado de degradação enzimática de PET em escala industrial é a tecnologia desenvolvida pela empresa francesa Carbios, em uma parceria público-privada com o Instituto de Biotecnologia de Toulouse e outros parceiros globais. Em 2020, a Carbios apresentou uma variante termoestabilizada da cutinase de compostagem de folhas e galhos (LCC), obtida a partir de engenharia enzimática assistida por computador, capaz de degradar garrafas descartadas de PET em escala piloto.^{19,28} Utilizando PET amorfo e micronizado como substratos, foi reportada uma conversão de 90% em menos de 10 horas, com uma produtividade média de 16,7 g de TPA L⁻¹ h⁻¹ (200 gramas por quilograma de suspensão de PET, com uma concentração de enzima de 3 miligramas por grama de PET).²⁹ Atualmente, a Carbios está construindo uma primeira unidade industrial na França, com previsão de início das operações em 2025, e capacidade para reciclar 50.000 toneladas de resíduos de PET por ano. Apesar desse avanço promissor, a degradação enzimática de PET altamente cristalino, predominante em garrafas comerciais e no ambiente, continua sendo um desafio significativo para a implementação em larga escala.

Além da alta cristalinidade de materiais de PET, o desenvolvimento de processos de degradação enzimática eficientes e economicamente viáveis também encontra outras limitações. Apesar de as enzimas ativas para degradação de PET seguirem um mecanismo de reação típico das hidrolases, diversas questões a nível molecular permanecem sem resposta. Por exemplo, as interações específicas entre essas enzimas e o substrato sólido de PET sintético ainda não foram totalmente esclarecidas, e a estrutura cristalina do complexo formado entre enzima e PET não foi reportada.²⁷ Uma compreensão detalhada do mecanismo catalítico das

enzimas é fundamental para o desenvolvimento estratégico de enzimas degradadoras de PET e para alcançar uma degradação mais eficiente desse polímero.²⁷

Outro desafio está no próprio meio reacional do sistema PET-enzima. A maioria das hidrolases de PET gera principalmente os monômeros TPA e EG após o processo de despolimerização enzimática. Além desses produtos principais, também podem ser formados, em menor proporção, intermediários de degradação, como MHET e BHET.³ A acidificação do meio reacional, provocada pela geração dos produtos ácidos MHET e TPA, é um desafio significativo na despolimerização enzimática do PET.³ Essa redução do pH prejudica a atividade catalítica das hidrolases de PET, que operam de forma otimizada em condições alcalinas devido ao seu mecanismo de reação, possivelmente impactado pela protonação do resíduo de histidina no sítio ativo. Para mitigar essa limitação, estratégias como o aumento da força ou concentração do tampão têm sido exploradas. Entretanto, tais abordagens são inadequadas para aplicações industriais, que demandam altas concentrações de PET e recuperação eficiente dos monômeros.³

Nos últimos anos, o avanço contínuo de bancos de dados de cristalografia de proteínas e o desenvolvimento de ferramentas computacionais, como bioinformática, docking molecular e simulação de dinâmica molecular, têm revolucionado a capacidade de realizar modificações direcionadas em enzimas, oferecendo novas possibilidades para ajustar e otimizar propriedades enzimáticas como estabilidade térmica e tolerância à variações de pH.²⁷ Em fases futuras, simulações computacionais de acoplamento molecular e dinâmica molecular serão realizadas para investigar e modificar resíduos de aminoácidos cruciais no complexo enzima-PET, visando criar mutantes de enzimas degradadoras de PET com atividade catalítica contra materiais de alta cristalinidade.²⁷

Estratégias mais práticas também podem ser exploradas para o aprimorar a abordagem de degradação enzimática de PET, como o desenvolvimento de etapas de pré-tratamento para amorfizar PET (semi)cristalino e a utilização de auxiliares biológicos em sinergia com PET hidrolases para acelerar a degradação do polímero.³⁰ Os auxiliares mais bem estabelecidos para as hidrolases de PET são as carboxilesterases, que podem aliviar a inibição das PET hidrolases causada por intermediários de degradação, como MHET, e promover uma maior degradação do PET.³⁰

Em 2017, De Castro e colaboradores reportaram a combinação de duas enzimas para uma despolimerização mais completa de PET em TPA, alcançando um aumento de 7,7 vezes no rendimento.³¹ Em uma triagem de 10 enzimas comerciais usando o intermediário BHET como substrato modelo, os pesquisadores identificaram a CaL-B e a cutinase de *Humicola*

insolens (HiC) como potenciais biocatalisadores para a degradação de PET. Após a avaliação dos efeitos do pré-tratamento do PET, da temperatura e da estratégia de adição de enzimas, foi relatado uma sinergia das atividades de CaL-B e HiC na hidrólise do PET. As concentrações do monômero final TPA, após 14 dias de incubação a 50 °C, foram de 1606 e 2247 µM, respectivamente, quando HiC e CaL-B foram combinadas nas proporções de 50%/50% e 90%/10%.³¹ Apesar das limitações, como a baixa concentração de TPA obtida e o longo tempo de incubação, este estudo destacou o uso de enzimas comerciais na degradação de PET, servindo como um exemplo claro de que ainda há um vasto espaço para a investigação de estratégias práticas voltadas ao desenvolvimento de sistemas enzimáticos acessíveis e eficientes para a degradação de plásticos.

2. OBJETIVOS

O presente projeto teve como objetivo geral a triagem de lipases comerciais com atividade na produção de monômeros e intermediários de PET – mais precisamente, os compostos bis(2-hidroxietil)tereftalato (BHET) e mono-(hidroxietil) tereftalato (MHET). Busca-se, com isso, identificar enzimas acessíveis para aplicação em processos biocatalíticos de degradação de PET, que sejam economicamente atrativos, além de ambientalmente amigáveis.

3. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA

O PET é um dos polímeros mais utilizados globalmente, com vasta aplicação em embalagens e têxteis. A produção massiva de PET gera grande quantidade de resíduos, impactando negativamente o meio ambiente. A reciclagem tradicional, embora importante, apresenta limitações quanto à qualidade do material reciclado e à geração de subprodutos. Nesse contexto, a aplicação de enzimas para despolimerizar o PET surge como uma solução promissora, com potencial para gerar monômeros de alta pureza e reduzir o impacto ambiental dos processos de reciclagem.

Um passo fundamental para o desenvolvimento de processos eficientes de degradação enzimática de PET é a triagem de biocatalisadores adequados. Nesse contexto, a utilização de lipases comerciais para a hidrólise de bis(2-hidroxietil)tereftalato (BHET), um intermediário solúvel de PET, apresenta-se como uma estratégia vantajosa. Lipases comerciais são produzidas em larga escala e amplamente acessíveis, o que facilita sua aplicação em processos industriais. Elas também exibem uma diversidade de propriedades catalíticas, especialmente

quando imobilizadas. Além disso, a triagem de lipases comerciais permite um estudo prático e rápido para a identificação de biocatalisadores com potencial para a degradação de PET, acelerando o desenvolvimento de novos processos de reciclagem enzimática.

Para o desenvolvimento de processos eficientes de degradação enzimática de PET, a triagem de biocatalisadores adequados é crucial. Neste projeto, utilizamos lipases comerciais para a hidrólise de bis(2-hidroxietil)tereftalato (BHET), um intermediário solúvel de PET. Essa estratégia é vantajosa pois enzimas comerciais são amplamente acessíveis e robustas (especialmente quando imobilizadas), o que facilita sua aplicação em escalas industriais. A disponibilidade comercial também permite um estudo prático e rápido na identificação de biocatalisadores eficientes para o desenvolvimento de processos enzimáticos de degradação de PET.

Em suma, este projeto apresenta grande relevância científica, tecnológica e ambiental, podendo ter impacto significativo na indústria de reciclagem de plástico ao promover a adoção de tecnologias mais limpas e eficientes. Ao viabilizar um processo biocatalítico prático e acessível para a reciclagem de PET, com a obtenção de monômeros de alta pureza, o projeto impulsiona a produção de materiais reciclados de alta qualidade, contribuindo para o desenvolvimento da biotecnologia industrial e para a transição para uma economia circular.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

O substrato bis(2-hidroxietileno) tereftalato (BHET, 85%) foi adquirido junto à TCI Chemicals e utilizado sem pré- tratamento. O ácido tereftálico (TPA, >99%) foi adquirido junto à AmBeed e utilizado como padrão para monitoramento das reações de hidrólise de BHET e cálculo de conversão. Todos os outros reagentes e solventes, como acetato de sódio, ácido acético, fosfato de sódio monobásico monohidratado, fosfato dissódico, bicarbonato de sódio, carbonato de sódio, acetonitrila e acetato de etila, foram adquiridos em grau analítico e utilizados sem pré-tratamento.

As lipases testadas foram adquiridas na Sigma-Aldrich (Merck), são elas: lipase A de *Candida antarctica* (CaL-A-150, recombinante de *Aspergillus oryzae*, imobilizada em Immobead 150, U/g $\geq$ 500), Novozym 435 (lipase B de *Candida antarctica*, CaL-B, expressa em *A. niger*, U/g $\geq$ 5000), lipase B de *Candida antarctica* (CaL-B-150, imobilizada em Immobead 150, U/g $\geq$ 2000), Amano Lipase A de *Aspergillus niger* (AnL, U/g $\geq$ 120000), lipase de pâncreas suíno (PPL, U/g $\geq$ 125000), lipase de *Thermomyces lanuginosus* (TIL-150,

imobilizada em Immobead 150, U/g $\geq$ 3000), lipase de *Candida rugosa* (CrL, U/g $\geq$ 700000), lipase de *Candida rugosa* (CrL-150, imobilizada em Immobead 150, U/g $\geq$ 100), lipase de *Rhizopus niveus* livre (RnL, U/g $\geq$ 1500), Amano Lipase de *Pseudomonas fluorescens* (PfL, U/g $\geq$ 20000), Amano lipase M de *Mucor javanicus* (MjL, U/g $\geq$ 10000), lipase de *Rhizomucor miehei* (RmL-150, imobilizada em Immobead 150, U/g $\geq$ 300), lipase de *Rhizopus oryzae* (RoL-150, imobilizada em Immobead 150, U/g $\geq$ 300) e lipase de *Burkholderia cepacia* (BcL, U/g $\geq$ 30000). As lipases em sua forma solúvel (não imobilizadas) foram recebidas como sólidos e solubilizadas em tampão adequado durante os procedimentos experimentais.

4.2 Avaliação da estabilidade de BHET – Auto-hidrólise

A auto-hidrólise de BHET foi analisada em diferentes valores de pH, sem a adição de enzima ao meio reacional, a fim de determinar a estabilidade deste substrato. Em um balão de fundo redondo de 25 mL, adicionou-se 9 mL de tampão 100 mM (acetato de sódio pH 5, fosfato de sódio pH 7 ou bicarbonato de sódio pH 9) e a solução foi mantida sob agitação e em aquecimento a 40 °C. Em um microtubo de 2 mL, adicionou-se 30 mg de BHET e 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO). Em seguida, adicionou-se a solução de BHET/DMSO ao balão contendo o tampão, atingindo o volume final da solução reacional de 10 mL. O meio reacional foi mantido sob agitação magnética e aquecimento a 40 °C por 24 horas.

4.3 Procedimento de hidrólise enzimática de BHET

Em um balão de fundo redondo de 25 mL, adicionou-se 9 mL de tampão fosfato de sódio 100 mM pH 7 e 10 mg de lipase (livre ou imobilizada). A solução enzimática foi deixada sob agitação e em aquecimento a 40 °C. Em um microtubo de 2 mL, adicionou-se 30 mg de BHET e 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO). Em seguida, adicionou-se a solução de BHET/DMSO ao balão contendo a solução enzimática tamponada (pH 7), atingindo o volume final de 10 mL. O meio reacional foi mantido sob agitação magnética e aquecimento a 40 °C por 24 horas.

Após 24 horas e análise da conversão de BHET aos seus produtos de hidrólise (MHET e/ou TPA) por CLAE, o meio reacional foi acidificado com 2 mL de solução HCl 2M até pH 2. Em seguida, realizou-se extração líquido-líquido com acetato de etila (3x10 mL). A fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ anidro e concentrada em rotaevaporador.

