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

THAYS ANDRÉA NOGUEIRA LOPES

Degradação enzimática de polietileno tereftalato (PET):
o efeito do pré-tratamento com solventes mais verdes

Araraquara
2024

THAYS ANDRÉA NOGUEIRA LOPES

DEGRADAÇÃO ENZIMÁTICA DE POLIETILENO TEREFTALATO (PET):

o efeito do pré-tratamento com solventes mais verdes

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Química, Araraquara, para obtenção do título de Bacharel em Química.

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

Araraquara

2024

L864d

Lopes, Thays Andréa Nogueira
Degradação enzimática de polietileno tereftalato (PET) : o efeito do pré-tratamento com solventes mais verdes / Thays Andréa Nogueira Lopes. -- Araraquara, 2024
44 f. : il.

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Química) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Química, Araraquara
Orientadora: Cíntia Duarte de Freitas Milagre

1. Polietileno tereftalato. 2. Polímeros - Deterioração. 3. Sustentabilidade. 4. Biocatálise. 5. Química verde. I. Título.

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

THAYS ANDRÉA NOGUEIRA LOPES

DEGRADAÇÃO ENZIMÁTICA DE POLIETILENO TEREFTALATO (PET):

o efeito do pré-tratamento com solventes mais verdes

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Universidade Estadual Paulista (UNESP) Instituto de Química, Araraquara, para obtenção do título de Bacharel em Química.

Data da defesa: 25/11/2024

Banca Examinadora:

Documento assinado digitalmente
gov.br
CINTIA DUARTE DE FREITAS MILAGRE
Data: 04/12/2024 08:52:48-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

_____

Prof.ª Dra. Cíntia Duarte de Freitas Milagre

Documento assinado digitalmente
gov.br
LIDIANE GASPARETO FELIPPE
Data: 05/12/2024 09:29:54-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

_____

Dra. Lidiane Gaspareto Felippe

Documento assinado digitalmente
gov.br
ANDRE HENRIQUE BARALDI DOURADO
Data: 04/12/2024 11:17:16-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

_____

Prof. Dr. André Henrique Baraldi Dourado

Dedico este trabalho ao meu querido irmão Thiago. Espero um dia ser sua inspiração, mas saiba que, até agora, você tem sido a minha.

AGRADECIMENTOS

Neste momento de reflexão, expresso minha profunda gratidão a todos que me apoiaram ao longo da minha trajetória. Agradeço ao Instituto de Química da UNESP Araraquara pela acolhida e infraestrutura que possibilitaram meu desenvolvimento. Um agradecimento especial à minha orientadora, Profª Dra. Cíntia Milagre, pela oportunidade de fazer parte do seu grupo, paciência e valiosos conselhos, que sempre levarei comigo.

Agradeço também ao Milagre Lab., que se tornou uma segunda família para mim. Meu sincero agradecimento a todos que me incentivaram e apoiaram durante essa caminhada, especialmente a Laiza e Laerte. Além disso, agradeço às agências de fomento que viabilizaram a infraestrutura necessária para o grupo, como a FAPESP, o projeto “Oceanos Livres de Plástico: Degradação Enzimática de PET” - Processo N° 408711/2022-1, e ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), e à Pró-Reitoria de Pesquisa (PROPe) da UNESP pela bolsa de Iniciação Científica que possibilitou o desenvolvimento deste trabalho. Ao meu coorientador e querido amigo Victor Cavalcanti por todo carinho, palavras de incentivo, paciência e toda confiança direcionada a mim desde a minha primeira reação.

À minha família, por todo o apoio e incentivo que me impulsionaram a seguir meus sonhos e superar cada obstáculo ao longo do caminho. Aos meus irmãos, fonte constante de inspiração e alegria, que me mostram, o quanto também os inspiro. Ao meu pai por sempre ter incentivado minha curiosidade. E à minha mãe e às minhas avós, mulheres guia da nossa família, que, com seu exemplo de força, me elevaram e extraíram o melhor de mim, fortalecendo-me em cada passo.

Ao meu parceiro, Diego, que esteve ao meu lado durante esses quatro anos, apoiando, incentivando e me lembrando de que sou capaz de alcançar qualquer sonho, sem você, esta jornada teria sido muito mais desafiadora.

Aos amigos preciosos que fiz ao longo dessa caminhada: Gabrielly, minha amiga-irmã, sempre pronta para o que der e vier; Diogo, pela paciência em responder às minhas inúmeras dúvidas; e aos queridos Lucas e Luisa, que espero ter ao meu lado sempre.

Por fim, a essa força do universo que me move e me possibilitou várias oportunidades. A todos, meu sincero obrigado.

RESUMO

Os plásticos são amplamente utilizados devido ao seu baixo custo, leveza e durabilidade, mas sua baixa degradabilidade leva à acumulação de resíduos, que representam 85% do lixo nos oceanos, impactando ecossistemas e contribuindo para mudanças climáticas. Entre esses plásticos, o PET (polietileno tereftalato) é um dos mais utilizados, sendo gerenciado principalmente por aterros, incineração e reciclagem, embora esses métodos não sejam ideais ambiental e economicamente. Um método promissor é a biodegradação enzimática, que degrada o PET até seus monômeros. Este estudo investigou diferentes métodos de pré-tratamento do PET que visam modificar sua superfície e reduzir a cristalinidade para facilitar a biodegradação. Utilizando duas matrizes — um filme PET da Sigma-Aldrich e uma garrafa PET pós-consumo — avaliamos o potencial de diferentes solventes para o pré-tratamento. Entre os solventes testados, a solução de NaOH 1,4 mol. L^{-1} (1:1 H_2O/ EtOH) foi mais eficaz e ambientalmente promissora, capaz de transformar o PET em ácido tereftálico (TPA) e outros oligômeros. Esse pré-tratamento, aliado a reações com a variante ssH218SF243T da enzima LCC (Leaf and Branch compost cutinase), aumentou o rendimento de despolimerização em até 9,6 vezes em reações de 48 horas e 2 vezes em 90 horas. O projeto se alinha aos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável 9, 12 e 14 da Agenda 2030 da ONU, promovendo um manejo sustentável de resíduos plásticos e a preservação ambiental.

Palavras-chave: polietileno tereftalato (PET); polímeros-degradação; sustentabilidade; biocatálise; química verde.

ABSTRACT

Plastics are widely used due to their low cost, lightweight, and durability, but their low degradability leads to the accumulation of waste, which accounts for 85% of the trash in the oceans, impacting ecosystems and contributing to climate change. Among these plastics, PET (polyethylene terephthalate) is one of the most widely used, primarily managed through landfills, incineration, and recycling, although these methods are not ideal environmentally or economically. A promising method is enzymatic biodegradation, which degrades PET into its monomers. This study investigated different PET pre-treatment methods aimed at modifying its surface and reducing crystallinity to facilitate biodegradation. Using two matrices — a PET film from Sigma-Aldrich and a post-consumer PET bottle — we evaluated the potential of different solvents for pre-treatment. Among the solvents tested, the 1.4 mol. L^{-1} $NaOH_{(aq)}$ (1:1 H_2O/EtOH) was the most effective and environmentally promising, capable of transforming PET into terephthalic acid (TPA) and other oligomers. This pre-treatment, combined with reactions using the variant enzyme ssH218SF243T of the enzyme LCC (Leaf and Branch compost cutinase), increased the depolymerization yield by up to 9.6 times in 48-hour reactions and by 2 times in 90-hour reactions. The project aligns with Sustainable Development Goals 9, 12, and 14 of the UN 2030 Agenda, promoting sustainable plastic waste management and environmental preservation.

Keywords: polyethylene terephthalate (PET); polymer-degradation; sustainability; biocatalysis; green chemistry.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 10
1.1 PLÁSTICOS 10
1.1.1 Produção e Gestão 10
1.1.2 Tipos de plásticos 11
1.2 POLIETILENO TEREFTALATO (PET) 12
1.2.1 Destinos do PET 13
1.3 DEGRADAÇÃO ENZIMÁTICA 14
1.3.1 Enzimas 14
1.3.2 Pré-tratamento 16
2 OBJETIVOS 16
2.1 OBJETIVO GERAL 16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 17
3 PARTE EXPERIMENTAL 17
3.1 MATERIAIS 17
3.2 ESTRATÉGIAS PARA O PRÉ-TRATAMENTO 18
3.3 REAÇÕES ENZIMÁTICAS 18
3.3.2 Pré-tratamento para reações enzimáticas 18
3.4 MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO 19
4 RESULTADOS 21
4.1 ESTUDO DO PRÉ-TRATAMENTO 21
4.1.1 Caracterização das amostras antes do pré-tratamento 21
4.1.2 Pré-tratamento: Alterações macroscópicas 25
4.1.2.1 Pré-tratamento: caracterização 27
4.1.3 Otimização do pré-tratamento para reações enzimáticas 33
4.2 ESTUDOS ENZIMÁTICOS 34
4.2.1 Atividade enzimática 34
4.2.2 Reações Enzimáticas 36
5 CONCLUSÃO 38
REFERÊNCIAS 39
APÊNDICE A – Cromatogramas das reações enzimáticas 42
ANEXO A – Curvas de calibração 45

1 INTRODUÇÃO

1.1 PLÁSTICOS

Os plásticos são uma categoria de polímeros, que são macromoléculas compostas pela repetição de unidades menores chamadas monômeros, unidas por ligações covalentes (Mano e Mendes,1999). Essa estrutura molecular confere aos plásticos a versatilidade necessária para serem moldados em diferentes formas e tamanhos, tornando-os adequados para uma ampla gama de aplicações no cotidiano.

Desde sua primeira síntese em 1862, por Alexander Parkes, os plásticos passaram por uma trajetória de evolução marcante, consolidando-se no mercado na década de 1950, especialmente no setor de alimentos e bebidas. Suas características, como baixo custo, leveza, transparência, estabilidade a estresses térmicos, químicos e mecânicos, além de sua maleabilidade, fizeram dos plásticos um recurso indispensável, não apenas em embalagens, mas também em tecnologias cruciais para a sociedade (Millican e Agarwal, 2021).

O impacto dos plásticos pode ser observado em diversas áreas, desde a microeletrônica até a segurança alimentar e hídrica, passando pela saúde e segurança da população. O material é amplamente aplicado em setores como construção civil, elétrica, eletrônica e transportes, proporcionando versatilidade e, muitas vezes, reduções econômicas em comparação a outros materiais mais tradicionais, como metais ou vidro (Klemes, Fan e Jiang, 2020).

Contudo, ao longo de sua evolução, os plásticos foram projetados com foco no desempenho funcional, sem a devida consideração para sua degradabilidade e reciclabilidade. A alta resistência dos plásticos à decomposição faz com que sua permanência no ambiente seja prolongada, podendo levar até 1000 anos para se degradar na natureza (Ritchie e Roser, 2018).

Essa durabilidade, que inicialmente foi vista como uma vantagem, tornou-se um problema global. O uso excessivo e a gestão inadequada dos resíduos plásticos têm resultado em elevados níveis de acumulação no ambiente, causando sérias ameaças aos ecossistemas e à saúde dos seres vivos. Hoje, os plásticos representam um dos maiores desafios ambientais, sendo urgente a necessidade de soluções sustentáveis para mitigar seu impacto negativo.

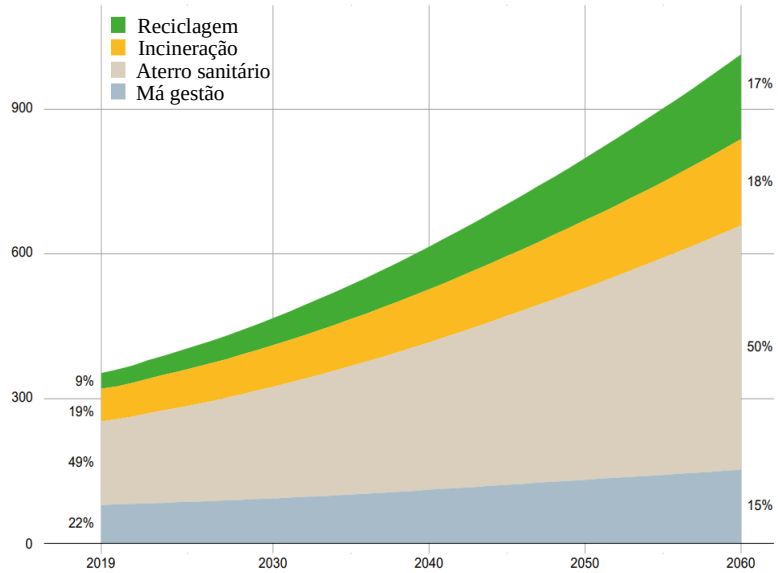
1.1.1 Produção e Gestão

A produção global de plásticos aumentou significativamente desde a década de 1950, totalizando cerca de 9,2 bilhões de toneladas até 2017, com uma média anual de 400 milhões de toneladas. Projeções apontam que esse número deve alcançar 550 milhões de toneladas até 2030, tornando os plásticos um dos materiais sintéticos mais consumidos mundialmente, devido à crescente demanda e suas diversas aplicações industriais (Atlas do Plástico, 2021; Tournier et al., 2023).

O relatório *Global Plastics Outlook: Policy Scenarios to 2060* sugere que, na ausência de políticas mais rigorosas, a produção global de plásticos poderá quase triplicar até 2060. Esse crescimento será impulsionado principalmente pelo aumento populacional e pelo crescimento econômico mundial.

Estudos de Geyer, Jambeck e Law (2017) mostram que apenas 9% dos plásticos produzidos foram reciclados, com a maior parte sendo incinerada, descartada em aterros ou no meio ambiente, onde representam 85% dos resíduos que chegam aos oceanos, impactando severamente os ecossistemas marinhos, conforme o Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente (PNUMA, 2021). Embora espere-se que as taxas de reciclagem aumentem de 9% em 2019 para 17% em 2060, a reciclagem ainda ficará atrás de outras formas de gestão de resíduos, como incineração (18%) e aterros sanitários (50%) (Figura 1).

Figura 1 - Projeção Global da Gestão de Resíduos Plásticos até 2060.



Fonte: Adaptado de OCDE (2022). Milhões de toneladas (eixo esquerdo).

