UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE PROCESSOS QUÍMICOS E BIOQUÍMICOS

DESPOLIMERIZAÇÃO DE POLI(TEREFTALATO DE ETILENO) UTILIZANDO ENZIMAS COMERCIAIS

ADRIANO CARNIEL DE OLIVEIRA

RIO DE JANEIRO 2020

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE PROCESSOS QUÍMICOS E BIOQUÍMICOS

ACADÊMICO: ADRIANO CARNIEL DE OLIVEIRA

DESPOLIMERIZAÇÃO DE POLI(TEREFTALATO DE ETILENO) UTILIZANDO ENZIMAS COMERCIAIS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE PROCESSOS QUÍMICOS E BIOQUÍMICOS, ESCOLA DE QUÍMICA, UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO, COMO REQUISITO PARCIAL NECESSÁRIO À OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM CIÊNCIAS.

ORIENTADORES:

Prof^a Dr^a MARIA ALICE ZARUR COELHO Dr^a ALINE MACHADO DE CASTRO

RIO DE JANEIRO 2020

CIP - Catalogação na Publicação

CC289d	Carniel de Oliveira, Adriano Despolimerização de poli(tereftalato de etileno) utilizando enzimas comerciais. / Adriano Carniel de Oliveira Rio de Janeiro, 2020. 128 f.
	Orientadora: Maria Alice Zarur Coelho. Coorientadora: Aline Machado de Castro. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Programa de Pós Graduação em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos, 2020.
	1. reciclagem enzimática. 2. poli(tereftalato de etileno). 3. cutinase. 4. lipase. 5. ácido tereftálico. I. Zarur Coelho, Maria Alice, orient. II. Machado de Castro, Aline, coorient. III. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Miguel Romeu Amorim Neto - CRB-7/6283.

FOLHA DE APROVAÇÃO

ACADÊMICO: ADRIANO CARNIEL DE OLIVEIRA

DESPOLIMERIZAÇÃO DE POLI(TEREFTALATO DE ETILENO) UTILIZANDO ENZIMAS COMERCIAIS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE PROCESSOS QUÍMICOS E BIOQUÍMICOS, ESCOLA DE QUÍMICA, UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO, COMO REQUISITO PARCIAL NECESSÁRIO À OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM CIÊNCIAS.

DISSERTAÇÃO APROVADA POR:

ORIENTADORA: Maria Alice Zarur Coelho

COORIENTADORA: Aline Machado de Castro

AVALIADOR: Bernardo Dias Ribeiro

AVALIADOR: Marta Antunes Pereira Langone

"Individually, we are one drop. Together, we are an ocean" Ryunosuke Satoro

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço aos meus queridos pais, Glaucia e José Aparecido, por sempre acreditarem em mim, investirem nos meus estudos e por serem a minha fortaleza. Agradeço às minhas irmãs, Giovana e Gabi, por sempre estarem do meu lado quando eu preciso. Também agradeço às minhas amadas tias, Dulci e Maria, por sempre me incentivarem a percorrer um caminho correto e me amarem como filho. Família, amo vocês mais que tudo nesta vida!

Agradeço às minhas orientadoras, Prof^a Maria Alice e Dr^a Aline Machado, pela oportunidade, ensinamentos e confiança. Obrigado por se engajarem em um estudo tão importante para o futuro do nosso planeta. Aline, você é um exemplo de profissional e de ser humano que todos deveriam ser na vida empresarial e acadêmica. Muito obrigado pela parceria, por todas as oportunidades, pelo incentivo e por compartilhar seu conhecimento nestes últimos anos que trabalhamos juntos. Com certeza, grande parte da minha evolução profissional se deve a você!

Agradeço à Petrobras pelo suporte financeiro e incentivo a execução desse projeto. Um enorme obrigado a toda a equipe da BIO/CENPES/Petrobras e da Falcão Bauer por terem auxiliado nas rotinas laboratoriais e nas discussões construtivas, além de tornarem os dias de trabalho mais divertidos! Também agradeço a toda a equipe do projeto de despolimerização de PET pela troca de conhecimento e pelo empenho e excelência de cada um neste desafio tecnológico.

Agradeço também à UFRJ e a todos do programa de pós da EPQB pela oportunidade de cursar o mestrado. Também agradeço a todos os meus professores que foram exemplos e contribuíram enormemente para o meu crescimento.

For last but never least, agradeço à família que escolhi – meus grandes amigos – que me aturam e sempre estão comigo nos momentos felizes ou tristes (em ordem alfabética para evitar o climão): Adriani, Aghata, Amanda, Camila, Dayane, Fabiana, Jéssica, Leandro, Lucas, Maria, Milena, Nathally, Nico, Priscila, Tiago e Twane. Cada um de vocês foi importante para mim nestes últimos anos e, juntos, a vida foi muito mais leve e divertida!

RESUMO

CARNIEL, Adriano. **Despolimerização de poli(tereftalato de etileno) utilizando enzimas comerciais**. Orientadores: Maria Alice Zarur Coelho e Aline Machado de Castro. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos). Rio de Janeiro, 2020.

O poli(tereftalato de etileno) (PET) é o principal polímero utilizado na fabricação de garrafas plásticas. O tempo de uso curto e o descarte destas embalagens causam impactos ambientais e, também, econômicos. A reciclagem pela recuperação dos seus monômeros iniciais – o ácido tereftálico (TPA) e o etilenoglicol (EG) tem sido uma alternativa para reutilizar estas embalagens. A rota de reciclagem enzimática tem demonstrado um enorme potencial devido à alta especificidade catalítica, emprego de condições brandas de temperatura e pH, além de ser ambientalmente amigável. Algumas hidrolases de classes como esterases, lipases e cutinases têm sido reportadas pela habilidade de catalisar a hidrólise do PET. Entretanto, a produtividade e extensão de degradação ainda são baixas para substratos com alto grau de polimerização, como as garrafas. Logo, é necessária a busca por enzimas capazes de despolimerizar este tipo de materiais eficientemente. Neste estudo, um conjunto de 10 enzimas comerciais (nove lipases e uma cutinase) foram inicialmente avaliadas para identificar o melhor biocatalisador capaz de atuar sobre a molécula de tereftalato de bis(2-hidroxietileno) (BHET) e dois graus contrastantes do polímero de PET amorfo e partículas de garrafa de água mineral após uso pelo consumidor. Em seguida, foram realizados ensaios em sistemas de reatores de agitação contínua empregando condições otimizadas de reação para o melhor biocatalisador visando despolimerizar um substrato moído de PET após uso pelo consumidor. Foram avaliados preliminarmente os efeitos de controle de pH, alimentação do biocatalisador e reduções nas cargas enzimáticas visando uma possível redução do custo do processo. Na triagem, a cutinase de Humicola insolens (HiC) apresentou significativamente a melhor performance sobre os dois graus de polímero de PET (soma dos produtos de hidrólise de 1372 µM para amorfo e 301,5 µM para garrafa). Entretanto, a HiC não converteu totalmente o BHET ao TPA a 37 °C, acumulando o tereftalato de mono(2-hidroxietileno) (MHET). A lipase B de Candida antarctica (CALB) foi a única enzima no estudo de hidrólise de BHET que apresentou alta especificidade ao produzir TPA (99,6%). Deste modo, um ensaio empregando a combinação de HiC e CALB confirmou um efeito sinergético entre as duas enzimas, potencializando 2,2 vezes a concentração de TPA formada em relação ao uso apenas de HiC. Nos ensaios em biorreatores, foi observado que o uso de água pura como sistema reacional e controle de pH com NaOH 0,5 M apresentou melhores resultados em comparação com sistema tamponado. Além disso, o maior valor de concentração de TPA atingido foi de 65 mM (10,9 g/L) em 4 dias a 62,6 °C utilizando apenas a HiC, um dos melhores resultados reportados até o momento na literatura para este grau de cristalinidade do PET.

ABSTRACT

CARNIEL, Adriano. **Depolimerization of poli(ethylene terephthalate) using commercial enzymes**. Supervisors: Maria Alice Zarur Coelho and Aline Machado de Castro. Dissertation (Master of Science in Chemistry and Biochemistry Processes Engineering). Rio de Janeiro, 2020.

Poly(ethylene terephthalate) (PET) is the main polymer used in the manufacture of plastic bottles. The short use time and disposal of these packages cause environmental and economic impacts. Recycling has been an alternative to reusing these packages by recovery of their initial monomers - terephthalic acid (TPA) and ethylene glycol (EG). The enzymatic recycling route has shown great potential due to its high catalytic specificity, use of mild temperature and pH conditions, as well as being environmentally friendly. Some hydrolases of classes such as esterases, lipases and cutinases have been reported for their ability to catalyze PET hydrolysis. However, productivity and extent of degradation are still low for higher polymer grade, such as PET bottles. Therefore, the search for enzymes capable of depolymerizing these materials efficiently is-urgent. In this study, a set of 10 commercial enzymes (nine lipases and one cutinase) were initially evaluated to identify the best biocatalyst capable of converting bis(2-hydroxyethyl) terephthalate (BHET) and two contrasting grades of PET, being one amorphous PET and the other, a post-consumer mineral water bottle particles. Subsequently, tests were performed on continuous stirring reactor systems employing optimized reaction conditions of the best biocatalyst to depolymerize a post-consumer ground PET substrate. The effects of pH control, biocatalyst feeding and reductions in enzymatic loads were preliminarily evaluated aiming at a possible reduction of the process cost. In screening tests, Humicola insolens (HiC) cutinase showed significantly the best performance on both grades of PET polymer (sum of 1372 µM amorphous and 301.5 µM hydrolysis products for bottle). However, HiC did not fully convert BHET to TPA at 37 °C, accumulating mono(2-hydroxyethyl) terephthalate (MHET). Candida antarctica lipase B (CALB) was the only enzyme in the BHET hydrolysis study that showed high specificity in converting BHET to TPA (99.6%). Thus, an assay employing the combination of HiC and CALB confirmed a synergistic effect between two enzymes, enhancing 2.2-fold TPA concentration formed in comparison to use of HiC solely. In the bioreactor assays, it was observed the use of pure water as reaction system and pH control with 0.5 M NaOH presented better results compared to buffered system. In addition, the highest TPA concentration achieved was 65 mM (10.9 g / L) within 4 days at 62,7 °C using HiC solely, one of the best results reported so far in the literature for this crystallinity grade of PET.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- BHET Tereftalato de bis(2-hidroxietileno)
- BSA Albumina do soro bovino
- CPR flocos de PET reciclado
- DCCR Delineamento Composto Central Rotacional
- DMT Tereftalato de dimetila
- EC Enzyme Comission
- EG Etilenoglicol
- GC Grau de cristalinidade
- GP Grau de polimerização
- GS Grau de sinergia
- HPLC Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
- MEV Microscopia eletrônica de varredura
- MHET Tereftalato de mono(2-hidroxietileno)
- MS Modificadora de superfície
- PET poli(tereftalato de etileno)
- PH PET hidrolase
- pH Potencial hidrogeniônico
- RMN Ressonância Magnética Nuclear
- Tg Temperatura de transição vítrea
- Tm Temperatura de fusão
- TPA Ácido tereftálico
- VI Viscosidade intrínseca

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Reações químicas envolvidas nas duas rotas de síntese do pré-polímero,			
BHET, para síntese de PET23			
Figura 2. Ilustração dos processos de esticamentos monoaxial e biaxial realizados			
em um polímero amorfo para induzir o processo de cristalização27			
Figura 3. Três principais métodos de reciclagem química do PET			
Figura 4. Possíveis produtos da hidrólise do polímero de PET catalisada por			
poliésteres hidrolases40			
Figura 5. Estrutura da superfície de filme de PET e diferenças das atividades de			
enzimas modificadoras de superfície do PET e das PET hidrolases41			
Figura 6. Atividade catalítica das lipases no metabolismo lipídico. Uma molécula			
de triacilglicerol pode ser hidrolisada pela ação de uma lipase e formar glicerol e ácidos			
graxos, embora esta mesma enzima passa utilizar estes produtos para realizar a			
reação reversa (síntese) de triacilgliceróis44			
Figura 7. Possível estrutura molecular da cutina e as diferentes famílias de ácidos			

graxos que podem ser encontrados. Figura adaptada de NIKOLAIVITS et al. (2018).

......46

Figura 8. Processo de degradação do polímero de PET pela bactéria *Ideonella sakaiensis*. O processo de degradação ocorre inicialmente pela adesão e secreção da enzima PETase, liberando MHET. Em seguida, o MHET é absorvido pela bactéria e hidrolisado a TPA e EG pela ação da MHETase, fornecendo estes monômeros como fonte de carbono para a célula. Figura adaptada de BORNSCHEUER (2016).......49

Figura 10. Curvas padrões construídas para (a) TPA, (b) MHET e (c) BHET para análise quantitativa em HPLC......63

Figura 12. Progresso dos produtos liberados da hidrólise de PET amorfo e garrafa catalisada por HiC a 37 °C em hibridizador. (a) Somatório dos produtos liberados e concentração de cada analito liberado na hidrólise de (b) PET amorfo e (c) PET garrafa. As reações foram realizadas em tampão fosfato de sódio 200 mM (pH 7,0), 200 mg de PET, carga de enzima de 0,01 g_{proteína}/g_{PET} e agitação de 25 rpm.......77

Figura 13. Progresso do grau de sinergia entre HiC e CALB durante hidrólise de três diferentes tipos de PET – (a) amorfo, (b) garrafa e (c) CPR – a 60 °C em hibridizador. As reações foram realizadas em tampão fosfato de sódio 200 mM (pH 7,0), 200 mg de PET, carga de enzima de 0,01g_{proteína}/g_{PET} e agitação de 25 rpm...83

Figura 18. Progresso do (a) monitoramento do pH e (b) somatório de TPA, MHET e BHET liberados durante hidrólise de PET CPR por HiC (0,065 g_{proteína}/g_{PET}) a 50 °C em reatores. Foram comparadas as condições com controle de pH em 8,95 com adição de NaOH 0,5 M (círculos) e de KOH (triângulos), além da condição sem controle de pH (quadrados). As reações foram realizadas em água com 80,8 g/L de PET e carga de enzima de 0,065 g_{proteína}/g_{PET} e agitação de 300 rpm.......93 Figura 19. Progresso da concentração de TPA liberado pela hidrólise de PET CPR por HiC a 50 °C em reatores, comparando duas estratégias de alimentação de enzima: carga total de enzima (0,065 g_{proteína}/g_{PET}) no início da reação (círculos) *versus* metade da carga total no início da reação e a outra metade em 48 hrs de reação (triângulos). As reações foram realizadas em tampão Tris-HCl 397 mM (pH 8,95) com 80,8 g/L de PET.

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Principais propriedades físico-químicas do PET				
Tabela 2. Relação dos principais organismos produtores de cutinases e hidrolases				
homólogas descritos na literatura por apresentar atividade hidrolítica sobre PET. (PH				
= PET hidrolase e MS = modificadora de superfície)48				
Tabela 3: Reagentes utilizados nos ensaios experimentais				
Tabela 4. Equipamentos utilizados nos ensaios experimentais				
Tabela 5. Enzimas comerciais utilizadas nos estudos de hidrólise de BHET e PET.				
Tabela 6. Variações estudadas para avaliar o efeito do controle de pH durante				
hidrólise de PET CPR catalisada pela HiC59				
Tabela 7. Variações estudadas para avaliar o efeito da redução de carga da enzima				
HiC durante hidrólise de PET CPR60				
Tabela 8. Gradiente de fase móvel utilizada em HPLC para análise quantitativa de				
TPA, MHET e BHET62				
Tabela 9. Resultados das variáveis de respostas da hidrólise de BHET catalisada				
por enzimas ao final da reação (24 horas)69				
Tabela 10. Resultados das variáveis de respostas da triagem de enzimas para				
hidrólise de PET amorfo e garrafa a 37 °C no final das reações (14 dias)74				
Tabela 11. Resultados das variáveis de respostas no final das reações (14 dias)				
Tabela 11. Resultados das variáveis de respostas no final das reações (14 dias) de hidrólise de PET amorfo, garrafa e CPR a 60 °C pela adição individual ou				
Tabela 11. Resultados das variáveis de respostas no final das reações (14 dias) de hidrólise de PET amorfo, garrafa e CPR a 60 °C pela adição individual ou simultânea de HiC e CALB				
Tabela 11. Resultados das variáveis de respostas no final das reações (14 dias) de hidrólise de PET amorfo, garrafa e CPR a 60 °C pela adição individual ou simultânea de HiC e CALB				
Tabela 11. Resultados das variáveis de respostas no final das reações (14 dias) de hidrólise de PET amorfo, garrafa e CPR a 60 °C pela adição individual ou simultânea de HiC e CALB				
Tabela 11. Resultados das variáveis de respostas no final das reações (14 dias) de hidrólise de PET amorfo, garrafa e CPR a 60 °C pela adição individual ou simultânea de HiC e CALB				
Tabela 11. Resultados das variáveis de respostas no final das reações (14 dias) de hidrólise de PET amorfo, garrafa e CPR a 60 °C pela adição individual ou simultânea de HiC e CALB				
Tabela 11. Resultados das variáveis de respostas no final das reações (14 dias) de hidrólise de PET amorfo, garrafa e CPR a 60 °C pela adição individual ou simultânea de HiC e CALB				
Tabela 11. Resultados das variáveis de respostas no final das reações (14 dias) de hidrólise de PET amorfo, garrafa e CPR a 60 °C pela adição individual ou simultânea de HiC e CALB				

ÍNDICE DE APÊNDICES

SUMÁRIO

1.	INTRO	DUÇÃO	19
2.	REVIS	ÃO BIBLIOGRÁFICA	21
	2.1.	Poli(tereftalato de etileno) (PET)	21
	2.1.1.	Síntese do PET	21
	2.1.2.	Propriedades e aplicações do PET	23
	2.1.3.	Impactos da indústria dos plásticos e do PET	29
	2.2.	Reciclagem do PET	33
	2.2.1.	Reciclagem enzimática de PET	39
	2.2.1.	1. Lipases	43
	2.2.1.2	2. Cutinases	45
	2.2.1.3	3. PETase	49
3.	OBJET	TVOS	52
	3.1.	Objetivo geral	52
	3.2.	Objetivos específicos	52
4.	METO	DOLOGIA	53
	4.1.	Materiais	53
	4.1.1.	Reagentes	53
	4.1.2.	Equipamentos	54
	4.1.3.	Enzimas	54
	4.2.	Quantificação da concentração de proteínas	55
	4.3.	Triagem de enzimas comerciais para hidrólise de BHET	56
	4.4.	Triagem de enzimas comerciais para hidrólise de PET garrafa e am	orfo .
			56
	4.5.	Despolimerização de diferentes tipos de PET por HiC e CALB	57
(4.6. empregar	Despolimerização de PET CPR por HiC em reator de agitação con ndo condições otimizadas de reação	tínua 58
	4.7.	Efeito do controle de pH na reação de despolimerização de PET CP	R por
I	HiC		59
	4.8.	Efeito de adição da enzima HiC na despolimerização de PET	59
	4.9.	Efeito da carga de enzima na despolimerização de PET CPR por Hi	C.60

	4.10.	Síntese de MHET60	
	4.11.	Quantificação dos produtos da despolimerização de PET por HPLC 61	
	4.12.	Microscopia Eletrônica por Varredura63	
	4.13.	Cálculos64	
	4.13.1.	Concentração em quantidade de matéria dos analitos64	
	4.13.2	Fração molar dos analitos64	
	4.13.3.	Conversão de BHET65	
	4.13.4.	Rendimento de MHET ou TPA na hidrólise de BHET65	
	4.13.5.	Seletividade da conversão de BHET a TPA66	
	4.13.6	Rendimento de TPA na hidrólise de PET67	
	4.13.7	Grau de sinergia67	
	4.13.8	Produtividade de TPA na hidrólise de PET68	
5.	RESUL	TADOS E DISCUSSÃO69	
	5.1.	Triagem de enzimas comerciais para hidrólise de BHET69	
	5.2.	Triagem de enzimas comerciais para hidrólise de PET amorfo e garrafa . 	
C	5.3. CALB	Hidrólise enzimática de diferentes tipos de PET pelas enzimas HiC e	
c	5.4. condições	Hidrólise de PET CPR catalisada por HiC em biorreatores empregando otimizadas	
þ	5.5. oor HiC	Estudo do efeito do controle de pH na hidrólise de PET CPR catalisada	
e	5.6. em biorrea	Estudo do efeito do tipo de alimentação de HiC na hidrólise de PET CPR atores96	
C	5.7. CPR	Estudo do efeito da redução da carga da enzima HiC na hidrólise de PET	
6.	CONCL	USÕES103	
7.	PERSP	ECTIVAS FUTURAS105	
8.	. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS106		
9.	ANPÊN	DICES	

1. INTRODUÇÃO

O mundo tem sido modificado economica e ambientalmente desde a descoberta e produção dos materiais plásticos. Devido às suas excelentes propriedades e baixo custo de produção, os plásticos têm sido aplicados em diversos setores industriais e é estimado que mais 1 bilhão de toneladas destes materiais deverão ser produzidas no ano de 2050 (NEW PLASTICS ECONOMY, 2016).

O poli(tereftalato de etileno) (PET) é um dos principais polímeros utilizados na fabricação de embalagens plásticas, principalmente em garrafas de bebidas carbonatadas. Isto porque este material possui excelentes propriedades requeridas para esta finalidade, como barreira a gases, transparência, leveza, resistência mecânica e durabilidade (MCINTYRE, 2004; ROBERTSON, 2016). O polímero de PET é produzido principalmente pela esterificação do ácido tereftálico com o etilenoglicol, ambos provenientes de matéria-prima fóssil (AWAJA; PAVEL, 2005).

O despejo inadequado dos resíduos das embalagens plásticas tem impactado negativamente os ecossistemas terrestres e marinhos, pois apresentam alta recalcitrância à degradação abiótica e biótica nestes ambientes (CRAWFORD; QUINN, 2016). Além disso, os monômeros utilizados para fabricar as embalagens descartadas são desperdiçados, demandando continuamente matérias-primas virgens para a síntese de novas embalagens e gerando uma perda econômica no processo (PAYNE; MCKEOWN; JONES, 2019).

A reciclagem é a melhor alternativa para o manejo destes resíduos, i.e. recuperar os monômeros que os compõem e criar uma forma de economia circular para a indústria dos plásticos (NEW PLASTICS ECONOMY, 2016). A rota de

reciclagem química tem apresentado excelentes resultados, porém utilizam reagentes agressivos ao meio ambiente (BARTOLOME et al., 2012).

Recentemente, a descoberta de algumas enzimas hidrolíticas microbianas capazes de despolimerizar o PET tem demonstrado um potencial uso no processo de reciclagem (KHOONKARI et al., 2015; BORNSCHEUER, 2016; WEI; ZIMMERMANN, 2017a). O uso industrial das enzimas torna o processo ambientalmente amigável devido à alta biodegradabilidade destes biocatalisadores (RAO et al., 2010). Entretanto, as taxas de despolimerização obtidas pelas enzimas conhecidas têm sido relativamente baixas para resíduos com propriedades mais complexas, como as garrafas PET (KAWAI; KAWABATA; ODA, 2019). Desta forma, a busca por enzimas com maiores atividades hidrolíticas sobre estes tipos de amostras é encorajada.

Portanto, este trabalho apresenta a triagem de dez enzimas produzidas comercialmente para avaliar a capacidade em catalisar a hidrólise do polímero de PET. A cutinase de *Humicola insolens* (HiC) e a lipase B de *Candida antarctica* (CALB) foram selecionadas como potenciais biocatalisadores para o uso na reciclagem enzimática de PET a fim de obter os seus monômeros iniciais: ácido tereftálico (TPA) e etilenoglicol (EG). Além disso, baseado em um estudo prévio de otimização das condições experimentais por delineamento experimental da despolimerização de PET reciclado apenas pela HiC (CASTRO et al., 2019), este trabalho também avaliou preliminarmente os efeitos do controle de pH, do tipo de alimentação do biocatalisador e da redução da carga de enzima visando a redução de custos de processo. Os principais resultados descritos no Capítulo 5 deram origem a dois artigos científicos publicados em periódicos e ambos se encontram no Capítulo 9 – Apêndices A e B.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Poli(tereftalato de etileno) (PET)

2.1.1. Síntese do PET

O poli(tereftalato de etileno), mundialmente conhecido pelo acrônimo PET, é um polímero sintético alifático–aromático de enorme importância comercial na indústria dos plásticos. Este material pertence à classe dos poliésteres, pois apresenta este grupo funcional – o éster – por toda sua cadeia estrutural devido às reações de esterificações entre seus monômeros (MCINTYRE, 2004). A síntese comercial do PET pode ser realizada em três ou quatro etapas de produção: (1) transesterificação ou esterificação direta, (2) pré-polimerização, (3) policondensação e (4) policondensação em estado sólido (RAVINDRANATH; MASHELKAR, 1986).