4.4 Otimização do protocolo de hidrólise enzimática de BHET

A otimização do protocolo de hidrólise enzimática de BHET foi realizada avaliando diferentes condições reacionais, mantendo como referência o procedimento descrito no Tópico 4.2: 9 mL de tampão 100 mM (acetato de sódio pH 5, fosfato de sódio pH 7 ou bicarbonato de sódio pH 9), lipase (10, 20, 40 ou 60 mg), 1 mL de solução BHET em DMSO (30 mg mL⁻¹) e aquecimento (40, 50, 60, 70 ou 80 °C). As reações foram monitoradas via CLAE e mantidas até máxima conversão de BHET aos seus respectivos produtos da hidrólise (MHET e TPA).

4.5 Reciclo do biocatalisador – Hidrólises consecutivas de BHET sob condição ótima

Em um balão de fundo redondo de 25 mL, adicionou-se 9 mL de tampão fosfato de sódio 100 mM pH 7 e 60 mg de lipase de *Thermomyces lanuginosus* imobilizada em Immobead 150 (TIL-150). A solução enzimática foi deixada sob agitação e em aquecimento a 40 °C. Em um microtubo de 2 mL, adicionou-se 30 mg de BHET e 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO). Em seguida, adicionou-se a solução de BHET/DMSO ao balão contendo a solução enzimática tamponada (pH 7), atingindo o volume final de 10 mL. O meio reacional foi mantido sob agitação magnética e aquecimento a 50 °C por 12 horas. Após 12 horas, a solução reacional foi removida do balão com o auxílio de uma seringa, acidificada com 2 mL de solução HCl 2M até pH 2 e extraída com acetato de etila (3x10 mL). A fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ anidro e concentrada em rotaevaporador.

O biocatalisador (TIL-150) foi mantido no balão de fundo redondo, lavado com tampão fosfato de sódio 100 mM pH 7 (3 x 2 mL) e reutilizado em um novo ciclo de hidrólise de BHET, seguindo as mesmas condições reacionais descritas neste tópico. O procedimento foi repetido por 10 ciclos.

4.6 Análises de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

As reações de hidrólise enzimática de BHET foram analisadas por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando o seguinte sistema JASCO: bomba quaternária PU-2089s Plus, forno de coluna CO-2065 Plus equipado com coluna Phenomenex Luna C18(2) (250 × 4.6 mm, 5 µm), interface LC-Net II/ADC, injetor AS-2055 Plus e detector de arranjo de fotodiodos (PDA) MD-2018 Plus. As fases móveis utilizadas na eluição em gradiente foram: solução 0,1% de ácido fórmico em água (A) e metanol (B). O método de gradiente consistiu em: 0–3 minutos, isocrático a 35% de B; 3–10 minutos, gradiente até 50% de B; 10–13 minutos, gradiente até 100% de B; 13–15, isocrático a 100% de B, 15–16 minutos,

gradiente até 35% de B; 16–28 minutos, isocrático a 35% de B para recondicionamento da coluna e estabilização. O comprimento de onda do detector UV foi ajustado para 254 nm, e o volume de injeção foi de 20 µL. O tempo total de corrida foi de 28.0 minutos, com uma taxa de fluxo de 0.8 mL min⁻¹ e temperatura da coluna de 40 °C. Os tempos de retenção foram: TPA 11,1 minutos, MHET 12,0 minutos e BHET 12,8 minutos.

As conversões foram determinadas usando uma curva de calibração feita com MHET sintetizado previamente (97% de pureza) e 2-hidróxi-etil-metil-tereftalato (>99%) como padrão interno na concentração fixa de 0.10 mg mL⁻¹. A faixa de concentração de MHET foi 0.03–0.10 mg mL⁻¹ e a curva foi construída em triplicada ($R^2 = 0.97$).

Para análises de CLAE, foram retiradas alíquotas de 40 µL de cada meio reacional. As alíquotas foram acidificadas com 60 µL de solução HCl 1M, seguida de adição de 800 µL de metanol grau HPLC e 100 µL de solução 1.0 mg mL⁻¹ de 2-hidróxi-etil-metil-tereftalato (padrão interno). Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 5 min à 11000 rpm e analisadas por CLAE, seguindo o método cromatográfico descrito neste tópico.

4.7 Análises de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e Carbono (RMN de ¹H e ¹³C)

Os espectros de RMN de ¹H e ¹³C foram registrados na Plataforma Instrumental de RMN do Instituto de Química UNESP Araraquara, em espectrômetro Bruker Fourier 600 (B₀ 14,1 T) operando na frequência de 600.13 MHz para o núcleo de hidrogênio e 150.90 MHz para o núcleo de carbono. Os sinais de deslocamentos químicos (δ) foram registrados em ppm utilizando como padrão interno tetrametilsilano (TMS, δ = 0,00) e padrão externo DMSO-*d*₆ (δ_H = 2,50; δ_C = 39.5).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Estabilidade de BHET – Auto-hidrólise

Inicialmente, realizou-se o estudo da estabilidade do substrato BHET em diferentes valores de pH, a fim de determinar a taxa de auto-hidrólise deste composto em meio ácido, neutro e alcalino (Tabela 1). Observou-se uma rápida auto-hidrólise de BHET em meio alcalino (pH 9), chegando em 35% de conversão em apenas 4 horas. Em pH 7, observou-se apenas 3% de conversão de BHET ao monoácido MHET após 24 horas, enquanto em meio ácido (pH 5) não foi observada taxa de auto-hidrólise.

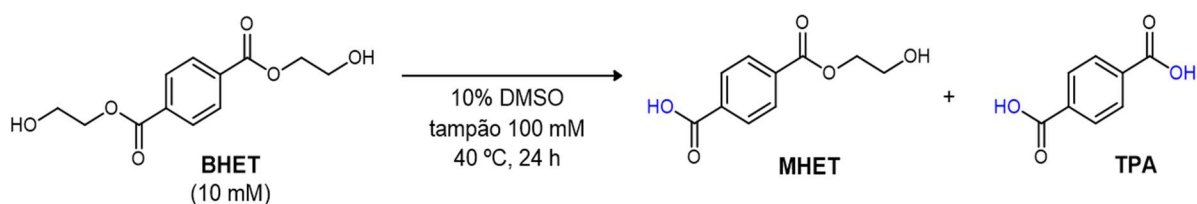


Tabela 1 – Estabilidade de BHET em diferentes valores de pH.

	pH	Conversão (%) ^[a]	MHET (%)	TPA (%)
1	5	-	-	-
2	7	3	3	-
3 ^[b]	9	35	34	<1

Condições: 10 mM de BHET em tampão 100 mM (Entrada 1: acetato de sódio pH 5; Entrada 2: fosfato de sódio pH 7; Entrada 3: bicarbonato de sódio pH 9) contendo 10% de DMSO (40 °C, agitação magnética, 24 horas). Conversão (%) = conversão de BHET em produtos de hidrólise; MHET (%) e TPA (%) = porcentagem de MHET e TPA, respectivamente. ^[a]Determinado por CLAE (Coluna C18, eluentes: 0.1% ácido fórmico em água (A) e metanol (B), gradiente: 35–55% de B, fluxo: 0.8 mL min⁻¹, tempo total de análise: 32 min). ^[b]Em meio alcalino (Entrada 3, pH 9), a conversão de 35% foi observada em apenas 4 horas.

Os resultados da análise de estabilidade de BHET em diferentes valores de pH corroboram o estudo de Świderek e colaboradores³², que reporta a influência do pH na atividade da enzima CaL-B na degradação de pequenos módulos de PET. No estudo de referência, a auto-hidrólise de BHET também foi favorecida em condições alcalinas (pH 9), reforçando a importância de se considerar o pH na interpretação dos resultados e na avaliação da eficiência da enzima na degradação do PET e seus intermediários.

Para a triagem de lipases comerciais para a hidrólise de BHET, optou-se por realizar as reações em pH 7. A escolha do pH 7 baseou-se em: (i) minimização da auto-hidrólise de BHET, o que permite avaliar com maior precisão a atividade hidrolítica das lipases, evitando que a hidrólise espontânea do substrato interfira nos resultados e dificulte a análise do desempenho das enzimas; e (ii) acidificação do meio reacional parece prejudicar a atividade catalítica de hidrolases³, como mencionado no Tópico 1.4.

5.2 Triagem de lipases comerciais

Neste trabalho, a atividade de diversas comerciais para a hidrólise de BHET foi avaliada em pH 7 e 40 °C, com concentração de enzima em 1 mg mL⁻¹ e tempo reacional fixado em 24 horas (Tabela 2), baseado na triagem de lipases reportada por Tudorache e colaboradores.³³ Considerando a pequena taxa de conversão na hidrólise espontânea de BHET (Tabela 2, entrada 1, “branco”), seis lipases apresentaram atividade: Amano lipase A de *Aspergillus niger* (AnL), Amano Lipase de *Pseudomonas fluorescens* (PfL), lipase de *Candida rugosa* (CrL), lipase de

pâncreas suíno (PPL), lipase de *Thermomyces lanuginosus* imobilizada em Immobead 150 (TIL-150) e lipase B de *Candida antarctica* (CaL-B-150 e Novozyme 435) (Tabela 2, entradas 2, 3, 7, 8, 13–15, respectivamente).

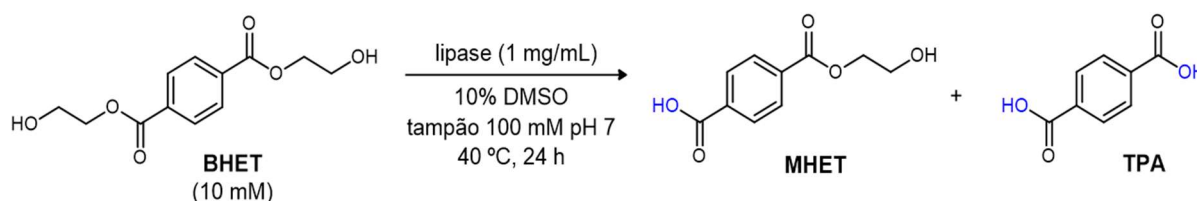


Tabela 2 – Triagem de lipases comerciais para a hidrólise de BHET.

	Lipases	Conversão (%) ^[a]	MHET (%) ^[b]	TPA (%) ^[b]
1	Branco ^[a]	3	>99	-
2	AnL	17	16	<1
3	PfL	16	16	-
4	MjL	5	5	-
5	BcL	7	7	-
6	RnL	6	6	-
7	CrL	20	19	<1
8	PPL	37	36	<1
9	RmL-150	5	5	-
10	RoL-150	7	7	-
11	CrL-150	6	-	-
12	CaL-A-150	7	7	-
13	TIL-150	63	63	-
14	CaL-B-150	62	60	2
15	CaL-B (Novozyme 435)	95	90	5

Entradas 2–7: Lipases solúveis (não imobilizadas), utilizadas sem pré-tratamento.

Entradas 8–15: Lipases imobilizadas em resina micro-mesoporosa (Immobead 150), exceto CaL-B (Novozyme 435), imobilizada em resina microporosa (resina acrílica).

Condições: 10 mg de lipase (1 mg mL⁻¹) foram misturados com 10 mL de solução de BHET 10 mM em tampão fosfato de sódio 100 mM (pH 7) contendo 10% de DMSO (40 °C, agitação magnética, 24 h de reação). Conversão (%) = conversão de BHET em produtos de hidrólise; MHET (%) e TPA (%) = porcentagem de MHET e TPA, respectivamente. ^[a]Auto-hidrólise de BHET (experimento sem adição de enzima). ^[b]Determinado por CLAE (Coluna C18, eluentes: 0.1% ácido fórmico em água (A) e metanol (B), gradiente: 35–50% de B, fluxo: 0.8 mL min⁻¹, 40 °C, 254 nm, tempo total de análise: 28 min). As conversões foram determinadas utilizando uma curva de calibração com MHET sintetizado (pureza de 97%) e tereftalato de 2-hidroxietil metila como padrão interno.