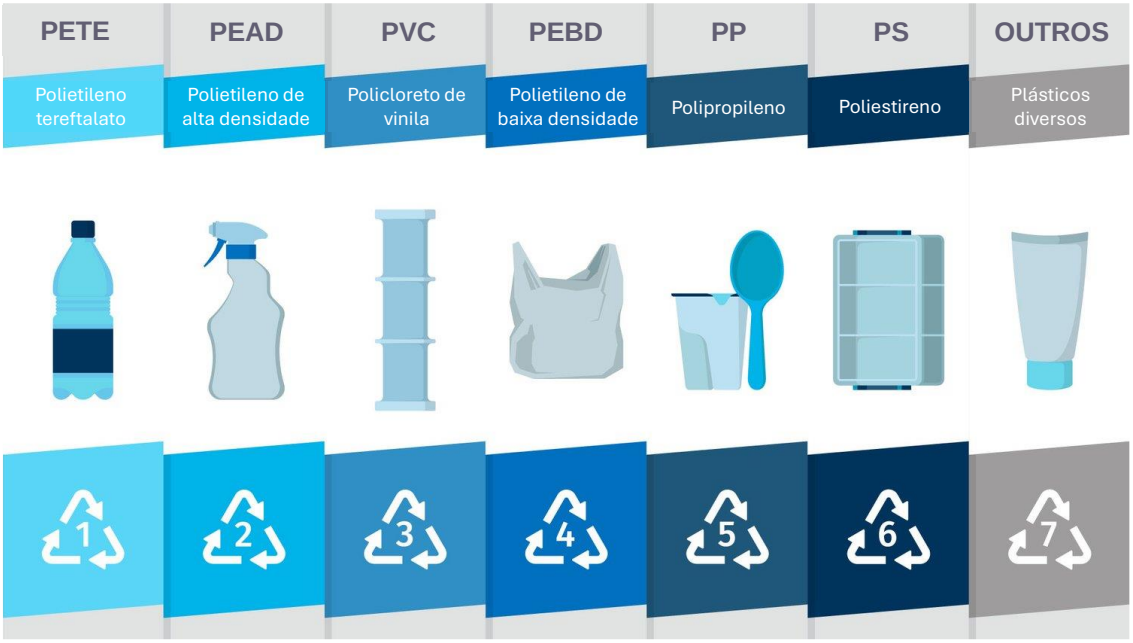
1.1.2 Tipos de plásticos

Os plásticos, além de se distinguirem por sua composição e estrutura, podem

ser classificados de acordo com sua origem e biodegradabilidade. Estima-se que cerca de 90% deles sejam derivados de petróleo e não biodegradáveis, a produção dessas resinas derivadas de petróleo gerou cerca de 2,24 gigatoneladas de dióxido de carbono em 2019, representando 5,3% do total de emissões globais de gases de efeito estufa (GEE), contribuindo para mudanças climáticas (NIHAN, K. et al. 2024).

A classificação dos plásticos é feita pelo Código de Identificação de Resina (RIC, do inglês *Resin Identification Code*), criado pela Sociedade Industrial de Plásticos em 1988, e atualmente gerido pela Sociedade Americana de Testes e Materiais (ASTM). Este sistema, que facilita o processo de reciclagem, utiliza um código numérico de 1 a 7 (Figura 2). Os números de 1 a 6 correspondem aos plásticos mais comumente usados como material principal nos produtos, enquanto o número 7 abrange todos os outros polímeros ou misturas (ASTM, 2020).

Figura 2 - Classificação dos plásticos pela identificação do código RIC.



Fonte: Adaptado de Sustainability (2022).

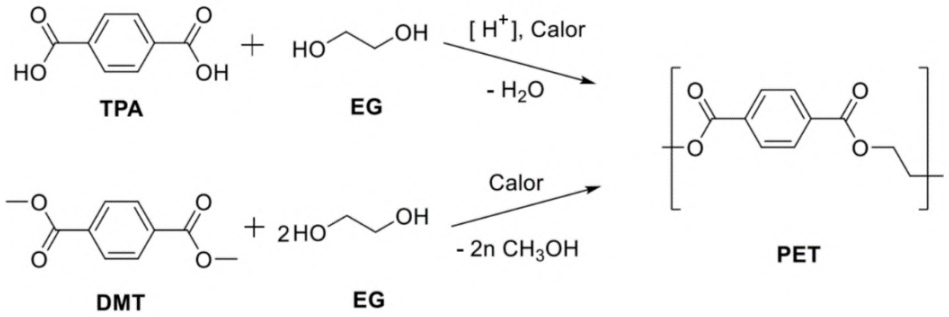
1.2 POLIETILENO TEREFTALATO (PET)

Dentre os principais tipos de plásticos, destaca-se o PET (polietileno tereftalato), um termoplástico. Os termoplásticos são materiais que podem ser moldados e remoldados quando aquecidos, sem sofrer alterações químicas.

O PET é um poliéster aromático, semicristalino, incolor e higroscópico, com resistência a desgastes e trações, que representa aproximadamente 18% da produção mundial de polímeros. Ele é sintetizado por meio da policondensação dos

monômeros ácido tereftálico (TPA) e etilenoglicol (EG), ou pela transesterificação do dimetiltereftalato (DMT) com EG (Figura 3). Essa estrutura química confere ao PET elevada resistência mecânica, excelentes propriedades de barreira contra gases e um alto nível de claridade óptica. Essas características justificam seu uso predominante na fabricação de embalagens, como garrafas e filmes, além de sua aplicação em fibras têxteis, como na produção de roupas e carpetes (Koshti, Mheta e Samarth, 2018; Tournier et al., 2023).

Figura 3 - Rotas para a síntese do PET – polietileno tereftalato



Fonte: elaborado pelo autor (2024).

1.2.1 Destinos do PET

Em 2020, foram consumidas cerca de 7.297 toneladas de resina PET virgem, dos quais apenas 23% foram reciclados em fibras, chapas, filmes e garrafas. O restante foi descartado, sendo 42% destinado a aterros sanitários e 35% incinerados (Duan, et al. 2024). Esses métodos de descarte do PET são prejudiciais tanto para o meio ambiente quanto para a economia. Os aterros sanitários requerem grandes áreas e são de alto custo, enquanto a incineração libera gases tóxicos e cinzas (Benyathiar, et al. 2022).

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, entretanto este método não garante a mesma qualidade do PET virgem diminuindo propriedades físico-químicas, como a ductibilidade do material reprocessado.

Na reciclagem química diferentes processos químicos podem ser usados para a degradação do PET, incluindo glicólise, metanólise e hidrolise (básica ou ácida),

este último é o único processo que produz TPA e EG, os monômeros para gerar novos polímeros de PET, no entanto, envolvem reagentes de fontes não renováveis e elevadas temperaturas e pressão.

A reciclagem biológica - mais conhecida como degradação enzimática do PET - realiza hidrólise das ligações de ésteres do PET através de enzimas até suas formas monoméricas e oligoméricas proporcionando uma economia circular, considerada uma das dez principais tecnologias emergentes em química de 2023 pela União internacional de Química Pura e Aplicada (UIPAC) (Koshti, Mheta e Samarth, 2018) (Benyathiar, et al., 2022).

1.3 DEGRADAÇÃO ENZIMÁTICA

A reciclagem via biocatálise é definida como a utilização de componentes biologicamente ativos, como enzimas, para catalisar transformações dos substratos de interesse (Tournier, et al., 2023). Este processo é atrativo tanto do ponto de vista ambiental quanto econômico, pois ocorre sob condições brandas de temperatura e pressão, utilizando catalisadores adaptáveis. As enzimas empregadas são provenientes de fontes renováveis, atóxicas e biodegradáveis, tornando a reciclagem do PET viável para a recuperação de seus monômeros, que podem ser reutilizados na síntese de novos PET ou outros compostos de interesse comercial. (Khairul Anuar, et al., 2022).

Em contraste a outros métodos de reciclagem, a degradação enzimática oferece uma rota de reciclagem mais seletiva permitindo a obtenção de monômeros de alta pureza. Isso reduz a necessidade de materiais virgens, contribuindo para uma economia circular e diminuindo as emissões de carbono associadas à produção de novos plásticos. Essa abordagem biotecnológica também pode ser expandida para lidar com outros tipos de plásticos além do PET (BUCHHOLZ, et al., 2022).

1.3.1 Enzimas

Nas últimas duas décadas, diversas enzimas foram relatadas para a despolimerização do PET, com 72 estruturas listadas no Protein Data Bank (PDB). 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 Os números EC (Enzyme Commission) atribuídos a essas enzimas representam a classificação oficial definida pelo Comitê de Nomenclatura da União Internacional de Bioquímica e Biologia

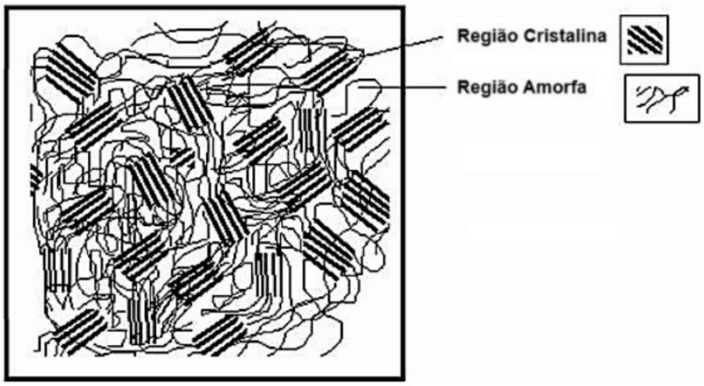
Molecular (NC-IUBMB). Nessa nomenclatura, o primeiro dígito indica a classe da enzima, enquanto os números subsequentes detalham suas subclasses.

A enzima Leaf-branch Compost Cutinase (LCC), uma cutinase termofílica classificada como EC 3.1.1.74, é capaz de catalisar a hidrólise de ésteres solúveis em água, triacilgliceróis emulsionados de cadeias curtas e longas, além de poliésteres sintéticos como o polietileno tereftalato (PET). Durante a hidrólise do PET, essa enzima atua sobre as ligações éster, promovendo a degradação em intermediários como bis(2-hidroxietil) tereftalato (BHET) e mono(2-hidroxietil) tereftalato (MHET), além dos monômeros ácido tereftálico (TPA) e etilenoglicol (EG), que são os principais produtos acumulados no processo de degradação do PET.

A LCC se destaca pela capacidade de atuar em altas temperaturas, sendo ideal para estudar a degradação de PET, pois opera em uma faixa de temperatura próxima à temperatura de transição vítrea do polímero. (Thomsen; Hunt; Meyer, 2022; Tournier, et al., 2023). Considerar a faixa de temperatura de transição vítrea do PET é crucial, pois a cristalinidade do material é um dos fatores limitantes nos avanços da degradação enzimática.

Como mencionado anteriormente, o PET é um polímero semicristalino, com uma morfologia composta por regiões amorfas e domínios cristalinos (Figura 4). As regiões cristalinas dificultam a acessibilidade das enzimas, que se limitam à hidrólise às regiões amorfas. Isso reduz o rendimento da despolimerização do PET, dificultando a aplicação comercial desse processo (Giraldo-Narcizo, Guenani, Sánchez-Pérez e Guerrero 2022).

Figura 4 – Representação esquemática da resina de PET semicristalina.



Fonte: Adaptado de Boyer (1975).

Outro fator que dificulta o desenvolvimento da reação enzimática é ela ocorrer em uma interface sólido/líquido, uma vez que o PET é insolúvel em água. Para melhorar

essa superfície de interação, é necessário aprimorar as características físicas do substrato, neste caso o PET. Partículas mais finas proporcionam uma maior interação enzima-substrato, o que aumenta a cinética de despolimerização e melhora o rendimento da reação (Soong, Sobkowicz e Xie, 2022).

1.3.2 Pré-tratamento

Adicionalmente à necessidade de desenvolver sistemas mais eficientes e catalisadores robustos, é desejável criar processos disruptivos na superfície do PET visando diminuir o grau de organização do polímero, aumentar sua solubilidade para iniciar a despolimerização, transformando o polímero em oligômeros para que as enzimas possam atuar mais facilmente nas estruturas poliméricas e acelerar a biodegradação.

No entanto, a solubilização do PET que atende aos critérios ambientais é desafiadora porque sofre com altos requisitos de energia, envolvem tratamentos complexos e os solventes comumente usados para a sua solubilização são altamente tóxicos, provenientes da plataforma petroquímica não renovável e/ou geram resíduos difíceis de tratar. (Giraldo-Narcizo, et al., 2022).

Portanto, desenvolver uma metodologia de pré-tratamento atrelada à hidrolise enzimática que esteja alinhado com os princípios da química verde especialmente o princípio 5 – uso de solventes auxiliares mais seguros; 6 – eficiência energética e 12 – química segura, oferece uma oportunidade para fechar o ciclo da economia circular do PET. Tal abordagem promove sustentabilidade ao oferecer uma solução eficiente para o tratamento de resíduos plásticos acumulados no meio ambiente, colaborando diretamente para o cumprimento dos Objetivos do Desenvolvimento Sustentável (ODS) da Agenda 2030 propostos pela Organização das Nações Unidas (ONU).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver um processo de pré-tratamento de polietileno tereftalato (PET) utilizando solventes, promovendo uma abordagem sustentável e alinhada aos princípios da química verde, com o objetivo de reduzir o impacto ambiental e viabilizar sua aplicação em processos de degradação enzimática subsequentes. E avaliar a

eficácia do pré-tratamento ao comparar a eficiência de degradação enzimática do PET antes e após a aplicação desse tratamento.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Selecionar e triar solventes eficientes para a solubilização do PET;
- Desenvolver uma metodologia de pré-tratamento que respeite os princípios da química verde;
- Ajustar a metodologia de pré-tratamento visando sua posterior aplicação em processos enzimáticos;
- Avaliar a eficiência do pré-tratamento em reações enzimáticas para otimização do processo de degradação;
- Contribuir para o cumprimento das metas de desenvolvimento sustentável (ODS) propostas pela ONU, especialmente os ODS 9 (Indústria, Inovação e Infraestrutura), 12 (Consumo e Produção Responsáveis) e 14 (Vida na Água).

3 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 MATERIAIS

Foram selecionadas duas matrizes um filme de PET, adquirido comercialmente junto a empresa Sigma-Aldrich® com as seguintes características: transparência, baixa orientação (amorfo) e espessura de 0,25 mm utilizado como padrão e uma garrafa de PET pós-consumo, adquiridas em um mercado local, da marca Nestlé, contendo o Código de Identificação de Resina (RIC) 1. Essas amostras foram recordas em quadrados e pesadas em balança analítica de 4 casas decimais.

Os reagentes utilizados para esta pesquisa foram adquiridos junto à empresa Sigma-Aldrich®. O reagente, padrão analítico mono(2-hidroxietil) tereftalato foi adquirido junto à empresa TCI America®. A enzima LCC variante ssH218SF243T utilizada foi produzida no Laboratório Milagre a partir do plasmídeo fornecido pelo Prof. Dr. Romas J. Kazlauskas, da Universidade de Minessota – EUA, e expressão heteróloga em *E. coli*. As soluções tampão utilizadas para as reações enzimáticas foram: tampão fosfato de potássio 100mM, pH 8,00 e tampão fostato de potássio 100mM pH 2,5 20% dimetilsulfóxido (DMSO) (grau HPLC), preparados com água Milli-Q®, fosfato dibásico de potássio, fosfato monobásico de potássio e ácido fosfórico.