A primeira etapa de síntese do PET (1) consiste em produzir o pré-polímero tereftalato de bis(2-hidroxietileno) (BHET). Esta molécula pode ser obtida por duas vias distintas: transesterificação ou esterificação direta (Figura 1). A transesterificação foi a primeira rota a ser desenvolvida e utiliza como monômeros o tereftalato de dimetila (DMT; porção aromática) e o etilenoglicol (EG; porção alifática) para produzir o BHET, liberando metanol como coproduto. Já a esterificação direta tem sido a rota industrial preferencial atualmente devido ao baixo custo de obtenção da matéria-prima desta via – o ácido tereftálico (TPA; porção aromática) de alta pureza – e melhores eficiências reacionais, além de não gerar metanol, um álcool tóxico (TEPHLY, 1991; HANSEN; SARGEANT, 2000). Nesta reação, o TPA é reagido com o EG para formar

o BHET através de uma reação de esterificação, liberando água como coproduto (RAVINDRANATH; MASHELKAR, 1986; PANG; KOTEK; TONELLI, 2006; WEBB et al., 2012).

Após a obtenção dos monômeros de BHET e eventuais oligômeros de cadeias curtas, diversas reações de transesterificação ocorrem entre estas moléculas liberando EG como coproduto e alongando a cadeia polimérica do PET. Na etapa de pré-polimerização (2), as moléculas de BHET são polimerizadas até atingirem cadeias com grau de polimerização (GP) de aproximadamente 30 unidades monoméricas.

Em seguida, a etapa de policondensação (3) é realizada para estender a cadeia do PET em um GP em cerca de 100 e massa molar de 16.000 a 19.000 g.mol⁻¹. Nesta etapa, o PET obtido já pode ser destinado a aplicações industriais que demandam um polímero com características mais maleáveis e de baixa massa molar (CULBERT; CHRISTEL, 2004).

Adicionalmente, uma etapa de policondensação em estado sólido (4) pode ser realizada para obter um polímero de PET de alta massa molar (27.000 a 38.000 g.mol⁻¹ e GP < 150) e com propriedades mais robustas (AWAJA; PAVEL, 2005; ROMÃO; SPINACÉ; PAOLI, 2009). Este processo consiste no resfriamento do PET fundido formado na etapa de policondensação (3) e sua granulação em forma de "*pellets*". Em seguida, estas partículas são processadas em condições específicas para induzir o aumento da cadeia polimérica e cristalização do PET (RAVINDRANATH; MASHELKAR, 1986; CULBERT; CHRISTEL, 2004).



Figura 1. Reações químicas envolvidas nas duas rotas de síntese do pré-polímero, BHET, para síntese de PET.

2.1.2. Propriedades e aplicações do PET

As propriedades físico-químicas inerentes do polímero de PET são as principais características que impulsionaram sua comercialização massiva desde a sua descoberta e patenteamento por John Rex Whinfield e James Tennant Dickson na Inglaterra em 1941 (WHINFIELD; DICKSON, 1941; MCINTYRE, 2004).

Transparência, leveza, rigidez, versatilidade, resistência química, térmica e mecânica, durabilidade e baixo custo de produção são algumas das principais vantagens do uso deste polímero (MANDAL; DEY, 2019).

O PET é um termoplástico, portanto pode ser aquecido e remodelado em diferentes formas de interesse através de técnicas de processamento, tais como modelagem por extrusão, por injeção e por sopro (AWAJA; PAVEL, 2005). Além disso, variações nos parâmetros reacionais no processo de síntese do PET podem ser empregadas a fim de obter diferentes graus do polímero final contendo características físico-químicas que variam de acordo com a finalidade de aplicação (WEBB et al., 2012). A Tabela 1 resume algumas destas características e evidencia a versatilidade com que o PET pode ser produzido.

Tabela 1. Principais propriedades físico-químicas do PET. Tabela adaptada de AWAJA & PAVEL (2005).

Propriedade	Valor (unidade)
Massa molar média	30.000 – 80.000 g.mol ⁻¹
Densidade	1,41 g.cm ⁻³
Temperatura de transição vítrea (Tg)	69 – 115 °C
Temperatura de fusão (Tm)	255 – 265 °C
Absorção de água (após 24 horas)	0,5 %

O monitoramento do aumento da massa molar do polímero é um dos principais parâmetros de processo da síntese de PET. Determinados valores de massas molares devem ser atingidos para que o PET possa ser empregado para uma certa finalidade. Geralmente, estes valores de massa molar são reportados como viscosidade intrínseca (VI) (GUPTA; BASHIR, 2002). A VI é uma forma de mensurar o tamanho das cadeias moleculares poliméricas através de uma técnica que determina a viscosidade de uma solução diluída contendo o polímero de interesse dissolvido em um solvente apropriado. Utilizando a equação de Mark-Houwink, é possível correlacionar a VI da solução com a massa molecular do polímero de forma diretamente proporcional (PADSALGIKAR, 2017).

O grau de cristalinidade também é um importante fator que influencia diretamente as propriedades do PET e suas aplicações, e consequentemente impacta nas condições reacionais e de processamento. Os polímeros podem apresentar dois estados morfológicos: amorfo (1), onde as cadeias poliméricas estão dispostas de forma desorganizada, e cristalino (2), na qual as cadeias poliméricas assumem uma organização conformacional, paralela e extremamente empacotada, originando os cristalitos (ROBERTSON, 2016). O PET pode ser obtido tanto na forma amorfa como semicristalina. Esta última forma é observada em polímeros que apresentam diversas regiões cristalinas – os cristalitos – embebidas em uma região amorfa formando uma complexa estrutura polimérica. Este fenômeno de cristalização parcial envolve diversos fatores intrínsecos e extrínsecos que impedem a perfeita organização e total cristalização do polímero, tais como a não uniformidade do tamanho das cadeias poliméricas (massa molar), interações químicas e espaciais entre as moléculas estruturais das cadeias, e dos parâmetros reacionais empregados para o processo de cristalização (DEMÍREL; YARAŞ; ELÇÍÇEK, 2011; ROBERTSON, 2016).

O PET é um polímero cristalizável devido à linearidade de sua cadeia polimérica e da uniformidade química e geométrica de suas repetições monoméricas. Para elevar o grau de cristalinidade e a massa molar do PET, geralmente é empregada uma estratégia térmica através da policondensação em estado sólido – a quarta etapa da síntese de PET (ROMÃO; SPINACÉ; PAOLI, 2009). Neste processo, os "*pellets*" de

PET são incubados em uma temperatura próxima à temperatura de fusão (Tm) em atmosfera inerte e, posteriormente, sofrem um resfriamento lento. Isto permite que as cadeias do PET possam assumir uma mobilidade capaz de induzir uma orientação estrutural que promova cristalização (DEMİREL; YARAŞ; ELÇİÇEK, 2011).

Inicialmente, o PET foi desenvolvido e explorado na forma de fibras para utilização na indústria têxtil (EFBW - EUROPEAN FEDERATION OF BOTTLED WATERS, 2013). Tenacidade e encolhimento são as principais características que o polímero deve apresentar para esta finalidade, além de possuir uma VI de 0,40 – 0,80 dL.g⁻¹ (GUPTA; BASHIR, 2002; MANDAL; DEY, 2019). Para obter tais características, estas fibras são produzidas logo após a terceira etapa de síntese do PET (policondensação). Geralmente, o polímero fundido é transpassado por um pequeno buraco de uma matriz e, conforme o filamento emerge pela saída, uma tensão é aplicada nesta fibra para induzir um alinhamento linear unidirecional das cadeias poliméricas (CARRAHER, 2003; AWAJA; PAVEL, 2005).

Durante a década de 1950, foram desenvolvidas técnicas capazes de produzir o PET em forma de filme. Este material tem sido empregado para inúmeras finalidades: folhas de raios-X, filmes fotográficos, fitas de gravadores, isolantes elétricos e filmes de embalagens alimentícias, entre outras (AWAJA; PAVEL, 2005; DEMEUSE, 2011). A principal característica destes materiais se deve à orientação biaxial das cadeias poliméricas do PET, produzindo o boPET – um tipo de polímero aprimorado altamente forte e rígido.

Para a obtenção dos filmes de boPET, geralmente é necessário um polímero que apresente uma VI entre 0,60 – 0,70 dL.g⁻¹ (GUPTA; BASHIR, 2002). A produção ocorre por um processo onde o polímero fundido é extrusado em um rolo resfriado, o

qual adota um estado amorfo através do rápido resfriamento – processo conhecido como "quenching". Em seguida, um processo de esticamento bidirecional (Figura 2) é realizado neste PET amorfo, permitindo o alinhamento biaxial das cadeias poliméricas e o aumento do grau de cristalização. Esta cristalização induzida por esticamento promove a formação de vários cristalitos menores que o comprimento de onda da luz visível, conferindo transparência ao polímero final (DEMEUSE, 2011).



Figura 2. Ilustração dos processos de esticamentos monoaxial e biaxial realizados em um polímero amorfo para induzir o processo de cristalização. Figura adaptada de WEI & ZIMMERMANN (2017a).

Na década de 1970, essa estratégia de orientação biaxial das cadeias do PET foi empregada no desenvolvimento de garrafas plásticas e provocou a popularização mundial deste polímero na indústria dos plásticos (ROBERTSON, 2016). Desde então, o PET tem sido o principal material de escolha para aplicação de embalagens plásticas para bebidas. Isto porque as garrafas de PET apresentam excelentes propriedades para esta finalidade: são mais leves que as garrafas de vidro, são transparentes, inquebráveis e quimicamente resistentes, fornecem uma excelente barreira de gases de bebidas gaseificadas e apresentam uma insignificante absorção de água (WELLE,

2011). Todas estas características tornaram as garrafas de PET altamente vantajosas tanto no ponto de vista de aplicação como econômico.

A fabricação das garrafas de PET tem sido realizada pelo processamento de modelagem de sopro. Inicialmente, uma pré-forma amorfa altamente precisa em forma e espessura é fabricada através da injeção do PET fundido em um molde resfriado. Posteriormente, esta pré-forma é transferida para uma unidade de modelagem por sopro que contém o molde da garrafa a ser produzida. Então um sopro de ar comprimido é realizado no centro da pré-forma, esticando o polímero em duas direções e expandindo as paredes do mesmo até as paredes do molde final. Estes processos podem ser realizados em um ou dois estágios de processo (AWAJA; PAVEL, 2005; LARSON, 2015).

Dependendo do tipo de bebida que será armazenada, diferentes graus do polímero de PET são necessários para a produção. Geralmente, as garrafas utilizadas para estocar água apresentam uma VI de 0,70 – 0,78 dL.g⁻¹, enquanto que para refrigerantes e outras bebidas carbonadas são necessárias VIs de 0,78 – 0,85 dL.g⁻¹ (GUPTA; BASHIR, 2002). Além disso, as garrafas PET podem apresentar um perfil heterogêneo de cristalinidade ao longo do corpo deste material. Geralmente as garrafas são mais amorfas na parte superior do "pescoço", enquanto que as paredes laterais apresentam o maior grau de cristalinidade do produto. Já na porção inferior da garrafa é observado um gradiente entre estas duas morfologias descritas (GUPTA; BASHIR, 2002).

Embora a produção mundial do polímero de PET seja majoritariamente demandada para as finalidades resumidas acima, existem outras dezenas de aplicações distintas em que este polímero pode ser utilizado, como em produtos

automotivos, equipamentos eletrônicos e esportivos, insumos medicinais, dispositivos elétricos, entre outros (CARRAHER, 2003).

2.1.3. Impactos da indústria dos plásticos e do PET

A indústria mundial de plásticos tem sido um mercado com enorme sucesso econômico e tem crescido exponencialmente desde a descobertas destes materiais. Estima-se que a produção global de fibras e resinas plásticas cresceu de 2 milhões em 1950 para 380 milhões de toneladas em 2015, com uma taxa de crescimento anual composta de 8,4%, produzindo um total de 8.300 milhões de toneladas de plásticos neste período (GEYER; JAMBECK; LAW, 2017). Estimativas apontam que a demanda para produção dos plásticos quadruplique em 2050 (NEW PLASTICS ECONOMY, 2016). Esta previsão está diretamente relacionada com a forte dependência destes materiais pela sociedade no uso cotidiano e industrial, além de acompanhar o aumento da população mundial – atualmente existem 7,7 bilhões de habitantes e estima-se que serão 9,7 bilhões em 2050 (UNITED NATIONS, 2019).

Dentre os diferentes tipos de polímeros plásticos produzidos, o PET representa o quinto maior mercado desta indústria, alcançando cerca de 50 milhões de toneladas produzidas anualmente (BORNSCHEUER, 2016; GEYER; JAMBECK; LAW, 2017). Mundialmente, as fibras demandam a maior quantidade do PET produzido (66%), seguida das embalagens processadas por sopro (28%), filmes (5%) e outras aplicações (1%) (ONG, 2018). No Brasil, foi estimado que 840 mil toneladas de PET foram consumidas apenas em 2016. Entretanto, o perfil brasileiro de consumo deste

polímero diverge em relação à tendência mundial, pois a produção de embalagens de bebidas e alimentos compreende 90% da demanda majoritária (ABIPET, 2012).

Devido às quantidades colossais de plásticos que foram produzidos e acumulados durante os últimos setenta anos e às previsões de crescimento desta indústria nas próximas décadas, diversas preocupações, debates e alternativas têm sido levantadas acerca da manutenção dos resíduos plásticos gerados. Os plásticos representam aproximadamente 12% do conteúdo dos resíduos sólidos urbanos (MOHARIR; KUMAR, 2019). Apesar do PET ter correspondido apenas a 5,9% do total de resinas plásticas consumidas no Brasil em 2016, este poliéster compõe cerca de 20% dos resíduos plásticos urbanos coletados (ROMÃO; SPINACÉ; PAOLI, 2009; ABIPLAST - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DO PLÁSTICO, 2018).

As embalagens plásticas alimentícias são os principais alvos de preocupações. Embora forneçam diversos benefícios, como reduzir o custo de transporte devido à leveza das embalagens e ampliar o tempo de prateleira dos produtos acondicionados, estes materiais apresentam um tempo de vida útil muito curta, geralmente para um único uso e, então, são descartados (HOPEWELL; DVORAK; KOSIOR, 2009; NEW PLASTICS ECONOMY, 2016). Estas embalagens plásticas após uso pelo consumidor podem receber diferentes destinos como resíduo. Em 2013, as embalagens plásticas coletadas globalmente foram destinadas aos aterros sanitários (40%), incineradores (14%) ou foram recicladas (14%). Entretanto, 32% destes resíduos foram descartados diretamente no meio ambiente (WEBB et al., 2012; NEW PLASTICS ECONOMY, 2016).

Até o ano de 2015, cerca de 4.900 milhões de toneladas de plásticos foram descartados diretamente no meio ambiente ou acumulados em aterros sanitários

(GEYER; JAMBECK; LAW, 2017). Estes aterros são enormes espaços reservados para que os resíduos sólidos urbanos sejam mantidos enterrados a fim de promover a degradação. No entanto, os resíduos plásticos apresentam baixíssimas taxas de degradação devido as suas características recalcitrantes e podem permanecer por dezenas ou até centenas de anos para que comecem a se deteriorar. Mesmo assim, a deterioração destes plásticos pode gerar inúmeros componentes tóxicos que contaminam os solos destes espaços (WEBB et al., 2012).

A incineração é outra rota de destinação que visa a degradação térmica dos resíduos plásticos e permite recuperar a energia contida nos plásticos em forma de calor. Esta rota tem sido bastante questionada devido à formação de compostos tóxicos voláteis e de gases do efeito estufa que podem ser liberados na atmosfera durante a combustão (SINHA; PATEL; PATEL, 2010; WEBB et al., 2012; NEW PLASTICS ECONOMY, 2016).

O descarte indevido dos resíduos plásticos diretamente no meio ambiente tem afetado diversos ecossistemas, porém os ambientes marinhos têm sido os mais impactados (LAW, 2017). Cerca de 8 milhões de toneladas de plásticos foram lançados nos oceanos apenas em 2015, podendo esta quantidade quadruplicar em 2050 e superar a quantidade total de peixes em termos de massa (NEW PLASTICS ECONOMY, 2016). Neste tipo de ecossistema, os plásticos podem apresentar diferentes tamanhos (macro ou microplásticos) e serem encontrados flutuando, submersos, sedimentados ou encalhados nas regiões costeiras (CRAWFORD; QUINN, 2016). Em 2012, cerca de 69,8% dos resíduos coletados no litoral brasileiro eram plásticos. Além disso, aproximadamente 62% destes resíduos plásticos coletados pertenciam a classe de embalagens plásticas (CRAWFORD; QUINN, 2016). Uma vez despejados nos ambientes marinhos, os plásticos podem permanecer por

período indeterminadamente longo devido à resistência desses materiais à degradação natural. Um estudo recente analisou diferentes garrafas de PET encontradas no fundo do mar do Golfo de Sarónico (Grécia) e observou que estas amostras permaneceram robustas por cerca de 15 anos, e, então, começaram a apresentar diferenças nos grupos funcionais nativos na superfície do polímero, indicando um processo de degradação destas garrafas (IOAKEIMIDIS et al., 2016).

A presença dos resíduos plásticos nos oceanos afeta imensamente o equilíbrio da biota marinha. Embora alguns grupos de bactérias e microalgas aparentam beneficiarse com estes materiais, diversos invertebrados, zooplânctons, peixes, tartarugas, pássaros, cetáceos e outros mamíferos são negativamente afetados através do emaranhamento ou ingestão destes plásticos, podendo ser letal. (BEAUMONT et al., 2019). Diferentes estudos vêm demonstrando a bioacumulação de microplásticos ingeridos por diferentes organismos marinhos, inclusive aqueles que são consumidos pelos seres humanos. Este fato tem preocupado a comunidade científica em relação à transferência destes contaminantes pelas cadeias tróficas e aos efeitos toxicológicos que podem impactar a saúde humana (ROCHMAN et al., 2015; MIRANDA; DE CARVALHO-SOUZA, 2016; FORREST; HINDELL, 2018; SMITH et al., 2018). Além deste desequilíbrio ecológico, a poluição marinha pelos plásticos poderá afetar economicamente o setor pesqueiro e de alimentação global pela redução de disponibilidade de alimentos oriundos do mar (BEAUMONT et al., 2019).

2.2. Reciclagem do PET

Devido às imensas quantidades de resíduos plásticos gerados, à baixa taxa de decomposição natural e aos impactos negativos que estes materiais causam ao meio ambiente, a reciclagem tem sido a melhor alternativa para a gestão dos resíduos plásticos, incluindo o PET (BARTOLOME et al., 2012). A reciclagem pode ser definida como a reutilização de resíduos em forma de matéria-prima para a produção de novos produtos (ROBERTSON, 2016). Atualmente, alguns países têm se conscientizado e investido na reciclagem de PET, especialmente de garrafas (WELLE, 2011). No Brasil, cerca de metade das garrafas de PET coletadas após uso pelo consumidor foram destinadas para reciclagem em 2015, porém, menos de 22% dos municípios brasileiros contavam com o serviço de coleta seletiva (ABIPET- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DO PET, 2016; CEMPRE - COMPROMISSO EMPRESARIAL PARA RECICLAGEM, 2019).

Para reciclar este tipo de embalagem, é imprescindível que haja inicialmente uma eficiente seleção deste material na mistura dos resíduos plásticos coletados. Após esta seleção, preferencialmente é realizada uma separação por cores de garrafas. Em seguida, as garrafas são lavadas utilizando detergentes para remover contaminantes, rótulos e cola. Logo, as garrafas são moídas em flocos e lavadas novamente. Polímeros de outras naturezas podem ser removidos durante as etapas de lavagem por flotação. Por fim, estes flocos são secos e disponibilizados para serem reciclados (WELLE, 2011; ROBERTSON, 2016). Existem duas principais rotas empregadas para reciclar o PET: a mecânica e a química.

A reciclagem mecânica consiste no reprocessamento do polímero de PET sem modificar sua estrutura química. Nesta rota ocorrem a reextrusão dos flocos de PET e granulação em forma de "pellets", que poderão ser reprocessados para a confecção de novos materiais (ROBERTSON, 2016). Este tipo de reciclagem apresenta diversas vantagens: baixo custo operacional, processo simplificado e de baixo impacto ambiental (PARK; KIM, 2014). No entanto, apresenta também diversas limitações. A principal desvantagem desta reciclagem se deve a deterioração das propriedades do PET a cada ciclo de reciclagem mecânica, reduzindo a massa molar / VI do PET. Isto ocorre devido ao rompimento das cadeias poliméricas do PET causada pela presença de contaminantes carreados nos flocos de PET processados (SINHA; PATEL; PATEL, 2010). Além disso, o PET reciclado mecanicamente geralmente apresenta uma coloração acinzentada, o que é indesejável para a reutilização em embalagens alimentícias (BARTOLOME et al., 2012). Deste modo, este tipo de reciclagem apenas permite que sejam produzidos materiais com propriedades inferiores em relação ao material original reciclado (PASZUN; SPYCHAJ, 1997). Mundialmente, cerca de 70% do PET pós-reciclado mecanicamente é convertido em fibras, pois geralmente requerem menores qualidades físico-químicas (SINHA; PATEL; PATEL, 2010; ROBERTSON, 2016).

Já a reciclagem química visa a despolimerização do plástico pós-consumido para recuperar os monômeros ou oligômeros constituintes do resíduo plástico (AWAJA; PAVEL, 2005; PAYNE; MCKEOWN; JONES, 2019). Assim como a maioria dos polímeros plásticos, os monômeros utilizados para a síntese industrial de PET são predominantemente oriundos de matéria-prima fóssil – um recurso sabidamente finito –, embora seja possível produzir de forma sustentável TPA e EG a partir de biomassas (PANG et al., 2016; ROBERTSON, 2016). Estima-se que, em 2014, aproximadamente

6% da quantidade total extraída de petróleo foram destinadas para o processo e formação dos plásticos, e a expectativa é que, em 2050, atinja 20% para permitir produzir cerca de 1,12 bilhões de toneladas de plásticos. Logo, a recuperação destes monômeros reduziria a dependência do petróleo como fonte de matéria-prima principal e evitaria a perda econômica do valor presente nos plásticos descartados indevidamente (NEW PLASTICS ECONOMY, 2016; PAYNE; MCKEOWN; JONES, 2019).

Além disso, a partir dos monômeros recuperados, é possível fabricar novos materiais com as mesmas propriedades e finalidades do material original que foi reciclado, ou também para síntese de outros produtos de alto valor agregado (HOPEWELL; DVORAK; KOSIOR, 2009). Logo, a reciclagem química evita a desvalorização do material reciclado e mantem o valor econômico dos resíduos plásticos (PAYNE; MCKEOWN; JONES, 2019).

Além disso, a reciclagem química atende a maioria das prerrogativas do conceito de economia circular, um novo modelo de sustentabilidade que vem sido fortemente incentivada por diversos países, principalmente os europeus (NEW PLASTICS ECONOMY, 2016). A aplicação deste modelo econômico na indústria dos plásticos visa a substituição do atual modelo linear (extração – processamento – consumo – descarte dos materiais fabricados) e preconiza a redução do volume de resíduos descartados e poluição dos ecossistemas através da regeneração dos produtos e matérias-primas e manutenção do valor dos resíduos (KAUR et al., 2018; PAYNE; MCKEOWN; JONES, 2019).