Ao compararmos as lipases com atividade na hidrólise de BHET, a CaL-B (Novozyme 435) demonstrou a maior atividade catalítica (Tabela 2, entrada 15, 97% de conversão). Esse resultado era esperado, visto que a CaL-B é comumente utilizada em processos de despolimerização de PET, especialmente na sua forma solúvel.^{26,31,32,34,35} No entanto, este

trabalho identificou a lipase de *Thermomyces lanuginosus* imobilizada em Immobead 150 (TIL-150) como uma alternativa promissora, alcançando 63% de conversão de BHET em MHET nas condições reacionais testadas. Portanto, esta enzima foi selecionada para as etapas seguintes do presente estudo.

5.3 Hidrólise de BHET catalisada pela enzima TIL-150 – Otimização do protocolo

5.3.1 Contextualização: A enzima TIL-150

A lipase de *Thermomyces lanuginosus* (TIL, anteriormente *Humicola lanuginosa*) é uma enzima termoestável, disponível comercialmente em ambas as formas solúvel e imobilizada, e que demonstrou grande potencial em várias aplicações industriais e biotecnológicas, como na indústria de detergentes, produção de biodiesel e na área de processamento de alimentos.³⁶

A TIL pertence à família das α/β -hidrolases e compartilha características estruturais comuns com outras enzimas nesta família. Sua estrutura é composta por uma folha β central de oito fitas, predominantemente paralela, com cinco α -hélices interconectantes. O sítio catalítico da TIL é formado pela tríade catalítica clássica das α/β -hidrolases, composta pelos resíduos Ser146, His258 e Asp201.³⁷ Uma característica importante da TIL é a presença de uma "tampa" hidrofóbica que cobre o sítio catalítico (Figura 7). Essa tampa consiste em uma alça móvel com estrutura α -helicoidal, desempenhando um papel essencial no mecanismo de ativação das lipases. As lipases, reconhecidas por catalisar a hidrólise de triglicerídeos de cadeia longa insolúveis em água, sofrem uma mudança conformacional na tampa na presença de uma interface água-lipídio (ativação interfacial). Esse rearranjo expõe o sítio catalítico, tornando-o acessível ao substrato (Figura 7).^{36,38}

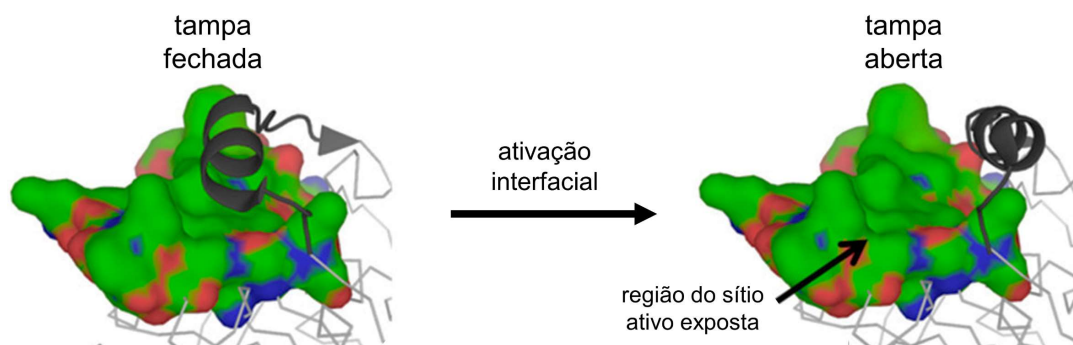


Figura 7. Modelos estruturais da TIL em suas conformações inativa (tampa fechada) e ativa (tampa aberta). Estruturas em representação de superfície (Códigos das estruturas no PDB (*Protein Data Bank*): 1DT3 para conformação inativa e 1EIN para conformação ativa).³⁹ Tampa hidrofóbica representada pela α -hélice preta; oxigênios em vermelho; nitrogênios em azul; carbonos em verde.

Fonte: Adaptado de Bjerrum e colaboradores, 2016.⁴⁰

Em 2009, Guebitz e colaboradores avaliaram a atividade da TIL na hidrólise do oligômero bis(benzoyloxietil) tereftalato (3PET), um substrato modelo para PET.³⁸ No estudo em questão, a adição do detergente Triton X-100 resultou em um aumento de sete vezes nos produtos de hidrólise liberados do 3PET, revelando o potencial da TIL para a degradação de polímeros como PET. A adição de um detergente aumenta a área superficial da interface água-lipídio, permitindo que a lipase se ligue à interface e realize a hidrólise de forma mais eficiente.

O mecanismo de ativação interfacial é amplamente utilizado para obter lipases imobilizadas em suportes hidrofóbicos, sendo uma das estratégias mais eficazes para melhorar tanto a estabilidade conformacional quanto a atividade catalítica dessas enzimas.⁴¹ Nesse processo, as lipases são adsorvidas em uma superfície hidrofóbica (o suporte de imobilização) com sua "tampa" aberta, garantindo a manutenção de sua atividade catalítica. Neste trabalho, a triagem de lipases comerciais para a hidrólise BHET foi realizada tanto com lipases em sua forma solúvel (Tabela 2, entradas 2–8) quanto com lipases imobilizadas no suporte hidrofóbico Immobead-150 (Tabela 2, entradas 9–14), com exceção da Novozyme 435, que corresponde à CaL-B imobilizada em resina acrílica (Tabela 2, entrada 15).

O Immobead 150 é um suporte comercial composto por polímeros de metacrilato com funções epóxi (aproximadamente 1000 μmol de grupos epóxi por grama de suporte), tamanho médio de partículas de 0,15–0,30 mm e poros na região de tamanhos micro e mesoporosos.^{41,42} Além disso, este suporte apresenta elevada hidrofobicidade, estabilidade térmica e alta estabilidade em pH neutro.⁴²

O presente trabalho identificou a atividade da TIL-150 para a hidrólise de BHET, alcançando 58% de conversão ao monoácido MHET em 24 horas (Tabela 2, entrada 13; condições reacionais: 10 mM de BHET (30 mg), 1 mg mL⁻¹ de enzima (10 mg), 40 °C, pH 7). Com o objetivo de otimizar esse protocolo, foram avaliadas diferentes condições reacionais

para a hidrólise de BHET catalisada pela TIL-150, incluindo o aumento da quantidade de enzima e aumento da temperatura. O incremento da quantidade de enzima é justificado pelo fato de a TIL-150 ser uma enzima imobilizada, permitindo sua recuperação e reutilização em múltiplos ciclos reacionais, o que contribui para a otimização da viabilidade econômica do processo em escala industrial. Já a avaliação do efeito da temperatura baseia-se na observação de que processos de degradação enzimática de PET realizados próximos à temperatura de transição vítrea do polímero (T_g , 70 °C) são favorecidos, promovendo uma maior eficiência na degradação.²⁷

5.3.2 Otimização do protocolo: Variação das condições reacionais

A otimização do protocolo de hidrólise enzimática de BHET catalisada pela TIL-150 foi iniciada com a avaliação do impacto do aumento da quantidade de enzima na taxa de conversão. O incremento na quantidade de TIL-150 resultou em um aumento significativo na taxa de conversão de BHET, conforme demonstrado nos resultados apresentados na Tabela 3. Além disso, independentemente da quantidade de enzima utilizada, observou-se a formação praticamente exclusiva do monoácido MHET, evidenciando a elevada regioesletividade da TIL-150 na hidrólise de BHET.

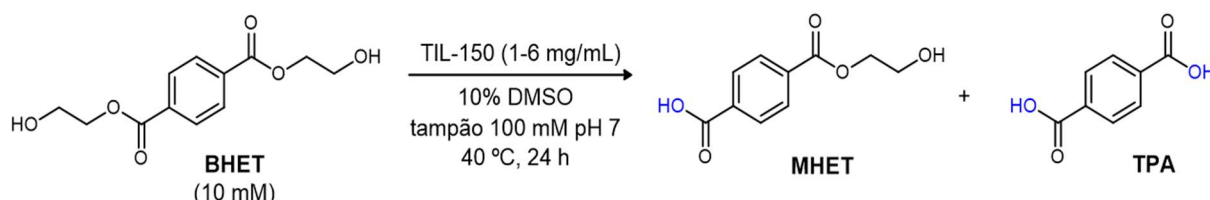


Tabela 3 – Hidrólise de BHET catalisada por TIL-150: Aumento da quantidade de enzima.

	TIL (mg/mL)	Conversão (%) ^[a]	MHET (%) ^[b]	TPA (%) ^[b]
1	1	63	63	-
2	2	79	78	<1
3	4	91	90	<1
4	6	97	96	<1

Condições: 10–60 mg de TIL-150 (1–6 mg mL⁻¹) foram misturados com 10 mL de solução de BHET 10 mM em tampão fosfato de sódio 100 mM (pH 7) contendo 10% de DMSO (40 °C, agitação magnética, 24 h de reação).

^[a]Conversão (%) = conversão de BHET em produtos de hidrólise; MHET (%) e TPA (%) = porcentagem de MHET e TPA, respectivamente. ^[b]Determinado por CLAE (Coluna C18, eluentes: 0.1% ácido fórmico em água (A) e metanol (B), gradiente: 35–50% de B, fluxo: 0.8 mL min⁻¹, 40 °C, 254 nm, tempo total de análise: 28 min). As conversões foram determinadas utilizando uma curva de calibração com MHET sintetizado (pureza de 97%) e tereftalato de 2-hidroxietil metila como padrão interno.

As lipases (EC 3.1.1.3, triacilglicerol hidrolases) catalisam naturalmente a hidrólise de triglicerídeos, resultando na formação de ácidos graxos e glicerol. Muitas lipases possuem a capacidade de distinguir e hidrolisar preferencialmente ligações éster em posições específicas do esqueleto de um glicerídeo, uma característica conhecida como *regiosseletividade*.⁴³ A lipase de *Thermomyces lanuginosus* (TIL), em sua forma solúvel, exibe 1,3-regiosseletividade na hidrólise de triglicerídeos, atuando preferencialmente sobre as ligações éster nas posições 1 e 3 (Figura 8).³⁶ Essa propriedade tem sido explorada em diversas aplicações industriais, como na produção de biodiesel e na modificação de óleos e gorduras.³⁶

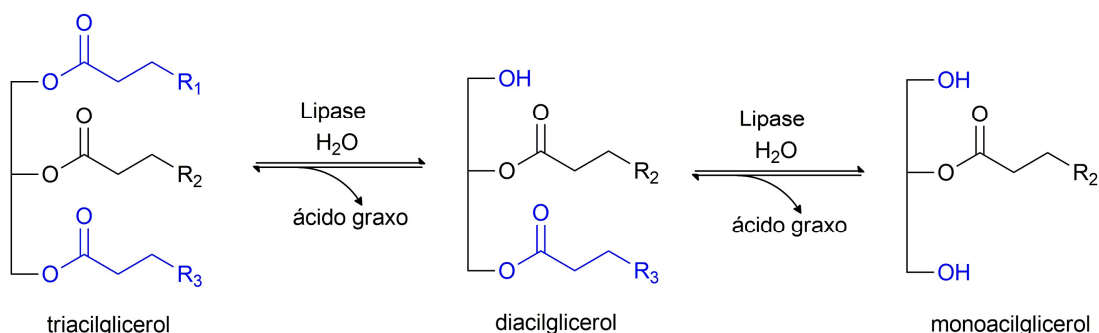


Figura 8. Hidrólise de triglicerídeos catalisada por lipases 1,3-regiosseletivas.
Fonte: De autoria própria.

A regiosseletividade da TIL também tem sido explorada em outras aplicações, como reações seletivas de transesterificação, acilação, e na modificação de açúcares. Por exemplo, a TIL também é capaz de proteger seletivamente um grupo hidroxila de um açúcar ou desproteger açúcares peracetilados por meio da hidrólise regiosseletiva dos grupos acetila.³⁶ Entretanto, a regiosseletividade pode ser afetada por diversos fatores, como o tipo de substrato e as condições reacionais.^{36,44}

Para avaliar a regiosseletividade da TIL-150 na hidrólise de BHET, foram testadas diferentes condições reacionais, mantendo a concentração de enzima fixa em 6 mg mL⁻¹ (Tabela 3, entrada 4). Essa concentração foi selecionada por garantir a maior conversão de BHET em MHET e possibilitar a redução do tempo reacional, atribuída à alta concentração de biocatalisador. Além disso, o uso de concentrações enzimáticas elevadas foi justificado pela intenção de avaliar o potencial de reciclo de TIL-150, contribuindo para a eficiência e a sustentabilidade do processo.