3.2 ESTRATÉGIAS PARA O PRÉ-TRATAMENTO

Amostras de aproximadamente 23 mg foram submetidas a diferentes pré-tratamentos em soluções de $NaOH_{(aq)}$ 10 mol. L^{-1}, NaOH 1,4 mol. L^{-1} (1:1 etanol/água) e no solvente orgânico cireno. As amostras foram colocadas em microtubos contendo 1 mL das respectivas soluções e mantidas por 24 horas a 70°C, em um termomixer operando a 700 rpm. Após o tratamento, os filmes de PET restantes foram removidos com pinças, lavados com água deionizada e acetona, e secos à temperatura ambiente. Nos casos em que houve solubilização dos filmes e formação de corpo de fundo (material sólido), a solução foi centrifugada e o material sólido restante lavado com água deionizada e seco a temperatura ambiente.

3.3 REAÇÕES ENZIMÁTICAS

Para as reações enzimáticas, foram utilizados 39,52 µL da enzima LCC variante ssH218SF243T, ajustados para uma concentração final de 0,040 mg/mL, a partir de uma solução enzimática inicial de 1012,157 mg/L (Cavalcanti,2024). A enzima foi incubada com 7 mg de filme de PET em 1 mL de tampão fosfato de potássio (100 mM, pH 8,0) em um termomixer ajustado para 500 rpm e 55°C, com tempos de reação de 48 h e 90 h. A reação foi interrompida pela adição de 2 mL de tampão fosfato de potássio (100 mM, pH 2,5) contendo 20% de DMSO (grau HPLC), seguida de centrifugação a 20.000 g por 10 min. Em seguida, aproximadamente 0,06 mg (60 ppm) do sobrenadante foi analisado em um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). O filme de PET restante foi lavado com água deionizada e etanol e seco a temperatura ambiente.

3.3.2 Pré-tratamento para reações enzimáticas

A metodologia inicial de pré-tratamento foi ajustada para otimizar as reações enzimáticas subsequentes. Para isso, 14,5 mg de PET foram imersos em 500 µL de solução de NaOH 1,4 mol. L^{-1} (1:1 etanol/água) e mantidos a 70°C por 1 hora em um termomixer operando a 700 rpm. Após o pré-tratamento, o filme de PET foi removido com o auxílio de uma pinça, lavado com pequenas porções de água deionizada e etanol e, em seguida, seco à temperatura ambiente para ser submetido às reações enzimáticas subsequentes.

3.4 MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO

Caracterização do material inicial: As amostras foram caracterizadas por diferentes técnicas para avaliar sua cristalinidade e propriedades morfológicas. As técnicas utilizadas foram: termogravimetria (TG), análise térmica diferencial (DTA), calorimetria exploratória diferencial (DSC), perfilometria, cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas por pirólise (Py -GC-MS), espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier com microscópio (FTIR - Microscópio) e espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier com reflexão total atenuada (ATR-FTIR),

Análise dos resultados após o pré-tratamento: O material sólido foi analisado pelas técnicas citadas acima e as frações líquidas foram analisadas por ressonância magnética nuclear (RMN).

Reações enzimáticas: as reações foram monitoradas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Os picos foram identificados pelo padrão

3.4.1 Termogravimetria (TG) e Análise Térmica Diferencial (DTA)

O conjunto de análises foram realizadas no equipamento do modelo SDT 2960 da marca TA *Instruments* sob atmosfera de ar seco com fluxo de 50 mL/min. Aproximadamente 7 mg das amostras foram condicionadas em cadinho de platina com volume de 90 µL. A faixa de temperatura foi de 30-750°C com razão de aquecimento de 10°C/min.

3.4.2 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

As análises foram realizadas no equipamento DSCQ10 (TA *Instrument).* Aproximadamente 2,5 mg das amostras foram condicionadas em cadinhos de alumínio com tampa de capacidade de 40 µL. O intervalo de aquecimento foi 30 a 280°C a uma taxa de 10°C/min em fluxo de N_2 a 50 mL/min.

3.4.3 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier com Microscópio (FTIR - Microscópio) e (ATR – FTIR)

Os espectros de absorção na região do infravermelho foram realizados no Laboratório Multiusuário I de Análises Químicas do Instituto de Química – UNESP Araraquara, em um espectrofotômetro Bruker Vertex 70, microscópio Bruker Hyperion 200 com objetiva de 20x e ATR com cristal de diamante. A faixa de leitura utilizada foi

de 400 a 4000 cm^{-1} e 64 scans.

3.4.4 Perfilometria

Os perfis periódicos 3D das amostras foram obtidos utilizando o perfilômetro Taylor-Hobson Form Talysurf para realizar o mapeamento 3D da superfície das amostras, ao longo de uma linha de 2 milímetros. Os parâmetros de rugosidade da superfície obtidos e analisados foram os seguintes: rugosidade média (R_a) e o parâmetro de diferença pico-vale (R_t).

3.4.4 Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas por pirólise (Py - GC-MS)

As análises foram realizadas utilizando o pirolisador (EGA/PY – 3030D, Frontier Laboratories, Japão), a temperatura do forno de cerâmica foi programada para 650°C com permanência de 0,2 minutos, conectado a um cromatógrafo gasoso. A separação cromatográfica foi realizada empregando uma coluna capilar composta por 5% difenildimetil polissiloxano (Ultra ALLOY®-Frontier Laboratories) como fase estacionária e utilizando hélio como fase móvel. O pirolizador foi acoplado a um cromatógrafo gasoso (GC-2010 plus, Shimadzu) equipado com um detector de espectrometria de massas (GCMS – 48 QP2020, Shimadzu) no qual foi operado a uma temperatura inicial de 40°C durante 2 minutos, aquecendo até 320°C a 20 °C/min[1] por 14 minutos e permanecendo a 320°C por 14 minutos. A fonte de ionização foi por impacto de elétrons (EI) 70 eV e o espectrômetro de massas foi operado a uma temperatura de 250°C na câmara de íons e 320°C na interface do detector. A análise no modo SCAN foi realizada em um intervalo de 35 a 700 *m/z*, e os compostos foram identificados a partir de comparação com compostos descritos na base de dados NIST e dados presentes na literatura.

3.4.5 Espectroscopia por Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de RMN de ^1H foram realizados no Instituto de Química – UNESP Araraquara, no espectrômetro Bruker Avance III, operando em frequência de 600,13 MHz para o núcleo de hidrogênio. Cada espectro foi adquirido com 64 scans, aproximadamente 3 mg de amostra foram dissolvidos em 0,6 mL de água deuterada (D_2O).

3.4.6 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.

Para análises utilizou-se como fase estacionária a coluna Luna C18(2) (5µ, 100A, 250 x 4.6mm) da marca Phenomenex. 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 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 ºC. Os tempos de retenção foram: TPA 11,1 minutos, MHET 12,0 minutos e BHET 12,8 minutos, para a identificação dos tempos de retenção utilizou-se padrões analíticos.

Para a quantificação dos produtos obtidos via degradação do PET utilizamos duas curvas de calibração com padrão interno (Anexo A) em uma faixa de concentração de 0,027 a 0,099 $mg.mL^{-1}$ dos produtos de degradação MHET e TPA, seguido da integração dos picos pelo software ChromNAV (JASCO Chromatography Data System) obtendo-se a área e altura do pico referente a cada produto. Na sequência foram calculadas as suas concentrações relacionando com equação da reta através do software Excel. A curva de calibração utilizada nesse trabalho foi realizada pela Dra. Laiza Araújo de Almeida.

4 RESULTADOS

4.1 ESTUDO DO PRÉ-TRATAMENTO

4.1.1 Caracterização das amostras antes do pré-tratamento

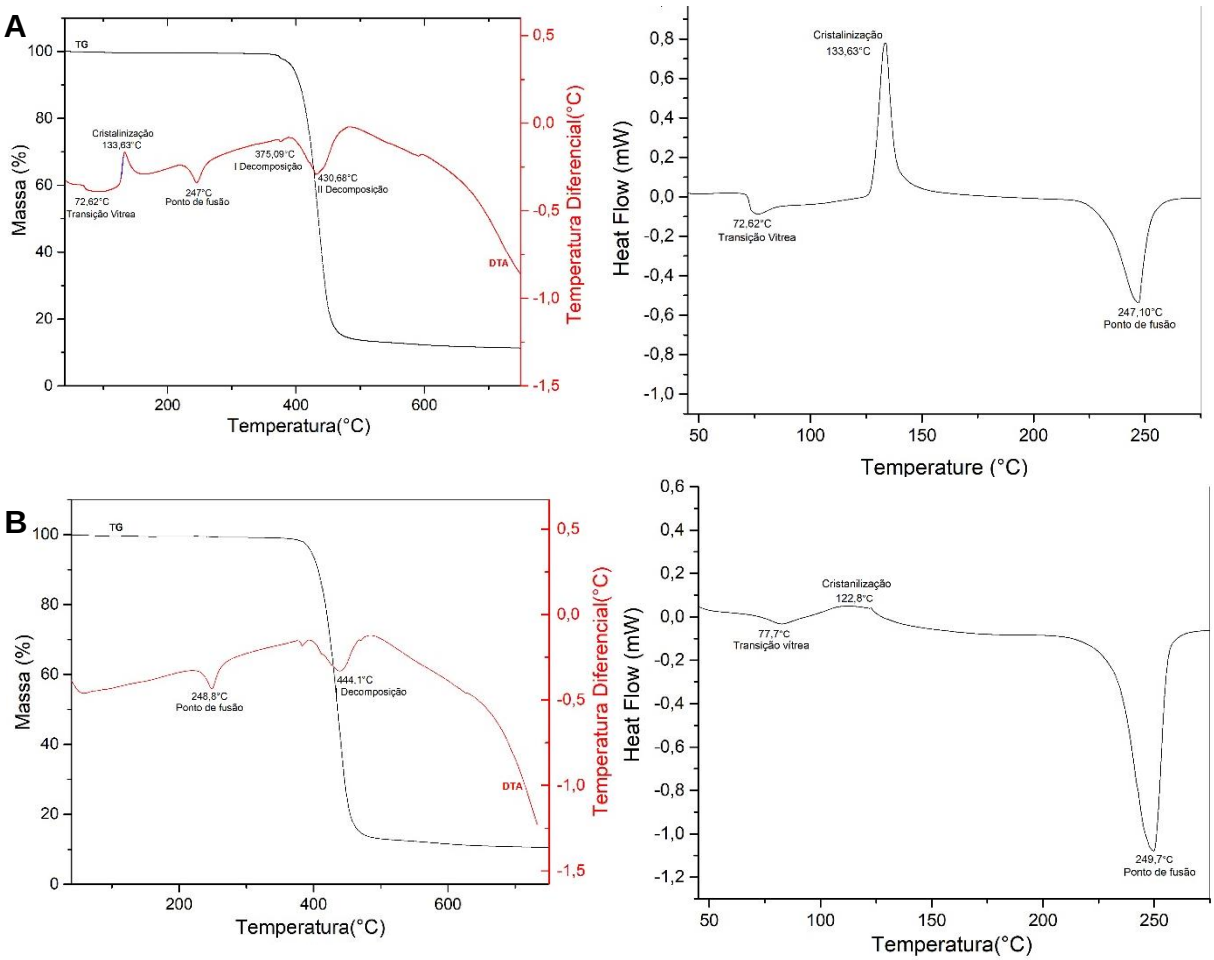
De acordo com a norma ASTM D7611/D7611M-21, para conter o código RIC 1 o material plástico deve ser composto majoritariamente por PET, podendo conter até 10% de outros polímeros, desde que seja constituído de pelo menos 90% de

monômeros de PET. Após as análises térmicas (Figura 5) da garrafa pós-consumo e do filme Sigma, observamos diferenças em sua composição. Através da DSC, o pico de cristalização do filme sigma indicou uma baixa orientação molecular, evidenciada pela alta liberação de energia. Em contraste, o pico exotérmico de baixa intensidade da garrafa pós-consumo sugere maior orientação molecular, caracterizando-a como semicristalina.

Na análise DTA, foi observada a temperatura de transição vítrea do filme sigma (72,62 °C) e da garrafa pós-consumo (77,7 °C), valores próximos ao referenciado na literatura, que situa a transição vítrea do PET em torno de 70 °C. Essas diferenças são cruciais, pois afetam diretamente os parâmetros limitantes nas reações de biodegradação. Estudos têm demonstrado que substratos de PET com alta cristalinidade apresentam maior resistência à degradação enzimática. Portanto, essas análises confirmam a necessidade de um pré-tratamento que reduza a cristalinidade do PET pós-consumo para aumentar a eficiência da degradação enzimática (Thomsen, et al., 2022).

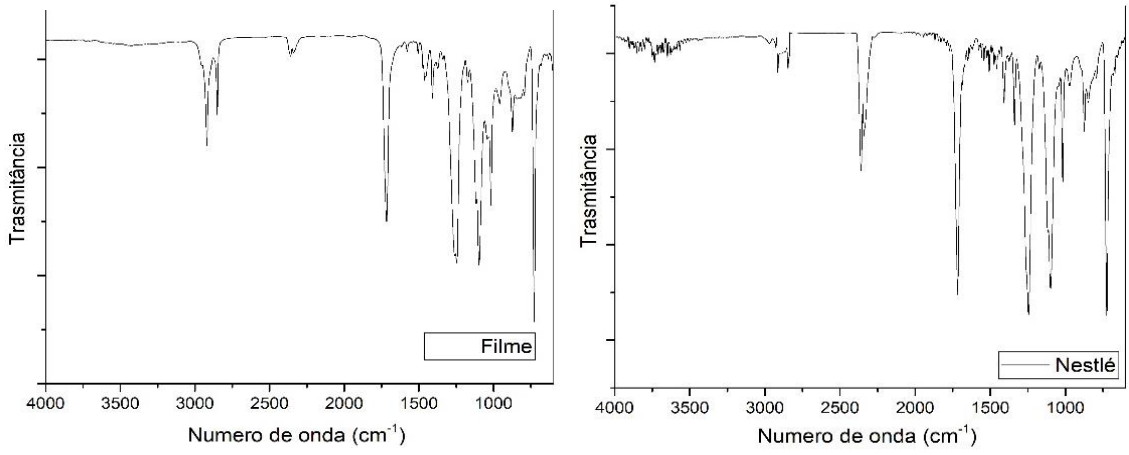
Os resultados da análise por Microscópio-FTIR confirmaram que a garrafa pós-consumo é predominantemente composta por PET, como esperado. Os espectros apresentaram bandas características das funções orgânicas presentes na estrutura do polietileno tereftalato, tais como o estiramento C=O em 1720 cm^{-1}, C-O em 1275 cm^{-1} e C-H (C sp^2) em 3000 cm^{-1} para ambas as amostras, como ilustrado na Figura 6. A identificação dessas bandas permite avaliar se o pré-tratamento químico atuará diretamente nas funções orgânicas do polímero ou apenas na sua superfície, promovendo a redução da cristalinidade e, consequentemente, otimizando sua morfologia para os processos de biodegradação.