A reciclagem química pode realizada principalmente através ser da despolimerização do PET por hidrólise, metanólise, glicólise, aminólise e amonólise (LORENZETTI et al., 2006). Cada uma destas rotas utiliza diferentes agentes químicos e gera produtos reacionais distintos. Entretanto, apenas a metanólise, glicólise, e hidrólise formam diretamente as moléculas fundamentais para a nova síntese de PET (Figura 3), enquanto que a aminólise e amonólise formam outras moléculas intermediárias com diferentes finalidades е valores agregados (LORENZETTI et al., 2006).



Figura 3. Três principais métodos de reciclagem química do PET.

A metanólise (Figura 3.a) promove a despolimerização de PET na presença de metanol e gera o DMT e EG, monômeros utilizados na síntese do BHET por transesterificação na fabricação de PET. Para isto, são empregados catalisadores metálicos que promovem a transesterificação entre o metanol e a molécula do PET (PASZUN; SPYCHAJ, 1997). Apesar deste método alcançar bons rendimentos, a metanólise não tem sido investida porque a produção do PET utilizando DMT tem se
tornado obsoleta, incompatibilizando o uso deste monômero nas unidades industriais atuais de síntese do PET (BARTOLOME et al., 2012).

A glicólise (Figura 3.b) permite a despolimerização do PET para formar monômeros e oligômeros de BHET – o monômero da polimerização do PET. Nesta reação, emprega-se o EG como solvente e, geralmente, um catalisador que promove a reação de transesterificação entre a cadeia do PET e a molécula de EG. Diferentes catalisadores podem ser empregados, tais como sais metálicos, líquidos iônicos ou hidrotalcitas (PASZUN; SPYCHAJ, 1997; KHOONKARI et al., 2015). Esta rota de reciclagem tem sido intensamente investigada e mostrando ser bastante promissora, apresentando excelentes resultados em termos de produtividade de BHET e tempo de reação. No entanto, os melhores resultados são obtidos com catalisadores pouco ambientalmente amigáveis e podem apresentar grandes riscos se aplicados em escala global (BARTOLOME et al., 2012).

A hidrólise (Figura 3.c) promove a formação de TPA e EG – os monômeros utilizados na principal rota comercial de síntese do PET (esterificação direta) – como produtos da despolimerização. Existem três tipos de reações de hidrólise do PET: alcalina, ácida e neutra. A hidrólise alcalina geralmente utiliza soluções aquosas de hidróxido de sódio ou de potássio (4 – 20% m/m). Em hidrólises ácidas, geralmente emprega-se concentrações elevadíssimas de ácido sulfúrico (>87%), encarecendo o processo. Já a hidrólise neutra possui a vantagem ecológica em relação às anteriores, porém ocorre em temperaturas mais elevadas e utiliza acetatos de metais alcalinos como biocatalisadores (PASZUN; SPYCHAJ, 1997; SINHA; PATEL; PATEL, 2010). Como desvantagem, a reação de hidrólise apresenta um taxa de despolimerização mais lenta em comparação com a glicólise e a metanólise, mesmo ocorrendo em pressões e temperaturas maiores, pois a molécula de água é um nucleófilo mais fraco

(BARTOLOME et al., 2012). Entretanto, esta é a única rota em que efetivamente podem ser recuperados os monômeros iniciais utilizados atualmente na fabricação de PET, aumentando o interesse nos estudos e desenvolvimento desta tecnologia (SINHA; PATEL; PATEL, 2010).

Apesar da reciclagem química solucionar diversos problemas causados pela indústria dos plásticos, diversas desvantagens podem ser pontuadas nesta estratégia. Todos os tipos de reciclagem química citadas demandam elevadas temperaturas (100 – 300 °C) e pressões (1 – 4 MPa) para o sucesso do processo de despolimerização (PASZUN; SPYCHAJ, 1997; SINHA; PATEL; PATEL, 2010). Além disso, o emprego em larga escala destes métodos demandaria uma gestão eficiente dos agentes químicos residuais – necessários para catalisar a despolimerização – e permitindo o enquadramento da reciclagem química no conceito de economia circular. O eventual despejo inadequado destes resíduos poderia trazer consequências graves ao meio ambiente. (MOHARIR; KUMAR, 2019).

Atualmente, a reciclagem química ainda é pouco empregada nos resíduos plásticos. No caso do PET, este tipo de reciclagem compreende apenas 4% do volume total reciclado (SINHA; PATEL; PATEL, 2010). Deste modo, ainda se faz necessário buscar alternativas de reciclagens sustentáveis que sejam ambientalmente amigáveis, empreguem condições mais brandas de processo e que apresentem alta eficiência.

2.2.1. Reciclagem enzimática de PET

Apesar do PET apresentar uma taxa de decomposição biótica extremamente lenta no meio ambiente, algumas enzimas de origem microbiana vêm sendo reportadas na literatura como demonstrando habilidade em catalisar a despolimerização deste material (WEI; ZIMMERMANN, 2017a). As enzimas são moléculas majoritariamente proteicas produzidas por todos os seres vivos e atuam como catalisadores biológicos nas reações químicas necessárias para a vida, aumentando a velocidade destas reações através da redução de energia de ativação (NELSON; COX, 2014). Devido a diversos fatores como versatilidade reacional, alta especificidade catalítica e atuação em condições brandas de temperatura e pH, as enzimas têm sido amplamente exploradas e empregadas em inúmeros processos industriais (LI et al., 2012). Além disso, as enzimas são facilmente biodegradadas na natureza e os resíduos da sua degradação não são tóxicos; portanto, o emprego em larga escala destes biocatalisadores possui um caráter ambientalmente amigável (RAO et al., 2010). Logo, existe uma enorme vantagem do uso das enzimas em relação à rota química para a reciclagem de resíduos plásticos.

Todas as enzimas capazes de promover a degradação do PET pertencem à grande classe das hidrolases (EC 3) – aquelas que utilizam a molécula de água para catalisar a clivagem de determinadas ligações covalentes por meio de uma reação de substituição nucleofílica (NELSON; COX, 2014; PAUL; SANGEETHA; DEEPIKA, 2019; WIERCKX et al., 2019). Isto porque a hidrólise é o principal processo pelo qual estas enzimas promovem a quebra das ligações ésteres das cadeias poliméricas do PET (Figura 4), liberando os seus monômeros iniciais – TPA e EG. Entretanto,

também podem ser liberados como produtos intermediários BHET e MHET (VERTOMMEN et al., 2005). O perfil de liberação destes produtos oriundos da despolimerização de PET varia de acordo com a natureza catalítica da enzima e as condições experimentais empregadas no processo (KAWAI; KAWABATA; ODA, 2019).



Figura 4. Possíveis produtos da hidrólise do polímero de PET catalisada por poliésteres hidrolases.

No ponto de vista de extensão da degradação do polímero de PET, são propostas duas classificações gerais: enzimas modificadoras de superfície do PET e PET hidrolases (Figura 5). O primeiro grupo é composto por enzimas que atuam na hidrólise das terminações ou das curvaturas das cadeias poliméricas presentes na superfície do polímero, reduzindo a hidrofobicidade natural do PET pela exposição de grupamentos carboxilas e hidroxilas. Entretanto, essas enzimas não são capazes de degradar a matriz interna do polímero e não provocam mudanças morfológicas observáveis por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Já as PET hidrolases são

enzimas que, além de modificar as cadeias de superfície, também degradam o polímero internamente, provocando mudanças morfológicas significativas. Por MEV, é possível observar um típico padrão de erosão na superfície do polímero resultante do processo de degradação enzimática (MÜLLER et al., 2005; HERZOG; MÜLLER; DECKWER, 2006; TANIGUCHI et al., 2019). Logo, o grupo das PET hidrolases apresenta um maior potencial de uso na reciclagem enzimática de PET e recuperação dos monômeros estruturais.



Figura 5. Estrutura da superfície de filme de PET e diferenças das atividades de enzimas modificadoras de superfície do PET e das PET hidrolases. Figura adaptada de KAWAI; KAWABATA & ODA (2019).

Existem diversos fatores que influenciam diretamente na eficiência de despolimerização enzimática do PET. A alta hidrofobicidade da superfície do PET tende a repelir a adsorção eficiente das enzimas neste substrato. Este efeito pode ser reduzido pela hidrólise das cadeias poliméricas superficiais (hidrofilização), permitindo maior adsorção, acessibilidade do sítio catalítico às cadeias do PET e avanço da degradação para as camadas mais internas (ATTHOFF; HILBORN, 2007; WEI; ZIMMERMANN, 2017a). Outras estratégias podem ser aplicadas para driblar este efeito, como aumentar a área de superfície do material polimérico a fim de permitir um maior contato entre as enzimas e o substrato (BARTH et al., 2015a; GAMERITH et al., 2017b), ou fusionar elementos proteicos funcionais na estrutura das PET hidrolases que promovam maior taxa de adsorção; cutinases fusionadas com diferentes hidrofobinas fúngicas – proteínas que se aderem a superfícies hidrofóbicas – ou com o módulo do complexo de ligação à carboidrato de uma celulase bacteriana demonstraram um aumento da atividade hidrolítica sobre o PET devido à maior interação destes complexos enzimáticos com a superfície polimérica (ESPINO-RAMMER et al., 2013; ZHANG et al., 2013; RIBITSCH et al., 2015).

Geralmente, maiores taxas de hidrólise são alcançadas quando as reações são executadas em temperaturas próximas à Tg do PET. Entretanto, o valor médio de Tg do PET *in natura* geralmente é menor quando o polímero está presente em meio aquoso. Isto ocorre devido à difusão das moléculas de água pela matriz do polímero, enfraquecendo as ligações hidrogênio estruturais e aumentando a mobilidade das cadeias poliméricas. Consequentemente, este fenômeno permite a maior acessibilidade das enzimas até as cadeias internas (HERRERO ACERO et al., 2011; KAWAI et al., 2014; WEI; ZIMMERMANN, 2017a; KAWAI; KAWABATA; ODA, 2019)

Outro fator que influencia fortemente a eficiência da despolimerização é o grau de cristalinidade, onde as regiões amorfas são mais facilmente degradadas enzimaticamente do que as regiões cristalinas (KAWAI; KAWABATA; ODA, 2019). Esta preferência ocorre porque as cadeias poliméricas dos cristalitos possuem menor mobilidade, impedindo a difusão das enzimas nestas seções (SHAH *et al.*, 2008; BILLIG, 2011; WEI; ZIMMERMANN, 2017; ZIMMERMANN). Além disso, materiais

com orientação biaxial das cadeias de PET são menos susceptíveis a despolimerização, pois induzem o processo de cristalização pela maior formação de ligações do tipo hidrogênio entre as cadeias poliméricas (RONKVIST et al., 2009; ZIMMERMANN; BILLIG, 2010; KAWAI; KAWABATA; ODA, 2019).

Em relação aos biocatalisadores, a atividade catalítica e a estrutura nativa da enzima é outro fator relevante que permite a reação de hidrólise do PET. Diferentes subclasses das hidrolases já foram identificadas pela habilidade de despolimerizar o PET, entretanto destacam-se as lipases, as cutinases e a recém-descoberta PETase (WEI; ZIMMERMANN, 2017a; KAWAI; KAWABATA; ODA, 2019).

2.2.1.1. Lipases

Também conhecidas como triacilglicerol éster hidrolases (EC 3.1.1.3), as lipases são uma classe de enzimas produzidas por quase todos os organismos vivos e estão geralmente envolvidas no metabolismo de lipídeos. Naturalmente, catalisam a hidrólise de ligações ésteres de tri-, di- ou monoglicerídeos (preferencialmente de cadeias longas – número de carbonos > 10), liberando ácidos graxos e glicerol ou, também, a reação reversa de síntese (Figura 6) (JAEGER, 1998). Geralmente, atuam na interface em um sistema bifásico composto por uma fase aquosa e outra orgânica. Entretanto, em condições reacionais específicas, as lipases também podem catalisar diversas reações de síntese, através de três rotas gerais: esterificação, transesterificação e interesterificação (CASAS-GODOY et al., 2012; KHAN et al., 2017). Devido à imensa diversidade catalítica, versatilidade e possuir tipo-, regio- e enantioseletividade, as lipases têm sido foco de intenso estudo e são largamente

empregadas nos processos industriais, com destaque para a área farmacêutica e de produtos de limpeza, como detergentes (HOUDE; KADEMI; LEBLANC, 2004; HASAN; SHAH; HAMEED, 2006).



Figura 6. Atividade catalítica das lipases no metabolismo lipídico. Uma molécula de triacilglicerol pode ser hidrolisada pela ação de uma lipase e formar glicerol e ácidos graxos, embora esta mesma enzima passa utilizar estes produtos para realizar a reação reversa (síntese) de triacilgliceróis.

Estruturalmente, as cadeias polipeptídicas das lipases possuem uma conformação típica das hidrolases, com folhas- β centralizadas e α -hélices laterais. Também são categorizadas como serina hidrolases, pois apresentam em seu sítio catalítico uma tríade catalítica altamente conservada composta por serina – glutamato ou aspartato – histidina (GUPTA; GUPTA; RATHI, 2004). Além disso, estas enzimas apresentam uma característica singular: uma estrutura flexível em forma de tampa localizada sobre o sítio catalítico para protegê-lo. Esta tampa possuí caráter anfipático e sua conformação varia de acordo com a polaridade do ambiente. O controle da abertura desta estrutura determina o estado de ativação da lipase pelo impedimento espacial do substrato com o sítio ativo. Logo, a lipase fica ativa quando a tampa está aberta, e inativa quando fechada (CASAS-GODOY et al., 2012; KHAN et al., 2017).

Em relação à atividade sobre o polímero de PET, a lipase A de *Candida antarctica* (KHODDAMI; MORSHED; TAVANAI, 2001; LEE; SONG, 2010), lipase PS de *Burkholderia cepacia* (HEUMANN et al., 2006), e as lipases de *Thermomyces lanuginosus* (EBERL et al., 2009) e de *Aspergillus oryzae* (WANG et al., 2008) já foram reportadas pela habilidade de modificar a superfície de fibras de PET para conferir características desejadas aos tecidos poliésteres como tingimento e maleabilidade. Entretanto, ainda não foram identificadas lipases capazes de degradar as cadeias internas do PET.

2.2.1.2. Cutinases

Também denominadas cutina hidrolases (EC 3.1.1.74), este grupo de enzimas catalisa a hidrólise de ligações éster presentes na estrutura polimérica da cutina: um poliéster natural complexo formado por unidades de glicerol e de diferentes famílias de ácidos graxos (hidroxilados, diácidos e epóxi) de 16 e 18 carbonos (

Figura 7). Estes monômeros são interconectados por estas ligações éster, formando uma macromolécula glicerolipídica insolúvel (DUTTA; SEN; VEERANKI, 2009; LI-BEISSON et al., 2016). A cutina, juntamente com ceras, compõe a estrutura da cutícula: uma camada protetora que recobre a epiderme de determinados tecidos vegetais da porção aérea das plantas, atuando como uma barreira contra a desidratação e ataques por insetos e micro-organismos (CHEN et al., 2013).



Figura 7. Possível estrutura molecular da cutina e as diferentes famílias de ácidos graxos que podem ser encontrados. Figura adaptada de NIKOLAIVITS et al. (2018).

As cutinases são enzimas predominantemente extracelulares, secretadas por microrganismos patogênicos e saprofíticos visando o rompimento da barreira polimérica protetora da cutina (DUTTA; SEN; VEERANKI, 2009; CHEN et al., 2013). Entretanto, as cutinases também podem ser produzidas por plantas atuando no processo de germinação dos pólens (MAITI; KOLATTUKUDY; SHAYKH, 1979).

Assim como as lipases, as cutinases apresentam o mesmo padrão de dobramento α/β das hidrolases e uma tríade catalítica conservada formada por serina – histidina – aspartato. Estes biocatalisadores também apresentem enorme versatilidade, atuando tanto na reação de hidrólise como nas de síntese (esterificação e transesterificação) e possuem atividade em uma enorme variedade de substratos como outros

poliésteres e triacilgliceróis de cadeia curta ou longa (HAN et al., 2017; NIKOLAIVITS et al., 2018).

No entanto, as cutinases são as menores enzimas dentre todo o grupo das hidrolases de conformação típica α/β (LONGHI; CAMBILLAU, 1999). Além disso, a estrutura de tampa que protege o sítio catalítico das lipases não está presente neste grupo, expondo-o diretamente a solventes e substratos. Elas também não apresentam ativação interfacial em sistema bifásico, permitindo catalisar a hidrólise de substratos hidrofóbicos que estejam em solução ou emulsionados. Porém, uma das principais características das cutinases é a ampla abertura da região do sítio catalítico, permitindo a acomodação de moléculas maiores, como o polímero de cutina e outros poliésteres complexos (DUTTA; SEN; VEERANKI, 2009; CHEN et al., 2013).

Diversas cutinases já foram reportadas por apresentar atividade hidrolítica sobre o PET e, atualmente, representam o principal grupo de enzimas com esta habilidade (LIU et al., 2019). Isto pode estar relacionado com a melhor difusão das enzimas pelas cadeias poliméricas devido aos seus menores tamanhos e, também, pela melhor acomodação da estrutura do polímero de PET na fenda catalítica totalmente exposta das cutinases. A Tabela 2 dispõe uma relação das principais cutinases, assim como algumas hidrolases homólogas a esta classe, que foram identificadas por apresentar atividade sobre o polímero de PET. Embora haja uma boa diversidade de enzimas, muitas destas atuam apenas em substratos de baixa massa molar, como filmes e fibras, e poucos trabalhos demonstram suas atuações em graus poliméricos mais complexos, como os das garrafas.

Tabela 2. Relação dos principais organismos produtores de cutinases e hidrolases homólogas descritos na literatura por apresentar atividade hidrolítica sobre PET. (PH = PET hidrolase e MS = modificadora de superfície).

Enzima	Organismo de origem	Atividade	Tipo de substrato de PET	Referência bibliográfica
Cutinase AnCUT2	Aspergillus niger	MS	" <i>pellets</i> " de PET	(AHMED AL-TAMMAR et al., 2016)
Cutinase	Fusarium oxysporum	MS	Fibras de PET	(DIMAROGONA et al., 2015; KANELLI et al., 2015)
Hidrolase tipo- cutinase LCH1	Fusarium oxysporum	MS	Fibras de PET	(NIMCHUA; PUNNAPAYAK; ZIMMERMANN, 2007)
Cutinase	Fusarium solani	РН	Filmes de PET amorfo e biorientado, Fibras de PET	(VERTOMMEN et al., 2005; ARAÚJO et al., 2007; O'NEILL et al., 2007; RONKVIST et al., 2009)
Cutinase	Humicola insolens	PH	Filmes de PET amorfo e biorientado	(RONKVIST et al., 2009)
LC cutinase	Metagenoma de composto de folhas e galhos	PH	Filme de PET, BHET	(SULAIMAN et al., 2012; SHIRKE et al., 2018)
Cutinase	Penicillium citrinum	MS	Fibra de PET	(LIEBMINGER et al., 2007)
Cutinase	Pseudomonas mendocina	PH	Filmes de PET (amorfo e biorientado)	(RONKVIST et al., 2009)
Cutinase (Cut190)	Saccharomonospora viridis	PH	Filme de PET	(KAWAI et al., 2014; KAWABATA; ODA; KAWAI, 2017)
Cutinases Est1 e Est119	Thermobifida alba	MS	PET filme amorfo	(RIBITSCH et al., 2012a; THUMARAT et al., 2015)
Cutinase Thc_Cut1	Thermobifida cellulosilytica	PH	Pó de PET, filmes de PET e garrafas de água	(HERRERO ACERO et al., 2011; RIBITSCH et al., 2013; GAMERITH et al., 2017a, 2017b)
Cutinase TfCut1 e TfCut2	Thermobifida fusca	РН	Filmes de PET, nanopartículas de PET	(HERRERO ACERO et al., 2011; BARTH et al., 2015a, 2015b, 2016; RIBITSCH et al., 2015; WEI et al., 2016)
Hidrolase tipo- cutinase	Thermobifida fusca DSM43793	PH	Garrafa de PET	(MÜLLER et al., 2005)
Esterase Thh_Est	Thermobifida halotolerans	MS	Filmes de PET	(RIBITSCH et al., 2012b)
Tcur1278 e Tcur0390	Thermomonospora curvata	PH	Nanopartículas de PET	(WEI et al., 2014b)
Cutinase	Thielavia terrestris	PH	Filme de PET	(YANG et al., 2013)

2.2.1.3. PETase

A subclasse das poli(tereftalato de etileno) hidrolases (EC 3.1.1.101) foi recentemente criada para categorizar enzimas que especificamente possuem o PET como substrato principal (FURUKAWA et al., 2018). Isto ocorreu devido à descoberta revolucionária de *Ideonella sakaiensis*, uma bactéria capaz de utilizar o polímero de PET como fonte de carbono (YOSHIDA et al., 2016). Neste estudo, foram identificadas duas enzimas-chave para o processo de degradação do PET: a PETase e a MHETase (Figura 8).



Figura 8. Processo de degradação do polímero de PET pela bactéria *Ideonella sakaiensis*. O processo de degradação ocorre inicialmente pela adesão e secreção da enzima PETase, liberando MHET. Em seguida, o MHET é absorvido pela bactéria e hidrolisado a TPA e EG pela ação da MHETase, fornecendo estes monômeros como fonte de carbono para a célula. Figura adaptada de BORNSCHEUER (2016).

Para utilizar o PET como fonte de energia, *I. sakaiensis* primeiramente adere na superfície do polímero e, então, secreta a PETase. Esta enzima catalisa a hidrólise das ligações éster das cadeias poliméricas do PET, liberando majoritariamente o MHET como produto e BHET e TPA em menores quantidades (YOSHIDA et al., 2016). Estruturalmente, a PETase foi identificada por apresentar a típica conformação α/β da superfamília das hidrolases e apresenta a tríade catalítica serina – aspartato – histidina (LIU et al., 2019). Além disso, a PETase possui alta similaridade com as lipases e, principalmente, com as cutinases. O homólogo de maior similaridade com a PETase é a cutinase de *Thermobifida fusca* (TfC), apresentando 51% de identidade de sequência peptídica (YOSHIDA et al., 2016; AUSTIN et al., 2018).

Após a formação do MHET, esta molécula é internalizada pela bactéria e, então, é hidrolisada pela ação da MHETase, formando TPA e EG – os monômeros inicias da síntese de PET que são utilizados como fonte de carbono por diferentes rotas metabólicas de *I. sakaiensis* (YOSHIDA et al., 2016). Apesar da PETase também conseguir catalisar a hidrólise do BHET em MHET, esta enzima não possui atividade sobre o MHET. Deste modo, a MHETase possui um papel fundamental nesta rota de metabolização do PET presente nesta bactéria (BORNSCHEUER, 2016; YOSHIDA et al., 2016). De forma semelhante, uma carboxilesterase de *Thermobida fusca* KW3 (TfCa) já foi anteriormente descrita por possuir alta especificidade sobre as moléculas de MHET e BHET, inclusive, sendo utilizada como biocatalisador para converter estes intermediários a TPA em um processo de despolimerização enzimática de PET (BILLIG et al., 2010; BARTH et al., 2016).

Em relação à estrutura, a MHETase também possui uma conformação clássica α/β das hidrolases e possui uma homologia que converge entre a classe das tanases (EC 3.1.1.20) e das feruloil esterases (EC 3.1.1.73), embora a MHETase não seja capaz 50 de metabolizar os substratos específicos destas famílias. Entretanto, a MHETase possui uma estrutura de tampa que confere a alta especificidade catalítica pelo substrato MHET e, provavelmente, está relacionada à baixa atividade desta enzima sobre o BHET e outros substratos (YOSHIDA et al., 2016; PALM et al., 2019).

Embora a expressão de ambas enzimas seja fortemente regulada pela presença do substrato de PET no meio extracelular, indicando uma adaptação evolutiva e um papel dedicado destes biocatalisadores no processo de degradação de PET por *I. sakaiensis*, as taxas de hidrólise observadas *in vitro* ainda são muito baixas, mesmo com substratos de PET com baixa cristalinidade, e envolvem condições reacionais mesofílicas que são distantes dos parâmetros adequados para uma efetiva despolimerização (BORNSCHEUER, 2016; YOSHIDA et al., 2016; FECKER et al., 2018; KAWAI; KAWABATA; ODA, 2019).