O efeito da temperatura na hidrólise seletiva de BHET catalisada pela TIL-150 foi investigado em uma faixa de 40 a 80 °C (Figura 9). Observou-se uma perda da regiosseletividade em temperaturas acima de 60 °C, atribuída ao aumento da hidrólise espontânea de BHET.

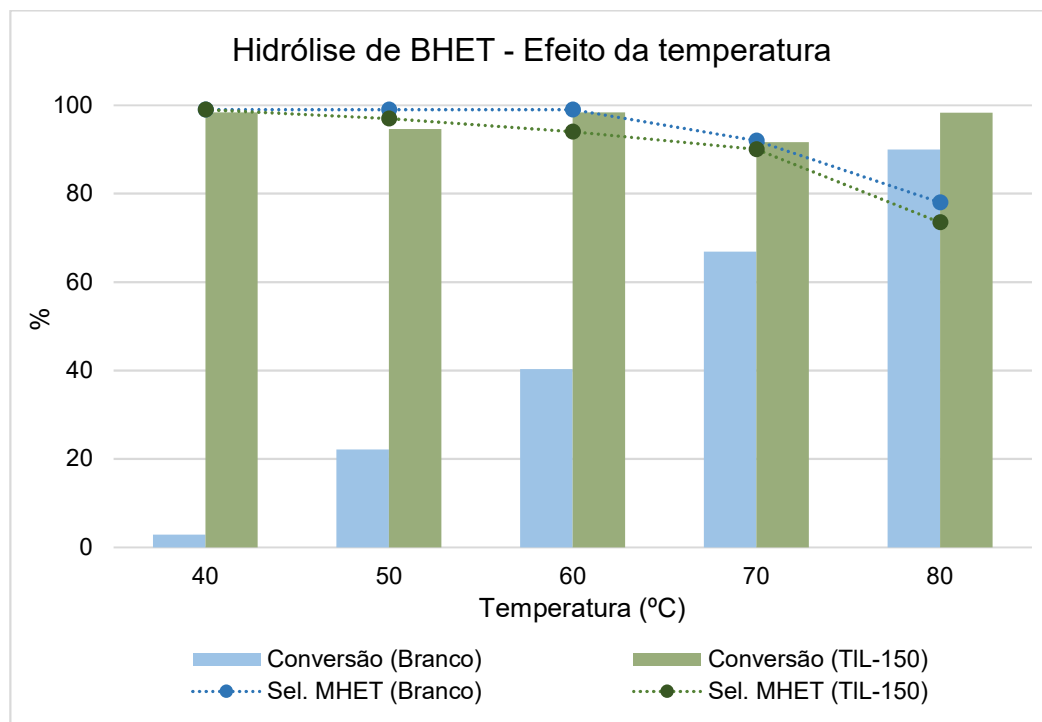
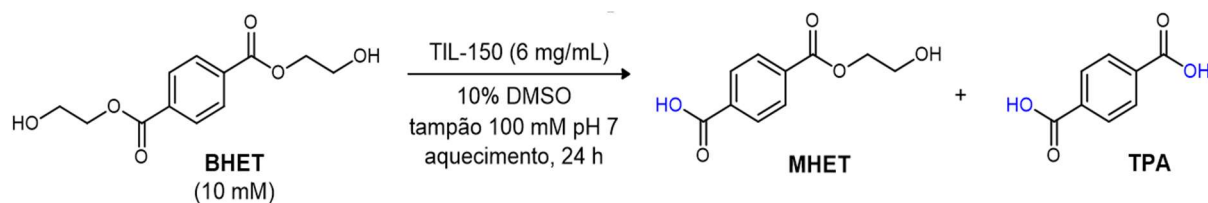


Figura 9. Hidrólise de BHET – Efeito da temperatura.

Fonte: De autoria própria.

Condições: 60 mg de TIL-150 (6 mg mL⁻¹) foram misturados com 10 mL de solução de BHET 10 mM em tampão fosfato de sódio 100 mM (pH 7) contendo 10% de DMSO (40–80 °C, agitação magnética, 24 h de reação).

Conversão (Branco) = resultados dos experimentos sem adição da enzima TIL-150 (avaliação da auto-hidrólise de BHET). Conversão (TIL-150) = resultados da hidrólise de BHET catalisada por TIL-150. Sel. MHET = seletividade da hidrólise para a formação do monoácido MHET. Conversões e seletividades determinadas por CLAE (Coluna C18, eluentes: 0.1% ácido fórmico em água (A) e metanol (B), gradiente: 35–50% de B, fluxo: 0.8 mL min⁻¹, 40 °C, 254 nm, tempo total de análise: 28 min). As conversões foram determinadas utilizando uma curva de calibração com MHET sintetizado (pureza de 97%) e tereftalato de 2-hidroxi-etil metila como padrão interno.

A temperatura de 50 °C foi selecionada para as etapas subsequentes deste estudo devido à possibilidade de que o aumento moderado da temperatura (de 40 para 50 °C) promovesse a redução do tempo reacional. No entanto, temperaturas superiores a 50 °C mostraram favorecer a auto-hidrólise de BHET (Figura 9, série "Conversão (Branco)"), resultando em uma diminuição da seletividade do processo devido ao aumento da formação do diácido TPA. Dessa forma, temperaturas acima de 50 °C foram consideradas desfavoráveis para uma avaliação precisa da atividade e seletividade enzimática, uma vez que a labilidade do substrato interfere significativamente nos resultados.

A hidrólise de BHET catalisada pela TIL-150, sob as condições otimizadas (pH 7, 6 mg mL⁻¹ de enzima, 50 °C), foi monitorada por CLAE para determinar o tempo necessário para atingir a conversão completa (Tabela 5). Observou-se que a conversão total de BHET ao monoácido MHET foi alcançada após 12 horas de reação (Figura 10). Além disso, não houve aumento significativo na formação do diácido TPA após esse período, evidenciando a elevada regioseletividade da enzima TIL-150 ao longo do processo.

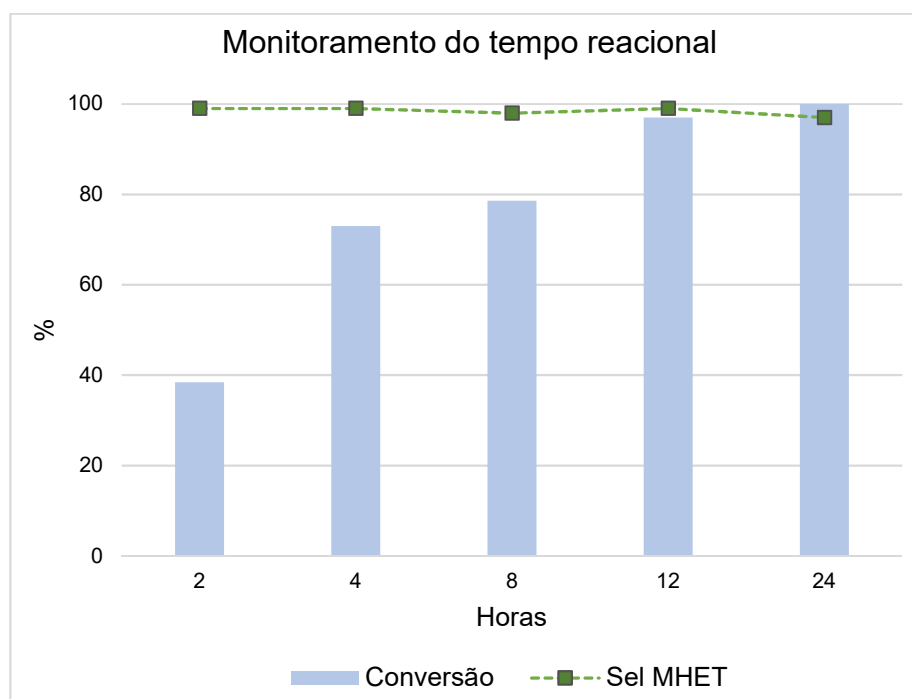
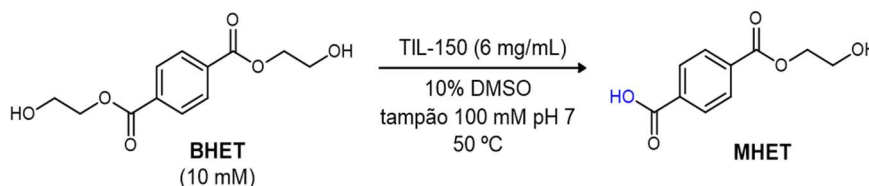


Figura 10. Hidrólise de BHET – Monitoramento do tempo reacional sob condição otimizada.
Fonte: De autoria própria.

Condições: 60 mg de TIL-150 (6 mg mL⁻¹) foram misturados com 10 mL de solução de BHET 10 mM em tampão fosfato de sódio 100 mM (pH 7) contendo 10% de DMSO (50 °C, agitação magnética, 24 h de reação). Conversão = resultados da hidrólise de BHET catalisada por TIL-150. Sel. MHET = seletividade da hidrólise para a formação do monoácido MHET. Conversões e seletividades determinadas por CLAE (Coluna C18, eluentes: 0.1% ácido fórmico em água (A) e metanol (B), gradiente: 35–50% de B, fluxo: 0.8 mL min⁻¹, 40 °C, 254 nm, tempo total de análise: 28 min). As conversões foram determinadas utilizando uma curva de calibração com MHET sintetizado (pureza de 97%) e tereftalato de 2-hidroxiethyl metila como padrão interno.

Após o estudo das condições reacionais, foi possível otimizar o protocolo de hidrólise seletiva de BHET catalisada pela enzima imobilizada TIL-150, obtendo uma conversão completa – e praticamente exclusiva – ao intermediário MHET em apenas 12 horas de reação, utilizando condições brandas de temperatura (50 °C) e pH neutro (pH 7).

5.4 Reciclabilidade da TIL-150

Este trabalho investigou a atividade da TIL-150 para a hidrólise de BHET, sendo este um biocatalisador disponível comercialmente na sua forma imobilizada. A imobilização de enzimas oferece diversas vantagens significativas, incluindo: (i) torná-las insolúveis no meio reacional de interesse, (ii) aumentar a estabilidade operacional, (iii) facilitar a recuperação e permitir a reutilização do biocatalisador, (iv) melhorar o controle do processo (separação produto/enzima e formação de produto), (v) automatizar processos (projetar reatores para processos contínuos) e (vi) minimizar possíveis processos de inibição enzimática.⁴⁵

A avaliação da reciclabilidade de biocatalisadores imobilizados é uma etapa fundamental para determinar sua viabilidade em aplicações industriais. A capacidade de uma enzima imobilizada de manter sua atividade catalítica ao longo de sucessivos ciclos de uso reflete sua estabilidade operacional e robustez, características indispensáveis para processos conduzidos em larga escala. Portanto, este trabalho avaliou a reciclabilidade da TIL-150 em sucessivos ciclos de hidrólise de BHET, conduzidos sob condições reacionais otimizadas.

Na análise dos ciclos reacionais (Figura 11), a enzima TLL-150 manteve-se ativa por 10 ciclos consecutivos de hidrólise de BHET. Até o sétimo ciclo, a TLL-150 apresentou conversões superiores a 90%. A partir do oitavo ciclo, verificou-se uma leve redução na taxa de conversão, culminando em uma perda mais significativa da atividade catalítica no décimo ciclo, com a conversão caindo para 71%. Importante destacar que a regiosseletividade da TLL-150 foi preservada ao longo dos ciclos, indicando que a formação seletiva de MHET é efetivamente atribuída à ação enzimática, demonstrando a robustez e especificidade do biocatalisador.