Figura 5 – Analises térmicas das amostras.



Fonte: elaborado pelo autor (2024). **(A)** Tg, DTA e DSC do filme sigma; **(B)** Tg, DTA e DSC da garrafa pós-consumo.

Figura 6 – Espectros na região do IV das amostras antes do pré-tratamento.



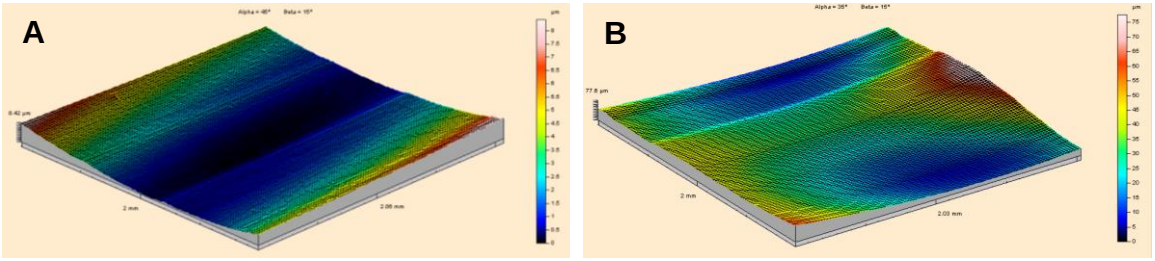
Fonte: elaborado pelo autor (2024).

A perfilometria, técnica óptica que permite analisar a topografia do polímero por

meio de medidas de rugosidade, foi utilizada para avaliar a superfície das amostras. Essa análise confirmou que as ranhuras presentes em ambas as amostras são superficiais e decorrentes da manipulação natural dos materiais (Wiacek, Jurak, Gozdecka e Worzakowska, 2017). Dessa forma, não foram observadas diferenças significativas entre a estrutura geométrica das superfícies das amostras, que podem ser consideradas lisas, uma vez que os valores do parâmetro R_t (diferença pico-vale) são pequenos e refletem apenas pequenas irregularidades.

Na Figura 7 é possível observar o perfil 3D da superfície das amostras, onde vemos uma superfície bastante homogênea, com pequenas variações em decorrência da sensibilidade da técnica. Espera-se que após o pré-tratamento ocorram mudanças na superfície e rugosidade das amostras.

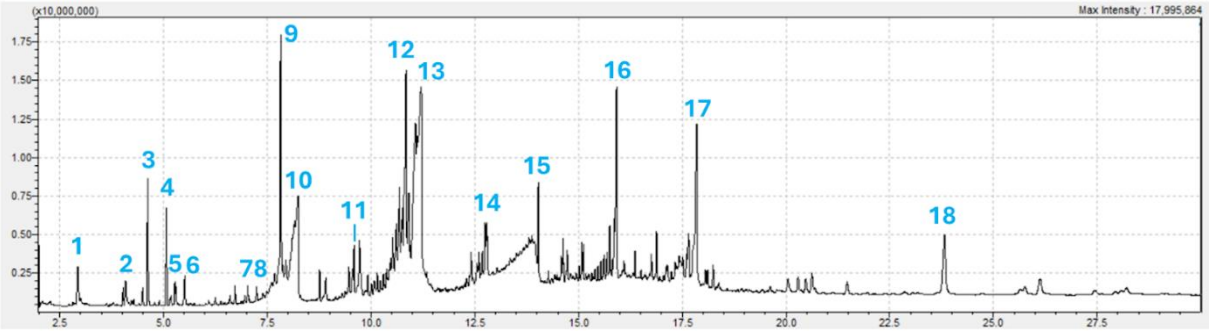
Figura 7 – Perfil periódico de varredura 3D para amostras virgens antes do pré-tratamento.



Fonte: elaborado pelo autor (2024). **(A)** Filme sigma; **(B)** Garrafa pós-consumo.

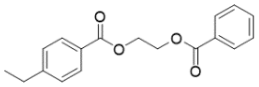
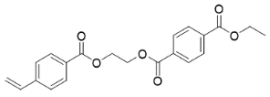
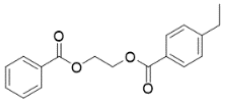
O cromatograma da Figura 8 mostra os picos correspondentes aos produtos resultantes da pirolise do filme sigma, descritos na Tabela 1. A análise desses produtos foi realizada comparativamente com estudos anteriores de Dimitrov, 2013 e Dziwiński, Iłowska Dziwiński, Iłowska e Gniady, 2018. Essa caracterização teve como objetivo investigar o perfil de pirólise tanto do filme sigma quanto da garrafa pós-consumo, verificando se ambos apresentam os mesmos produtos de decomposição térmica, tanto antes quanto após o pré-tratamento, avaliando possíveis modificações estruturais no polímero que possam resultar na formação de novos produtos de pirólise ou na alteração das intensidades dos produtos existentes. Ajudando a entender as mudanças na composição química do PET causadas pelo pré-tratamento.

Figura 8 – Cromatograma dos produtos de pirólise do filme de PET.



Fonte: Cavalcanti (2024).

Tabela 1 – Descrição dos produtos da pirólise do filme de PET.

Num	RT (min)	Fragmentos
1	2.940	Tolueno
2	4.623	Tolueno
3	4.623	Desconhecido
4	5.077	Desconhecido
5	5.280	Etilbenzeno
6	5,517	Estireno
7	7.027	Metilbenzaldeido
8	7.243	Acetofenona
9	7.823	Benzoato de vinila
10	8.247	Ácido benzóico
11	9.597	Metil 4-vinilbenzoato
12	10.843	Divinil tereftalato
13	11.230	Monometil tereftalato
14	12.753	Monovinil éster difenilico
15	14.017	1,2-Etanodiol, dibenzoato
16	15.950	
17	17.863	
18	23.837	

Fonte: Adaptada de Cavalcanti (2024)

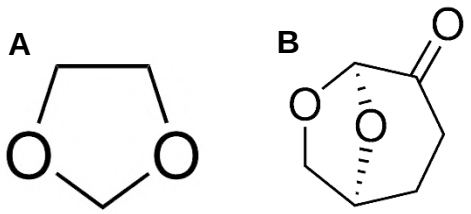
4.1.2 Pré-tratamento: Alterações macroscópicas

O pré-tratamento em temperaturas abaixo de 100°C altera a superfície das

amostras de polietileno tereftalato (PET) e reduz sua cristalinidade, melhorando assim o acesso das enzimas às ligações químicas hidrolisáveis e aumentando a produção de seus monômeros (Giraldo-Narcizo, 2024; Guo, 2023). Neste estudo, comparamos os efeitos de diferentes solventes em uma amostra de baixa orientação (filme sigma) e uma amostra semicristalina (garrafa pós-consumo).

Foram selecionados três solventes: $NaOH_{(aq)}$10 mol. L^{-1}, amplamente utilizado como método de pré-tratamento na literatura (Giraldo-Narcizo, et al., 2023); NaOH 1,4 mol. L^{-1} (1:1 H_2O/EtOH), escolhido por gerar um resíduo mais fácil de ser tratado e proporcionar maior segurança ao operador, alinhando-se aos princípios 5, 6 e 12 da química verde; e o solvente orgânico cireno, selecionado devido à sua estrutura similar ao 1,3-dioxolano, molécula heterociclica com átomos de oxigênio (Figura 9) que demonstrou boa capacidade de solubilização do PET conforme discutido por Luna et al. 2024, e ser um solvente de origem biorenovável e menos tóxico.

Figura 9 – Estrutura molecular solventes 1,3-dioxolano e cireno.



Fonte: elaborado pelo autor (2024). (A) 1,3-dioxolano. (B) Cireno.

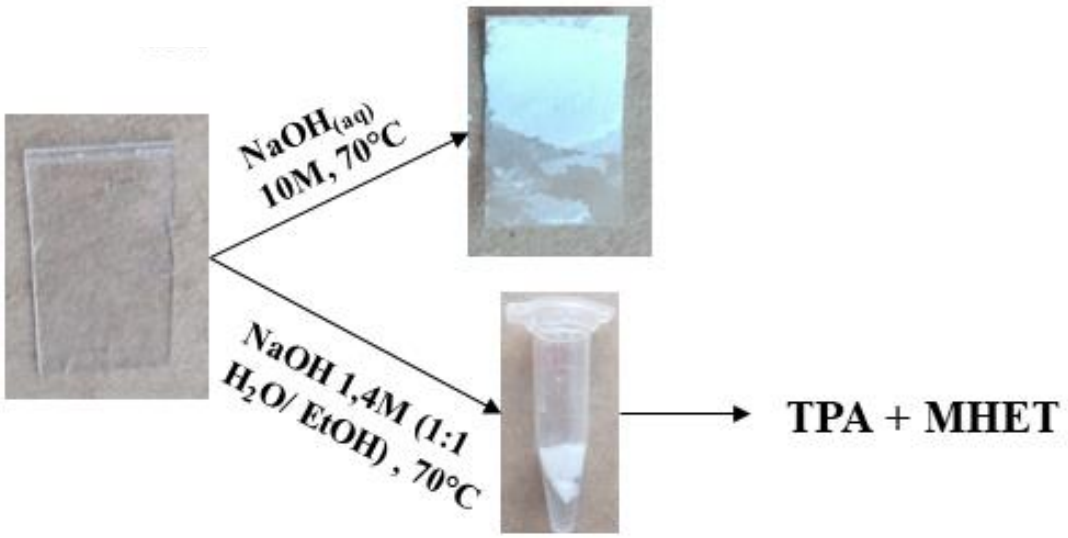
A temperatura de trabalho escolhida foi de 70°C, valor próximo à temperatura de transição vítrea do PET, além de ser adequada para as reações enzimáticas que comporão a etapa subsequente deste estudo. A proporção entre a massa de PET e o solvente, bem como a velocidade de agitação, foram definidas com base em estudos anteriores, visando otimizar a interação entre o polímero e o solvente durante o pré-tratamento. (GIRALDO-NARCIZO, S. et al. 2023).

Inicialmente, foram observadas diferenças visuais entre o filme sigma não tratado e o filme pré-tratado com $NaOH_{(aq)}$ 10 mol. L^{-1}, como ilustrado na Figura 10. Enquanto a amostra não tratada se manteve transparente e incolor, o pré-tratamento com $NaOH_{(aq)}$ 10 mol. L^{-1} resultou em um material opaco e esbranquiçado. No caso da garrafa pós-consumo, o pré-tratamento converteu completamente o material em um sólido branco.

O filme sigma tratado com cireno apresentou coloração amarelada e opaca,

enquanto a garrafa pós-consumo tratada com o mesmo reagente não exibiu alterações visuais significativas. Nas amostras tratadas com NaOH 1,4 mol. L^{-1} (1:1 H_2O/EtOH), após o tempo de reação, observou-se que o material se transformou completamente em um pó branco. Após a centrifugação e adição de água deionizada, a maior parte das partículas foi solubilizada, indicando uma solubilização eficaz do polímero tratado.

Figura 10 – Efeitos do pré-tratamento alcalino nas amostras



Fonte: elaborado pelo autor (2024).

4.1.2.1 Pré-tratamento: caracterização

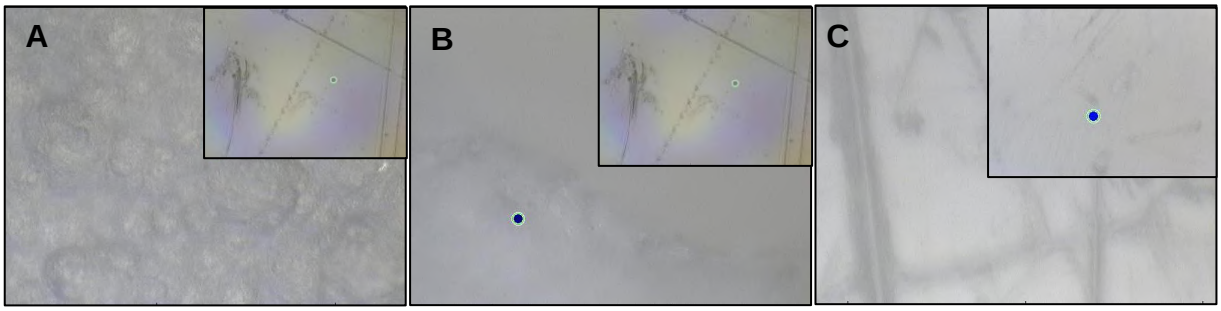
Nas imagens obtidas por Microscópio-FTIR, é possível identificar as mudanças microscópicas nas amostras antes e após o pré-tratamento. A Figura 11A mostra o filme de PET pré-tratado com $NaOH_{(aq)}$ 10 mol. L^{-1}, que apresentou uma superfície áspera, com deformações na rede polimérica, em contraste com a superfície lisa e com ranhuras superficiais observada antes do pré-tratamento.

O filme tratado com cireno, por sua vez, exibiu uma fina camada de deposição do solvente em sua superfície (Figura 11B). No entanto, para a garrafa pós-consumo tratada com cireno, não foram observadas alterações significativas na superfície (Figura 11C). Essas diferenças sugerem que o pré-tratamento com $NaOH_{(aq)}$ 10 mol. L^{-1} e cireno afetaram de maneira distinta a morfologia do PET.

Em relação ao tratamento com NaOH 1,4 mol. L^{-1} (1:1 H_2O/EtOH), não foi

possível realizar essas observações, pois não restou nenhum filme para análise, indicando uma dissolução completa do material.

Figura 11 – Imagens do Microscópio (20x).



Fonte: elaborado pelo autor (2024). **(A)** filme sigma tratado com $NaOH_{(aq)}$ 10 mol. L^{-1}. **(B)** filme sigma tratado com cireno. **(C)** Garrafa pós-consumo tratada com cireno. As imagens menores no canto superior direito de cada figura mostram as amostras antes do pré-tratamento, para efeito de comparação visual.

As análises das superfícies realizadas por perfilometria confirmaram as mudanças macro e microscópicas observadas na topografia da superfície do filme sigma pré-tratado com $NaOH_{(aq)}$ 10 mol. L^{-1}. Os parâmetros de rugosidade, medidos antes e após o pré-tratamento, estão detalhados na Tabela 2. Observou-se um aumento expressivo na rugosidade média R_a de 0,82 μm para 10,67 μm. O gráfico 3D obtido (Figura 12A) revela uma maior abertura da rede polimérica dessa amostra, sugerindo que esse aumento na rugosidade e abertura estrutural favorece a interação enzimática com a superfície do material.