Diversos estudos de engenharia de proteínas estão sendo desenvolvidos visando aumento da atividade e promiscuidade catalítica da PETase e MHETase nativas, assim como conferir uma maior estabilidade térmica para processos de despolimerização em temperaturas próximas à Tg do polímero do PET (AUSTIN et al., 2018; LIU et al., 2018; PALM et al., 2019; SON et al., 2019). Deste modo, estas enzimas submetidas a técnicas de engenharia de proteínas podem ser potenciais para o uso no processo de reciclagem enzimática do PET, recuperando seus monômeros iniciais (BORNSCHEUER, 2016).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Identificar uma potencial enzima comercial capaz de catalisar a despolimerização hidrolítica de resíduos de garrafas de PET de forma eficiente e avaliar as condições operacionais para este processo.

3.2. Objetivos específicos

- Realizar uma triagem para identificar diferentes enzimas comerciais capazes de catalisar a hidrólise de BHET e de PET.
- Selecionar o melhor biocatalisador e realizar ensaios de hidrólise enzimática de diferentes tipos de PET que variam em graus de cristalinidade.
- Realizar ensaios de hidrólise enzimática de PET em reatores de agitação contínua a fim de avaliar o controle do pH da reação, o fracionamento da alimentação de biocatalisador e a redução de carga de enzima, visando a redução de custos do processo.

4. METODOLOGIA

4.1. Materiais

4.1.1. Reagentes

Os principais reagentes utilizados neste estudo estão listados na Tabela 3.

Reagente	Fornecedor	Pureza (%)
Acetonitrila	Tedia	99,9
Ácido fórmico	Sigma	≥95
Ácido sulfúrico	Vetec	95 – 99
Albumina do Soro Bovino (BSA)	New England BioLabs	95
BHET	Sigma	95
Corante concentrado para ensaio de Bradford	Bio-Rad	-
Fosfato de sódio dibásico	Vetec	99
Fosfato de sódio monobásico	Vetec	99
Hidróxido de potássio	Vetec	99
Hidróxido de sódio (Micropérolas)	Isofar	99
MHET	Obtido conforme descrito no item 4.10	86,7
PET (amorfo)	Petroquímica Suape	_
PET (garrafa)	Crystal®/Coca Cola Brasil	_
PET (CPR)	Global PET	_
TPA	Sigma	98
Tris-Base	CALBIOQUEM	≥99

Tabela 3: Reagentes utilizados nos ensaios experimentais.

4.1.2. Equipamentos

Os equipamentos utilizados neste estudo estão listados na Tabela 4.

Equipamento	Fabricante	Modelo
Cromatógrafo (HPLC)	Thermo Scientific	Dionex UltiMate 3000
Espectrofotômetro	Thermo Scientific	Multiskan GO™
Agitador com banho de água	New Brunswick Scientific	Innova 3100
Hibridizador	FINEPCR	Combi-D24
Biorreator de agitação contínua	Infors HT	Multifors 2
Biorreator de agitação contínua	New Brunswick	BioFlo 110
Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV)	Zeiss	EVO-LS15
pHmetro	Metrohm	827
Metalizador	Quorum Technologies	Q150TES
Moinho de facas	lka	A11 Basic

Tabela 4. Equipamentos utilizados nos ensaios experimentais.

4.1.3. Enzimas

Todas as enzimas comerciais que foram empregadas neste estudo e suas origens biológicas estão detalhas na Tabela 5.

Código	Enzima	Origem	Código do Produto	Fabricante
CALB	Lipase B	Candida antarctica	Lipozyme© CALB L	Novozymes
CrL	Lipase	Candida rugosa	62316	Sigma
HiC	Cutinase	Humicola insolens	NZ 51032	Novozymes
MmL	Lipase	Mucor miehei	62298	Sigma
PcL	Lipase	Pseudomonas cepacia	62309	Sigma
PfL	Lipase	Pseudomonas fluorescens	534730	Sigma
PPL	Lipase	Pâncreas suíno	L3126	Sigma
RmL	Lipase	Rhizomucor miehei	80484	Sigma
RnL	Lipase	Rhizopus niveus	62310	Sigma
TIL	Lipase	Thermomyces lanuginosus	76546	Sigma

Tabela 5. Enzimas comerciais utilizadas nos estudos de hidrólise de BHET e PET.

4.2. Quantificação da concentração de proteínas

Os teores de proteínas de todos os preparados enzimáticos utilizados nesse estudo foram mensurados pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976) adaptado para análises de alto rendimento em microplacas de 96 poços com fundo chato. Primeiramente uma curva de calibração foi construída utilizando BSA (New England BioLabs) em diferentes níveis de concentrações: 5; 10; 15; 20; 30; 40; e 50 mg/L. Para cada reação, 40 µL do reagente comercial Coomassie Brillian Blue G-250 (Bio-Rad) foram adicionados em cada poço e, posteriormente, 160 µL de solução proteica. As reações foram incubadas por 5 min à temperatura ambiente e, em seguida, a microplaca foi inserida no espectrofotômetro Multiskan GO[™] (Thermo Scientific) para leitura de absorbâncias no comprimento de onda de 595 nm. Para a quantificação da concentração proteica das soluções enzimáticas comerciais, também foram aplicados 40 µL do reagente comercial de Comassie em cada poço e, posteriormente, 160 µL da solução enzimática. As reações foram incubadas por 5 min à temperatura ambiente e, em seguida, foi registrada a leitura da absorbância no comprimento de onda de 595 nm. Quando necessário, as soluções enzimáticas comerciais foram diluídas em tampão fosfato de sódio 200 mM (pH 7,0) para que a concentração proteica da amostra analisada estivesse abrangida na faixa dos níveis da curva padrão construída.

4.3. Triagem de enzimas comerciais para hidrólise de BHET

Foi realizada uma triagem com 10 enzimas comerciais (Tabela 5) a fim de avaliar a capacidade de hidrolisar o BHET. Deste modo, foram utilizados tubos Falcon de 15 mL com meio reacional de 1,1 mL contendo 2 mM de BHET em tampão fosfato de sódio 200 mM (pH 7,0) e carga de enzima de 4 g_{proteína}/g_{BHET}. As reações foram conduzidas a 37 °C e rotação de 180 rpm em um agitador com banho de água Innova 3100 (New Brunswick Scientific). Além disso, reações controles foram realizadas nas mesmas condições, porém, com a ausência das enzimas.

4.4. Triagem de enzimas comerciais para hidrólise de PET garrafa e amorfo

A fim de avaliar a despolimerização do PET pelas enzimas do ensaio anterior (Tabela 5), foi realizada uma nova triagem utilizando dois tipos de substrato: (1) PET garrafa – partículas cortadas do corpo de garrafas PET de água mineral da marca Crystal© após uso pelo consumidor de espessura de 1 mm e (2) PET amorfo – *"pellets"* doados cortesmente pela planta de produção industrial de PET Petroquímica

Suape (Suape, Brasil), que foram moídos por um moinho de facas A11 Basic (Ika) em baixa temperatura pelo uso de nitrogênio líquido.

Para as reações, foram utilizados tubos Falcon de 15 mL com meio reacional de de 10 mL contendo tampão fosfato de sódio 200 mM (pH 7,0), 200 mg de substrato de PET e carga de enzima de 0,01 g_{proteína}/g_{PET}. Então, foram incubadas em um hibridizador Combi-D24 (FINEPCR) a 37 °C e 25 rpm. Além disso, reações controle foram realizadas nas mesmas condições, porém, com a ausência das enzimas.

4.5. Despolimerização de diferentes tipos de PET por HiC e CALB

Com o intuito de avaliar a atuação das enzimas HiC e CALB em diferentes tipos de substratos de PET, foram realizados ensaios de hidrólise com as seguintes amostras: (1) PET garrafa, (2) PET amorfo e (3) PET CPR – flocos moídos de PET reciclado proveniente de uma planta industrial local (Rio de Janeiro, Brasil) que foram doados gentilmente pelo Professor Marcos Lopes Dias (UFRJ).

As reações foram realizadas em tubos Falcon de 15 mL com volume reacional de 10 mL contendo tampão fosfato de sódio 200 mM (pH 7,0). Foram utilizados 200 mg de substrato de PET e carga de enzima de 0,01 g_{proteína}/g_{PET}. Também foi testada a combinação simultânea das duas enzimas, adicionando a mesma carga de cada uma, totalizando uma carga final de 0,02 g_{proteína}/g_{PET}. Então, as reações foram incubadas em hibridizador a 60 °C e 25 rpm. Além disso, reações controle foram realizadas nas mesmas condições, porém, com a ausência das enzimas.

4.6. Despolimerização de PET CPR por HiC em reator de agitação contínua empregando condições otimizadas de reação

Com base no estudo de otimização das varáveis de processo da reação de hidrólise do PET CPR catalisada apenas por HiC, publicado previamente por CASTRO et al. (2019), foi realizado um ensaio empregando as condições otimizadas em um sistema de biorreator de agitação contínua modelo BioFlo 110 (New Brunswick) de vasos com capacidade de 1,3 L. Foi utilizado um volume reacional de 500 mL contendo 80,76 g/L de PET CPR em tampão Tris-HCl 397,3 mM (pH 8,95). A carga da enzima HiC foi de 0,065 g_{proteínas}/g_{PET}. As reações foram conduzidas a 62,6 °C e agitação de 300 rpm. A Figura 9 ilustra a montagem e operação do biorreator durante esta hidrólise enzimática de PET CPR.



Figura 9. Biorreator BioFlo 110 operacional durante hidrólise de PET CPR catalisada pela enzima HiC em condições otimizadas.

4.7. Efeito do controle de pH na reação de despolimerização de PET CPR por HiC

Com o objetivo de avaliar o impacto do controle de pH nas reações de hidrólise de PET CPR, foram realizados diferentes experimentos variando o tipo de controle de pH (Tabela 6) nas reações em biorreatores de agitação contínua Multifors 2 (Infors HT) de vasos com capacidade de 1 L. Foi utilizado um volume reacional de 500 mL contendo 80,76 g/L de PET CPR e carga da enzima HiC de 0,065 g_{proteínas}/g_{PET}. As reações foram conduzidas a 50 °C e agitação de 300 rpm.

Tabela 6. Variações estudadas para avaliar o efeito do controle de pH durante hidrólise de PET CPR catalisada pela HiC.

Condição	Meio Reacional	Solução de ajuste de pH
Α	Tampão Tris-HCl 397,3 mM (pH 8,95)	Sem ajuste
В	Tampão Tris-HCl 397,3 mM (pH 8,95)	NaOH 5 M
С	Água alcalinizada	Sem ajuste de pH
D	Água alcalinizada	NaOH 0,5 M
Е	Água alcalinizada	KOH 0,5 M

4.8. Efeito de adição da enzima HiC na despolimerização de PET

A fim de avaliar o tipo de carregamento das enzimas durante a reação de hidrólise, foi realizado um experimento em biorreatores Multifors 2 (Infors HT) com vasos de capacidade de 500 mL. O volume reacional foi de 300 mL contendo 80,76 g/L de PET CPR em tampão Tris-HCI 397,3 mM (pH 8,95). A carga de enzima total foi de 0,065g_{proteínas}/g_{PET}, e a forma de adição foi realizada de duas condições: (1) toda a carga de enzima foi adicionada no início do tempo da reação e (2) metade da carga de enzima foi adicionada no início, enquanto a outra parte ocorreu no meio tempo de reação. Então, as reações foram incubadas a 50 °C e 300 rpm.

4.9. Efeito da carga de enzima na despolimerização de PET CPR por HiC

Para estudar o impacto da redução da quantidade de enzima empregada nas reações de hidrólise de PET, foram realizados ensaios em triplicata usando tubos Falcon de 15 mL com volume reacional de 5 mL contendo tampão Tris-HCl 397,3 mM (pH 8,95) e 80,76 g/L de PET CPR. As variações das cargas de enzima avaliadas estão descritas na Tabela 7. Por fim, as reações foram incubadas em hibridizador a 62,6 °C, 25 rpm.

Tabela 7. Variações estudadas para avaliar o efeito da redução de carga da enzima HiC durante hidrólise de PET CPR.

Condição	Carga de enzima (g _{proteína} /g _{PET})	Redução de carga de enzima em relação a condição padrão (%)
Α	0,065	condição padrão
В	0,0325	50%
С	0,0065	90%
D	0,00325	95%

4.10. Síntese de MHET

A molécula de MHET foi obtida com base na reação de hidrólise de BHET a MHET catalisada pela lipase B de *Candida antarctica* (CALB) – conforme descrito por

CARNIEL et al. (2017) – e sua síntese e purificação foram realizadas pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Tecnologia Enzimática (LTE) situado na Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ). Nessa metodologia, a reação de hidrólise de 60 mM de BHET ocorreu a 40°C, por 2,5 horas, e foi interrompida por acidificação do meio reacional (pH 1 ~ 2). Em seguida, o MHET foi removido da fase aquosa utilizando acetato de etila como solvente orgânico. Por fim, o acetato de etila foi evaporado e o sólido remanescente de MHET foi lavado com água gelada e desidratado a vácuo.

A pureza deste MHET sintetizado foi avaliada pela técnica de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de carbono (13C) na Gerência de Química do Centro de Pesquisa е Desenvolvimento Leopoldo Américo Miguez de Mello (CENPES/Petrobras) (dados não publicados). Em temperatura ambiente, 25 mg do sólido obtido foram dissolvidos em 750 µL de dimetilsulfóxido hexadeuterado seco em um tubo de RMN. Como referência interna de quantificação, foram também dissolvidos 5 mg de 1,3,5-trioxano. Para a aquisição dos espectros, foi utilizado um espectrômetro Bruker Avence III 500 com campo magnético de 11,75 Tesla e sonda de detecção direta de 5 mm. As condições operacionais foram: 28 °C de temperatura, janela espectral de 29,8 KHz, tempo de aquisição de 1,1 s, pulso de radiofrequência de 90° com intervalos de 45 s, 256 scans e desacoplamento de hidrogênio apenas durante a aquisição do sinal. Com base nas intensidades obtidas de ressonância, a pureza calculada do MHET na amostra sólida foi de 86,7 %.

4.11. Quantificação dos produtos da despolimerização de PET por HPLC

Para a quantificação de TPA, MHET e BHET, todas as alíquotas de amostragens experimentais foram diluídas apropriadamente em metanol padrão HPLC. Em

seguida, foram processadas em filtro de seringa com membrana de PTFE 0,22 μ m e analisadas pelo cromatógrafo Dionex UltiMate 3000 (Thermo Scientific) equipado com uma coluna Eclipse Plus C18 de 5 μ m – 4,6 mm x 250 mm (Agilent) e uma pré-coluna SB-C18 de 5 μ m – 4,6 mm x 12,5 mm (Zorbax). As amostras foram injetadas utilizando as seguintes condições: volume de injeção de 10 μ L, temperatura da coluna em 30 °C e detector de UV em comprimento de onda de 254 nm. A fase móvel era formada por um gradiente de duas soluções – solução A (Acetonitrila padrão HPLC) e solução B (ácido fórmico 0,05%) – e mantinha o fluxo de 0,5 mL.min⁻¹ com tempo total de análise de 30 min. O padrão do gradiente formado durante as análises está descrito na Tabela 8. Posteriormente, foram utilizadas curvas padrões construídas previamente de cada analito (Figura 10) para correlacionar com as áreas destes produtos presentes nas amostras e, assim, quantificar as concentrações mássicas de cada analito.

Tempo	Solução A (%)	Solução B (%)	
(minutos)	Acetonitrila	Ácido fórmico 0,05%	
0	20	80	
5	60	40	
13	60	40	
16	100	0	
24	100	0	
25	20	80	
30	20	80	

Tabela 8. Gradiente de fase móvel utilizada em HPLC para análise quantitativa de TPA, MHET e BHET.



Figura 10. Curvas padrões construídas para (a) TPA, (b) MHET e (c) BHET para análise quantitativa em HPLC.

4.12. Microscopia Eletrônica por Varredura

Com o intuito de observar os padrões morfológicos da degradação enzimática do PET, diversas partículas foram selecionadas e fixadas em fita condutora dupla face presa em um suporte de alumínio. Em seguida, as partículas foram recobertas com liga de ouro e paládio utilizando o metalizador Q150TES (Quorum Technologies). Por fim, as amostras foram analisadas no microscópio EVO-LS15 (Zeiss), com filamento de LaB6 no modo alto vácuo, a 1 kV, com distância de trabalho em torno de 11 mm.

4.13. Cálculos

4.13.1. Concentração em quantidade de matéria dos analitos

Devido à equimolaridade da reação de hidrólise da molécula de BHET a MHET ou TPA e com o intuito de auxiliar a compreensão correta dos perfis de liberação destes produtos durante a hidrólise de PET, os valores de concentração em massa (g/L) dos produtos de hidrólise de PET – BHET, MHET e TPA –, obtidos por HPLC, foram convertidos em concentrações em quantidade de matéria (mol/L) utilizando a equação abaixo:

Equação 1.
$$Conc. analito = \frac{(Conc. massa analito * 1000)}{M.molar analito}$$

Onde:

Conc. analito = concentração em quantidade de matéria do analito (μ M);

Conc. massa analito = concentração em massa do analito (mg/L);

M. molar analito = massa molar do analito (mg/mmol);

[TPA = 166,13 mg/mmol, MHET = 210,17 mg/mmol e BHET = 254,24 mg/mmol]

4.13.2. Fração molar dos analitos

A fração molar é uma forma alternativa de expressar a quantidade relativa de um determinado produto em uma mistura de diferentes produtos, ou seja, representa a razão da concentração de um dos produtos da hidrólise do PET (BHET, MHET ou TPA) em relação ao somatório da concentração molar destes três produtos, conforme a equação abaixo:

Equação 2.
$$X \text{ analito} = \frac{Conc. \text{ analito}}{\Sigma \text{ conc. analitos}}$$

Onde:

X analito = Fração molar do analito;

Conc. analito = Concentração do analito (µM);

 Σ Conc. analitos = Somatório das concentrações de TPA, MHET e BHET (μ M);

4.13.3. Conversão de BHET

A hidrólise enzimática do BHET foi calculada através da equação abaixo que estabelece a conversão de BHET ao final da reação:

Equação 3
$$Conv.BHET = \left(\frac{Conc.BHET_{inicial} - Conc.BHET_{finial}}{Conc.BHET_{inicial}}\right) * 100$$

Onde:

Conv. BHET = Conversão de BHET (%);

Conc. BHET_{inicial} = Concentração de BHET no início da reação (µM);

Conc. BHET_{final} = Concentração de BHET no final da reação (μ M);

4.13.4. Rendimento de MHET ou TPA na hidrólise de BHET

A hidrólise enzimática da molécula de BHET pode ocorrer em duas etapas (Equação 4a): (I) uma ligação éster da molécula de BHET é hidrolisada, formando MHET e EG; e (II) uma outra ligação éster da molécula de MHET também sofre hidrólise, liberando TPA e EG.

Equação 4a.
(I)
$$1 BHET + 1 H_2 O \xrightarrow{hidrolase} 1 MHET + 1 EG$$

(II) $1 MHET + 1 H_2 O \xrightarrow{hidrolase} 1 TPA + 1 EG$

Logo, foi utilizada a equação a seguir para quantificar o percentual de rendimento de MHET ou de TPA formado pela hidrólise enzimática de BHET presente na reação:

Equação 4b.
$$Rend._{analito} = \left(\frac{Conc._{analito}}{Conc._{BHET_{inicial}} - Conc._{BHET_{final}}}\right) * 100$$

Onde:

Rend. analito = Rendimento do analíto [MHET ou TPA] (%); Conc. analito = Concentração do analito liberado [MHET ou TPA] (μM); Conc. BHET_{inicial} = Concentração de BHET no início da reação (μM); Conc. BHET_{final} = Concentração de BHET no final da reação (μM);

4.13.5. Seletividade da conversão de BHET a TPA

A fim de avaliar a capacidade de uma determinada enzima em catalisar as duas etapas de hidrólise da molécula de BHET, formando TPA e EG como produtos finais, a equação abaixo foi utilizada para quantificar esta seletividade de conversão do BHET a TPA:

Equação 5. $S_{TPA} = \frac{Conc. TPA,24h}{Conc. MHET,24h}$

Onde:

STPA = Seletividade da reação para formação de TPA;

Conc. TPA, 24h = Concentração de TPA em 24 horas (µM);

Conc. MHET, 24h = Concentração de MHET em 24 horas (µM);

4.13.6. Rendimento de TPA na hidrólise de PET

Para quantificar a despolimerização do PET em seu monômero final, o TPA, a equação abaixo foi utilizada para determinar o percentual obtido de TPA na reação com base no rendimento teórico máximo possível de TPA para a quantidade de PET presente na reação.

Equação 6.
$$Rend_{TPA} = \left[\frac{(Conc. TPA)}{Conc. PET * Rend. teórico}\right] * 100\%$$

Onde:

Rend_{TPA} = Rendimento de TPA (%);

Conc. TPA = Concentração de TPA (mg/L);

Conc. PET = Concentração de PET no início da reação (mg/L);

Rend. teórico = Fator de rendimento teórico de TPA \rightarrow 0,86436 [razão entre a massa molar do TPA (166,13 g/mol) e a massa molar média do PET (192,20 g/mol)];

4.13.7. Grau de sinergia

Para investigar o grau de sinergia entre duas enzimas visando impulsionar a formação de TPA pela hidrólise de PET, a equação abaixo foi aplicada utilizando a razão entre a concentração de TPA obtida, nas mesmas condições reacionais, pelo uso das enzimas simultaneamente e as concentrações de TPA obtidas por ambas separadamente.

Equação 7.
$$GS = \frac{Conc. TPA [HiC+CALB]}{(Conc. TPA [HiC]) + (Conc. TPA [CALB])}$$

Onde:

GS = Grau de sinergia;

Conc. TPA [HiC + CALB] = Concentração de TPA na reação com as duas enzimas simultaneamente (µM);

Conc. TPA [HiC] = Concentração de TPA na reação com apenas a HiC (µM); Conc. TPA [CALB] = Concentração de TPA na reação com apenas a CALB (µM);

4.13.8. Produtividade de TPA na hidrólise de PET

Para verificar a liberação de TPA em função do tempo durante as reações de despolimerização de PET, a produtividade de TPA foi calculada conforme a equação abaixo:

Equação 8.
$$Prod. de TPA = \frac{Conc. TPA_{(t)}}{t}$$

Onde:

Prod. de TPA = Produtividade de TPA (ex: μ M.min⁻¹);

Conc. TPA_(t) = concentração de TPA (µM) no um determinado tempo de reação (t);

t = tempo de reação (ou min ou hrs ou dias);

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Triagem de enzimas comerciais para hidrólise de BHET

Com o objetivo de avaliar preliminarmente a capacidade de diferentes enzimas comerciais em hidrolisar a cadeia polimérica do PET, foi realizado um ensaio utilizando como substrato um dos monômeros fundamentais do polímero de PET – o BHET. Para as triagens iniciais, foi fixada uma condição branda de temperatura (37 °C) e de pH (7,0) a fim de permitir que todas as enzimas estivessem ativas e estáveis durante o período reacional avaliado, mesmo que estas não sejam as condições ideais para a atuação ótima de cada enzima em particular. As reações foram incubadas por 24 horas e as concentrações dos analitos liberados foram quantificadas por HPLC. Diferentes variáveis de respostas foram calculadas utilizando os valores de concentrações e as mesmas estão dispostas na Tabela 9.

Enzima	Conversão de BHET (%)	Rendimento de TPA (%)	Rendimento de MHET (%)	Stpa
Controle negativo (sem enzima)	22,7	4,05	95,95	-
TIL	55,7	4,37	95,63	0,046
PfL	64,3	2,40	97,60	0,025
MmL	74,5	7,32	92,68	0,079
RmL	84,5	2,74	97,26	0,025
PcL	93,3	2,74	97,26	0,028
RnL	95,1	2,75	97,25	0,028
PPL	96,2	1,86	98,14	0,019
CrL	98,6	3,35	96,65	0,035
HiC	99,6	10,19	89,91	0,113
CALB	99,8	99,60	0,40	250,381

Tabela 9. Resultados das variáveis de respostas da hidrólise de BHET catalisada por enzimas ao final da reação (24 horas).