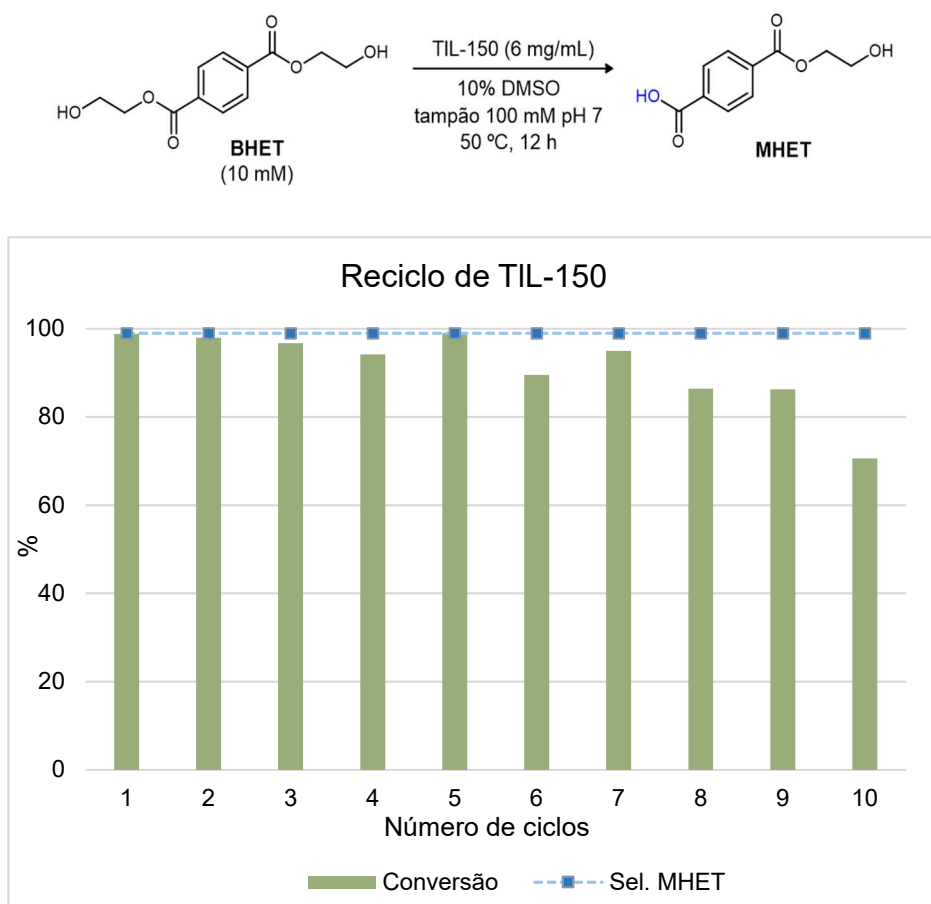


Figura 11. Reciclo de TIL-150 – Hidrólises consecutivas de BHET.

Fonte: De autoria própria.

Condições: 60 mg de TIL-150 (6 mg mL⁻¹) foram misturados com 10 mL de solução de BHET 10 mM em tampão fosfato de sódio 100 mM (pH 7) contendo 10% de DMSO (50 °C, agitação magnética, 12 h de reação para cada ciclo). Após 12 h, a enzima foi lavada e utilizada em um novo ciclo de hidrólise, mantendo as mesmas condições reacionais descritas. Conversão = resultados da hidrólise de BHET catalisada por TIL-150. Sel. MHET = seletividade da hidrólise para a formação do monoácido MHET. Conversões e seletividades determinadas por CLAE (Coluna C18, eluentes: 0.1% ácido fórmico em água (A) e metanol (B), gradiente: 35–50% de B, fluxo: 0.8 mL min⁻¹, 40 °C, 254 nm, tempo total de análise: 28 min). As conversões foram determinadas utilizando uma curva de calibração com MHET sintetizado (pureza de 97%) e tereftalato de 2-hidroxi-etil metila como padrão interno.

5.5 Aumento de escala da hidrólise de BHET – Robustez do protocolo

Para validar a reprodutibilidade e a robustez do protocolo, a hidrólise de BHET catalisada por TIL-150 foi realizada em uma escala 10 vez maior. O experimento utilizou 600 mg de TIL-150 e 100 mL de uma solução de BHET 10 mM em tampão fosfato de sódio (pH 7) contendo 10% de DMSO, a 50 °C, por 12 horas. Nessa escala ampliada, o monoácido MHET foi obtido com um rendimento de 94% (0,197 g), confirmando tanto a reprodutibilidade quanto a robustez do protocolo.

Análises de RMN de ^1H e de ^{13}C (Figuras 12 e 13, respectivamente) foram realizadas para verificar a estrutura química de MHET e os dados obtidos estão de acordo com a literatura.^{46,47} No RMN de ^1H (Figura 12), os tripletos largos em 3,71 ppm e 4,31 ppm representam os hidrogênios dos grupos metileno adjacentes à hidroxila e ao éster, respectivamente. O multiplete observado na faixa de 8.11–7.94 ppm indicam a presença de hidrogênios aromáticos pertencentes ao anel para-dissubstituído assimétrico, característico de MHET. Em contraste, TPA e BHET, que são compostos simétricos, exibem apenas um singlete para os hidrogênios aromáticos. No RMN de ^{13}C (Figura 13), observa-se os carbonos carboxílicos quaternários em 166,7 e 165,4 ppm referentes ao ácido carboxílico e ao éster, respectivamente. Os carbonos aromáticos estão na faixa de 129–135 ppm, enquanto os carbonos dos grupos metileno estão na faixa de 59–67 ppm.

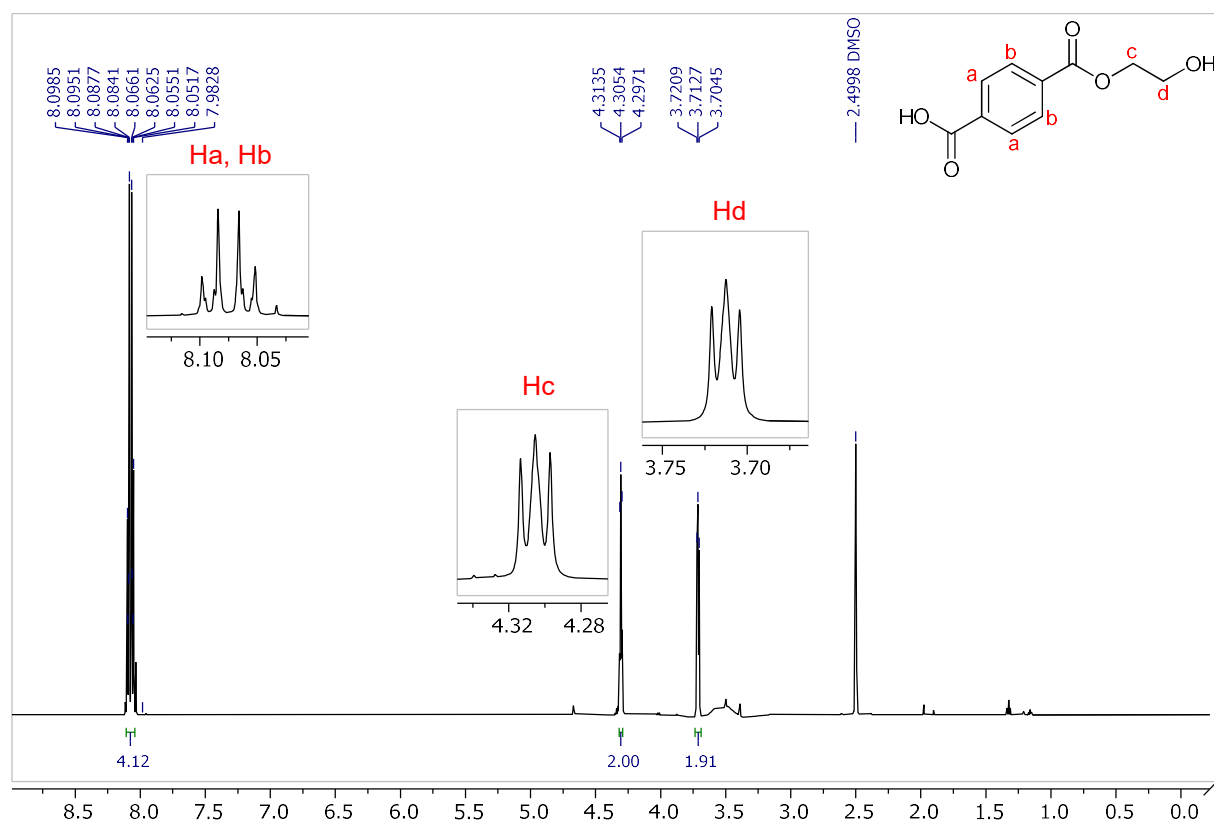


Figura 12. RMN de ^1H (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do monoácido MHET.

Fonte: De autoria própria.

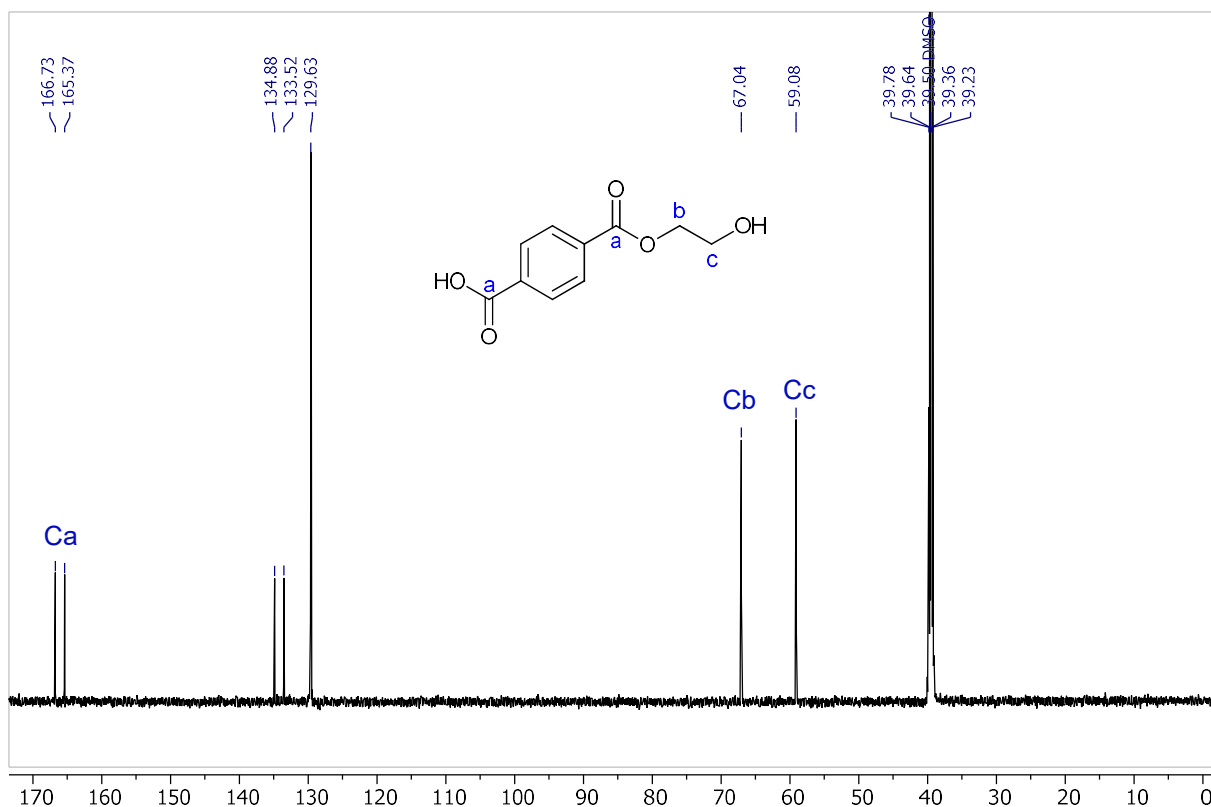


Figura 13. RMN de ^{13}C (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do monoácido MHET.
Fonte: De autoria própria.