No caso do filme tratado com cireno, também foi registrado um aumento na rugosidade, embora o gráfico (Figura 12B) não tenha mostrado mudanças significativas na organização da rede polimérica. Já na garrafa pós-consumo tratada com cireno, não foram identificadas alterações consideráveis nos parâmetros de rugosidade ou na morfologia da superfície (Figura 12C).

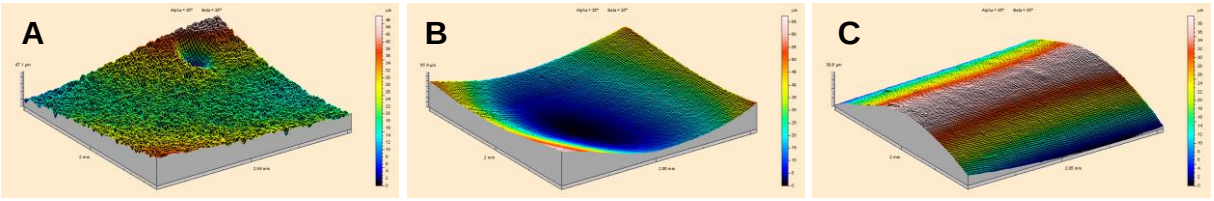
Para as amostras tratadas com NaOH 1,4 mol. L^{-1} (1:1 H_2O/EtOH), assim como nas análises microscópicas, não foi possível realizar a perfilometria, já que os filmes foram completamente solubilizados durante o pré-tratamento, restando apenas cerca de 1 mg de sólido residual, o que tornou a amostra inadequada para ser analisada por essa técnica.

Tabela 2 – Parâmetros de rugosidade das amostras antes e após o pré-tratamento.

Superficie	R_t(μm)	R_a(μm)
Filme PET	0,02	0,82
Fime – NaOH 10 mol. L^{-1}	1,08	10,67
Filme – Cireno	0,14	1,89
Garrafa pós-consumo	0,05	0,08
Garrafa - Cireno	0,07	0,65

Fonte: elaborado pelo autor (2024).

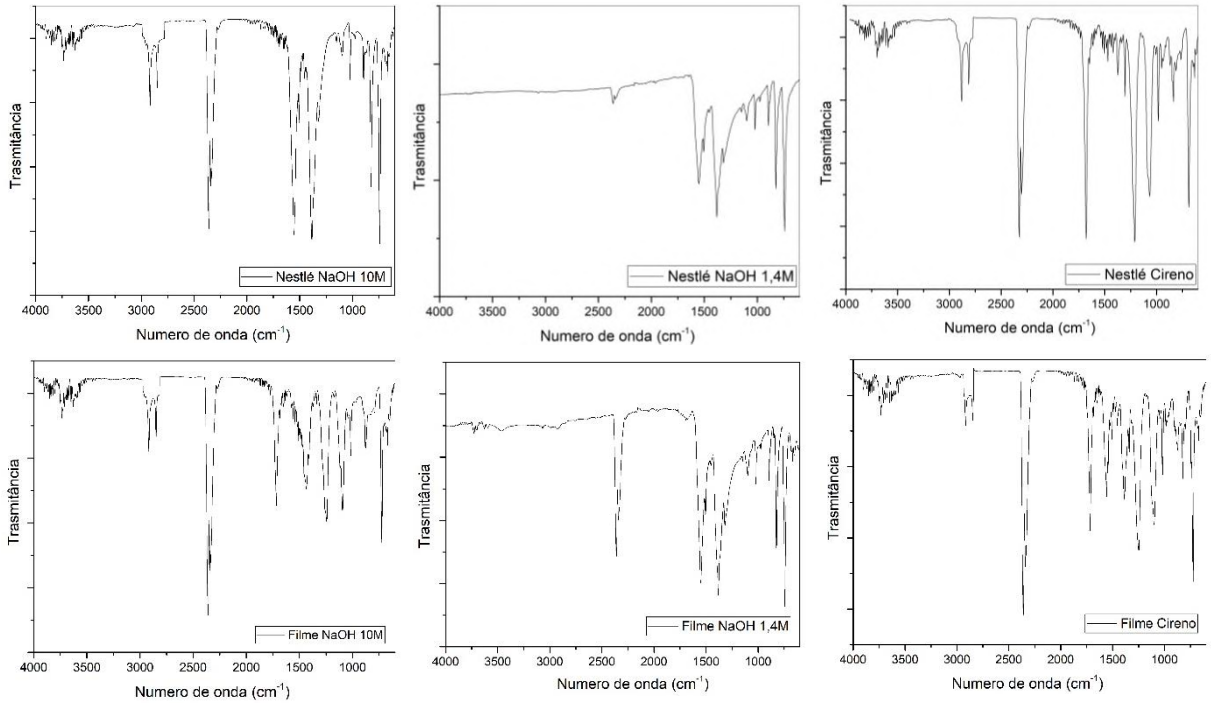
Figura 12 – Imagens do Microscópio-FTIR.



Fonte: elaborado pelo autor (2024).

Os espectros na região de IV (Figura 13) não apresentaram variações significativas nas amostras tratadas com $NaOH_{(aq)}$ 10 mol. L^{-1}, mantendo as bandas relativas ao PET e seus oligômeros. Similarmente, nas amostras tratadas com cireno, as bandas associadas ao PET permaneceram inalteradas antes e após o pré-tratamento. No entanto, nas amostras tratadas com NaOH 1,4 mol. L^{-1} (1:1 H_2O/EtOH), não há bandas nas regiões correspondentes aos hidrogênios aromáticos e carbonilas, típicas do PET e seus oligômeros, indicando que todo o PET foi solubilizado. O resíduo sólido remanescente provavelmente consiste em resíduos do meio reacional.

Figura 13 – Espectros na região do IV para as amostras após o pré-tratamento.



Fonte: elaborado pelo autor (2024). No caso das amostras tratadas com NaOH 1,4 mol. L-1 (1:1 H2O/EtOH) o espectro foi obtido através do modulo ATR. Para as outras amostras utilizaram-se o microscópio-FTIR.

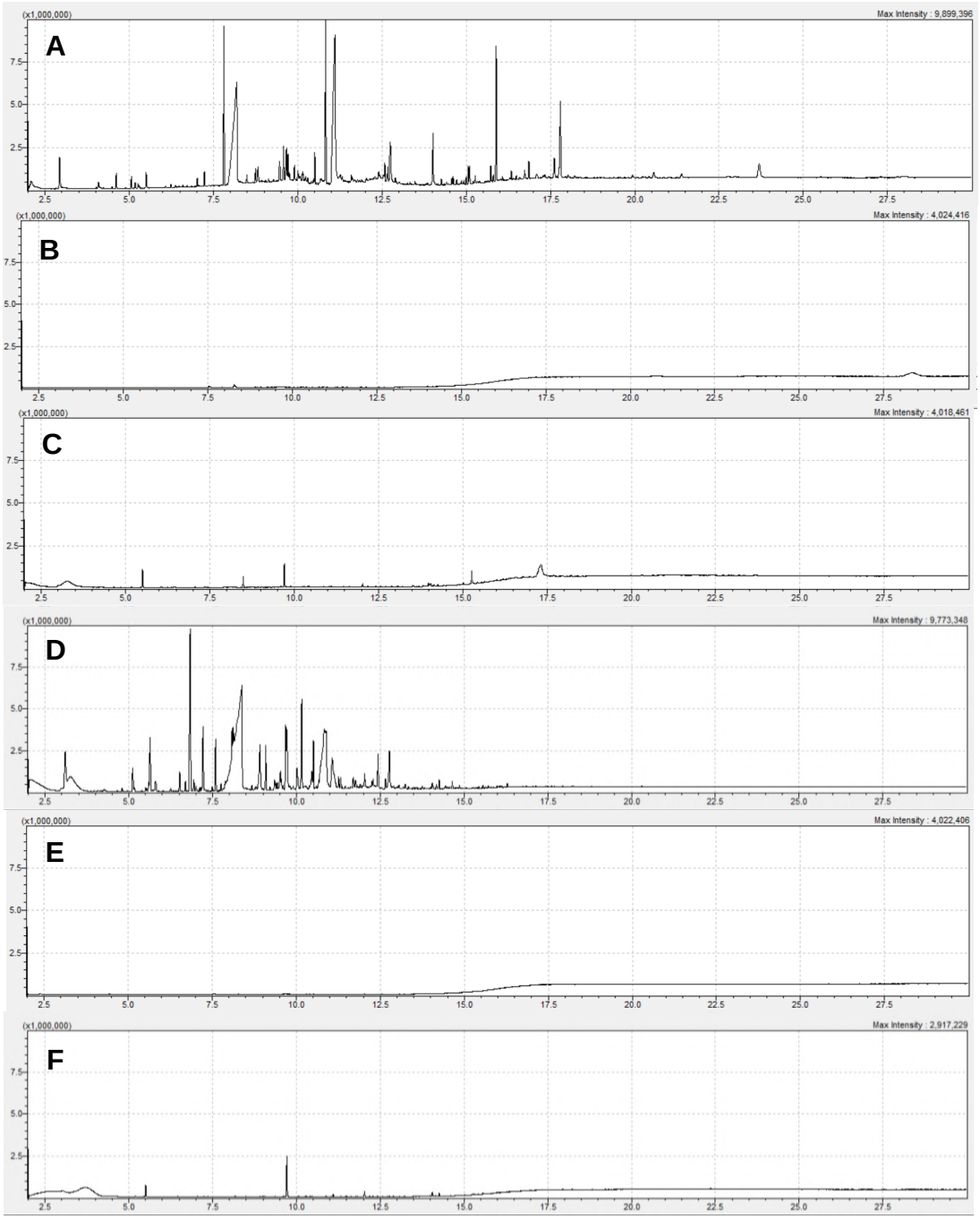
O cromatograma obtido das análises de Py-GC-MS para o filme sigma tratado com $NaOH_{(aq)}$ 10 mol. L^{-1} (Figura 14A) revelou que os principais produtos da pirólise, como benzoato de vinila, ácido benzoico e divinil tereftalato, são compatíveis com os produtos gerados pela pirólise do filme antes do pré-tratamento sugerindo que o pré-tratamento não alterou a estrutura química do polímero, mantendo as ligações químicas intactas, uma vez que os produtos da pirólise permaneceram os mesmos.

No caso do filme tratado com cireno, não houve detecção de pirólise (Figura 14B), possivelmente devido à deposição do cireno na superfície do PET, formando um material com temperatura de pirólise superior à temperatura do método utilizado. Outras análises serão necessárias para confirmar essa hipótese.

O cromatograma do sólido remanescente do filme tratado com NaOH 1,4 mol. L^{-1} (1:1 H_2O/EtOH) (Figura 14C) não apresenta picos compatíveis com os produtos de pirólise do filme antes do pré-tratamento, os novos picos indicam que houve a formação de novos produtos de pirólise que estão sendo investigados, nesse caso, há indícios que o tratamento modificou as ligações do polímero, promovendo a hidrólise dos ésteres. Os cromatogramas das garrafas pós-consumo tratadas com $NaOH_{(aq)}$ 10 mol. L^{-1} (figura 14D); cireno (figura 14E) e NaOH 1,4 mol. L^{-1} (1:1

H_2O/EtOH) (figura 14F) seguem o mesmo perfil dos resultados observados para o filme sigma, uma vez que, a garrafa é composta majoritariamente por PET.

Figura 14 – Cromatogramas dos produtos de pirolise das amostras após o pré-tratamento.

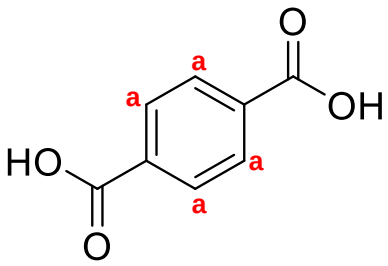


Fonte: elaborado pelo autor (2024). **(A)** Filme PET tratado com $NaOH_{(aq)}$ 10 mol. L^{-1};**(B)** Filme PET tratado com cireno; **(C)** Filme PET tratado com NaOH 1,4 mol. L^{-1} (1:1 H_2O/EtOH) **(D)** Garrafa pós consumo tratada com $NaOH_{(aq)}$ 10 mol. L^{-1};**(E)** Garrafa pós-consumo tratada com cireno **(F)** Garrafa pós-consumo tratada com NaOH 1,4 mol. L^{-1} (1:1 H_2O/EtOH).

Ao final dos experimentos com NaOH 1,4 mol. L^{-1} (1:1 H_2O/EtOH), todo o PET em forma de filme foi solubilizado, resultando em dois sobrenadantes relevantes para cada amostra: o primeiro, proveniente da própria solução de NaOH 1,4 mol. L^{-1} (1:1 H_2O/EtOH) onde os filmes foram dissolvidos, e o segundo obtido a partir da lavagem do pouco resíduo sólido restante com água deionizada. Após observar que o resíduo sólido foi inteiramente solubilizado na água, ambos os sobrenadantes foram analisados por espectroscopia de RMN de ^1H - 600,13 MHz. O solvente utilizado para as análises foi água deuterada (D_2O), sendo que o pico em torno de 4,82 ppm corresponde a esse solvente.

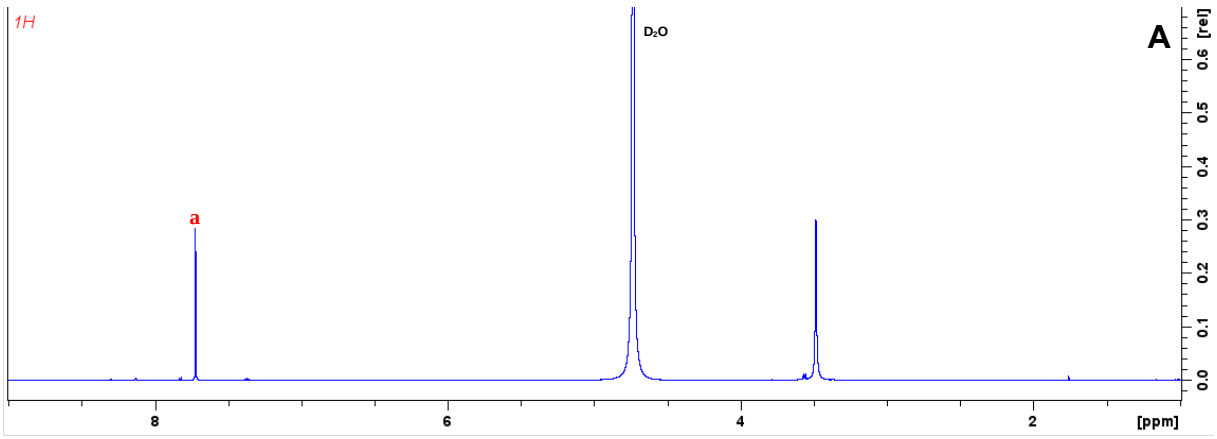
Os espectros de ^1H RMN apresentaram os mesmos deslocamentos químicos para todas as amostras, com vários picos na região dos aromáticos entre 7,72 e 7,84 ppm, correspondendo a sinais característicos do monômero ácido tereftálico (TPA). O TPA, em particular, exibe um singleto que integra para 4H, localizado a 7,72 ppm, sinal que representa os hidrogênios destacados na posição "a" da Figura 15.