Foi possível observar que todas as enzimas foram capazes de hidrolisar o BHET, porém em diferentes extensões (Tabela 9). Considerando a conversão global de BHET ao final das reações, o menor valor observado foi de 55,7% através da lipase de *Thermomyces lanuginosus* (TIL), enquanto que a lipase B de *Candida antarctica* (CALB), a cutinase de *Humicola insolens* (HiC) e a lipase de *Candida rugosa* (CrL) praticamente esgotaram todo o BHET presente na reação – 99,8%, 99,6% e 98,6%, respectivamente. Já na reação controle sem biocatalisador, pôde ser observada uma hidrólise do BHET (22,7%), porém, muito inferior aos valores obtidos pela ação das enzimas (valores contendo a hidrólise não biocatalisada). Esse mesmo fenômeno já foi reportado por Hantani et al. em reações sem enzima, contendo BHET em tampão Tris-HCl, e foi observado um aumento da hidrólise do BHET conforme o pH e a temperatura das reações eram elevados (HANTANI et al., 2018). Entretanto, são necessários estudos adicionais que investiguem a influência destas variáveis na estabilidade do BHET, assim como a de MHET – visto que essa molécula foi acumulada nas reações (Tabela 9).

Quando se observa os valores de TPA ou de MHET liberados pela conversão do BHET pelas enzimas (Equação 4b), nota-se que a CALB foi a única enzima que realizou com êxito as duas etapas da reação de hidrólise do BHET – conforme ilustrado pela Equação 44a – convertendo 99,60% do BHET em TPA. Logo após a CALB, a HiC apresentou apenas 10,19% de TPA formado, acumulando 89,91% de MHET. Este mesmo perfil de acúmulo foi observado para o restante das enzimas, porém de forma mais acentuada – 92,68% até 98,14% de MHET como a molécula predominante da reação – indicando que possivelmente estas enzimas apresentam alguma limitação em realizar a segunda etapa de hidrólise do BHET e assim obter o TPA como produto final. Como forma de corroborar o entendimento deste perfil, foi

calculado um fator de seletividade de cada biocatalisador em converter BHET em TPA. O STPA (Equação 5) é a razão entre a concentração de TPA pela concentração de MHET liberados na reação. Como esperado, a CALB obteve o maior STPA (250,381) e significa que sua ação liberou cerca de 250 vezes mais TPA do que MHET na reação, ao contrário das outras enzimas que variaram o FTPA em valores ínfimos entre 0,113 (HiC) até 0,019 (PPL).

Para ilustrar a diferença entre os dois perfis de ação descritos acima, a Figura 11 representa as frações molares dos analitos (Equação 2) presentes no meio reacional durante o curso do tempo de hidrólise do BHET pela CALB e HiC – os dois melhores biocatalisadores baseado na resposta de conversão de BHET (Tabela 9). A fração molar é uma maneira distinta de expressar a concentração de um determinado analito presente numa mistura. No caso deste estudo, expressamos as frações molares de TPA, MHET e de BHET presentes na mistura da reação, ou seja, no somatório da concentração destes três analitos produzidos ao longo da hidrólise. Ambas as enzimas conseguem hidrolisar praticamente todo o BHET em até 30 minutos de reação, porém, neste período a CALB (Figura 11.a) libera mais MHET ($\chi_{MHET} = 0,787$) do que TPA ($\chi_{TPA} = 0,205$) e, posteriormente, vai convertendo gradativamente todo este MHET em TPA até 24 horas de reação. Em contrapartida, a HiC (Figura 11.b) mantém o MHET como o produto majoritário ($\chi_{MHET} = 0,987$ em 30 minutos; $\chi_{MHET} = 0,895$ em 24 horas), apresentando uma pequena conversão de MHET a TPA a partir de 1 hora de reação ($\chi_{TPA} = 0,007$) até o final da reação ($\chi_{TPA} = 0,102$).



Figura 11. Frações molares dos analitos presentes nas reações de hidrólise de 2 mM BHET por (a) CALB e (b) HiC. As reações foram realizadas em tampão fosfato de sódio 200 mM (pH 7,0), carga de enzima de 4g_{proteína}/g_{BHET}, 180 rpm, 37 °C, em hibridizador.

Este perfil de preferência catalítica já foi observado na literatura. As enzimas produzidas por *I. sakaiensis* para degradar o PET possuem atividades distintas em relação aos monômeros liberados da hidrólise deste polímero (YOSHIDA et al., 2016). A PETase, responsável por atacar as cadeias do polímero, consegue consumir eficientemente o BHET, mas possui baixa atividade sobre o MHET, acumulando-o. Já MHETase é responsável pela hidrólise deste intermediário, pois apresenta uma estrutura de tampa sobre o sítio catalítico que fornece um domínio de ligação altamente específico para o grupo terminal carboxila do MHET (YOSHIDA et al., 2016; PALM et al., 2019). Similarmente, as lipases também possuem uma tampa que cobre o sítio catalítico e, geralmente, é aberta por ativação interfacial anfifílica ou por protonação (KHAN et al., 2017). Como o MHET é mais hidrofílico que o BHET, talvez esta diferença de hidrofobicidade esteja impactando a ativação da abertura da tampa e a ligação desse intermediário ao do sítio catalítico das lipases, exceto pela CALB. Logo, esta enzima provavelmente possui um mecanismo similar ao da MHETase,
conferindo uma habilidade singular em realizar as duas etapas de hidrólise do BHET: um perfil único de seletividade entre as enzimas aqui estudadas.

5.2. Triagem de enzimas comerciais para hidrólise de PET amorfo e garrafa

Uma nova triagem foi realizada utilizando o mesmo conjunto de enzimas estudadas anteriormente, porém, empregando o polímero de PET como substrato. Sabendo que o grau de cristalinidade (GC) interfere na despolimerização enzimática do PET, foram usados dois tipos de substratos que apresentam caráter contrastante em relação a esta propriedade: (1) o PET amorfo moído (GC = $12.9 \pm 3.0\%$) e (2) partículas de PET de garrafa (GC = $36.6 \pm 0.5\%$). Ambos valores de cristalinidade foram obtidos por análise de calorimetria diferencial de varredura (DSC), realizadas no Instituto de Macromoléculas (IMA) da UFRJ, conforme condições descritas em DE CASTRO et al. (2017).

As reações foram incubadas por 14 dias e as concentrações dos analitos formados foram quantificadas por HPLC. Diferentes variáveis de respostas foram calculadas utilizando os valores de concentrações, e as mesmas estão dispostas na Tabela 10.

Baseado nos somatórios das concentrações de BHET, MHET e TPA liberados até o final da reação (Tabela 10), a cutinase de *H. insolens* apresentou expressivamente o melhor desempenho em catalisar a hidrólise de ambos tipos de PET: 1372,05 µM para amorfo e 301,50 µM para garrafa- Entretanto, as outras enzimas apresentaram desempenhos substancialmente inferiores, atingindo o valor máximo de 16,739 µM para PET amorfo pela ação da MmL e 15,583 µM para PET garrafa pela PcL (comparado com HiC, uma diferença de aproximadamente 82 vezes e 19 vezes, respectivamente) e valor mínimo de 8,261 μM pela RmL em PET amorfo e 5,087 μM pela PfL em garrafa (comparado com HiC, uma diferença de 166 vezes e 59 vezes, respectivamente). Em relação aos controles negativos das reações, ambos substratos apresentaram concentrações de produtos de hidrólise inferiores aos limites de quantificação por HPLC.

Enzima	Tipo de PET	Σ Conc. molar dos analitos (μΜ)	Хвнет	Хмнет	Хтра	Rendimento de TPA (%)
Controle	amorfo	0,229	0,000	0,312	0,688	0,0002
negativo	garrafa	0,411	0,000	0,000	1,000	0,0003
Dml	amorfo	8,261	0,276	0,526	0,198	0,0017
	garrafa	7,449	0,294	0,385	0,321	0,0015
T U	amorfo	8,370	0,248	0,422	0,331	0,0017
	garrafa	7,432	0,262	0,464	0,274	0,0017
וחח	amorfo	8,638	0,327	0,301	0,372	0,0020
PPL	garrafa	7,791	0,312	0,324	0,365	0,0027
RnL	amorfo	11,435	0,344	0,311	0,346	0,0017
	garrafa	8,280	0,358	0,432	0,210	0,0024
CrL	amorfo	11,538	0,583	0,233	0,184	0,0024
	garrafa	14,449	0,386	0,407	0,207	0,0019
PfL	amorfo	11,911	0,206	0,385	0,409	0,0012
	garrafa	5,087	0,325	0,426	0,250	0,0026
	amorfo	13,376	0,000	0,000	1,000	0,0030
CALB	garrafa	10,012	0,045	0,201	0,754	0,0057
PcL	amorfo	15,583	0,314	0,513	0,172	0,0016
	garrafa	15,583	0,314	0,513	0,172	0,0016
MmL	amorfo	16,739	0,168	0,512	0,320	0,0028
	garrafa	10,596	0,224	0,476	0,299	0,0051
LI:C	amorfo	1372,054	0,015	0,692	0,293	0,3863
HIC	garrafa	301,498	0,015	0,659	0,327	0,0946

Tabela 10. Resultados das variáveis de respostas da triagem de enzimas para hidrólise de PET amorfo e garrafa a 37 °C no final das reações (14 dias).

Onde: x = Fração molar do analíto; Controle negativo = sem adição de enzima;

Em relação aos perfis de frações molares dos produtos de hidrólise (Tabela 10), nota-se que o MHET foi a molécula majoritária entre os três analitos para maioria das enzimas aplicadas. Os maiores valores de χ_{MHET} foram atingidos pela HiC: 0,692 (949,5 µM) e 0,659 (198,7 µM) para PET amorfo e garrafa, respectivamente. Em contraste, a CALB liberou baixas concentrações dos analitos, mas resultou nos maiores valores de χ_{TPA} : 1,000 (13,4 µM) para PET amorfo e 0,754 (7,5 µM) para garrafa. Este mesmo comportamento foi observado na triagem destas duas enzimas utilizando o BHET como substrato, corroborando a ideia de que elas possuem ações distintas em relações as etapas da hidrólise do BHET nestas condições experimentais. Em relação ao χ_{BHET} , os valores permaneceram medianos, destacando-se como espécie majoritária apenas para PET amorfo (0,583).

Para avaliar a extensão de despolimerização do PET até seu monômero inicial, o TPA, foi empregada a Equação 6, que correlaciona a concentração de TPA liberada na hidrólise enzimática e a concentração máxima teórica de TPA que poderia ser liberado pela massa de PET presente no meio reacional. Como a maior concentração de TPA atingida nas reações foi pela atividade da HiC, esta resultou no maior percentual de rendimento de TPA (0,3863% para PET amorfo e 0,0946% para garrafa), mesmo não sendo a melhor enzima para formar esta molécula como espécie majoritária da reação nestas condições experimentais. Nota-se também que houve uma diferença de aproximadamente 4 vezes entre os valores de rendimento de TPA para PET amorfo e garrafa. Isto possivelmente está correlacionado com a diferença do grau de cristalinidade dos substratos (cerca de 2,8 vezes) que influencia diretamente na disposição e acessibilidade das cadeias poliméricas do PET pelo sítio ativo das enzimas. A influência do grau de cristalinidade na despolimerização enzimática também já foi observada por VERTOMMEN et al. (2005), que registrou

uma redução significativa (> 14 vezes) do somatório dos produtos liberados pela hidrólise – catalisada pela cutinase de *Fusarium solani* (FsC) – de filmes de PET com diferentes graus de cristalinidades (amorfo [GC = 4,1%] *versus* grânulos comerciais [GC = 13,7%]).

A Figura 12 ilustra o progresso do perfil de liberação dos produtos da hidrólise de PET amorfo e garrafa pelo melhor biocatalisador da triagem – a cutinase de HiC. Avaliando o somatório dos analitos gerados (Figura 12.a), pôde ser observado que a liberação das moléculas ocorreu de forma constante, com uma taxa de 105,526 μ M.d⁻¹ no PET amorfo (R²= 0,9942) e 18,932 μ M.d⁻¹ para PET garrafa (R²= 0,9864), indicando que esta cutinase permaneceu ativa durante todo período reacional estudado. Além da diferença das taxas, cada curva apresentou uma inclinação distinta que pode ser atrelado à influência das propriedades contrastantes de cada tipo de PET. Este mesmo perfil de linearidade também foi notado quando individualizamos as concentrações de cada produto da reação (Figura 12.b – c). As taxas de liberação de TPA pelo PET amorfo e garrafa foram de 32,316 μ M.d⁻¹ (R²= 0,9984) e 6,905 μ M.d⁻¹ (R²= 0,9980), respectivamente. Do mesmo modo, as taxas de liberação para MHET foram 71,889 μ M.d⁻¹ (R²= 0,9991) e 11,896 μ M.d⁻¹ (R²= 0,9895) para PET amorfo e garrafa, respectivamente. No entanto, um perfil de linearidade de liberação do BHET foi apenas observado para o PET amorfo: taxa de 1,3213 μ M.d⁻¹ (R²= 0,9912).

A HiC já foi reportada por RONKVIST *et al.* (2009) onde apresentou uma alta atividade hidrolítica sobre filme de PET de baixa cristalinidade (GC = 7%), i.e. 97% de perda de massa em 96 horas a 70°C. Entretanto, esta enzima apresentou uma redução na despolimerização em cerca de 10 vezes quando foi usado um filme biorientado (GC = 35%).



Figura 12. Progresso dos produtos liberados da hidrólise de PET amorfo e garrafa catalisada por HiC a 37 °C em hibridizador. (a) Somatório dos produtos liberados e concentração de cada analito liberado na hidrólise de (b) PET amorfo e (c) PET garrafa. As reações foram realizadas em tampão fosfato de sódio 200 mM (pH 7,0), 200 mg de PET, carga de enzima de 0,01 g_{proteína}/g_{PET} e agitação de 25 rpm.

5.3. Hidrólise enzimática de diferentes tipos de PET pelas enzimas HiC e CALB

Com base nas triagens realizadas, a cutinase de *H. insolens* foi definida como o melhor biocatalisador entre o conjunto de enzimas avaliadas para hidrólise de PET. Além disso, a CALB também foi selecionada devido à sua habilidade em realizar a rápida conversão de MHET a TPA. Desta forma, ambas as enzimas poderiam se complementar, em termos de perfil de atividade hidrolítica, na despolimerização do PET até seus monômeros finais.

Nesta etapa do estudo, a temperatura da reação foi elevada de 37 °C para 60 °C, visto que a faixa de termoestabilidade é de 35 a 70 °C para HiC e de 30 °C até 60 °C para CALB (NOVOZYMES, 2019) e, também, induzindo a mobilidade das cadeias

poliméricas das regiões amorfas e aumentando a acessibilidade para as enzimas (WEI; ZIMMERMANN, 2017b). Ademais, foi investigada a sinergia entre as duas enzimas na despolimerização de três tipos de substrato: PET amorfo e CPR moído, além do PET garrafa, com graus de cristalinidade de 12,9%, 41,1% e 36,6%, respectivamente, conforme determinado em DE CASTRO et al. (2017). As reações realizadas empregando individualizadas foram as enzimas e. também, simultaneamente por um período de 14 dias. As concentrações dos produtos liberados foram quantificadas por HPLC e a Figura 12 ilustra as liberações no progresso da reação. Já a Tabela 11 dispõe de diferentes variáveis de respostas calculadas a partir desses valores de concentração.

Tabela 11. Resultados das variáveis de respostas no final das reações (14 dias) de hidrólise de PET amorfo, garrafa e CPR a 60 °C pela adição individual ou simultânea de HiC e CALB.

Tipo de PET	Enzima	Somatório dos produtos (µM)	Хвнет	Хмнет	X _{TPA}	Rendimento de TPA (%)
	Controle negativo	2,267	0,000	0,344	0,656	0,00
Amorfo	HiC	63864,38	0,011	0,495	0,494	30,31
	CALB	14,86	0,019	0,099	0,883	0,01
	HiC + CALB	57329,66	0,004	0,214	0,782	43,09
	Controle negativo	0,942	0,303	0,000	0,697	0,00
Garrafa	HiC	801,20	0,000	0,303	0,697	0,42
	CALB	9,18	0,000	0,084	0,916	0,01
	HiC + CALB	1128,48	0,011	0,383	0,606	0,66
	Controle negativo	2,573	0,296	0,000	0,704	0,00
CPR	HiC	15570,83	0,012	0,429	0,558	8,35
	CALB	10,70	0,029	0,040	0,931	0,01
	HiC + CALB	12176,77	0,009	0,331	0,661	7,73

Onde: x = Fração molar do analíto; Controle negativo = sem adição de enzima;

Avaliando o efeito do aumento da temperatura nas reações somente com HiC em 14 dias (Tabela 11), os somatórios dos produtos de hidrólise do PET amorfo (63864,38 μM) e PET garrafa (801,20 μM) apresentaram um aumento de 46 e 2,6 vezes, respectivamente, quando comparado com os resultados obtidos a 37 °C (Tabela 10). Logo, a elevação da temperatura para 60 °C melhorou significativamente a biocatálise pela enzima HiC. Já para a CALB, esta mudança de temperatura não apresentou um efeito tão favorável e substancial visto que reação foi realizada na temperatura limite da sua faixa nominal de temperatura de atuação. Como resultado, o aumento deste parâmetro induziu um leve aumento no somatório dos analitos de 1,11 vezes (11%) para o PET amorfo e uma redução de 1,09 vezes (8%) para o PET garrafa.



Figura 12. Progresso da liberação de TPA e MHET durante hidrólise de três diferentes tipos de PET – (a) amorfo, (b) garrafa e (c) CPR – utilizando HiC, CALB e ambas simultaneamente a 60°C em hibridizador. As reações foram realizadas em tampão fosfato de sódio 200 mM (pH 7,0), 200 mg de PET, carga de enzima de 0,01g_{proteína}/g_{PET} e agitação de 25 rpm.

Em relação ao tipo de substrato, as reações controle sem adição das enzimas apresentaram valores insignificantes de produtos de despolimerização. Já para todas

as condições com aplicação das enzimas, as maiores concentrações de produtos liberados foram, em ordem decrescente, pela despolimerização do PET amorfo, CPR e garrafa (Tabela 11 e Figura 12). Embora o PET CPR moído apresente maior grau de cristalinidade do que o grau da garrafa, este substrato moído apresenta maior área superficial média (0.0110 m²/g) do que os pedaços cortados de garrafa, possivelmente levando a um maior ataque da HiC e, consequentemente, maiores taxas de despolimerização. Esta relação entre a área superficial e a taxa de hidrólise já foi demonstrada pelo nosso grupo de trabalho na despolimerização de diferentes granulometrias de PET CPR usando HiC (CASTRO et al., 2019). GAMERITH et al. (2017b) também observaram este efeito com uma cutinase de *T. cellulosilytica* na hidrólise enzimática de partículas menores de PET (0,05 mm), que atingiu uma concentração de TPA de 13 mM em 21 dias, enquanto que partículas maiores (0,25 mm) liberaram apenas 5 mM – uma diferença de 2,6 vezes. Além disso, o aumento da temperatura da reação (de 40 °C para 60 °C) resultou em um aumento de 10 vezes na concentração de TPA em 7 dias.

Em relação aos perfis de fração molar, foi notado que o MHET permaneceu como molécula majoritária da mistura reacional até a metade do tempo de reação (7 dias) e decaiu posteriormente, tornando o TPA predominante para todas as condições, exceto na qual a enzima HiC foi empregada separadamente no PET amorfo (x_{TPA} = 0,494 e x_{MHET} = 0,495). Já nos ensaios em que as reações foram conduzidas com as duas enzimas concomitantemente, pôde ser observado que o MHET acumulado foi sendo hidrolisado ao longo da reação à medida que o TPA era formado, indicando a ação da lipase B de *C. antarctica* sobre o MHET. Quando os rendimentos de TPA das duas condições foram comparados (HiC contra HiC mais CALB –Tabela 11), foi observado um aumento de 1,42 vezes para PET amorfo e 1,57 vezes para PET garrafa, indicando

um incremento na produtividade de TPA na reação quando as duas enzimas foram combinadas. Entretanto, este efeito não foi observado para o PET CPR, visto que a concentração final de TPA formado somente pela HiC foi superior em relação às enzimas juntas. Uma hipótese que poderia explicar esse fenômeno se deve ao caráter heterogêneo deste substrato (CPR), que é oriundo da reciclagem mecânica de diferentes embalagens de PET e pode variar em granulometria, massa molar e cristalinidade. Outra hipótese que poderia ser explorada está relacionada com a maior disposição de regiões menos cristalinas devido à maior área superficial média das partículas de PET CPR em relação aos outros substratos. Diversos estudos já reportaram o efeito positivo na despolimerização enzimática de PET pela redução do tamanho de partícula que, consequentemente, aumenta a área superficial disponível para a adsorção do biocatalisador (HERZOG; MÜLLER; DECKWER, 2006; WEI et al., 2014a; BARTH et al., 2015a). Porém, uma maior competição entre a CALB e a HiC poderia ter ocorrido pela adsorção nessas regiões, impactando a eficiência da sua hidrólise pela menor adsorção de HiC, visto que a CALB sozinha não se mostrou um biocatalisador eficiente sobre o polímero (Tabela 11). Contudo, ensaios adicionais devem ser realizados para investigar essas hipóteses sugeridas.

Intrigantemente, não foi observada a depleção total do MHET acumulado para nenhum dos substratos, o que era esperado devido aos resultados obtidos nas reações de hidrólise de BHET a 37 °C (Tabela 9). Possivelmente, a temperatura de reação (60 °C) pôde ter impactado na estabilidade de ação da CALB ao longo dos 14 dias de reação.

Em relação ao estudo da sinergia, foi investigado se a ação simultânea de HiC e CALB poderia impulsionar o rendimento de TPA na reação. Através do cálculo do grau de sinergia (GS – Equação 7) foi possível observar este efeito ao longo das reações

para os três tipos de PET. Graus efetivos de sinergia foram encontrados em todas as condições; porém, esses efeitos foram decaindo ao longo do tempo de reação (Figura 13). O maior grau de sinergia (2,21) foi observado em 7 dias de reação com o PET garrafa, pois a ação conjunta das enzimas provocou um incremento de 110,5% na quantidade de TPA liberada (Figura 12) quando comparado com a soma obtida pelas enzimas separadamente (208,31 μ M pela HiC e 3,91 μ M pela CALB totalizam 212,22 μ M *versus* 469,52 μ M com o uso simultâneo). Em seguida, este GS reduziu para 1,73 e 1,52 em 10 e 14 dias, respectivamente.

Um perfil similar foi observado para PET amorfo e CPR, que registraram graus de sinergia máximos no início das reações (3 dias) de 2,00 e 1,57, respectivamente. Em seguida, ambos foram reduzidos até o fim da reação para 1,42 (amorfo) e 0,92 (CPR). Intrigantemente, no final da reação com CPR, os graus de sinergia obtidos foram menores que 1, ou seja, a concentração de TPA liberada apenas com a HiC superou a concentração obtida com a mistura de HiC e CALB.

Conforme pontuado anteriormente, uma possível causa para o decaimento dos graus de sinergia ao longo da reação seria a perda de estabilidade de ação da CALB pela elevação da temperatura de reação de 37 °C para 60 °C, influenciando negativamente na conversão de MHET ao TPA durante os 14 dias de ensaio.



Figura 13. Progresso do grau de sinergia entre HiC e CALB durante hidrólise de três diferentes tipos de PET – (a) amorfo, (b) garrafa e (c) CPR – a 60 °C em hibridizador. As reações foram realizadas em tampão fosfato de sódio 200 mM (pH 7,0), 200 mg de PET, carga de enzima de 0,01g_{proteína}/g_{PET} e agitação de 25 rpm.

Deste modo, foi realizado um experimento pontual em triplicata usando PET CPR a fim de investigar a hipótese do impacto da temperatura sobre a ação da CALB. Foram empregadas as mesmas condições experimentais; no entanto, foi adotada uma estratégia para a adição da CALB: reduzir a temperatura de 60 °C para 37 °C ao final da reação com HiC (14 dias) e, então, adicionar CALB e incubar por mais 24 horas.