5.6 Contextualização: O intermediário MHET

A obtenção de MHET de alta pureza e seletividade tem implicações significativas para a reciclagem do PET. Primeiramente, o MHET pode ser utilizado como substrato para a caracterização de enzimas degradadoras de PET, permitindo a identificação e a engenharia de enzimas mais eficientes.⁴⁶ Além disso, o MHET pode ser utilizado para a síntese de novos polímeros ou pode ser diretamente repolimerizado em PET, oferecendo uma rota mais sustentável e energeticamente eficiente para a reciclagem de plásticos.⁴⁸

Em 2024, Li e colaboradores propuseram uma via de repolimerização do PET iniciada por MHET, que mostrou ser mais eficiente em termos energéticos em comparação com o processo tradicional que utiliza TPA como monômero.⁴⁸ Essa abordagem foi validada por meio de cálculos teóricos quânticos e experimentos, demonstrando que o MHET pode ser um bloco de construção mais favorável para a síntese de PET, reduzindo o número de etapas necessárias e, consequentemente, o consumo de energia.

Vale ressaltar que o MHET ainda não é amplamente disponível comercialmente e, portanto, e sua síntese enzimática oferece uma alternativa viável para a obtenção desse intermediário. Em conclusão, a obtenção de MHET como intermediário na reciclagem do PET

representa um avanço significativo no desenvolvimento de processos de reciclagem mais sustentáveis.

6. CONCLUSÕES

O presente estudo demonstrou o potencial das lipases comerciais, em particular a lipase de *Thermomyces lanuginosus* imobilizada em Immobead 150 (TIL-150), para a degradação enzimática de BHET, intermediário de PET. A TIL-150 mostrou-se altamente eficiente e seletiva, alcançando conversões superiores a 90% em condições brandas de temperatura e pH neutro, além de manter sua atividade catalítica ao longo de múltiplos ciclos de reação. A obtenção de MHET como principal produto da hidrólise abre caminho para a síntese de novos polímeros ou a repolimerização direta em PET partindo deste monoácido, oferecendo uma rota mais sustentável e energeticamente eficiente para a reciclagem de plásticos. A robustez do protocolo foi verificada em escala ampliada, confirmando a viabilidade da TIL-150 para aplicações em maiores escalas.

Este trabalho contribui significativamente para o avanço da biotecnologia industrial, destacando a importância da biocatálise na promoção de processos de reciclagem mais limpos e eficientes, alinhados com os princípios da economia circular. Futuras pesquisas devem focar na otimização das condições reacionais e na exploração de sinergias entre processos químicos de depolimerização de PET e o protocolo de hidrólise catalisada por TIL-150 aqui descrito, visando a implementação em larga escala dessas tecnologias sustentáveis.

7. REFERÊNCIAS

- (1) Alex Olanrewaju Adekanmbi; Emmanuel Chigozie Ani; Ayodeji Abatan; Uchenna Izuka; Nwakamma Nindwezuor-Ehiobu; Alexander Obaigbena. Assessing the Environmental and Health Impacts of Plastic Production and Recycling. *World J. Biol. Pharm. Heal. Sci.* **2024**, 17 (2), 232–241. <https://doi.org/10.30574/wjbphs.2024.17.2.0081>.
- (2) Geyer, R.; Jambeck, J. R.; Law, K. L. Production, Use, and Fate of All Plastics Ever Made. *Sci. Adv.* **2017**, 3 (7), 25–29. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1700782>.
- (3) Tournier, V.; Duquesne, S.; Guillaumot, F.; Cramail, H.; Taton, D.; Marty, A.; André, I. Enzymes' Power for Plastics Degradation. *Chem. Rev.* **2023**, 123 (9), 5612–5701. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.2c00644>.
- (4) Cuttaz, E. A.; Bailey, Z. K.; Chapman, C. A. R.; Goding, J. A.; Green, R. A. Polymer Bioelectronics: A Solution for Both Stimulating and Recording Electrodes. *Adv. Healthc. Mater.* **2024**, 2304447, 1–16. <https://doi.org/10.1002/adhm.202304447>.
- (5) Luo, H.; Tyrrell, H.; Bai, J.; Ibrahim Muazu, R.; Long, X. Fundamental, Technical and Environmental Overviews of Plastic Chemical Recycling. *Green Chem.* **2024**. <https://doi.org/10.1039/D4GC03127J>.
- (6) Nielsen, T. D.; Hasselbalch, J.; Holmberg, K.; Stripple, J. Politics and the Plastic Crisis: A

- Review throughout the Plastic Life Cycle. *Wiley Interdiscip. Rev. Energy Environ.* **2020**, 9 (1), 1–18. <https://doi.org/10.1002/wene.360>.
- (7) Tan, J.; Jia, S.; Ramakrishna, S. Accelerating Plastic Circularity: A Critical Assessment of the Pathways and Processes to Circular Plastics. *Processes* **2023**, 11 (5), 20–22. <https://doi.org/10.3390/pr11051457>.
 - (8) Borrelle, S. B.; Ringma, J.; Law, K. L.; Monnahan, C. C.; Lebreton, L.; McGivern, A.; Murphy, E.; Jambeck, J.; Leonard, G. H.; Hilleary, M. A.; Eriksen, M.; Possingham, H. P.; De Frond, H.; Gerber, L. R.; Polidoro, B.; Tahir, A.; Bernard, M.; Mallos, N.; Barnes, M.; Rochman, C. M. Predicted Growth in Plastic Waste Exceeds Efforts to Mitigate Plastic Pollution. *Science* (80-.). **2020**, 369 (6510), 1515–1518. <https://doi.org/10.1126/science.aba3656>.
 - (9) Enache, A. C.; Grecu, I.; Samoila, P. Polyethylene Terephthalate (PET) Recycled by Catalytic Glycolysis: A Bridge toward Circular Economy Principles. *Materials (Basel)*. **2024**, 17 (12). <https://doi.org/10.3390/ma17122991>.
 - (10) Singh, N.; Walker, T. R. Plastic Recycling: A Panacea or Environmental Pollution Problem. *npj Mater. Sustain.* **2024**, 2 (1), 1–7. <https://doi.org/10.1038/s44296-024-00024-w>.
 - (11) Bertocchini, F.; Arias, C. F. Why Have We Not yet Solved the Challenge of Plastic Degradation by Biological Means? *PLoS Biol.* **2023**, 21 (3), e3001979. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3001979>.
 - (12) Lee, A.; Liew, M. S. Tertiary Recycling of Plastics Waste: An Analysis of Feedstock, Chemical and Biological Degradation Methods. *J. Mater. Cycles Waste Manag.* **2021**, 23 (1), 32–43. <https://doi.org/10.1007/s10163-020-01106-2>.
 - (13) Hiraga, K.; Taniguchi, I.; Yoshida, S.; Kimura, Y.; Oda, K. Biodegradation of Waste PET . *EMBO Rep.* **2019**, 20 (11), 1–5. <https://doi.org/10.15252/embr.201949365>.
 - (14) Abedsoltan, H. A Focused Review on Recycling and Hydrolysis Techniques of Polyethylene Terephthalate. *Polym. Eng. Sci.* **2023**, 63 (9), 2651–2674. <https://doi.org/10.1002/pen.26406>.
 - (15) Sambyal, P.; Najmi, P.; Sharma, D.; Khoshbakhti, E.; Hosseini, H.; Milani, A. S.; Arjmand, M. Plastic Recycling: Challenges and Opportunities. *Can. J. Chem. Eng.* **2024**, No. August, 1–37. <https://doi.org/10.1002/cjce.25531>.
 - (16) Al-Sabagh, A. M.; Yehia, F. Z.; Eshaq, G.; Rabie, A. M.; ElMetwally, A. E. Greener Routes for Recycling of Polyethylene Terephthalate. *Egypt. J. Pet.* **2016**, 25 (1), 53–64. <https://doi.org/10.1016/j.ejpe.2015.03.001>.
 - (17) Carniel, A.; Waldow, V. de A.; Castro, A. M. de. A Comprehensive and Critical Review on Key Elements to Implement Enzymatic PET Depolymerization for Recycling Purposes. *Biotechnol. Adv.* **2021**, 52 (July), 107811. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2021.107811>.
 - (18) 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*. *Macromol. Rapid Commun.* **2005**, 26 (17), 1400–1405. <https://doi.org/10.1002/marc.200500410>.
 - (19) Oda, K.; Wlodawer, A. Development of Enzyme-Based Approaches for Recycling PET on an Industrial Scale. *Biochemistry* **2024**. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.3c00554>.
 - (20) Carr, C. M.; Clarke, D. J.; Dobson, A. D. W. Microbial Polyethylene Terephthalate Hydrolases: Current and Future Perspectives. *Front. Microbiol.* **2020**, 11 (November 2020), 1–23. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.571265>.
 - (21) Bauer, T. L.; Buchholz, P. C. F.; Pleiss, J. The Modular Structure of α/β -Hydrolases. *FEBS J.* **2020**, 287 (5), 1035–1053. <https://doi.org/10.1111/febs.15071>.
 - (22) Lord, C. C.; Thomas, G.; Brown, J. M. Mammalian Alpha Beta Hydrolase Domain (ABHD) Proteins: Lipid Metabolizing Enzymes at the Interface of Cell Signaling and Energy Metabolism. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **2013**, 1831 (4), 792–802.

- <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2013.01.002>.
- (23) Filho, D. G.; Silva, A. G.; Guidini, C. Z. Lipases: Sources, Immobilization Methods, and Industrial Applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2019**, *103* (18), 7399–7423. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10027-6>.
 - (24) Chen, H.; Meng, X.; Xu, X.; Liu, W.; Li, S. The Molecular Basis for Lipase Stereoselectivity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2018**, *102* (8), 3487–3495. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8858-z>.
 - (25) Ribitsch, D.; Heumann, S.; Trotscha, E.; Herrero Acero, E.; Greimel, K.; Leber, R.; Birner-Gruenberger, R.; Deller, S.; Eiteljoerg, I.; Remler, P.; Weber, T.; Siegert, P.; Maurer, K. H.; Donelli, I.; Freddi, G.; Schwab, H.; Guebitz, G. M. Hydrolysis of Polyethyleneterephthalate by P-Nitrobenzylesterase from *Bacillus Subtilis*. *Biotechnol. Prog.* **2011**, *27* (4), 951–960. <https://doi.org/10.1002/btpr.610>.
 - (26) Castro, A. M. de; Carniel, A. A Novel Process for Poly(Ethylene Terephthalate) Depolymerization via Enzyme-Catalyzed Glycolysis. *Biochem. Eng. J.* **2017**, *124*, 64–68. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2017.04.011>.
 - (27) Qiu, J.; Chen, Y.; Zhang, L.; Wu, J.; Zeng, X.; Shi, X.; Liu, L.; Chen, J. A Comprehensive Review on Enzymatic Biodegradation of Polyethylene Terephthalate. *Environ. Res.* **2024**, *240* (P2), 117427. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2023.117427>.
 - (28) Orlando, M.; Molla, G.; Castellani, P.; Pirillo, V.; Torretta, V.; Ferronato, N. Microbial Enzyme Biotechnology to Reach Plastic Waste Circularity: Current Status, Problems and Perspectives. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24* (4). <https://doi.org/10.3390/ijms24043877>.
 - (29) Tournier, V.; Topham, C. M.; Gilles, A.; David, B.; Folgoas, C.; Moya-Leclair, E.; Kamionka, E.; Desrousseaux, M. L.; Texier, H.; Gavalda, S.; Cot, M.; Guémard, E.; Dalibey, M.; Nomme, J.; Cioci, G.; Barbe, S.; Chateau, M.; André, I.; Duquesne, S.; Marty, A. An Engineered PET Depolymerase to Break down and Recycle Plastic Bottles. *Nature* **2020**, *580* (7802), 216–219. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2149-4>.
 - (30) Wongsatit, T.; Srimora, T.; Kiattisewee, C.; Uttamapinant, C. Enzymes, Auxiliaries, and Cells for the Recycling and Upcycling of Polyethylene Terephthalate. *Curr. Opin. Syst. Biol.* **2024**, *38*, 100515. <https://doi.org/10.1016/j.coisb.2024.100515>.
 - (31) Carniel, A.; Valoni, É.; Nicomedes, J.; Gomes, A. da C.; Castro, A. M. de. Lipase from *Candida Antarctica* (CALB) and Cutinase from *Humicola Insolens* Act Synergistically for PET Hydrolysis to Terephthalic Acid. *Process Biochem.* **2017**, *59*, 84–90. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2016.07.023>.
 - (32) Świderek, K.; Velasco-Lozano, S.; Galmés, M.; Olazabal, I.; Sardon, H.; López-Gallego, F.; Moliner, V. Mechanistic Studies of a Lipase Unveil Effect of PH on Hydrolysis Products of Small PET Modules. *Nat. Commun.* **2023**, *14* (1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-39201-1>.
 - (33) Ion, S.; Voicea, S.; Sora, C.; Gheorghita, G.; Tudorache, M.; Parvulescu, V. I. Sequential Biocatalytic Decomposition of BHET as Valuable Intermediator of PET Recycling Strategy. *Catal. Today* **2021**, *366* (December 2019), 177–184. <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2020.08.008>.
 - (34) Brackmann, R.; de Oliveira Veloso, C.; de Castro, A. M.; Langone, M. A. P. Enzymatic Post-Consumer Poly(Ethylene Terephthalate) (PET) Depolymerization Using Commercial Enzymes. *3 Biotech* **2023**, *13* (5), 1–9. <https://doi.org/10.1007/s13205-023-03555-6>.
 - (35) Hwang, D. H.; Lee, M. E.; Cho, B. H.; Oh, J. W.; You, S. K.; Ko, Y. J.; Hyeon, J. E.; Han, S. O. Enhanced Biodegradation of Waste Poly(Ethylene Terephthalate) Using a Reinforced Plastic Degrading Enzyme Complex. *Sci. Total Environ.* **2022**, *842* (April), 156890. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.156890>.