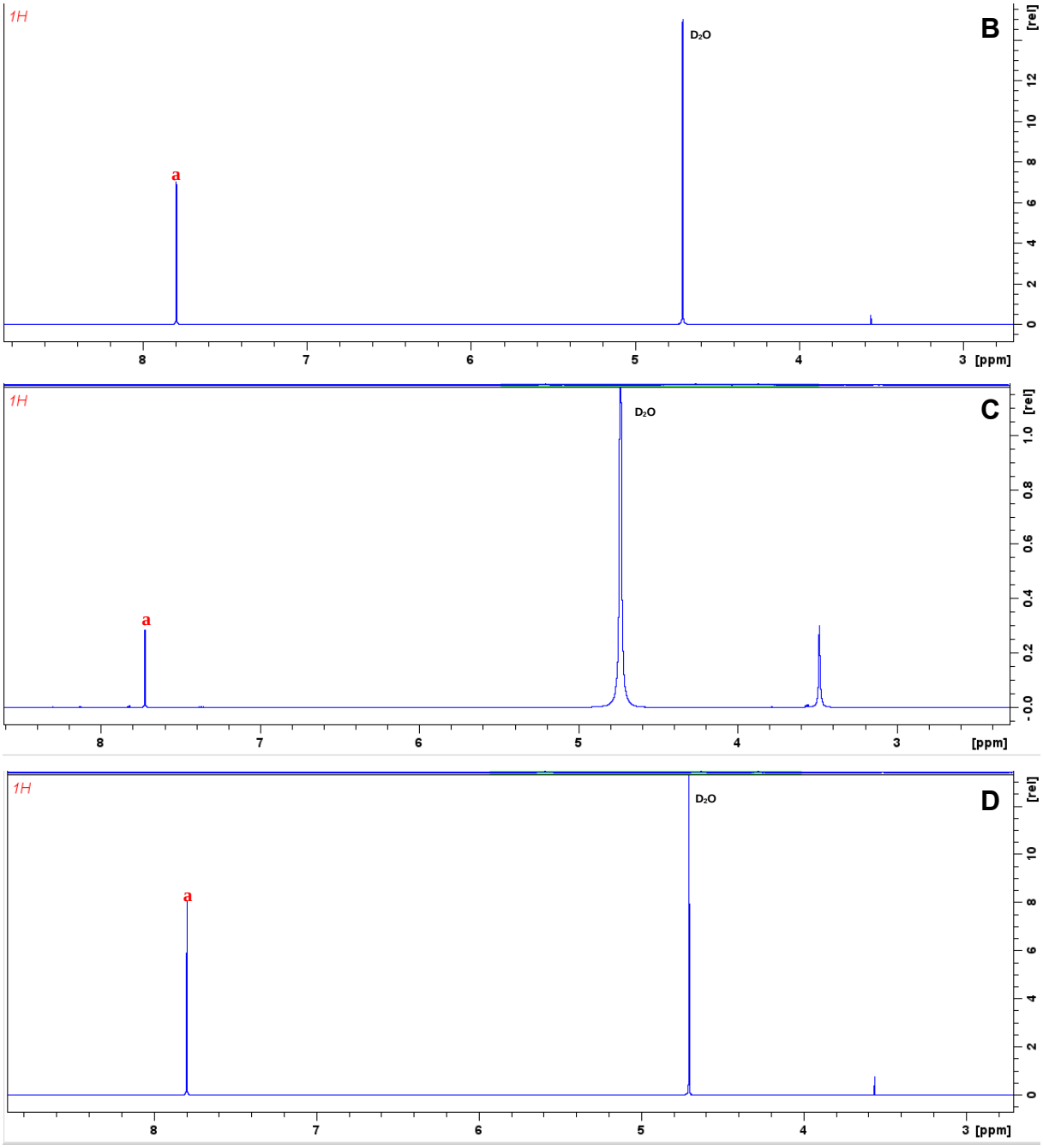
Figura 15 – Estrutura química do ácido tereftálico (TPA).



Fonte: elaborado pelo autor (2024).

Figura 16 – Espectros de ^1H RMN em D_2O (600,13 MHz) das soluções obtidas após o pré-tratamento e após a lavagem do sólido resultante.





Fonte: elaborado pelo autor (2024). *(*A) Filme PET, NaOH 1,4 mol. L^{-1} (1:1 H_2O/EtOH) (B) Filme PET, lavagem – água deionizada (C) Garrafa pós-consumo, NaOH 1,4 mol. L^{-1} (1:1 H_2O/EtOH) (D) Garrafa pós-consumo, lavagem – água deionizada.

4.1.3 Otimização do pré-tratamento para reações enzimáticas

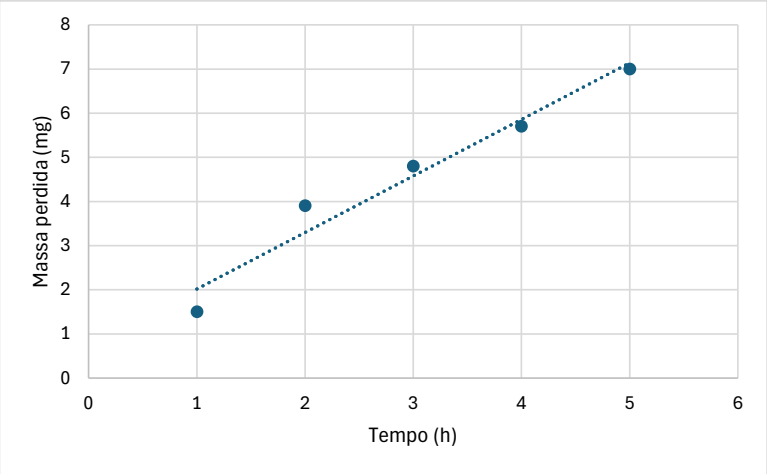
Após os estudos de pré-tratamento, concluiu-se que a solução de NaOH 1,4 mol. L^{-1} (1:1 H_2O/EtOH) foi o solvente mais eficiente, pois, além de solubilizar praticamente todo o PET, está alinhado aos princípios da química verde propostos. No entanto, o pH 14 da solução contendo os oligômeros e monômeros obtidos ao final do pré-tratamento representa um desafio para sua aplicação direta na reação

enzimática subsequente, considerando que o pH ideal de trabalho da enzima LCC, utilizada na etapa seguinte, é 8, conforme relatado na literatura. (Pirillo, et al., 2023).

Para contornar essa limitação, foi necessário ajustar a metodologia de pré-tratamento, reduzindo o tempo de reação para evitar a completa hidrólise do PET, mantendo o filme ainda como um sólido e não mais em solução. Com isso, a solução interage com o polímero apenas o suficiente para iniciar a hidrólise e reduzir sua cristalinidade, melhorando a acessibilidade da enzima e potencializando a eficácia do processo enzimático subsequente.

Para ajustar a metodologia, foi realizado um ensaio que avaliou a relação entre a perda de massa e o tempo. À medida que a hidrólise avança, os oligômeros formados se dissolvem, resultando na diminuição da massa do filme, essa relação está representada na Figura 17.

Figura 17 – Perda de massa do PET ao longo do tempo de pré-tratamento.



Fonte: elaborado pelo autor (2024). A massa de filme PET utilizada inicialmente foi 7mg.

Considerando que após 1 hora de pré-tratamento já ocorre mudanças macroscópicas significativas além de uma perca de massa, a metodologia foi ajustada mantendo a proporção massa/volume, agitação e temperatura definidas inicialmente mudando o tempo para 1 hora. Também é possível observar através desse gráfico que a reação ocorre por meio de uma cinética de ordem zero, ou seja, a variação da concentração do reagente não altera a velocidade da reação.

4.2 ESTUDOS ENZIMÁTICOS

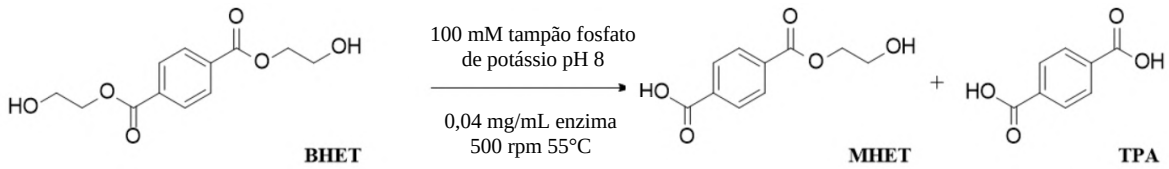
4.2.1 Atividade enzimática

Nosso estudo baseia-se na atividade enzimática da variante ssH218SF243T, uma versão otimizada da enzima *leaf-branch compost cutinase* (LCC). Esta variante apresenta múltiplas substituições de aminoácidos na sequência original da proteína (LCC), incluindo a troca de uma histidina por uma serina na posição 218 e de uma fenilalanina por uma tirosina na posição 243, além da inserção de uma ponte de dissulfeto, ligações covalentes de enxofre, que estabilizam a estrutura tridimensional da enzima (Bošnjak, et al. 2014). Essas modificações aumentam a rigidez e resistência térmica da enzima e são direcionadas para aprimorar características como estabilidade térmica, atividade catalítica, especificidade e seletividade para o substrato (Jiang, Ran,Yang, 2022).

Não exploramos a eficiência dessas modificações diretamente; no entanto, estudos complementares estão sendo conduzidos para essa avaliação (Cavalcanti, 2024). A atividade enzimática foi verificada frente ao substrato BHET, monitorando-se o consumo do material inicial com uma curva analítica que apresentou coeficiente de correlação (R^2) de aproximadamente 0,97 e equação da reta y = 10,776x + 0,0278.

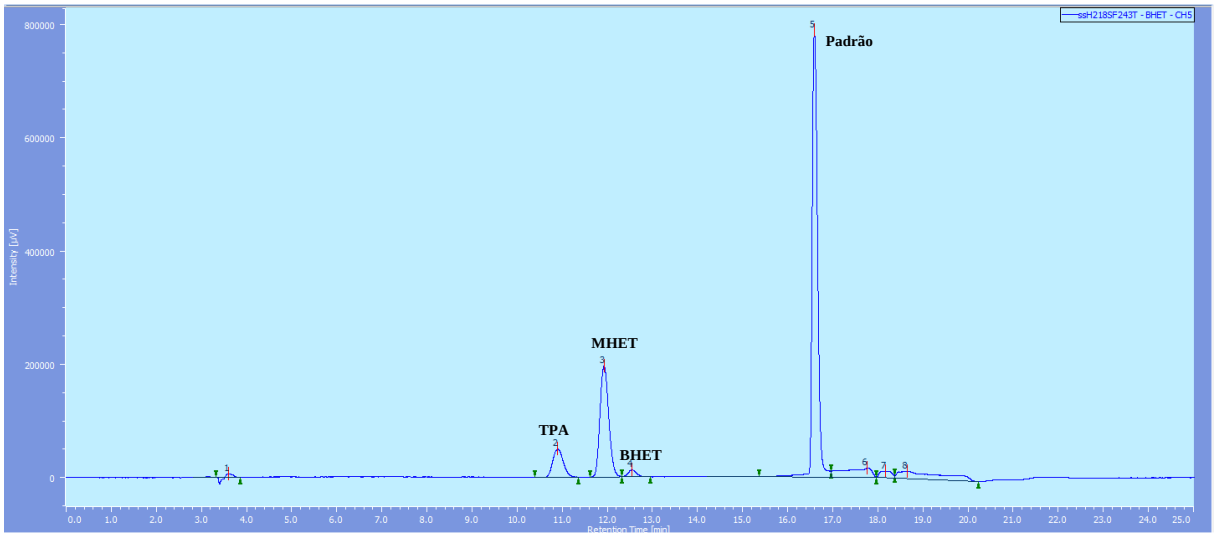
As condições reacionais, ilustradas na Figura 18 (Shirke, et al. 2018), indicaram, conforme o cromatograma da Figura 19, uma baixa formação de TPA, inferior ao limite de quantificação, levando a quantificação baseada na formação de MHET. A unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de MHET formada a partir do BHET por minuto, por microlitro de solução enzimática. Para o substrato testado, a atividade enzimática foi de 0,693 $U.mg^{-1}$, com uma conversão de 47%, indicando que a enzima ssH218SF243T apresenta atividade catalítica nas condições de pH, temperatura e agitação utilizadas.

Figura 18 – Reação de hidrolise do BHET



Fonte: elaborado pelo autor (2024).

Figura 19 – Cromatograma da hidrolise de BHET



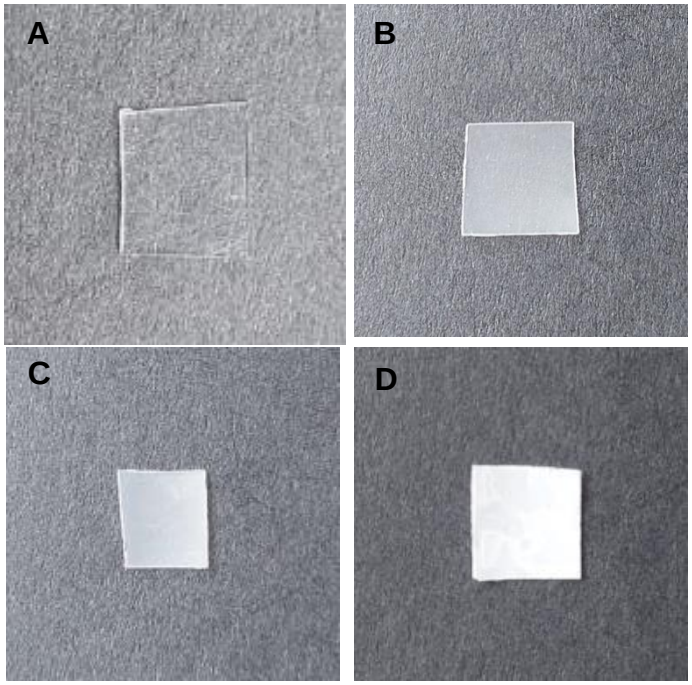
Fonte: elaborado pelo autor (2024).

4.2.2 Reações Enzimáticas

Comparamos a atividade enzimática em filmes de PET amorfo não tratados com sua atividade em substratos similares submetidos a um pré-tratamento com solução hidroalcóolica de NaOH 1,4 mol. L^{-1} a 70°C durante 1 hora. Inicialmente, identificamos diferenças visuais entre as seguintes amostras: a condição inicial sem tratamento, apenas o tratamento enzimático, o pré-tratamento isolado e a combinação de pré-tratamento seguido pelo tratamento enzimático.