A Figura 14 ilustra a liberação dos produtos de hidrólise no progresso da reação. Em 14 dias de ensaio com HiC, novamente o TPA permaneceu predominante na reação ($x_{TPA} = 0,59$), atingindo uma concentração de 6772,70 µM. Em seguida, o MHET apresentou um acúmulo de 4706,25 µM e fração molar de 0,40. No entanto, quando a enzima CALB foi adicionada, foi observado um consumo rápido do MHET acumulado até sua depleção total em 24 horas de reação (0 µM; $x_{MHET} = 0,00$). Consequentemente, foi observada uma formação intensa de TPA devido a hidrólise 83 do MHET catalisada pela CALB, atingindo o valor de 13640,39 µM e x_{TPA} = 0,99, dobrando a concentração de TPA em relação a concentração liberada apenas com a HiC em 14 dias. Também foi observada uma formação superior de TPA do que o esperado pela hidrólise total do MHET acumulado até 14 dias, cerca de 2161,44 µM de TPA excedente. Este ganho pode ser atribuído a continuidade da atividade de HiC sobre o PET CPR pelas 24 horas adicionais de reação e, também, pela ação da CALB sobre o MHET formado neste período. Isso significa que a adição da CALB a 37 °C resultou em um aumento de aproximadamente 1,7 vezes na concentração de TPA em comparação com a reação utilizando as duas enzimas simultaneamente a 60 °C. Além disso, o rendimento de TPA foi incrementado de 8,61%, com apenas a HiC em 14 dias, para 13,58% Logo, esta estratégia demonstrou ser mais efetiva para aumentar o rendimento do monômero final do PET, visto que a CALB atuou melhor em uma temperatura mais branda.

Um estudo similar de combinação enzimática foi reportado por BARTH et al. (2016), onde foi empregada uma carboxilesterase imobilizada (TfCa) capaz de consumir o MHET no sistema de reação de despolimerização com uma PET hidrolase livre (TfCut2 ou LC-cutinase; ambas inibidas pela presença do MHET no meio). Deste modo, a conversão do MHET ao TPA pela TfCa imobilizada durante a reação gerou um aumento da atividade das enzimas livres em 104% (TfCut2) e 91% (LCc) quando comparado com as enzimas livres sozinhas. Entretanto, a TfCa imobilizada também não foi capaz de converter totalmente o MHET acumulado em TPA a 60 °C.



Figura 14. Progresso da liberação de TPA, MHET e BHET durante hidrólise de PET CPR utilizando a estratégia de adição consecutiva de CALB a 37 °C após a reação com HiC a 60 °C por 14 dias em hibridizador. Os ensaios foram realizados em tampão fosfato de sódio 200 mM (pH 7,0), 200 mg de PET, carga de enzima de 0,01g_{proteína}/g_{PET} e agitação de 25 rpm.

Com o intuito de investigar as mudanças morfológicas que podem ter ocorrido na superfície do polímero pela hidrólise catalisada por ambas as enzimas, diferentes partículas do PET CPR ao fim da reação sequencial com HiC e CALB foram selecionadas aleatoriamente e observadas por MEV. A Figura 15.a ilustra a superfície controle de uma partícula de PET CPR – proveniente de uma reação em que não foram adicionadas as enzimas – e apresentou um perfil liso e uniforme. Já nas partículas provenientes das reações enzimáticas (Figura 15.b) pôde ser observado um padrão de erosões profundas na superfície do PET, indicando uma degradação do polímero nestes locais decorrente da ação dos biocatalisadores.



Figura 15. Imagens obtidas por MEV de partícula de PET CPR após a reação com HiC a 60 °C seguida da adição de CALB a 35 °C. (a) partículas controle proveniente de reação sem enzimas e (b) partículas degradadas pelas enzimas.

5.4. Hidrólise de PET CPR catalisada por HiC em biorreatores empregando condições otimizadas

Para a execução dos conjuntos de ensaios desta subseção (5.4) até a última (5.7), foram empregadas as condições otimizadas por delineamento experimental da reação de hidrólise do PET CPR utilizando apenas a HiC, conforme reportado por CASTRO et al. (2019). Cinco variáveis de processo foram otimizadas: concentração de PET (80,76 g/L), carga de enzima (0,065 g_{proteína}/g_{PET}), pH inicial (8,95), concentração de tampão Tris-HCI (397 mM) e temperatura (62,6 °C). Com base nisso, foi realizado um escalonamento da reação otimizada de hidrólise do PET CPT pela HiC em hibridizador com tubos Falcon para um reator instrumentado de agitação contínua. A reação foi mantida por 100 horas e as concentrações dos produtos de hidrólise foram quantificadas por HPLC. A Figura 16 ilustra a liberação dos produtos no progresso da reação e, com estes valores, diferentes variáveis de respostas calculadas.

Analisando o gráfico de liberação de produtos da hidrólise (Figura 16), o somatório das concentrações finais dos produtos liberados foi de 68009,96 µM. Pode ser

observado que o TPA permaneceu majoritário por todo o tempo de reação, partindo de uma fração molar inicial de 0,51 até finalizar em 0,96, atingindo uma concentração final de 65037,73 μ M (Rendimento de TPA = 11,6%). Já o MHET teve um baixo acumulo (concentração final de 2914,64 μ M; X_{MHET} = 0,04), enquanto que o BHET apresentou uma concentração final irrisória (57,59 μ M; x_{BHET} = 0,001). Entretanto, os perfis de frações molares citados apresentaram uma mudança brusca em relação aos obtidos nos ensaios antes da otimização (Tabela 11). Isto pode ter sido acarretado por diversos fatores como aumento da temperatura reacional, hidrólise térmica do MHET, troca do reagente tamponante, entre outros. Entretanto, são necessários experimentos adicionais para elucidar essa mudança de perfil da mistura.



Figura 16. Progresso da liberação de TPA. MHET e BHET, inclusive o monitoramento do pH, durante hidrólise de PET CPR por HiC em biorreator a 62,6 °C e agitação de 300 rpm. A reação foi realizada em tampão Tris-HCl 397 mM (pH 8,95), 80,8 g/L de PET e carga de enzima de 0,065 g_{proteína}/g_{PET}.

Comparando estes resultados em reator com os dados obtidos no ensaio em tubo Falcon de 15 mL agitado por tombamento pelo hibridizador, pôde ser identificado um ganho no somatório das concentrações dos produtos e na concentração final de TPA de 1,49 e 1,53 vezes, respectivamente (CASTRO et al., 2019). Isso indica que a agitação mecânica contínua do reator pode ter sido mais eficaz na transferência de massa do sistema, gerando um efeito positivo na reação de despolimerização. Um estudo reportado por O'NEILL et al. (2007) que estudava a hidrofilização de fibras de PET pela ação de uma cutinase de F. solani, comprovou que a agitação mecânica promoveu uma maior adsorção enzimática e concentração de TPA formado (200 µM) quando comparado com uma agitação orbital (75 µM). BARTH et al. (2015a) também observaram um efeito positivo da agitação mecânica nas reações de hidrólise de filmes de PET pela ação de TfCut2 em um reator contendo membrana de ultrafiltração para remover os produtos inibitórios desta enzima. Com base nos resultados, o autor propõe que este tipo de sistema de agitação auxilia na difusão dos produtos da hidrólise, removendo estas moléculas da proximidade do sítio catalítico da enzima e acelerando o processo de adsorção-hidrólise-dessorção da enzima sobre o substrato do PET.

Além disso, também foi observado que o pH da reação teve um declínio relevante de 8,95 para 7,25 (Figura 16), mesmo com o sistema reacional tamponado com a solução de Tris-HCI. Este decréscimo está correlacionado com a alta concentração do ácido tereftálico liberado ao longo da reação que, consequentemente, aumentou a acidez do sistema (SHIRKE et al., 2018). Apesar desta variação ainda compreender a faixa nominal de pH para atuação da cutinase de *H. insolens* (NOVOZYMES, 2019), a condição ótima de pH para o processo de despolimerização não foi mantida durante toda a reação.

Uma opção que possibilitaria mitigar este efeito seria elevar a capacidade tamponante do Tris-HCI pelo aumento da sua concentração. No entanto, foi observado nos estudos de otimização que, para o fator molaridade do tampão, os níveis superiores ao valor obtido pela função de "*desirability*" (397 mM) apresentaram valores de respostas inferiores (CASTRO et al., 2019). Logo, esta estratégia não seria conveniente para driblar a redução do pH. Desta forma, foi proposta uma outra estratégia que compreendia a adição de diferentes soluções de agentes alcalinizantes para ajuste do pH durante a reação de hidrólise de PET no reator instrumentado.

5.5. Estudo do efeito do controle de pH na hidrólise de PET CPR catalisada por HiC

Afim de observar o efeito da manutenção do pH ótimo durante a reação de hidrólise do PET CPR, foram realizados dois ensaios em paralelo usando biorreatores de agitação contínua Multifors 2 (Infors HT) capazes de controlar o pH do sistema reacional. Foram empregados os parâmetros otimizados pelo DCCR/"*steepest ascent*", com exceção da temperatura (realizados a 50 °C), visto que estes reatores não foram capazes de atingir a temperatura de 62,6 °C. Neste estudo, um dos reatores controlou o pH em 8,95 durante toda a reação pela adição de solução NaOH 5 M, enquanto que no outro não se realizou o controle de pH. As reações foram mantidas por 96 horas e as concentrações dos produtos de hidrólise foram quantificadas por HPLC. A Figura 17 ilustra a liberação dos produtos no progresso das reações e, com estes valores, diferentes variáveis de respostas calculadas, as quais estão dispostas na Tabela 12.

Tabela 12. Resultados das variáveis de respostas das reações em reatores de agitação contínua para hidrólise de PET CPR com HiC (0,065 g_{proteína}/g_{PET}) a 50 °C no final das reações (96 horas).

Solução do meio reacional	Solução de ajuste de pH	Soma de produtos da reação (mM)	Хвнет	Хмнет	Х ТРА	Rendimento de TPA (%)
Tampão Tris-HCl 397,3 mM (pH 8,95)	Sem ajuste	11,01	0,000	0,083	0,917	1,79
Tampão Tris-HCl 397,3 mM (pH 8,95)	NaOH 5 N	14,49	0,000	0,000	1,000	2,58
Água alcalinizada pH 8,95	Sem ajuste	7,09	0,000	0,000	1,000	1,26
Água alcalinizada pH 8,95	NaOH 0,5 N	26,28	0,021	0,423	0,557	2,60
Água alcalinizada pH 8,95	KOH 0,5 N	18,33	0,000	0,317	0,683	2,18

Onde: x = Fração molar do analíto;

Embora a reação de despolimerização não tenha ocorrido na temperatura ótima (62,6 °C), o que inviabilizou a comparação apropriada com os resultados obtidos no ensaio da seção 5.4, ainda foi possível observar o efeito da manutenção do pH durante a hidrólise enzimática do PET CPR neste ensaio. Na condição sem controle de pH (Figura 17), foi observado um decréscimo do valor inicial de pH (8,95) ao longo da reação até atingir o valor final de 8,09 (96 horas). No entanto, o pH permaneceu estável durante o ensaio na condição em que houve o controle do pH pela adição de NaOH 5 M, atingindo um valor final de 8,89.



Figura 17. Progresso do somatório de TPA, MHET e BHET (curvas cheias) e monitoramento do pH (curvas pontilhadas) durante hidrólise de PET CPR por HiC (0,065 g_{proteína}/g_{PET}) a 50 °C em reatores, comparando as condições com controle de pH em 8,95 com adição de NaOH 5 M (triângulos) e sem controle de pH (círculos). As reações foram realizadas em tampão Tris-HCI 397 mM (pH 8,95) com 80,8 g/L de PET e carga de enzima de 0,065 g_{proteína}/g_{PET}.

Analisando as quantificações dos produtos liberados na despolimerização (Figura 17.a), foi obtido um somatório de 11005,71 μ M ao final da reação a 50°C sem controle de pH, uma redução de aproximadamente 5,8 vezes ao somatório obtido no mesmo tempo de ensaio a 62,6 °C (64403,48 μ M), reiterando o efeito significativo da temperatura no processo de despolimerização. Ainda assim, o perfil dos analitos na mistura reacional foi mantido: o TPA permaneceu majoritário durante toda a reação, finalizando em 10092,24 μ M e com fração molar de 0,917, seguido do MHET (2218,21 μ M; x = 0,083) e BHET (51,79 μ M x = 0,000). Já na condição em que houve a manutenção do pH pela adição de NaOH 5 M, o somatório dos produtos de hidrólise

foi compreendido apenas pela concentração final de TPA (14489,85 μ M), visto que este foi o produto absoluto no final da reação (x_{TPA} = 1,000). Logo, com a estratégia de manutenção do pH durante a despolimerização, pôde ser observado um incremento no somatório dos analitos e na concentração de TPA de 1,32 e 1,44 vezes, respectivamente.

Adicionalmente, um conjunto de estudos preliminares foi realizado a fim de avaliar a redução de elementos fatoriais da reação que estão diretamente relacionados ao custo do processo. Ainda no contexto do controle de pH na reação de despolimerização, foram realizados ensaios eliminando o uso do tampão e adotando a estratégia de adição de solução de agentes alcalinizantes para controlar o pH em água pura. Foram empregados dois tipos de agentes comumente utilizados no ajuste de pH em processos industriais: KOH e NaOH. Ambos foram empregados na concentração de 0,5 M. Também foi incluída uma condição em que não ocorreu o controle do pH para avaliar o impacto no processo de despolimerização. Desta forma, três reações foram realizadas em paralelo e mantidas por 96 horas a 50°C. As concentrações dos produtos de hidrólise foram quantificadas por HPLC e, com estes valores, diferentes variáveis de respostas foram calculadas e estão dispostas na Tabela 12

Avaliando a Figura 18.a foi observado que na condição sem controle de pH ocorreu uma queda brusca deste parâmetro, registrando uma variação de 3,3 unidades ao longo da reação (pH final = 5,59). Já o somatório dos produtos de hidrólise (Figura 18.b) atingiu 7094,08 μ M em 96 horas, sendo composto totalmente por TPA (x = 1,000). Como esperado, a ausência do controle de pH impactou negativamente na reação, reduzindo em 0,36 e 0,30 vezes o somatório dos analitos e a concentração

final de TPA, respectivamente, quando comparado com os resultados obtidos na condição com tampão Tris-HCl sem o controle de pH a 50 °C (Tabela 12).



Figura 18. Progresso do (a) monitoramento do pH e (b) somatório de TPA, MHET e BHET liberados durante hidrólise de PET CPR por HiC (0,065 g_{proteína}/g_{PET}) a 50 °C em reatores. Foram comparadas as condições com controle de pH em 8,95 com adição de NaOH 0,5 M (círculos) e de KOH (triângulos), além da condição sem controle de pH (quadrados). As reações foram realizadas em água com 80,8 g/L de PET e carga de enzima de 0,065 g_{proteína}/g_{PET} e agitação de 300 rpm.

Surpreendentemente, a condição em água com ajuste de pH utilizando NaOH 0,5 M apresentou resultados superiores em relação a todas condições em tampão estudadas a 50 °C. Foi observado que o pH permaneceu estável durante toda a reação (Figura 18.b), enquanto que o somatório de produtos liberados atingiu 26279,78 µM em 96 horas. Isto é, em relação aos somatórios obtidos nas condições em tampão com controle usando NaOH 5 M e sem este controle, houve um aumento de 1,81 e 2,39 vezes, respectivamente. Deste modo, a eliminação do uso do tampão Tris-HCI poderia trazer uma economia no processo. No entanto, quando foi observado o perfil das frações molares dos produtos gerados nesta condição (Tabela 12), foi acumulada uma alta quantidade de MHET, embora o TPA ainda tenha predominado na mistura ($x_{TPA} = 0,557$; $x_{MHET} = 0,423$; $x_{BHET} = 0,021$). Isto contrariou os perfis observados nas condições usando tampão, onde o TPA foi praticamente o único produto final da hidrólise (com ajuste de pH – $x_{TPA} = 1,000$; sem controle de pH – x_{TPA} = 0,917). Portanto, em relação a concentração final de TPA liberada na reação, a condição em água com controle de pH empregando NaOH 0,5 M atingiu o valor de 14624,94 µM, não apresentando um aumento significativo quando comparado com a concentração obtida na condição em tampão e pH controlado usando NaOH 5 M. Logo, uma alternativa que poderia aumentar o rendimento de TPA na reação seria o emprego da CALB que converteria rapidamente este MHET, porém adicionaria um custo ao processo.

Já na condição empregando o KOH como agente alcalinizante (Figura 18), também foi observado que o pH permaneceu estável durante toda a reação. Em relação ao somatório dos produtos de hidrólise e à concentração de TPA final em 96 horas, foram atingidos os valores de 18328,26 µM e 12518,20 µM, respectivamente. Isto significa que houve uma redução de 30% e 14% em relação aos dados obtidos com NaOH 0,5 M de somatório e concentração final de TPA, respectivamente. Uma hipótese que poderia elucidar essa redução está relacionada a uma possível diferença nos coeficientes de solubilidade dos dois sais de tereftalato produzidos em cada condição: dissódico ou dipotássico. Entretanto, outros estudos devem ser realizados para compreender esta diferença na reação de hidrólise com diferentes álcalis. Contudo, o uso do NaOH é uma alternativa mais atrativa, além de ser um álcali mais

barato do que o KOH (BART; PALMERI; CAVALLARO, 2010). Além disso, o perfil de fração molar com KOH (Tabela 12) apresentou uma similaridade com a condição empregando NaOH, com o TPA como molécula predominante (x = 0,683) e com alto acúmulo de MHET (x = 0,317).

Baseado neste conjunto de ensaios, pôde ser notado que a composição do meio reacional e/ou os valores de pH durante as reações influenciaram no perfil das frações molares dos produtos liberados durante a hidrólise do PET CPR catalisada pela HiC. Avaliando apenas as condições onde a água alcalinizada foi utilizada como solvente, o TPA foi a molécula predominante na condição sem controle de pH; enquanto que nas condições em que o pH foi mantido próximo a 8,95, houve um grande acúmulo de MHET. Essa mudança de perfil poderia ter ocorrido devido à hidrólise do MHET em pH mais ácido em alta temperatura, justificando esse alto acúmulo de TPA. Já nas condições com sistema tamponado usando Tris-HCl, ambas mantiveram o pH alcalino (8,95 ~ 8,1) e, mesmo assim, essas reações não foram favoráveis pelo acúmulo de MHET, resultando na formação majoritária de TPA. Uma possibilidade que poderia ser considerada se baseia na hidrólise do MHET pela adição de NaOH 5 M; entretanto, o MHET acumulado nas reações apenas com água alcalinizada também teria sido hidrolisado. Outro fator que poderia estar relacionado seria a influência dos íons provenientes do tampão na modulação do perfil catalítico da HiC sobre as etapas de hidrólise do polímero de PET até o monômero de TPA. Diferentes íons e suas concentrações podem afetar diretamente a estabilidade de proteínas em solução aquosa – conhecido como efeito Hofmeister – através de interações entres os íons e essas macromoléculas, como também com as moléculas de água, modulando assim a camada de solvatação/hidratação das proteínas (HOFMEISTER, 1888; KUNZ; HENLE; NINHAM, 2004; ZHANG; CREMER, 2006). A atividade catalítica e a estrutura

proteica também são afetadas pelo pH do sistema e suas variações, pois alteram as cargas globais das proteínas. Adicionalmente, diferentes íons também podem influenciar a ancoragem molecular da enzima em um substrato, interferindo na atividade catalítica. SCHMIDT et al. (2016) reportaram variações nas taxas de hidrólise de filmes de PET por duas cutinases utilizando diferentes tipos de tampões e variações nas suas concentrações, além de demonstrar a interferência de alguns tampões no ensaio de ancoragem, molecular entre o polímero de PET e as cutinases. Além dessas hipóteses, o nosso grupo de trabalho também observou em um experimento pontual uma intensa hidrólise do MHET na presença de tampão fosfato de sódio (200 mM; pH 7,0) em alta temperatura (62,6 °C) em apenas 24 horas, resultando em um perfil molar absoluto de TPA (dados não publicados). Isso também poderia estar ocorrendo nas reações de despolimerização utilizando o tampão Tris-HCI em temperaturas altas. No entanto, outros estudos necessitam ser realizados para investigar essa modulação do sistema reacional sobre o perfil de fração molar da mistura.

Por fim, uma análise mais profunda dever ser realizada para avaliar o custobenefício da mudança do tipo de sistema reacional e avaliar os custos para cada opção.

5.6. Estudo do efeito do tipo de alimentação de HiC na hidrólise de PET CPR em biorreatores

O uso da estratégia de alimentação fracionada de enzima ao invés da alimentação completa no início das reações tem potencializado a performance de reações

hidrolíticas pela redução da desativação enzimática (SUGIHARTO et al., 2016). Com o intuito de investigar o modo de alimentação do biocatalisador durante a hidrólise de PET CPR, foi realizado um ensaio preliminar em biorreatores de agitação contínua Multifors 2 (Infors HT) que consistiu em duas estratégias de adição da enzima HiC (0,065 g_{proteína}/g_{PET}): (1) toda a carga enzimática foi adicionada no tempo inicial da reação, enquanto que (2) a carga enzimática foi fracionada em duas partes sendo a primeira adicionada no tempo inicial e a outra no meio tempo da reação (48 horas). As reações foram incubadas em paralelo por 96 horas a 50 °C. As concentrações dos produtos de hidrólise foram quantificadas por HPLC e, com estes valores, diferentes variáveis de respostas foram calculadas e estão dispostas na Tabela 13.

Tabela 13. Resultados das variáveis de respostas correspondentes ao tipo de alimentação da enzima durante a hidrólise de PET CPR com HiC (0,065 g_{proteína}/g_{PET}) a 50 °C no final das reações (96 horas). As reações foram realizadas em tampão Tris-HCI 397,3 mM pH 8,95.

Adição de enzima	Soma de produtos da reação (µM)	Хвнет	Х мнет	Хтра	Rendimento de TPA (%)
100%	13818,26	0,000	0,083	0,917	2,25%
50%/50%	11872,43	0,000	0,082	0,918	1,94%

Onde: x = Fração molar do analíto;

A Figura 19 ilustra a liberação de TPA durante a hidrólise de PET CPR pelas duas estratégias de alimentação da carga enzimática. Foi observado que ambas as condições apresentaram um perfil de hidrólise muito similar. Na condição em que alimentada toda a carga de enzima no início da reação, a concentração máxima de TPA obtida foi 12670,46 µM em 96 horas com uma taxa de liberação 119,97 µM.h⁻¹

(R² = 0,991). Já na estratégia em que a alimentação aconteceu de forma fracionada, o TPA atingiu uma concentração máxima de 10900,99 μM e taxa de liberação de 107,570 μM.h⁻¹ (R² = 0,996). Logo, foi observado que ao fracionar a carga enzimática na reação não surtiu uma diferença substancial, inclusive apresentando uma redução de 14% na concentração de TPA liberada. Em relação ao somatório dos produtos da hidrólise (Tabela 13), também foi observada a mesma magnitude de redução com a estratégia de alimentação fracionada.



Figura 19. Progresso da concentração de TPA liberado pela hidrólise de PET CPR por HiC a 50 °C em reatores, comparando duas estratégias de alimentação de enzima: carga total de enzima (0,065 g_{proteína}/g_{PET}) no início da reação (círculos) *versus* metade da carga total no início da reação e a outra metade em 48 hrs de reação (triângulos). As reações foram realizadas em tampão Tris-HCI 397 mM (pH 8,95) com 80,8 g/L de PET.

Portanto, foi concluído que a condição estudada de fracionamento da alimentação de HiC não influenciou positivamente na reação de hidrólise do PET CPR para este tempo de reação. Além disso, pôde ser concluído através das curvas lineares de

liberação de TPA de ambas as condições que não houve perda de atividade enzimática pela temperatura ao longo da reação na condição com toda a carga de enzima adicionada inicialmente.