- (36) Fernandez-Lafuente, R. Lipase from *Thermomyces Lanuginosus*: Uses and Prospects as an Industrial Biocatalyst. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2010**, *62* (3–4), 197–212. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2009.11.010>.
- (37) Skjold-Jørgensen, J.; Vind, J.; Svendsen, A.; Bjerrum, M. J. Altering the Activation Mechanism in *Thermomyces Lanuginosus* Lipase. *Biochemistry* **2014**, *53* (25), 4152–4160. <https://doi.org/10.1021/bi500233h>.
- (38) Eberl, A.; Heumann, S.; Brückner, T.; Araujo, R.; Cavaco-Paulo, A.; Kaufmann, F.; Kroutil, W.; Guebitz, G. M. Enzymatic Surface Hydrolysis of Poly(Ethylene Terephthalate) and Bis(Benzoyloxyethyl) Terephthalate by Lipase and Cutinase in the Presence of Surface Active Molecules. *J. Biotechnol.* **2009**, *143* (3), 207–212. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2009.07.008>.
- (39) Brzozowski, A. M.; Savage, H.; Verma, C. S.; Turkenburg, J. P.; Lawson, D. M.; Svendsen, A.; Patkar, S. Structural Origins of the Interfacial Activation in *Thermomyces (Humicola) Lanuginosa* Lipase. *Biochemistry* **2000**, *39* (49), 15071–15082. <https://doi.org/10.1021/bi0013905>.
- (40) Skjold-Jørgensen, J.; Vind, J.; Svendsen, A.; Bjerrum, M. J. Lipases That Activate at High Solvent Polarities. *Biochemistry* **2016**, *55* (1), 146–156. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.5b01114>.
- (41) Matte, C. R.; Bordinhaõ, C.; Poppe, J. K.; Rodrigues, R. C.; Hertz, P. F.; Ayub, M. A. Z. Synthesis of Butyl Butyrate in Batch and Continuous Enzymatic Reactors Using *Thermomyces Lanuginosus* Lipase Immobilized in Immobead 150. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2016**, *127*, 67–75. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2016.02.016>.
- (42) Matte, C. R.; Bussamara, R.; Dupont, J.; Rodrigues, R. C.; Hertz, P. F.; Ayub, M. A. Z. Immobilization of *Thermomyces Lanuginosus* Lipase by Different Techniques on Immobead 150 Support: Characterization and Applications. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2014**, *172* (5), 2507–2520. <https://doi.org/10.1007/s12010-013-0702-4>.
- (43) Park, J. Y.; Park, K. M. Lipase and Its Unique Selectivity: A Mini-Review. *J. Chem.* **2022**, 2022 (Figure 1). <https://doi.org/10.1155/2022/7609019>.
- (44) Abreu Silveira, E.; Moreno-Perez, S.; Basso, A.; Serban, S.; Pestana Mamede, R.; Tardioli, P. W.; Sanchez Farinas, C.; Rocha-Martin, J.; Fernandez-Lorente, G.; Guisan, J. M. Modulation of the Regioselectivity of *Thermomyces Lanuginosus* Lipase via Biocatalyst Engineering for the Ethanolysis of Oil in Fully Anhydrous Medium. *BMC Biotechnol.* **2017**, *17* (1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12896-017-0407-9>.
- (45) Remonato, D.; Miotti, R. H.; Monti, R.; Bassan, J. C.; de Paula, A. V. Applications of Immobilized Lipases in Enzymatic Reactors: A Review. *Process Biochem.* **2022**, *114* (December 2021), 1–20. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2022.01.004>.
- (46) Eugenio, E. de Q.; Campisano, I. S. P.; Dias, A. G.; Castro, A. M. de; Coelho, M. A. Z.; Langone, M. A. P. Novel Efficient Enzymatic Synthesis of the Key-Reaction Intermediate of PET Depolymerization, Mono(2-Hydroxyethyl Terephthalate) – MHET. *J. Biotechnol.* **2022**, *358* (September), 102–110. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2022.08.019>.
- (47) Palm, G. J.; Reisky, L.; Böttcher, D.; Müller, H.; Michels, E. A. P.; Walczak, M. C.; Berndt, L.; Weiss, M. S.; Bornscheuer, U. T.; Weber, G. Structure of the Plastic-Degrading *Ideonella Sakaiensis* MHETase Bound to a Substrate. *Nat. Commun.* **2019**, *10* (1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09326-3>.
- (48) Li, A.; Wu, L.; Cui, H.; Song, Y.; Zhang, X.; Li, X. Unlocking a Sustainable Future for Plastics: A Chemical-Enzymatic Pathway for Efficient Conversion of Mixed Waste to MHET and Energy-Saving PET Recycling. *ChemSusChem* **2024**, *17* (13). <https://doi.org/10.1002/cssc.202301612>.

8. ORIENTAÇÕES

Larissa Wielli Terrabuio – Iniciação Científica (Bolsa CNPq). Projeto: Estudo da degradação de pequenos oligômeros de PET mediada por lipase.

9. DISCIPLINAS MINISTRADAS E/OU ATIVIDADES DE EXTENSÃO

Participação do Comitê Técnico do LatinXChem, edição 2024. Monitora da categoria LatinXChemGreen, em parceria com Beyond Benign.

Avaliadora dos trabalhos apresentados do XXXVI Congresso de Iniciação Científica da Unesp. 2024. Instituto de Química – UNESP Araraquara.

10. COMENTÁRIOS DO ORIENTADOR

A avaliação do desempenho da Dra. Laíza Araujo de Almeida durante seu pós-doutorado pode ser considerada muito boa e satisfatória, conforme indicado pelos resultados apresentados no relatório final.

Pontos positivos:

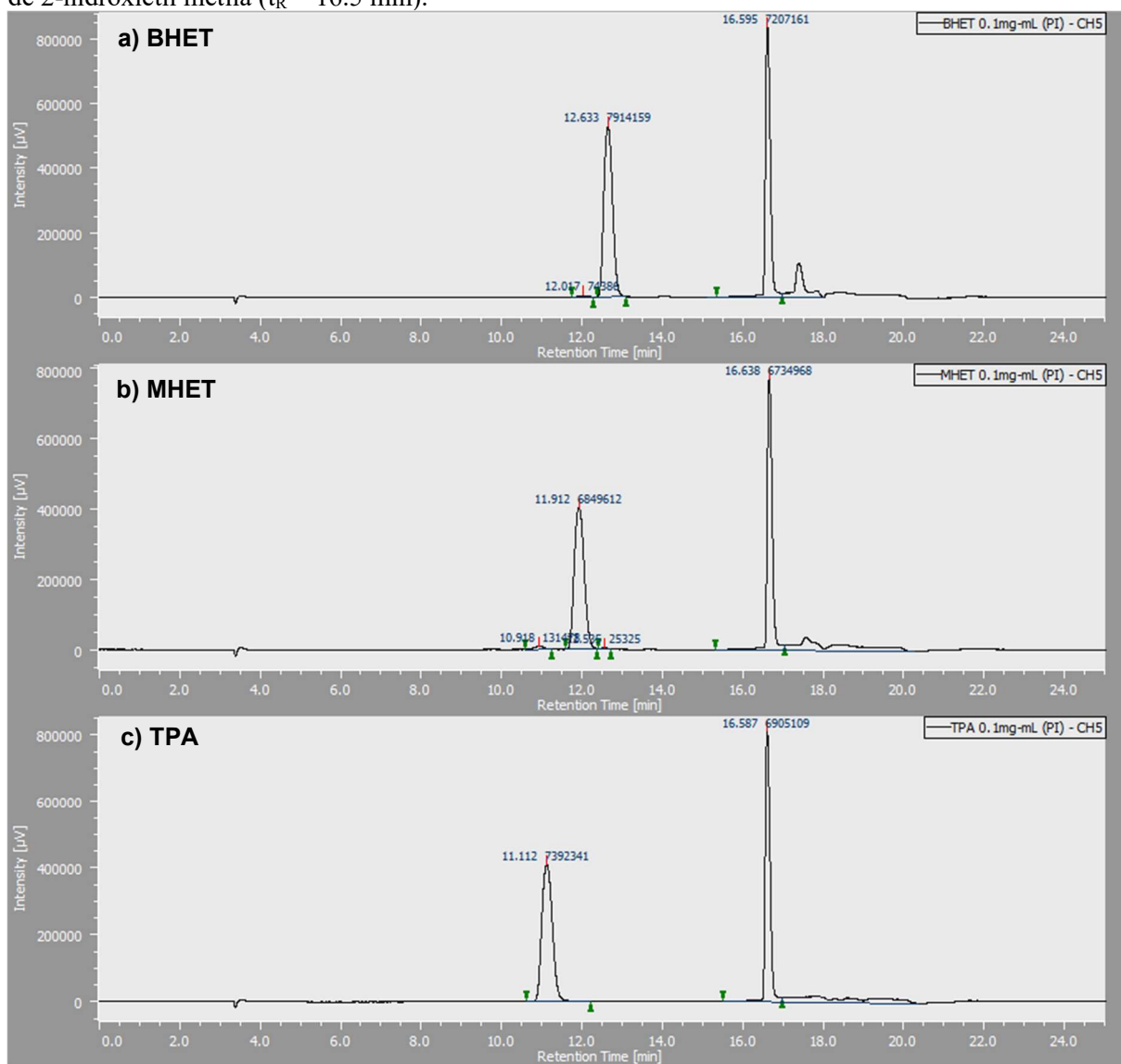
1. Pesquisa relevante e bem estruturada: O projeto abordou um tema atual e ambientalmente relevante, a degradação enzimática de intermediários de PET, utilizando lipases comerciais. O trabalho demonstra impacto potencial na sustentabilidade e na biotecnologia industrial.
2. Resultados significativos: O estudo identificou a lipase de *Thermomyces lanuginosus* imobilizada (TIL-150) como um biocatalisador promissor, alcançando conversões superiores a 90% na hidrólise de BHET para MHET. A enzima também manteve sua atividade catalítica por 10 ciclos consecutivos, indicando robustez e potencial de escalonamento.
3. Otimização do processo: Foram conduzidos experimentos para aprimorar a reação enzimática, com ajustes na temperatura, pH e quantidade de enzima. A otimização levou a uma maior eficiência e seletividade do biocatalisador.
4. Métodos analíticos bem estabelecidos: O estudo utilizou CLAE e RMN para caracterização dos produtos, garantindo rigor científico e confiabilidade nos dados obtidos.

5. Contribuição para a literatura científica: O trabalho se insere em um contexto de inovação na reciclagem enzimática de plásticos e pode servir de base para futuras pesquisas e desenvolvimento de soluções mais sustentáveis para a degradação de PET.