Observa-se que a amostra não tratada incialmente é transparente e incolor (Figura 20A), enquanto as amostras submetidas ao tratamento enzimático por 48h (Figura 20B) e apenas ao pré-tratamento de 1 hora (Figura 20C) apresentaram opacidade. Já a amostra que passou pelo pré-tratamento seguido do tratamento enzimático por 48 horas exibiu um aspecto opaco e esbranquiçado, sugerindo uma alteração estrutural mais intensa devido à combinação dos processos.

Figura 20 – Mudanças macroscópicas nas amostras – fotos.

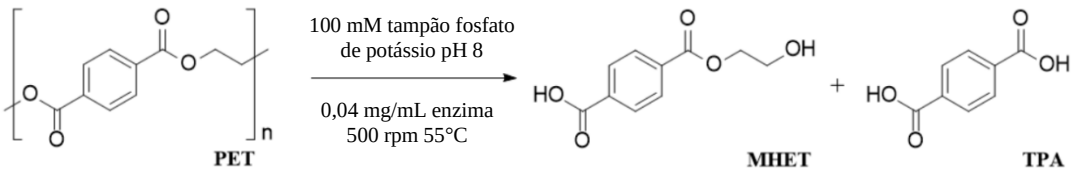


Fonte: elaborado pelo autor (2024). (A) Controle; (B) após reação enzimática 48h; (C) após pré-tratamento; (D) após pré-tratamento e reação enzimática.

Para avaliar se as alterações morfológicas da superfície levam à hidrólise melhorada durante o tratamento enzimático, quantificamos os produtos em cada amostra usando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), através de uma curva de analítica que apresentou coeficiente de correlação (R^2) de aproximadamente 0,98 e equação da reta y = 10,572x + 0,0644.

As reações foram conduzidas conforme os parâmetros da Figura 21, e os cromatogramas (Apêndice A) indicaram a formação predominante de TPA, com formação de MHET em menor quantidade, abaixo do limite de quantificação. O rendimento de despolimerização foi calculado a partir da equação 1.

Figura 21 – Reação de hidrólise do PET



Fonte: elaborado pelo autor (2024).

$$\frac{(m_{inicial} - m_{final}) * 100}{m_{inicial}} \quad (1)$$

Através da Tabela 3 é possivel observar que para as reações de 48h o pré-tratamento aumentou 9,6 vezes o rendimento de despolimerização e aproximadamente 3 vezes a conversão de TPA. Para as reações de 90h o pré-tratamento não foi tão eficiente em aumentar a conversão para TPA, aumentando apenas 0,1 mg, porém foi eficiente aumentando a despolimerização em 2 vezes.

Tabela 3 – Produtos de hidrólise de PET observados e rendimento de massa de despolimerização.

Tempo	Conversão TPA (mg)	Rendimento de despolimerização (%)
48h	0,30	7
48h[a]	0,84	67
90h	1,52	16
90h[a]	1,62	33

Fonte: elaborado pelo autor (2024).[a]amostra com pré-tratamento

5 CONCLUSÃO

Este estudo revelou que a garrafa PET pós-consumo, apesar de ser composta majoritariamente por PET, contém uma porcentagem de outros polímeros, resultando em uma composição ligeiramente distinta do filme Sigma-Aldrich padrão. Apesar dessas diferenças, as amostras responderam de maneira semelhante ao pré-tratamento com os diferentes solventes avaliados.

Entre os solventes testados, o NaOH 1,4 mol. L^{-1} (1:1 H_2O/EtOH) mostrou-se o mais eficiente, solubilizando todo o PET das amostras em oligômeros e formando ácido tereftálico (TPA) como evidenciado pela presença do pico característico desse composto nos espectros de RMN. A metodologia utilizando este solvente está alinhada com os princípios da química verde, em especial o princípio 5 – uso de solventes e auxiliares mais seguros, gerando resíduos mais facilmente tratáveis; princípio 6 - maior eficiência energética e princípio 12 – química segura, proporcionando maior segurança ao operador.

A combinação do pré-tratamento com solução hidroalcoólica de NaOH 1,4 mol.

L^{-1} e reações enzimáticas com a variante ssH218SF243T resultou em um aumento de 9,6 vezes e 2 vezes no rendimento de despolimerização para as reações de 48 e 90 horas, respectivamente, além de um aumento de 3 vezes na conversão de TPA para a reação de 48 horas. Esses resultados indicam que o pré-tratamento foi eficaz em elevar os rendimentos das reações enzimáticas, embora tenha mostrado limitação em melhorar a conversão final para TPA, o monômero de interesse.

Este estudo contribui para um manejo mais eficaz dos resíduos de PET, promovendo uma economia circular e sustentável, reduzindo o impacto da poluição plástica. Contemplando os objetivos do desenvolvimento sustentável 9 - indústria, inovação e infraestrutura; 12 – consumo e produção responsáveis e 14 – vida na água, ao fomentar inovações na gestão de resíduos, otimizar recursos energéticos e proteger ecossistemas marinhos, promovendo um equilíbrio entre desenvolvimento industrial e preservação ambiental.

REFERÊNCIAS

American Society for Testing and Materials. **D20**. Plastics Committee Revises Resin ID Code, More Updates Comin: ASTM 2020.

ANUAR, K. S. F. N. et al. An Overview into Polyethylene Terephthalate (PET) Hydrolases and Efforts in Tailoring Enzymes for Improved Plastic Degradation. **Molecular Sciences**, v. 23, n. 20, p. 12644, 2022.

BENYATHIAR, P. et al. Polyethylene Terephthalate (PET) Bottle-to-Bottle Recycling for the Beverage Industry (review). **Polymers,** v. 14, n. 12, p. 2366, 2022.

BOYER, F. R. Glassy transitions in semicrystalline polymers**. Journal of Polymer Science**, v. 50, n. 1, p. 189-242, 1975.

BOŠNJAK, I; et al. Occurrence of protein disulfide bonds in different domains of life: a comparison of proteins from the Protein Data Bank. **Protein Engineering, Design and Selection**, v. 27, n. 3, p 65-72, 2014.

BUCHHOLZ, P. C. F.; et al. Plastics Degradation by Hydrolytic Enzymes: The Plastics-active Enzymes Database - PAZy. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**. v. 90, p. 1443−1456, 2022.

CAVALCANTI, V. H. O. **Estudo da degradação de PET (polietileno tereftalato) via catálise enzimática.** 2024. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara. – (Em elaboração).

DUAN, C.; et al. Global Polyethylene Terephthalate (PET) Plastic Supply Chain Resource Metabolism Efficiency and Carbon Emissions Co-Reduction Strategies. **Sustainability**, 16(10), 3926, 2024. Disponível em: 10.3390/su16103926. Acesso em: 1 out. 2024.

DIMITROV, N. et al. Analysis of recycled PET bottles products by pyrolysis-gas chromatography. **Polymer Degradation and Stability,** v. 98, n. 5, p. 972-979, 2013.

DZIWIŃSKI, J. E.; IŁOWSKA, J.; GNIADY, J. Py-GC/MS analyses of poly(ethylene terephthalate) film without and with the presence of tetramethylammonium acetate reagent: Comparative study. **Polymer Testing**, v. 65, p. 111-115, 2018.

GEYER, R.; JAMBECK, R. J.; LAW, L. K. Production, use, and fate of all plastics ever made. **Science Advances**, v. 3, n. 7, e1700782, 2017. Disponível em: 10.1126/sciadv.1700782. Acesso em 28 set. 2024.

GIRALDO-NARCIZO, S. et al. Accelerated Polyethylene Terephthalate (PET) Enzymatic Degradation by Room Temperature Alkali Pre-treatment for Reduced Polymer Crystallinity. **Chembiochem**, v. 24, n. 1, e202200503, 2023. Disponível em: 10.1002/cbic.202200503. Acesso em 28 out. 2024

GUO, B. et al. Fast Depolymerization of PET Bottle Mediated by Microwave Pre-Treatment and An Engineered PETase. **ChemSusChem,** v. 16, n. 18, e202301238, 2023. Disponível em: 10.1002/cssc.202301238.

JIANG, Y.; RAN, X.; YANG, J. Z. Data-driven enzyme engineering to identify function-enhancing enzymes. Protein Engineering, Design and Selection, v. 36, gzac009, 2022. Disponível em: https://doi.org/10.1093/protein/gzac009. Acesso em: 28 out. 2024

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. Acesso em 13 set. 2024.

KOSHTI, R.; MEHTA, L.; SAMARTH, N. Biological Recycling of Polyethylene Terephthalate: A Mini-Review. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 26, p. 3520-3529, 2018.

LUNA, E. et al. Towards a better understanding of the cosolvent effect on the low-temperature glycolysis of Polyethylene Terephthalate (PET). **Chemical Engineering Journal**, v. 482, p. 148861, 2024.

NIHAN, K.; KHANNA, N.; SHAH, N. Climate Impact of Primary Plastic Production. eScholarship. 2024. Disponivel em: https://escholarship.org/uc/item/12s624vf. Acesso em 14 out. 2024.

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

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

Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD). Global Plastics Outlook: Policy Scenarios to 2060, **OECD Publishing**, Disponível em: https://doi.org/10.1787/aa1edf33-en. Acesso em: 28 out. 2024

PIRILLO, V. et al. Efficient polyethylene terephthalate degradation at moderate temperature: a protein engineering study of LC-cutinase highlights the key role of residue 243. **The FEBS Journal**. v. 290, n. 12, p. 3185-3202, 2023.

RADWELL, O. Plastic Types and the Global Plastic Hate **[Blog].** Disponível em: https://blog.radwell.codes/2021/07/plastic-types-and-global-plastic-hate/. Acesso em: 11 set. 2024.

RITCHIE, H.; ROSER, M. Plastic Pollution, **OurWorldInData.org**, 2018. Disponível em: https://ourworldindata.org/plastic-pollution. Acesso em: 29 out. 2024.

SHIRKE, N. A. et al. Stabilizing Leaf and Branch Compost Cutinase (LCC) with Glycosylation: Mechanism and Effect on PET HydrolysisClick to. **Biochemistry,** v. 57, n. 7, 1190–1200, 2018.

SOONG, V. Y. H.; SOBKOWICZ, J. M.; DONGMING, X. Recent Advances in Biological Recycling of Polyethylene Terephthalate (PET) Plastic Wastes. **Bioengineering**, v. 9, n. 3, p. 98, 2022.

TANIGUCHI, I. et al. Biodegradation of PET: Current Status and Application Aspects. **ACS Catalysis**, v. 9, n. 5, p. 4089-4105, 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.

Types of Plastic: 7 Plastic Symbols You See Daily (and why HDPE is our favorite). **Sustainability**. Disponível em: https://www.pvpallet.com/news/types-of-plastic-7-plastic-symbols-you-see-daily-and-why-hdpe-is-our-favorite. Acesso em: 28 out. 2024.

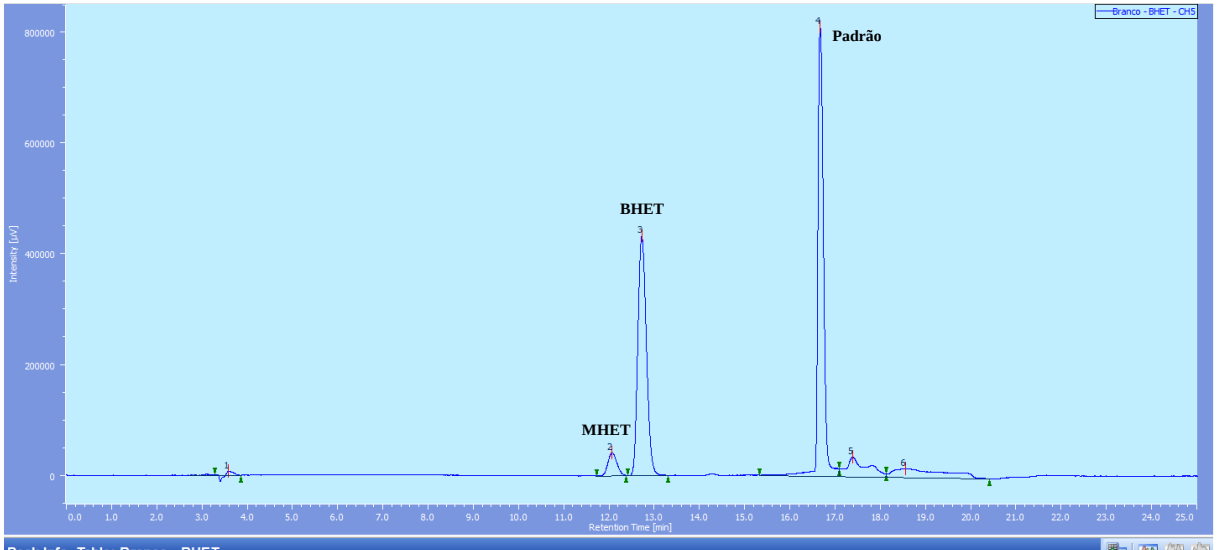
TOURNIER, V. et al. Enzymes' Power for Plastics Degradation. **Chemical Reviews**,v. 123, n. 9, p. 5612-5701, 2023.

UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAMME (UNEP). From Pollution to Solution: A Global Assessment of Marine Litter and Plastic Pollution. Disponível em: https://www.unep.org/pt-br/noticias-e-reportagens/comunicado-de-imprensa/relatorio-da-onu-sobre-poluicao-plastica-alerta-sobre. Acesso em: 11 set. 2024.

WIACEK, E. A. et al. Interfacial properties of PET and PET/starch polymers developed by air plasma processing. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 532, p. 323-331, 2017.

APÊNDICE A – CROMATOGRAMAS DAS REAÇÕES ENZIMÁTICAS

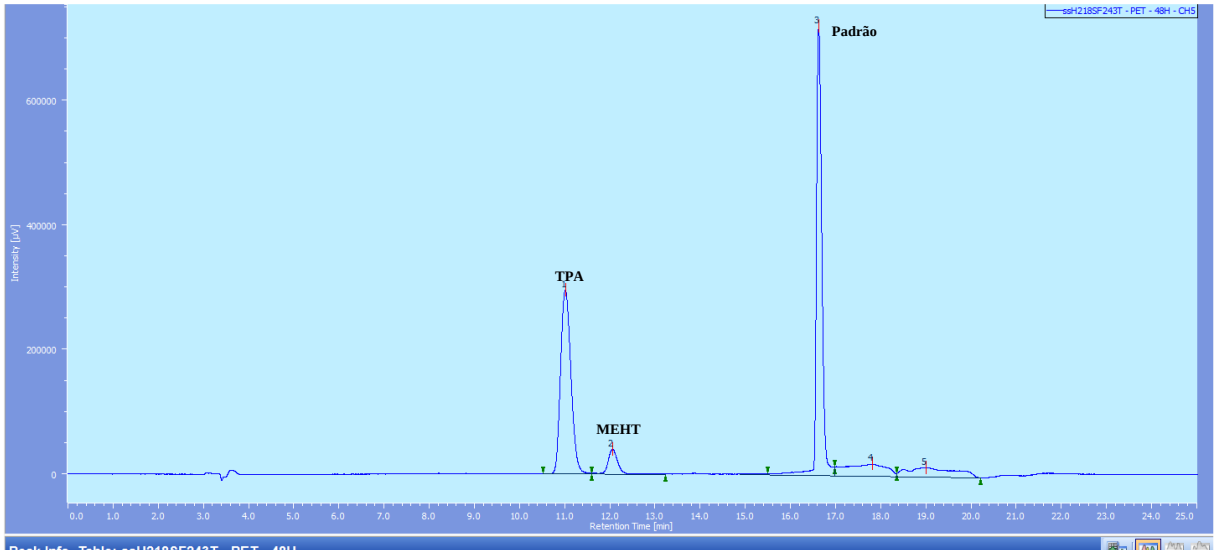
- Atividade enzimática: Branco.