No entanto, foi realizada a comparação destes parâmetros avaliados até 48 horas de reação a fim de comparar as diferenças na reação entre a condição padrão e a que continha apenas metade da carga de HiC. Na condição contendo 0,065 g_{proteína}/g_{PET} foi obtido o somatório de 5742,19 μ M, concentração de TPA de 5267,35 μ M e taxa de 113,07 μ M (R² = 0,998). Por outro lado, todos estes parâmetros foram relativamente superiores na condição com a metade desta carga, com somatório de produtos de 6080,07 μ M e concentração de TPA de 5851,52 μ M com taxa de liberação de 117,54 μ M (R² = 0,993). Isso poderia estar ocorrendo por uma possível saturação da adsorção da HiC sobre o polímero de PET já com a metade da carga de enzima. Logo, estes resultados apontam que existe uma possibilidade de reduzir a carga enzimática e, então, esta variável ainda é passível de ser explorada.

5.7. Estudo do efeito da redução da carga da enzima HiC na hidrólise de PET CPR

Baseado nos resultados apresentados na seção anterior e visando a redução dos custos no processo de despolimerização de PET, foram realizados ensaios preliminares para estudar o efeito da redução de carga de HiC empregada na reação. Os experimentos foram conduzidos em tubo Falcon de 15 mL utilizando diferentes cargas enzimática (Tabela 7). Deste modo, os outros parâmetros otimizados foram mantidos e as reações foram incubadas em hibridizador a 62,6 °C por 14 dias. As

concentrações dos produtos de hidrólise foram quantificadas por HPLC e, com estes valores, diferentes variáveis de respostas foram calculadas e estão dispostas na Tabela 14.

Tabela 14. Resultados das variáveis de respostas ao final das reações (14 dias) de hidrólise do PET CPR a 62,6 °C empregando diferentes reduções de carga da enzima.

Carga de enzima (g _{proteína} /g _{PET})	Redução da carga de enzima (%)	Soma de produtos da reação (µM)	Хвнет	Хмнет	Х ТРА	Rendimento de TPA (%)
0,065	Referência	83543,39 ± 5931,40	0,000	0,041	0,959	19,06%
0,0325	50	97072,39 ± 1579,24	0,001	0,005	0,994	22,96%
0,0065	90	50839,18 ± 2023,29	0,000	0,009	0,991	11,99%
0,00325	95	21389,07 ± 3104,84	0,000	0,004	0,996	5,07%

Onde: x = Fração molar do analíto;

Analisando o somatório dos produtos liberados da hidrólise e o rendimento de TPA (Tabela 14), pôde ser observado que na reação com metade da carga de HiC obtevese uma concentração total de produtos de 97072,39 µM e rendimento de TPA de 22,96%, representando um aumento de 16% e 20%, respectivamente, quando comparado com os resultados utilizando a carga padrão de HiC (0,065 g_{proteína}/g_{PET}). Estes dados corroboram com os resultados obtidos na seção 5.6, onde foi observado o aumento destes parâmetros com metade da carga de enzima padrão. Já quando a carga foi reduzida dez vezes, o somatório dos produtos (50839,18 µM) e o rendimento de TPA (11,99%) foram reduzidos em 39% e 27%, respectivamente, em relação a carga padrão. E por fim, na condição em que houve a redução de vinte vezes na carga de enzima, foi observado um impacto negativo de 74% (somatório da concentração dos analítos) e 73% (rendimento de TPA). A Figura 20 ilustra a concentração de TPA liberada ao longo da reação com as diferentes cargas de enzimas. Como a fração molar do TPA foi elevada e muito similar entre as condições (Tabela 14), as diferenças da concentração de TPA obtida entre as condições foram muito similares em relação às diferenças do somatório dos produtos liberados da hidrólise, conforme foram descritas anteriormente: aumento de 20% (com 50% da carga) e reduções de 37 e 73% (com 10% e 5% de carga, respectivamente).



Figura 20. Progresso da concentração de TPA liberada durante hidrólise de PET CPR por HiC a 62,6 °C reduzindo a carga enzimática padrão de 0,065 g_{proteína}/g_{PET} (quadrados) em 50% (losângos), 100% (círculos) e 500% (triângulos). As reações foram realizadas em tampão Tris-HCl 397 mM (pH 8,95) e com 80,8 g/L de PET e agitação de 25 rpm em hibridizador.

No entanto, foi realizada uma padronização dos valores das concentrações finais do somatório de produtos liberados e, também, das concentrações de TPA pela massa de enzima empregada em cada condição reacional (Tabela 15). Desta forma, foi possível observar a influência de diferentes concentrações enzimáticas, isto é, das cargas de enzima empregadas nas reações de hidrólise de PET CPR catalisada por HiC. Quando foram comparadas as concentrações dos somatórios dos analitos entre as condições testadas, curiosamente a maior concentração foi atingida com a carga de enzima de 0,0065 g_{proteína}/g_{PET}, resultando em um aumento de 6,3 vezes em relação a concentração obtida na condição padrão. Em seguida, as cargas de 0,00325 e 0,0325 g_{proteína}/g_{PET} apresentaram um incremento de 5,3 e 2,4 vezes, respectivamente. Valores de incremento parecidos foram encontrados quando foram analisadas as concentrações de TPA, visto que estas também foram similares com o somatório dos analítos (Tabela 15). Embora os maiores valores de concentrações de TPA e do somatório de todos os analitos tenham sido atingidos com metade da carga de enzima padrão, a concentração de enzima presente na condição com 0,0065 g_{proteína}/g_{PET} (redução de 10 vezes) apresentou a maior atividade hidrolítica por grama de biocatalisador utilizado na despolimerização do PET CPR.

Tabela 15. Concentrações finais do somatório de produtos de hidrólise e de TPA liberado obtidos por grama de enzima nos ensaios de hidrólise de PET CPR utilizando diferentes cargas da enzima HiC. As reações foram realizadas em tampão Tris-HCI 397 mM (pH 8,95) e com 80,8 g/L de PET e agitação de 25 rpm em hibridizador a 62,6 °C por 14 dias.

Carga de enzima (g _{proteína} /g _{PET})	Redução da carga de enzima (%)	Soma de produtos liberados por grama de HiC (mM/g _{proteína})	Concentração de TPA liberado por g de HiC (mM/g _{proteína})
0,065	Referência	1060,46 ± 75,29	1016,56 ± 71,42
0,0325	50	$2464,39 \pm 40,09$	$2449,50 \pm 44,09$
0,0065	90	6453,31 ± 256,83	6394,30 ± 258,18
0,00325	95	5430,08 ± 788,23	5407,50 ± 787,68

6. CONCLUSÕES

Neste estudo, foi comprovada a atuação de 10 hidrolases sobre o monômero precursor da síntese de PET, o BHET. Foi observado que a maioria das enzimas apresentou dificuldade em converter o BHET totalmente ao TPA ($S_{TPA} = 0,019 \sim 0,113$), acumulando o MHET na reação. Apenas a lipase B de *C. antarctica* se destacou por realizar as duas etapas ($S_{TPA} = 250$), tornando este biocatalisador uma potencial opção para converter o BHET e MHET, acumulados nas reações na despolimerização de PET, ao TPA.

Embora todas as enzimas tenham conseguido catalisar a hidrólise do BHET, apenas a cutinase de *H. insolens* foi eficiente em catalisar a hidrólise das cadeias poliméricas do PET. Além disso, foi observada a influência do grau de cristalinidade de diferentes substratos exercida sobre as reações de hidrólise enzimática. Outro fator determinante foi o aumento da temperatura para um valor próximo da Tg de PET, influenciando as características físico-químicas do polímero, assim como na atividade catalítica da HiC.

Através da utilização de biorreatores para as reações, foi possível observar o efeito positivo que a agitação mecânica trouxe para o processo de hidrólise de PET pela HiC. Também foi observado que o controle de pH durante as reações é fundamental para promover maiores rendimentos de produtos de hidrólise.

Os resultados obtidos neste trabalho estão entre os maiores rendimentos provenientes de reação de hidrólise enzimática de PET grau garrafa até o momento (rendimento de TPA de 23% em 14 dias) e demonstram o potencial que esta rota de reciclagem apresenta a fim de mitigar os impactos que o despejo deste polímero traz

ao meio ambiente, assim como fornecer uma economia no processo de fabricação do PET pela recuperação dos monômeros.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

- Realizar os ensaios em biorreatores deste estudo em que não foi empregada a temperatura ótima da reação de despolimerização de PET CPR por HiC.
- Avaliar outras estratégias de adição fracionada de enzima combinada com a adição de substrato.
- Avaliar o reuso da enzima nas reações consecutivas de despolimerização.
- Avaliar a inibição da atividade da HiC pelo aumento da concentração dos produtos de hidrólise de PET.
- Avaliar a fusão de acessórios proteicos à estrutura da enzima HiC que permita promover a maior adsorção da enzima a superfície do polímero.
- Avaliar pré-tratamentos que permitam reduzir o grau de cristalinidade das partículas de PET antes da reação de despolimerização.
- Avaliar a recuperação do TPA e EG no meio reacional ao final da despolimerização enzimática.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIPET- Associação Brasileira da Indústria do PET. Décimo censo da reciclagem de PET no Brasil. Disponível em: http://www.abipet.org.br/indexAjax.html?method=baixarArquivo&id=548>.

ABIPET - Associação Brasileira da Indústria do PET. Indústria do PET no Brasil. Disponível <http://www.abipet.org.br/indexAjax.html?method=baixarArquivo&id=392>.

ABIPLAST - Associação Brasileira da Indústria do Plástico. Perfil 2018 Abiplast. Disponível em: http://www.abiplast.org.br/wp-content/uploads/2019/08/perfil-2018-web.pdf>.

AHMED AL-TAMMAR, K. et al. Expression and characterization of a cutinase (AnCUT2) from *Aspergillus niger*. **Open Life Sciences**, v. 11, n. 1, p. 29–38, jan. 2016.

AL-SABAGH, A. M. et al. Greener routes for recycling of polyethylene terephthalate. **Egyptian Journal of Petroleum**, v. 25, n. 1, p. 53–64, mar. 2016.

ARAÚJO, R. et al. Tailoring cutinase activity towards polyethylene terephthalate and polyamide 6,6 fibers. **Journal of Biotechnology**, v. 128, n. 4, p. 849–857, 2007.

ATTHOFF, B.; HILBORN, J. Protein adsorption onto polyester surfaces: Is there a need for surface activation? **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 80B, n. 1, p. 121–130, jan. 2007.

AUSTIN, H. P. et al. Characterization and engineering of a plastic-degrading aromatic polyesterase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 115, n. 19, p. E4350–E4357, 2018.

AWAJA, F.; PAVEL, D. Recycling of PET. European Polymer Journal, v. 41, n. 7, p. 1453–1477, 2005.

BART, J. C. J.; PALMERI, N.; CAVALLARO, S. Biodiesel catalysis. In: **Biodiesel** Science and Technology. Elsevier, 2010. p. 322–385.

BARTH, M. et al. Enzymatic hydrolysis of polyethylene terephthalate films in an ultrafiltration membrane reactor. **Journal of Membrane Science**, v. 494, n. 029, p. 182–187, 2015a.

BARTH, M. et al. Effect of hydrolysis products on the enzymatic degradation of polyethylene terephthalate nanoparticles by a polyester hydrolase from *Thermobifida fusca*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 93, p. 222–228, jan. 2015b.

BARTH, M. et al. A dual enzyme system composed of a polyester hydrolase and a carboxylesterase enhances the biocatalytic degradation of polyethylene terephthalate films. **Biotechnology Journal**, v. 11, n. 8, p. 1082–1087, 2016.

BARTOLOME, L. et al. Recent developments in the chemical recycling of PET. In: **Material Recycling - Trends and Perspectives**. InTech, 2012. p. 65–84.

BEAUMONT, N. J. et al. Global ecological, social and economic impacts of marine plastic. **Marine Pollution Bulletin**, v. 142, n. march, p. 189–195, maio, 2019.

BILLIG, S. et al. Hydrolysis of cyclic poly(ethylene terephthalate) trimers by a carboxylesterase from *Thermobifida fusca* KW3. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, n. 5, p. 1753–1764, 2010.

BORNSCHEUER, U. T. Feeding on plastic. **Science**, v. 351, n. 6278, p. 1154–1155, mar. 2016.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, maio 1976.

CARNIEL, A. et al. Lipase from *Candida antarctica* (CALB) and cutinase from *Humicola insolens* act synergistically for PET hydrolysis to terephthalic acid. **Process Biochemistry**, v. 59, p. 84–90, ago. 2017.

CARRAHER, C. E. J. **Polymer Chemistry**. 6° edição. Nova lorque. Marcel Dekker, 2003.

CASAS-GODOY, L. et al. Lipases: An Overview. In: Lipases and Phospholipases: Methods and Protocols, v. 1835, p. 3–30. Springer Science + Business. Nova Iorque, 2012.

CASTRO, A. M. de et al. High-fold improvement of assorted post-consumer poly(ethylene terephthalate) (PET) packages hydrolysis using *Humicola insolens* cutinase as a single biocatalyst. **Process Biochemistry**, v. 81, n. nov. 2018, p. 85–91, jun. 2019.

CEMPRE - Compromisso Empresarial para Reciclagem. Review 2019. Disponível em: http://cempre.org.br/upload/CEMPRE-Review2019.pdf>.

CHEN, S. et al. Cutinase: Characteristics, preparation, and application. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 8, p. 1754–1767, dez. 2013.

CRAWFORD, C. B.; QUINN, B. **Microplastic Pollutants**. 1° edição. Elsevier Science, 2017.

CULBERT, B.; CHRISTEL, A. continuous solid-state polycondensation of polyesters. In: Modern Polyesters: Chemistry and Technology of Polyesters and Copolyesters, p. 143–194. John Wiley & Sons, Ltd. Chichester, UK, 2004.

DE CASTRO, A. M. et al. Screening of commercial enzymes for poly(ethylene terephthalate) (PET) hydrolysis and synergy studies on different substrate sources. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 44, n. 6, p. 835–844, jun. 2017.

DEMEUSE, M. T. Other polymers used for biaxial films. In: **Biaxial stretching of film: Principles and applications**. p. 47-58. Woodhead Publishing, 2011.

DEMİREL, B.; YARAŞ, A.; ELÇİÇEK, H. Crystallization Behavior of PET Materials. **BAÜ Fen Bil. Enst. Dergisi Cilt**, v. 13, n. 1, p. 26–35, 2011.

DIMAROGONA, M. et al. Structural and functional studies of a *Fusarium oxysporum* cutinase with polyethylene terephthalate modification potential. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1850, n. 11, p. 2308–2317, nov. 2015.

DUTTA, K.; SEN, S.; VEERANKI, V. D. Production, characterization and applications of microbial cutinases. **Process Biochemistry**, v. 44, n. 2, p. 127–134, fev. 2009.

EBERL, A. et al. Enzymatic surface hydrolysis of poly(ethylene terephthalate) and bis(benzoyloxyethyl) terephthalate by lipase and cutinase in the presence of surface active molecules. **Journal of Biotechnology**, v. 143, n. 3, p. 207–212, set. 2009.

EFBW - European Federation of Bottled Waters. The Facts about PET. Disponível em:

<http://www.efbw.org/fileadmin/user_upload/documents/Publications/Facts_about_P ET_-_25_March_2013.pdf>.

ESPINO-RAMMER, L. et al. Two novel class II hydrophobins from *Trichoderma spp.* stimulate enzymatic hydrolysis of poly(ethylene terephthalate) when expressed as fusion proteins. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 14, p. 4230–4238, jul. 2013.

FECKER, T. et al. Active site flexibility as a hallmark for efficient PET degradation by *I. sakaiensis* PETase. **Biophysical Journal**, v. 114, n. 6, p. 1302–1312, 2018.

FORREST, A. K.; HINDELL, M. Ingestion of plastic by fish destined for human consumption in remote South Pacific Islands. **Australian Journal of Maritime & Ocean Affairs**, v. 10, n. 2, p. 81–97, abr. 2018.

FRANKEN, B. et al. Mechanism of acetaldehyde-induced deactivation of microbial lipases. **BMC Biochemistry**, v. 12, n. 1, p. 10, 2011.

FURUKAWA, M. et al. Acceleration of enzymatic degradation of poly(ethylene terephthalate) by surface coating with anionic surfactants. ChemSusChem, v. 11, n. 23, p. 4018–4025, dez. 2018.

GAMERITH, C. et al. Enzymatic degradation of aromatic and aliphatic polyesters by *P. pastoris* expressed cutinase 1 from *Thermobifida cellulosilytica*. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1–14, 24 maio 2017a.

GAMERITH, C. et al. Enzymatic recovery of polyester building blocks from polymer blends. **Process Biochemistry**, v. 59, p. 58–64, ago. 2017b.
GEYER, R.; JAMBECK, J. R.; LAW, K. L. Production, use, and fate of all plastics ever made. **Science Advances**, v. 3, n. 7, p. e1700782, jul. 2017.

GUPTA, R.; GUPTA, N.; RATHI, P. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, n. 6, p. 763–781, jun. 2004.

GUPTA, V. B.; BASHIR, Z. PET fibers, films, and bottles. In: Handbook of Thermoplastic Polyesters: Homopolymers, Copolymers, Blends and Composites, p. 317–361. Wiley-VCH Verlag GmbH. Weinheim, 2002.

HAN, X. et al. Structural insight into catalytic mechanism of PET hydrolase. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, p. 2106, dez. 2017.

HANSEN, S. M.; SARGEANT, P. B. Fibers, Polyester. In: **Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology**, p. 1-20. John Wiley & Sons. Hoboken, 2000.

HANTANI, Y. et al. Functional characterizations of polyethylene terephthalatedegrading cutinase-like enzyme Cut190 mutants using bis(2-hydroxyethyl) terephthalate as the model substrate. **AIMS Biophysics**, v. 5, n. 4, p. 290–302, 2018.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 2, p. 235–251, jun. 2006.

HERRERO ACERO, E. et al. Enzymatic surface hydrolysis of PET: Effect of structural diversity on kinetic properties of cutinases from *Thermobifida*. **Macromolecules**, v. 44, n. 12, p. 4632–4640, 2011.

HERZOG, K.; MÜLLER, R.-J.; DECKWER, W.-D. Mechanism and kinetics of the enzymatic hydrolysis of polyester nanoparticles by lipases. **Polymer Degradation and Stability**, v. 91, n. 10, p. 2486–2498, out. 2006.

HEUMANN, S. et al. New model substrates for enzymes hydrolysing polyethyleneterephthalate and polyamide fibres. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 69, n. 1–2, p. 89–99, nov. 2006.

HOFMEISTER, F. Zur Lehre von der Wirkung der Salze. Archiv für Experimentelle Pathologie und Pharmakologie, v. 25, n. 1, p. 1–30, ago. 1888.

HOPEWELL, J.; DVORAK, R.; KOSIOR, E. Plastics recycling: challenges and opportunities. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 364, n. 1526, p. 2115–2126, jul. 2009.

HOUDE, A.; KADEMI, A.; LEBLANC, D. Lipases and their industrial applications: an overview. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 118, n. 1–3, p. 155–170, 2004.

IOAKEIMIDIS, C. et al. The degradation potential of PET bottles in the marine environment: An ATR-FTIR based approach. **Scientific Reports**, v. 6, n. October 2015, p. 1–8, 2016.

JAEGER, K. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. **Trends in Biotechnology**, v. 16, n. 9, p. 396–403, set. 1998.

KANELLI, M. et al. Surface modification of poly(ethylene terephthalate) (PET) fibers by a cutinase from *Fusarium oxysporum*. **Process Biochemistry**, v. 50, n. 11, p. 1885–1892, 2015.

KAUR, G. et al. Recent trends in green and sustainable chemistry & waste valorisation: Rethinking plastics in a circular economy. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**, v. 9, p. 30–39, fev. 2018.

KAWABATA, T.; ODA, M.; KAWAI, F. Mutational analysis of cutinase-like enzyme, Cut190, based on the 3D docking structure with model compounds of polyethylene terephthalate. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 124, n. 1, p. 28–35, 2017.

KAWAI, F. et al. A novel Ca2+-activated, thermostabilized polyesterase capable of hydrolyzing polyethylene terephthalate from *Saccharomonospora viridis* AHK190. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 24, p. 10053–10064, dez. 2014.

KAWAI, F.; KAWABATA, T.; ODA, M. Current knowledge on enzymatic PET degradation and its possible application to waste stream management and other fields. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, n. 11, p. 4253–4268, jun. 2019.

KHAN, F. I. et al. The lid domain in lipases: structural and functional determinant of enzymatic properties. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 5, n. mar., p. 1–13, mar. 2017.

KHODDAMI, A.; MORSHED, M.; TAVANAI, H. Effects of enzymatic hydrolysis on drawn polyester filament yarns. **Iranian Polymer Journal (English Edition)**, v. 10, n. 6, p. 363- 370, 2001.

KHOONKARI, M. et al. Chemical recycling of PET wastes with different catalysts. **International Journal of Polymer Science**, v. 2015, p. 1–11, 2015.

KUNZ, W.; HENLE, J.; NINHAM, B. W. 'Zur lehre von der wirkung der salze' (About the science of the effect of salts): Franz Hofmeister's historical papers. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 9, p. 19–37, ago. 2004.

LARSON, E. R. Why use plastic? In: **Thermoplastic Material Selection: A Pratical Guide**, p. 19–56. 1° edição. William Andrew, 2015.

LAW, K. L. Plastics in the marine environment. **Annual Review of Marine Science**, v. 9, n. 1, p. 205–229, jan. 2017.

LEE, S. H.; SONG, W. S. Surface modification of polyester fabrics by enzyme treatment. **Fibers and Polymers**, v. 11, n. 1, p. 54–59, 2010.

LI-BEISSON, Y. et al. Cutin and suberin polyesters. In: **eLS**. p. 1–12. John Wiley & Sons. Chichester, 2016.

LI, S. et al. Technology prospecting on enzymes: application, marketing and engineering. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 2, n. 3, p. e201209017, set. 2012.

LIEBMINGER, S. et al. Hydrolysis of PET and bis-(benzoyloxyethyl) terephthalate with a new polyesterase from *Penicillium citrinum*. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 25, n. 2–4, p. 171–177, jan. 2007.

LIU, B. et al. Protein crystallography and site-direct mutagenesis analysis of the poly(ethylene terephthalate) hydrolase PETase from *Ideonella sakaiensis*. **ChemBioChem**, v. 19, n. 14, p. 1471–1475, jul. 2018.

LIU, C. et al. Structural and functional characterization of polyethylene terephthalate hydrolase from *Ideonella sakaiensis*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 508, n. 1, p. 289–294, jan. 2019.

LONGHI, S.; CAMBILLAU, C. Structure-activity of cutinase, a small lipolytic enzyme. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1441, n. 2–3, p. 185–196, nov. 1999.

LORENZETTI, C. et al. Chemical recovery of useful chemicals from polyester (PET) waste for resource conservation: a survey of state of the art. **Journal of Polymers** and the Environment, v. 14, n. 1, p. 89–101, 2006.

MAITI, I. B.; KOLATTUKUDY, P. E.; SHAYKH, M. Purification and characterization of a novel cutinase from nasturtium (*Tropaeolum majus*) pollen. Archives of Biochemistry and Biophysics, v. 196, n. 2, p. 412–423, set. 1979.

MANDAL, S.; DEY, A. PET Chemistry. In: **Recycling of Polyethylene Terephthalate Bottles**, p. 1–22. 1° edição. William Andrew, 2019.

MCINTYRE, J. E. The historical development of polyesters. In: **Modern Polyesters: Chemistry and Technology of Polyesters and Copolyesters**, p. 1–28. John Wiley & Sons. Chichester, 2004.

MIRANDA, D. de A.; DE CARVALHO-SOUZA, G. F. Are we eating plastic-ingesting fish? **Marine Pollution Bulletin**, v. 103, n. 1–2, p. 109–114, fev. 2016.

MOHARIR, R. V.; KUMAR, S. Challenges associated with plastic waste disposal and allied microbial routes for its effective degradation: A comprehensive review. **Journal of Cleaner Production**, v. 208, p. 65–76, jan. 2019.