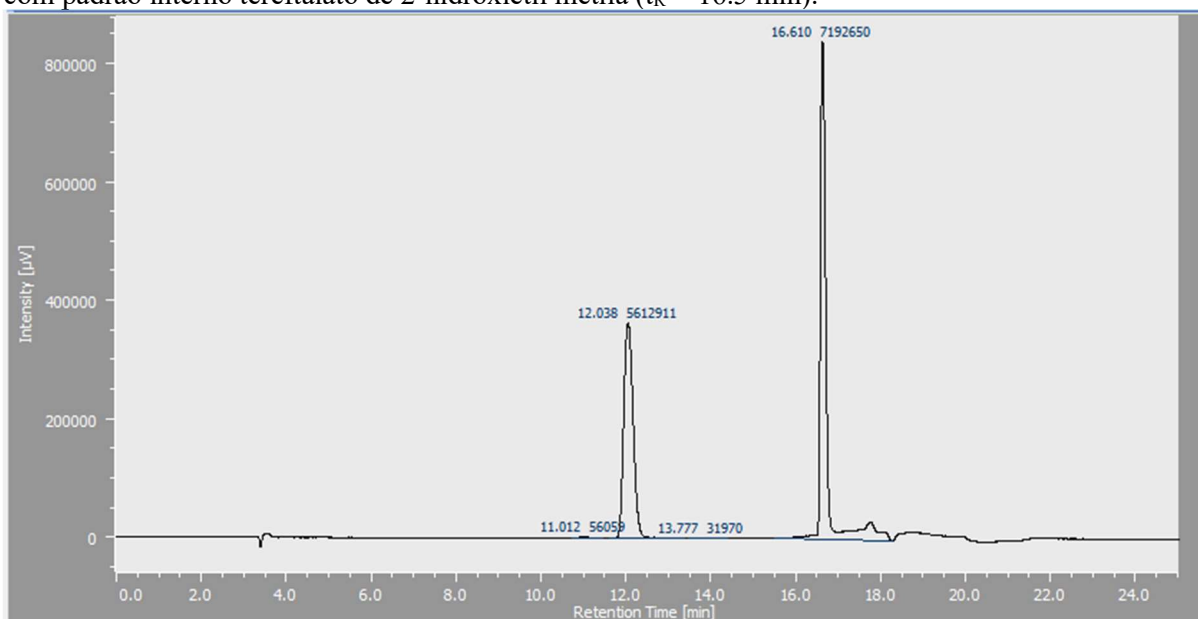
A Dra. Laíza Araujo de Almeida demonstrou bom desempenho no desenvolvimento de seu projeto de pós-doutorado, apresentando um estudo bem fundamentado, com resultados relevantes e promissores para a área de biocatálise aplicada à degradação de plásticos.

ANEXOS

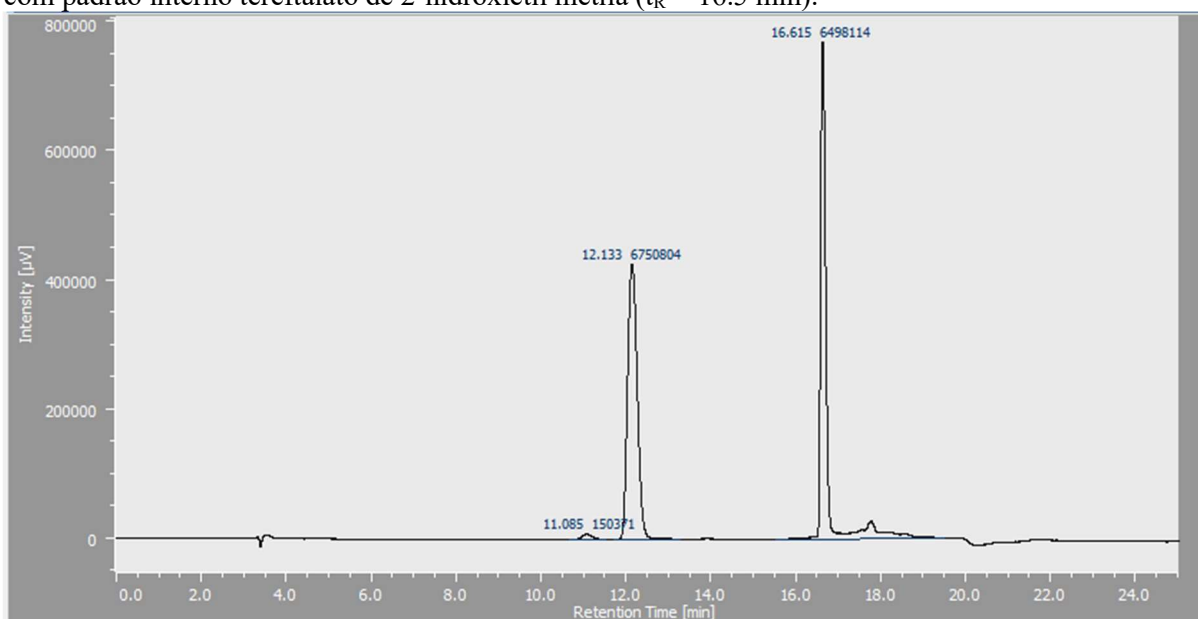
A1. Análises de CLAE dos compostos BHET (a), MHET (b) e TPA (c) com padrão interno tereftalato de 2-hidroxi-etil metila ($t_R = 16.5$ min).



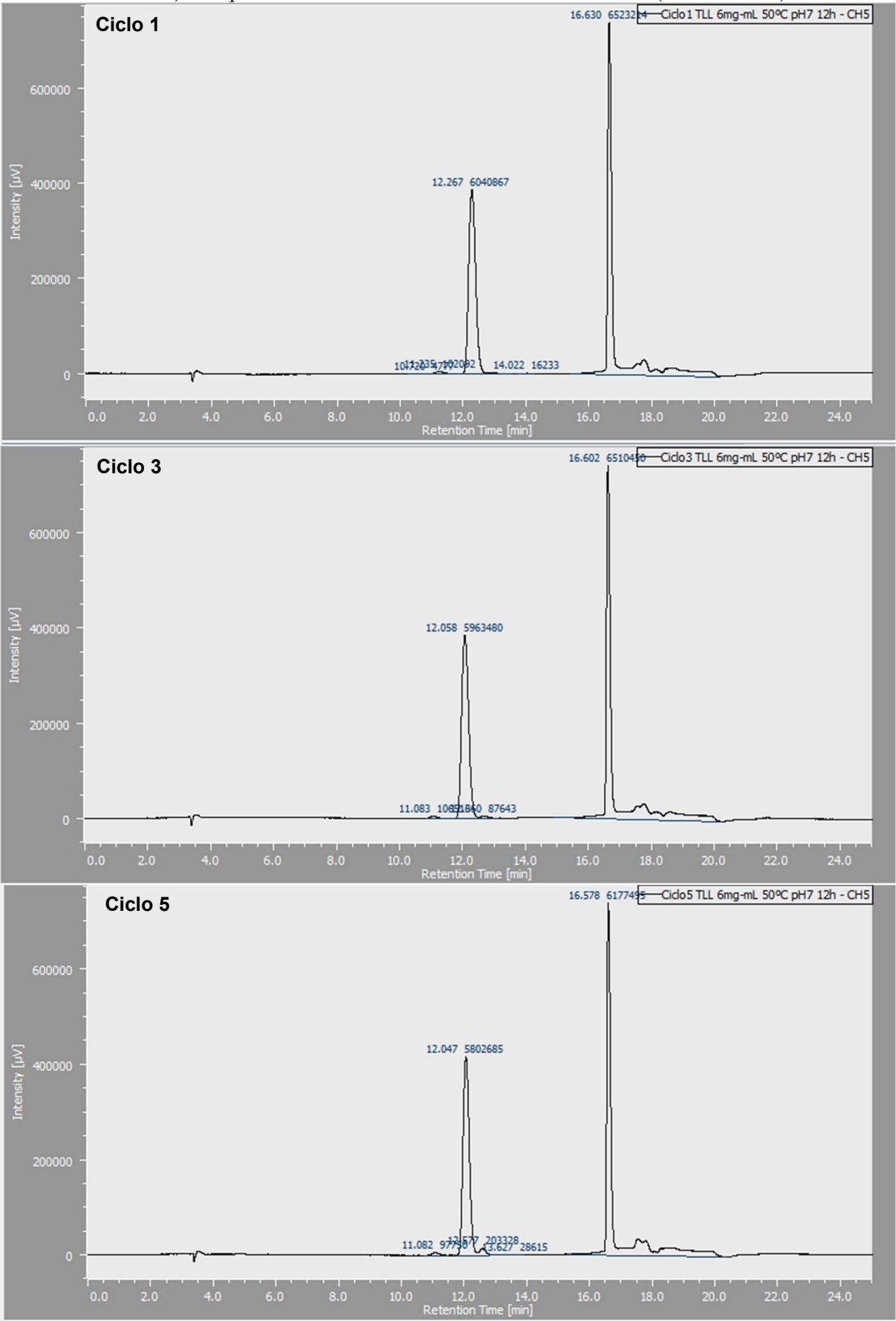
A2. Análise de CLAE da hidrólise de BHET catalisada por TIL-150 (40 °C, 6 mg mL⁻¹ de enzima, 24 h) com padrão interno tereftalato de 2-hidroxietil metila ($t_R = 16.5$ min).

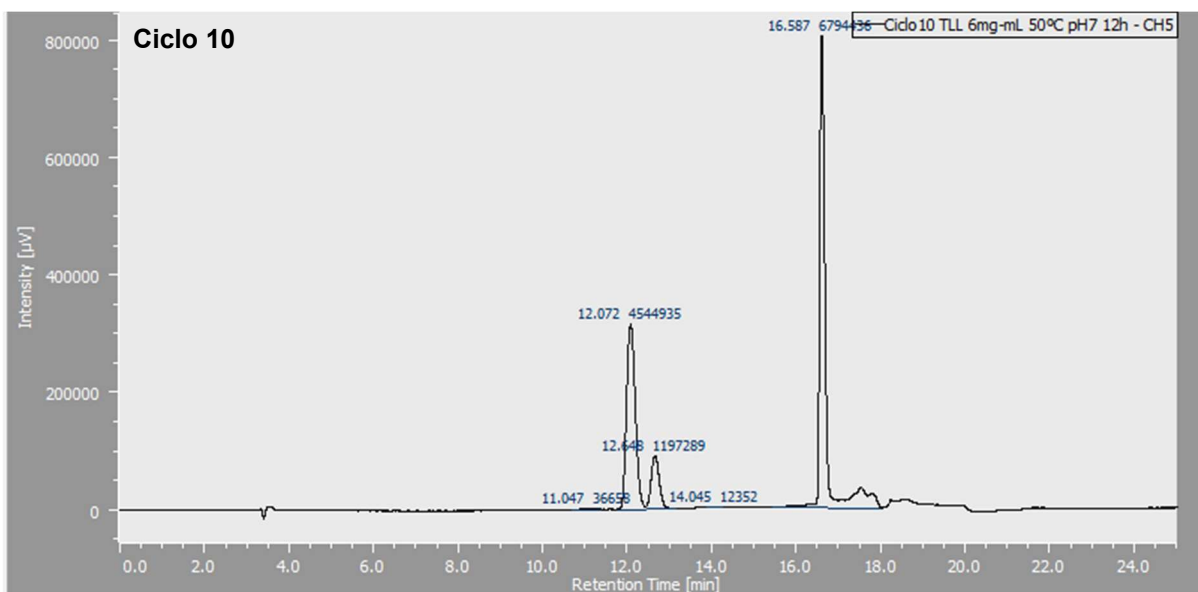


A3. Análise de CLAE da hidrólise de BHET catalisada por TIL-150 (50 °C, 6 mg mL⁻¹ de enzima, 12 h) com padrão interno tereftalato de 2-hidroxietil metila ($t_R = 16.5$ min).



A4. Análises de CLAE do reciclo de TIL-150 na hidrólise de BHET (50 °C, 6 mg mL⁻¹ de enzima, 12 h cada ciclo reacional) com padrão interno tereftalato de 2-hidroxi-etil metila ($t_R = 16.5$ min).





A5. Análise de CLAE da hidrólise em larga escala de BHET catalisada por TIL-150 (50 °C, 6 mg mL⁻¹ de enzima, 12 h) com padrão interno tereftalato de 2-hidroxiethyl metila (t_R = 16.5 min).