Peak Info. Table: Branco - BHET

1	Unknown	5	3.587	81211	7357	0.510	0.548	N/A	2358	25.549	N/A
2	Unknown	5	12.063	569670	41488	3.577	3.091	N/A	17018	1.821	1.112
3	Unknown	5	12.717	5682407	431994	35.680	32.182	N/A	21173	13.814	1.178
4	Unknown	5	16.660	7135233	810050	44.802	60.347	N/A	89397	1.152	1.391
5	Unknown	5	17.383	1134727	35498	7.125	2.645	N/A	4500	0.571	N/A
6	Unknown	5	18.540	1322794	15940	8.306	1.187	N/A	601	N/A	N/A

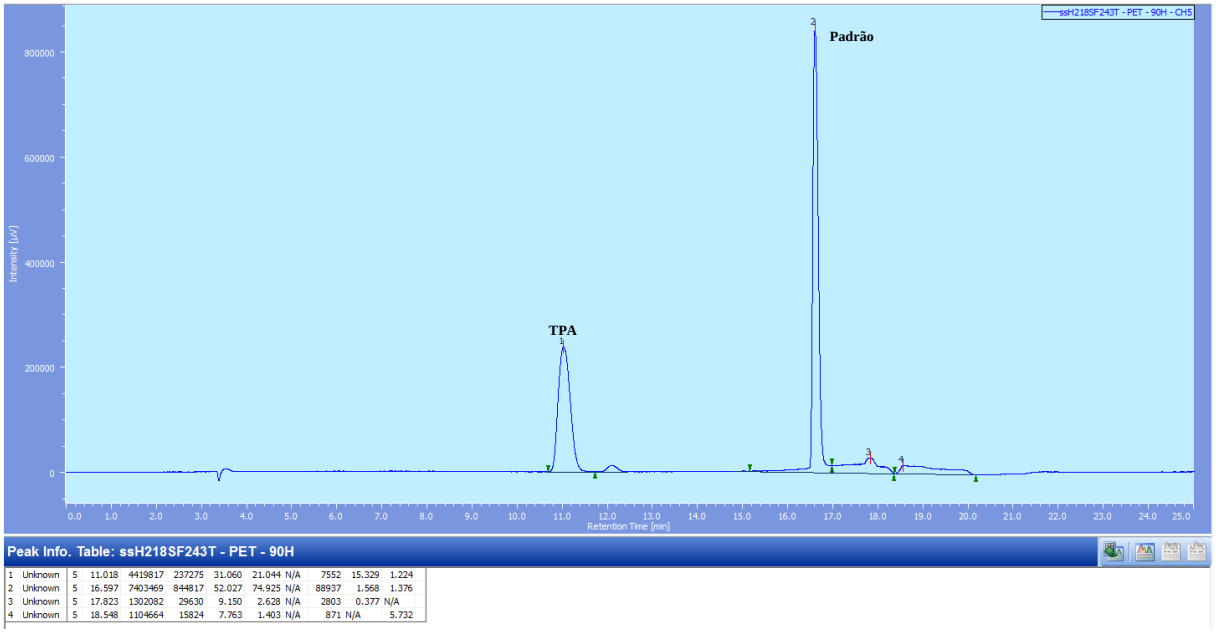
- Reações com PET 48h sem pré-tratamento



Peak Info. Table: ssH218SF243T - PET - 48H

#	Peak Name	CH	tR	Area	Height	Area%	Height%	Quantity	NTP	Resolution	Symmetry Factor	Warning
1	Unknown	5	11.008	4699182	295155	33.842	27.055	N/A	10820	2.672	1.183	
2	Unknown	5	12.057	595998	39874	4.292	3.655	N/A	17617	15.871	1.131	
3	Unknown	5	16.613	6106790	720402	43.979	66.035	N/A	97875	N/A	1.414	
4	Unknown	5	17.812	1274384	20048	9.178	1.838	N/A	N/A	N/A	N/A	
5	Unknown	5	18.990	1209354	15461	8.709	1.417	N/A	766	N/A	N/A	

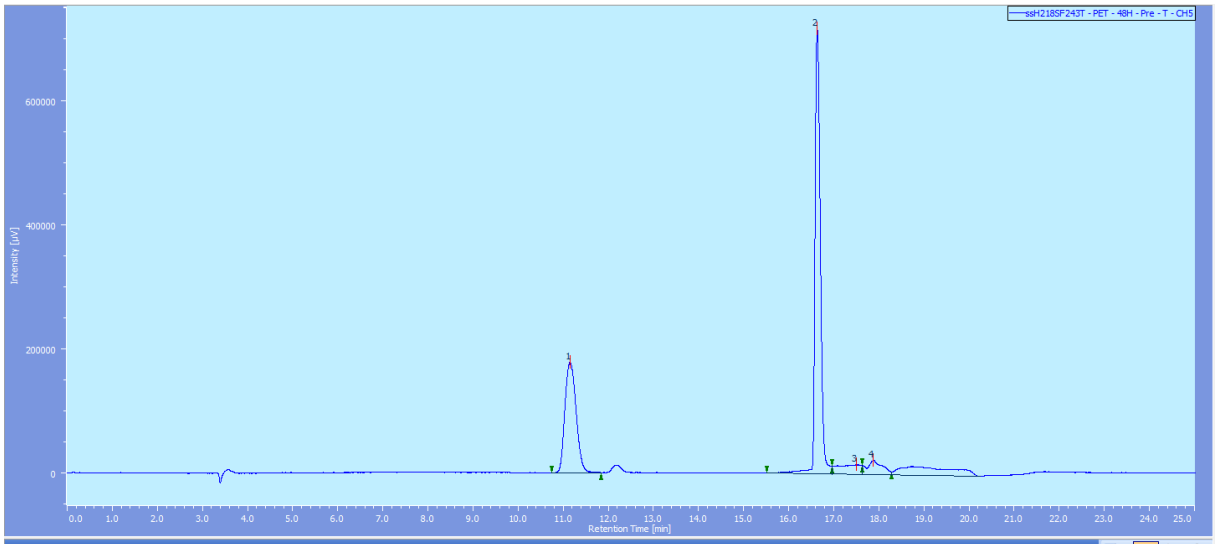
- Reações com PET 90h sem pré-tratamento



Peak Info. Table: ssH218SF243T - PET - 90H

1	Unknown	5	11.018	4419817	237275	31.060	21.044	N/A	7552	15.329	1.224
2	Unknown	5	16.597	7403469	844817	52.027	74.925	N/A	88937	1.568	1.376
3	Unknown	5	17.823	1302082	29630	9.150	2.628	N/A	2803	0.377	N/A
4	Unknown	5	18.548	1104664	15824	7.763	1.403	N/A	871	N/A	5.732

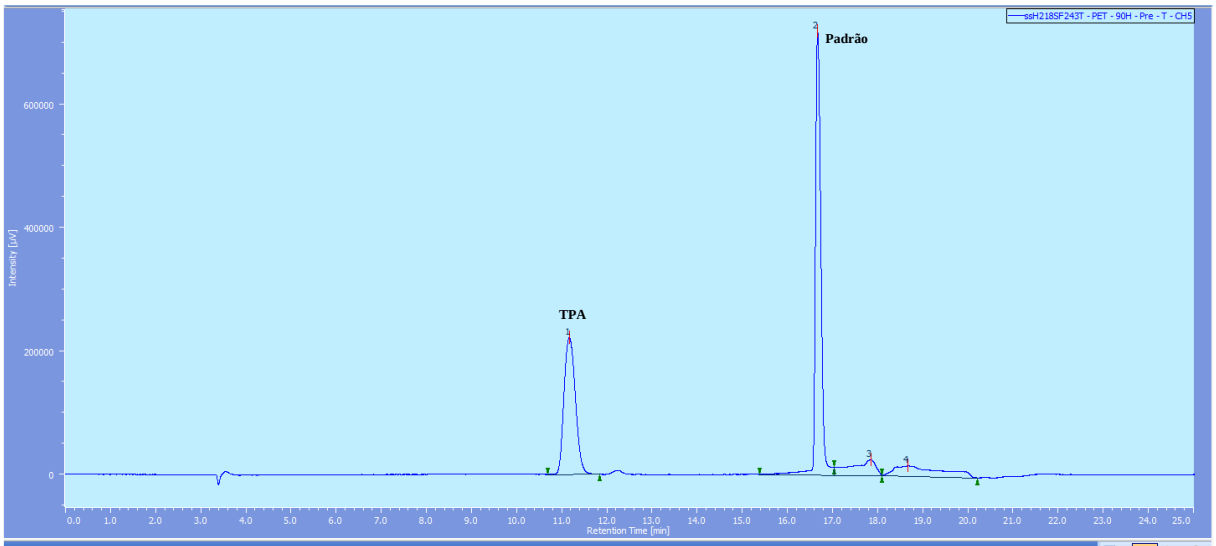
- Reações com PET 48h com pré-tratamento



Peak Info. Table: ssH218SF243T - PET - 48H - Pre - T

#	Peak Name	CH	tR	Area	Height	Area%	Height%	Quantity	NTP	Resolution	Symmetry Factor	Warning
1	Unknown	5	11.145	3070442	177863	30.073	19.045	N/A	9192	16.187	1.182	
2	Unknown	5	16.623	6011449	716887	58.878	76.763	N/A	96798	N/A	1.370	
3	Unknown	5	17.482	568964	15600	5.573	1.670	N/A	N/A	N/A	N/A	
4	Unknown	5	17.868	559178	23543	5.477	2.521	N/A	N/A	N/A	N/A	

- Reações com PET 90h com pré-tratamento

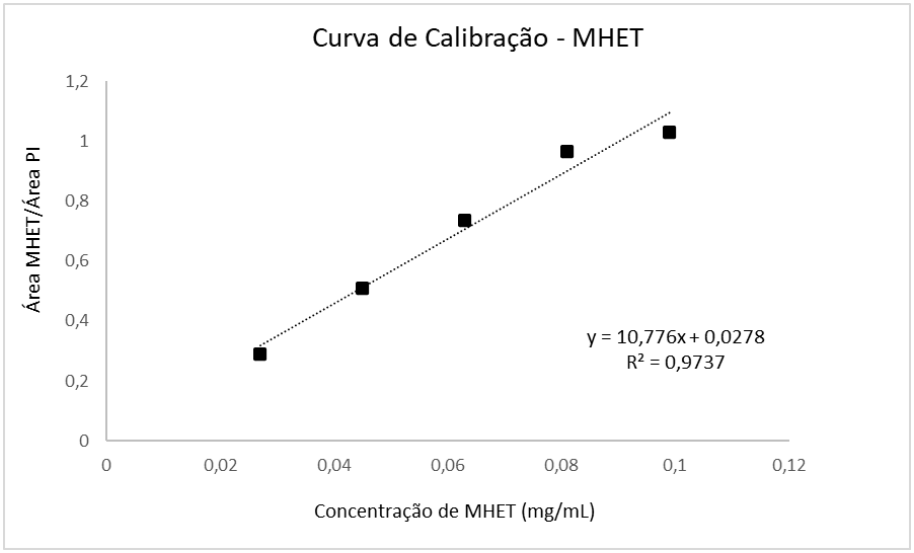


Peak Info. Table: ssH218SF243T - PET - 90H - Pre - T

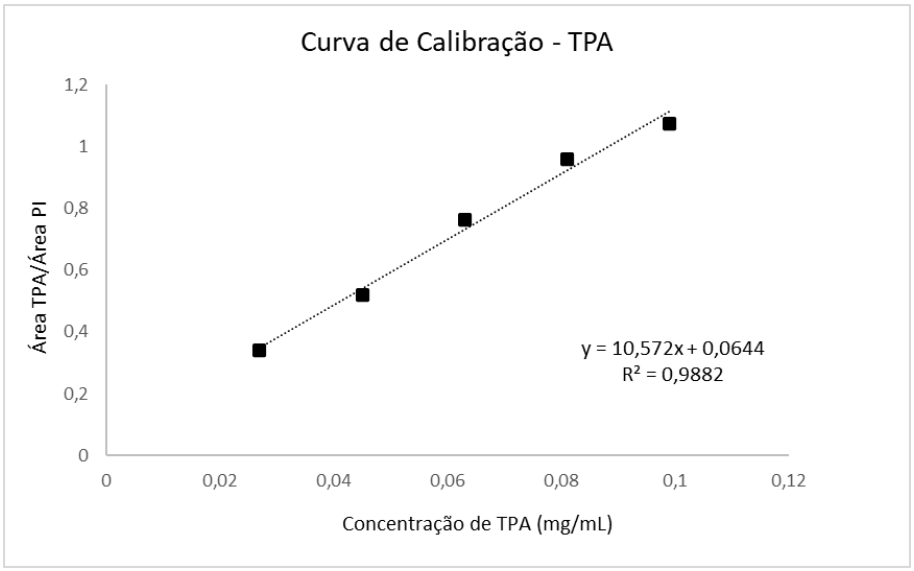
#	Peak Name	CH	tR	Area	Height	Area%	Height%	Quantity	NTP	Resolution	Symmetry Factor	Warning
1	Unknown	5	11.162	3889436	221587	31.899	22.595	N/A	8862	15.973	1.158	
2	Unknown	5	16.660	6114457	717489	50.148	73.163	N/A	95173	1.523	1.383	
3	Unknown	5	17.838	943351	24951	7.737	2.544	N/A	2856	0.394	N/A	
4	Unknown	5	18.660	1245677	16644	10.216	1.697	N/A	686	N/A	1.895	

ANEXO A – CURVAS DE CALIBRAÇÃO

- Curva de calibração de MHET com padrão interno.



- Curva de calibração de TPA com padrão interno.



O padrão interno utilizado foi o *1-(2-Hidroxietil) 4-metil tereftalato* (pureza: > 97%), adicionado nas amostras com uma concentração de 0,1 mg. mL^{-1}.