MÜLLER, R.-J. et al. Enzymatic degradation of poly(ethylene terephthalate): rapid hydrolyse using a hydrolase from *T. fusca*. **Macromolecular Rapid Communications**, v. 26, n. 17, p. 1400–1405, set. 2005.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Princípios de Bioquímica de Lehninger - 6° Edição. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, 2014. NEW PLASTICS ECONOMY. Rethinking the Future of Plastics. Disponível em: http://www3.weforum.org/docs/WEF_The_New_Plastics_Economy.pdf>.

NIKOLAIVITS, E. et al. A middle-aged enzyme still in its prime: Recent advances in the field of cutinases. **Catalysts**, v. 8, n. 12, p. 612, dez. 2018.

NIMCHUA, T.; PUNNAPAYAK, H.; ZIMMERMANN, W. Comparison of the hydrolysis of polyethylene terephthalate fibers by a hydrolase from *Fusarium oxysporum* LCH I and *Fusarium solani* f. sp. *pisi*. **Biotechnology Journal**, v. 2, n. 3, p. 361–364, mar. 2007.

NOVOZYMES. Enzymes for biocatalysis. Disponível em: https://www.novozymes.com/-/media/Project/Novozymes/Website/website/document-library/Advance-your-business/Pharma/Biocatalysis brochure Lipases.pdf>.

O'NEILL, A. et al. Effect of the agitation on the adsorption and hydrolytic efficiency of cutinases on polyethylene terephthalate fibres. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 7, p. 1801–1805, jun. 2007.

PADSALGIKAR, A. D. Introduction to Plastics. In: **Plastics in Medical Devices for Cardiovascular Applications**, p. 1–29. William Andrew, 2017.

PALM, G. J. et al. Structure of the plastic-degrading *Ideonella sakaiensis* MHETase bound to a substrate. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, p. 1–10, 2019.

PANG, J. et al. Synthesis of ethylene glycol and terephthalic acid from biomass for producing PET. **Green Chemistry**, v. 18, n. 2, p. 342–359, 2016.

PANG, K.; KOTEK, R.; TONELLI, A. Review of conventional and novel polymerization processes for polyesters. **Progress in Polymer Science**, v. 31, n. 11, p. 1009–1037, nov. 2006.

PARK, S. H.; KIM, S. H. Poly (ethylene terephthalate) recycling for high value added textiles. **Fashion and Textiles**, v. 1, n. 1, p. 1, 1 dez. 2014. Disponível em: ">http://link.springer.com/10.1186/s40691-014-0001-x>.

PASZUN, D.; SPYCHAJ, T. Chemical recycling of poly(ethylene terephthalate). Industrial & Engineering Chemistry Research, v. 36, n. 4, p. 1373–1383, abr. 1997.

PAUL, P. E. V.; SANGEETHA, V.; DEEPIKA, R. G. Emerging trends in the industrial production of chemical products by microorganisms. In: **Recent Developments in Applied Microbiology and Biochemistry**, p. 107–125. 1° edição. Academic Press, 2019.

PAYNE, J.; MCKEOWN, P.; JONES, M. D. A circular economy approach to plastic waste. **Polymer Degradation and Stability**, v. 165, p. 170–181, jul. 2019.

RAO, M. . et al. Role of enzymes in the remediation of polluted environments. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 10, n. 3, p. 333–353, jul. 2010.

RAVINDRANATH, K.; MASHELKAR, R. A. Polyethylene terephthalate – I. Chemistry, thermodynamics and transport properties. **Chemical Engineering Science**, v. 41, n. 9, p. 2197–2214, 1986.

RIBITSCH, D. et al. Characterization of a new cutinase from *Thermobifida alba* for PET-surface hydrolysis. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 30, n. 1, p. 2–9, 14 fev. 2012a.

RIBITSCH, D. et al. A new esterase from *Thermobifida halotolerans* hydrolyses polyethylene terephthalate (PET) and polylactic acid (PLA). **Polymers**, v. 4, n. 1, p. 617–629, 21 fev. 2012b.

RIBITSCH, D. et al. Fusion of binding domains to *Thermobifida cellulosilytica* cutinase to tune sorption characteristics and enhancing PET hydrolysis. **Biomacromolecules**, v. 14, n. 6, p. 1769–1776, jun. 2013.

RIBITSCH, D. et al. Enhanced cutinase-catalyzed hydrolysis of polyethylene terephthalate by covalent fusion to hydrophobins. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 11, p. 3586–3592, 2015.

ROBERTSON, G. L. Food Packaging: Principles and Practice. 3° edição. CRC Press, 2013.

ROCHMAN, C. M. et al. Anthropogenic debris in seafood: Plastic debris and fibers from textiles in fish and bivalves sold for human consumption. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, p. 14340, nov. 2015.

ROMÃO, W.; SPINACÉ, M. A. S.; PAOLI, M. De. Poli(tereftalato de etileno), PET: uma revisão sobre os processos de síntese, mecanismos de degradação e sua reciclagem. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 19, n. 2, p. 121–132, 2009.

RONKVIST, Å. M. et al. Cutinase-catalyzed hydrolysis of poly(ethylene terephthalate). **Macromolecules**, v. 42, n. 14, p. 5128–5138, jul. 2009.

SCHMIDT, J. et al. Effect of Tris, MOPS, and phosphate buffers on the hydrolysis of polyethylene terephthalate films by polyester hydrolases. **FEBS Open Bio**, v. 6, n. 9, p. 919–927, 2016.

SHAH, A. A. et al. Biological degradation of plastics: A comprehensive review. **Biotechnology Advances**, v. 26, n. 3, p. 246–265, 2008.

SHIRKE, A. N. et al. Stabilizing Leaf and Branch Compost Cutinase (LCC) with glycosylation: Mechanism and effect on PET hydrolysis. **Biochemistry**, v. 57, n. 7, p. 1190–1200, fev. 2018.

SINHA, V.; PATEL, M. R.; PATEL, J. V. Pet waste management by chemical recycling: A review. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 18, n. 1, p. 8–25, mar. 2010.

SMITH, M. et al. Microplastics in seafood and the implications for human health. **Current Environmental Health Reports**, v. 5, n. 3, p. 375–386, set. 2018.

SON, H. F. et al. Rational protein engineering of thermo-stable PETase from *Ideonella sakaiensis* for highly efficient PET degradation. **ACS Catalysis**, v. 9, n. 4, p. 3519–3526, abr. 2019.

SUGIHARTO, Y. E. C. et al. Enzyme feeding strategies for better fed-batch enzymatic hydrolysis of empty fruit bunch. **Bioresource Technology**, v. 207, p. 175–179, maio 2016.

SULAIMAN, S. et al. Isolation of a novel cutinase homolog with polyethylene terephthalate-degrading activity from Leaf-Branch Compost by using a metagenomic approach. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 5, p. 1556–1562, mar. 2012.

TANIGUCHI, I. et al. Biodegradation of PET: Current status and application aspects. **ACS Catalysis**, v. 9, n. 5, p. 4089–4105, maio 2019.

TEPHLY, T. R. The toxicity of methanol. Life Sciences, v. 48, n. 11, p. 1031–1041, jan. 1991.

THUMARAT, U. et al. Comparison of genetic structures and biochemical properties of tandem cutinase-type polyesterases from *Thermobifida alba* AHK119. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 120, n. 5, p. 491–497, 2015.

UNITED NATIONS. World Population Prospects 2019. Department of Economic and Social Affairs. Disponível em: < https://population.un.org/wpp/Publications/Files/WPP2019_Highlights.pdf>.

VERTOMMEN, M. A. M. E. et al. Enzymatic surface modification of poly(ethylene terephthalate). **Journal of Biotechnology**, v. 120, n. 4, p. 376–386, dez. 2005.

WANG, X. et al. Preparation of a PET-hydrolyzing lipase from *Aspergillus oryzae* by the addition of bis(2-hydroxyethyl) terephthalate to the culture medium and enzymatic modification of PET fabrics. **Engineering in Life Sciences**, v. 8, n. 3, p. 268–276, 2008.

WEBB, H. et al. Plastic degradation and its environmental implications with special reference to poly(ethylene terephthalate). **Polymers**, v. 5, n. 1, p. 1–18, dez. 2012.

WEBER, H. K.; STECHER, H.; FABER, K. Sensitivity of microbial lipases to acetaldehyde formed by acyl-transfer reactions from vinyl esters. **Biotechnology Letters**, v. 17, n. 8, p. 803–808, ago. 1995.

WEI, R. et al. Turbidimetric analysis of the enzymatic hydrolysis of polyethylene terephthalate nanoparticles. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 103, p. 72–78, 2014a.

WEI, R. et al. Functional characterization and structural modeling of synthetic polyester-degrading hydrolases from *Thermomonospora curvata*. **AMB Express**, v. 4, n. 1, p. 44, dez. 2014b.

WEI, R. et al. Engineered bacterial polyester hydrolases efficiently degrade polyethylene terephthalate due to relieved product inhibition. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 113, n. 8, p. 1658–1665, ago. 2016.

WEI, R.; ZIMMERMANN, W. Microbial enzymes for the recycling of recalcitrant petroleum-based plastics: how far are we? **Microbial Biotechnology**, v. 10, n. 6, p. 1308–1322, nov. 2017a.

WEI, R.; ZIMMERMANN, W. Biocatalysis as a green route for recycling the recalcitrant plastic polyethylene terephthalate. **Microbial Biotechnology**, v. 10, n. 6, p. 1302–1307, nov. 2017b.

WELLE, F. Twenty years of PET bottle to bottle recycling – An overview. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 55, n. 11, p. 865–875, set. 2011.

WIERCKX, N. et al. Plastic biodegradation: Challenges and opportunities. In: Consequences of Microbial Interactions with Hydrocarbons, Oils, and Lipids: Biodegradation and Bioremediation, p. 333–361, Springer International Publishing, 2019.

YANG, S. et al. A low molecular mass cutinase of *Thielavia terrestris* efficiently hydrolyzes poly(esters). **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 40, n. 2, p. 217–226, fev. 2013.

YOSHIDA, S. et al. A bacterium that degrades and assimilates poly(ethylene terephthalate). **Science**, v. 351, n. 6278, p. 1196–1199, mar. 2016.

ZHANG, Y. et al. Enhanced activity toward PET by site-directed mutagenesis of *Thermobifida fusca* cutinase–CBM fusion protein. **Carbohydrate Polymers**, v. 97, n. 1, p. 124–129, ago. 2013.

ZHANG, Y.; CREMER, P. Interactions between macromolecules and ions: the Hofmeister series. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 10, n. 6, p. 658–663, dez. 2006.

ZIMMERMANN, W.; BILLIG, S. Enzymes for the biofunctionalization of poly(ethylene terephthalate). In: Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, v. 125, n. May, p. 97–120, 2010. Springer Berlin Heidelberg. Berlin, 2010.

9. ANPÊNDICES

Apêndice A - Artigo publicado em 2016 no periódico Process Biochemistry: "Lipase from Candida antarctica (CALB) and cutinase from Humicola insolens act synergistically for PET hydrolysis to terephthalic acid".

Process Biochemistry 59 (2017) 84-90



Process Biochemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/procbio

Contents lists available at ScienceDirect



Lipase from Candida antarctica (CALB) and cutinase from Humicola insolens act synergistically for PET hydrolysis to terephthalic acid



Adriano Carniel, Érika Valoni, José Nicomedes Junior, Absai da Conceição Gomes, Aline Machado de Castro

Biotechnology Division, Research and Development Center, PETROBRAS, Av. Horácio Macedo, 950. Ilha do Fundão, Rio de Janeiro 21941-915, Brazil

ARTICLE INFO

ABSTRACT

Article history: Received 2 May 2016 Received in revised form 1 July 2016 Accepted 20 July 2016 Available online 21 July 2016

Keywords Poly(ethylene terephthalate) Lipases Hydrolysis Enzymatic depolymerization Terephthalic acid PET recycling

Poly(ethylene terephthalate) (PET) is one of the most important industrial plastics in the world. The development of technologies for its depolymerization aiming at monomer recycling is of paramount interest and in this context enzyme-catalyzed hydrolysis has been recognized as a promising alternative. In the present study, a screening of 10 commercial enzymes using bis-(hydroxyethyl) terephthalate (BHET) as model substrate revealed *Candida antarctica* lipase B (CALB) and *Humicola insolens* cutinase (HiC) as potential biocatalysts. HiC showed limitation for the last reaction step, but CALB completely con-verted BHET to terephthalic acid (TPA), even at the highest substrate concentration investigated (31 mM). When used for PET hydrolysis, HiC demonstrated better potential, although accumulating considerable amounts of the intermediate mono-(hydroxyethyl) terephthalate (MHET). After evaluation of the effects of PET pretreatment, temperature and enzyme addition strategy, the combination of these two enzymes revealed synergy for a more complete PET depolymerization to TPA (mole fraction up to 0.88) and a 7.7-fold increase in PET to TPA yield was achieved. This finding adds new investigation possibilities for one of the most studied and versatile lipases, CALB.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The future of plastics is of global concern. In 2014, their production processes consumed 6% of total petroleum produced in the world and it is expected that this rate will rise to 20% by 2050 [1]. Another concern is that the amount that leaks out of the collecting systems after consumers' use is increasing, and it is projected that by 2025 for each three tons of fish there will be one ton of plastics in the oceans [1]. Therefore, the development of green technologies that can contribute for reduction in petroleum consumption as well as in environmental impacts, such as recycling, is highly appreciated.

Poly(ethylene terephthalate)(PET) in one of the most consumed plastics, with annual global production over 50 million tons [2]. It is usually regarded as non-biodegradable, but previous studies have indicated that it or its copolymers can be depolymerized by the action of hydrolytic enzymes, either in vitro [3,4] or in microbial systems [4-6]. Enzymes reported for their PET-degrading activity

include lipases [7,8], cutinases [8-10], serine esterases [8] and pnitrobenzylesterases [11], among others.

However, there are still few enzymes with this ability and some of them relies on the fact that one of the hydrolysis end-products, mono-(hydroxyethyl) terephthalate (MHET) is a strong and competitive enzyme inhibitor [4,9]. This fact, in addition to need of enzyme thermostability improvement, leads to interest in protein engineering studies [12-14].

Therefore, the search for new enzymes and catalytic systems is of global interest. The objective of this work was to present new perspectives for PET hydrolysis, from the polymer to its monomers. First a screening of 10 lipases was performed over bis-(2-hydroxyethyl) terephthalate (BHET) in order to understand their mode of action (hydrolysis extension and ability to catalyze both hydrolysis steps to convert BHET to terephthalic acid). Choice of BHET as a screening substrate was due to be one of the intermediate products released from PET hydrolysis and also to be commercially available. The best biocatalysts were then evaluated for PET hydrolysis, in different process conditions.

^{*} Corresponding author. E-mail address: alinebi

bio@petrobras.com.br (A.M.d. Castro).

^{://}dx.doi.org/10.1016/i.prochio.2016.07.023

^{1359-5113/© 2016} Elsevier Ltd. All rights reserved.



Fig. 1. Mole fractions of reaction components during BHET hydrolysis by different lipases at 37 °C. (a) χ_{BHET}; (b) χ_{MHET}; (c) χ_{TPA}. Reactions were carried out with 2.0 mM initial BHET concentration at pH 7.0 and protein loading of 4g/g_{BHET}.

A screening of enzymes performance was reported for hydrolysis of ester bonds in PET. Lipases from Aspergillus, C. antarctica, C. cylindracea, M. miehei, P. cepacia, P. fluorescens, R. arrhizus, R. niveus and hog pancreas were evaluated aiming at PET fabric modification. After 30 min treatment at the optimal conditions for each enzyme, the highest moisture regain (1.3%) was observed when C. antarctica lipase was used [7].

Enzymes from various microbial sources were evaluated for PET film hydrolysis. After 6 days of incubation, the highest relative MHET and TPA releases were observed by *T. lanuginosus* and *Fusarium solani* enzymes, respectively, which were thereafter classified as cutinases [19].

Barth et al. [9] evaluated the kinetics of PET nanoparticles hydrolysis by a *Thermobifida fusca* polyester hydrolase. During the first hour, a fast BHET hydrolysis to MHET was observed and the intermediate accumulated in the reaction (up to 500μ M). Then it was almost gradually converted to TPA along the following 24 h reaction, thus showing behavior similar to HiC in the present study, although with a higher conversion.

As the most promising enzymes, CALB and HiC were also used for BHET hydrolysis at higher substrate concentrations, in order to investigate possible inhibition (see Fig. 2).

For CALB, MHET was accumulated by 5 min or 10 min reaction, depending on the initial BHET concentration, and thereafter hydrolysis rate of MHET to TPA increased exponentially. In general terms, the higher initial BHET concentration, the more simultaneous both reaction steps occurred. HiC completely converted BHET to MHET after 2 h reaction, but after 24 h global conversion of BHET to TPA was only up to 26.7%. At the concentration range evaluated (2.0–31.5 mM) no inhibition was observed for these enzymes. TPA initial formation rate (r_{TPA} , mmol $L^{-1}h^{-1}$) as a function of initial BHET concentration (S₀, mM) in the reactions catalyzed by CALB and HiC can be expressed by Eqs. (3) and (4), respectively.

 $r_{TPA,CALB} = 0.968 \cdot S_0$ (3) $r_{TPA,HIC} = 0.011 \cdot S_0$ (4)

The two most promising enzymes selected from BHET screening, CALB and HiC, were then used for PET bottle hydrolysis. *H. insolens* cutinase has been previously reported as a potential biocatalyst for polyester synthesis [20] and also evaluated for hydrolysis of lowcrystallinity and biaxially oriented PET films as model substrates [21]. *H. insolens* is reported as a lipase, according to the supplier specifications of the liquid preparation used [22], but this fungus is more commonly known as a cutinase producer, and SDS-PAGE analysis indicated that the predominant protein in the commercial preparation (around 32 kDA) presents molar mass very similar to the reported for cutinases (20–30 kDa) [23].

Furthermore, hydrolytic activities of both HiC and CALB over *p*-nitrophenyl butyrate as substrate were determined to be $367.6 \pm 7.6 \text{ UmL}^{-1}$, and $22.5 \pm 0.5 \text{ UmL}^{-1}$, respectively, which corroborate that Novozym 51032 main enzyme is probably a cutinase, since this is a commonly reported substrate to represent cutinase activity [5,16].

Regarding lipases from *C. antarctica* (both lipase A and lipase B), they were previously evaluated for either PET fabric modification or PET film hydrolysis, but no potential was observed [19,24,25].

CALB and HiC were incubated with PET PT-A and PET PT-B at a protein loading of 20 mg g⁻¹. Concentration of hydrolysis products after up to 28 reaction days indicated much better performance of HiC for PET depolymerization than CALB, which led to maximum TPA concentration of only 61 μ M (Fig. 3). For HiC, PET PT-B showed to be a more suitable substrate (maximum of 956 μ M TPA concentration versus 816 μ M with PET PT-A) and was therefore used for the subsequent experiments. Maximum PET conversion to TPA in these experiments was 0.52%.

In order to investigate possible effect of pretreatments on crystallinity of PET particles, which could influence the enzymecatalyzed hydrolysis, the materials were analyzed by DSC. The results obtained showed no significant differences in the crystallinity of PET (Table 2). Furthermore, intrinsic viscosity was obtained, allowing correlate to viscosimetric molar mass and viscosimetric polymerization degree of PET samples. In this case, no significant differences were observed also (Table 2). According to literature, it is believed that PET soaking with MEG is more effective for PET depolymerization via chemical glycolysis [17].

Gomes et al. [16] used a recombinant Fusarium solani pisi cutinase expressed in *E. coli* for hydrolysis of PET bottles pretreated with a Tween 80 solution followed by UV radiation. After 48 h reaction at $37 \,^\circ$ C, a weight loss of 0.90% was observed. A putative cutinase from *Saccharomonospora viridis* AHK190 expressed in *Escherichia coli* was used for hydrolysis of PET samples. After 3 days of incubation at $63 \,^\circ$ C, TPA concentrations of 11.5 and 27.3 mM were observed in the reactions with the amorphous and the package polyester, respectively [13].





Fig. 2. BHET hydrolysis at different initial concentrations. (a,b,c) HiC; (d,e,f) CALB. Reactions were carried out at pH 7.0 and protein loading of 4g/g_BHET.



Fig. 3. Molar concentration of products obtained from PET PT-A and PET PT-B hydrolysis by HiC and CALB at 37 °C: (a) BHET; (b) MHET; (c) TPA. Reactions were carried out with 40 g/L initial PET concentration at pH 7.0 and protein loading of 20 mg g⁻¹.

 Table 2

 Some properties of PET samples used in this study.

PET source	intrinsic viscosity (dl/g)	molar mass (g/mol)	polymerization degree	crystallinity (%)
non-treated PET PET PT-A PET PT-B	$\begin{array}{c} 0.7453 \pm 0.0032 \\ 0.7559 \pm 0.0066 \\ 0.7521 \pm 0.0007 \end{array}$	$\begin{array}{l} 42737 \pm 288 \\ 43678 \pm 592 \\ 43340 \pm 63 \end{array}$	$222.4 \pm 1.5 227.3 \pm 3.1 225.5 \pm 0.3$	$\begin{array}{c} 36.6 \pm 0.5 \\ 37.4 \pm 0.6 \\ 36.5 \pm 0.1 \end{array}$

87





Fig. 5. Molar concentration of products obtained from PET PT-B hydrolysis by different enzyme loading strategies at 50 °C: 40 mg g⁻¹ at the beginning of reaction (HiC 2x, CALB 2x), 20 mg g⁻¹ at the beginning and after 7 days of reaction (HiC MU, CALB MU) and enzymes mixtures at total 40 mg g⁻¹ at the beginning of reaction (HiC/CALB 50/50, HiC/CALB 90/10). (a) BHET; (b) MHET; (c) TPA.



Fig. 6. SEM images of PET PT-B after enzyme hydrolysis at 50 °C catalyzed by: (a, b) HiC; (c) CALB; (d) HiC and CALB; and (e) control (no enzyme added).

conditions must be modulated according to the target application (e.g. complete depolymerization, fiber modification).

4. Conclusions

In this paper, a screening of 10 lipases from different sources was performed to evaluate their abilities to catalyze BHET hydrolysis into MHET and TPA. Lipase from *Humicola insolens* and CALB stood out as the best biocatalysts for these reactions. It was observed that these two enzymes demonstrated different modes of action over BHET hydrolysis: HiC showed preference to catalyze the first hydrolysis step (accumulating the intermediate MHET), while CALB demonstrated high efficiency for both hydrolysis steps (thus accumulating the final product TPA).

The capability of HiC and CALB to catalyze mineral water PET bottle hydrolysis was also investigated and different PET pre-treatments, temperatures, enzyme loadings and forms of enzyme addition were tested. Soaking PET particles with MEG pretreatment strategy showed to increase TPA formation from PET depolymerization, especially by HiC lipase. TPA concentration at the end of reactions increased gradually by reaction temperature elevation from 37 °C to 50 and 60 °C and protein loading 'make up' strategy. Overall, HiC showed to be the best biocatalyst for PET depolymerization, however this enzyme showed limited capability to convert MHET into TPA, unlike CALB. Thus, we found out that a considerable increase of TPA concentration could be achieved by applying a mixture of these two enzymes, which showed to act synergistically for a more complete PET hydrolysis to its monomers.

Further optimization of reaction conditions, including fine tuning of temperature and pH values, as well as proportion of the enzymes, oriented by the strategies addressed in this study, which should increase the efficiency of depolymerization of PET bottles by mutual hydrolytic activity of these two biocatalysts, are ongoing.

Acknowledgements

To PETROBRAS for the financial support. To Rogério Martins for his support in SEM analyses. To Aline Lima, Erica Chaves and Sylvia Teixeira for support in intrinsic viscosity and DSC analyses.

89

References

90

- [1] The New Plastics Economy-Rethinking the Future of Plastics, 2016 http://
- www3.weforum.org/docs/WEF_The_New_Plastics_Economy.pdf.
 [2] U.T. Bornscheuer, Feeding on plastic, Science 351 (80) (2016) 1154–1155,
- http://dx.doi.org/10.1126/science.aaf2853. [3] M. Barth, R. Wei, T. Oeser, J. Then, J. Schmidt, F. Wohlgemuth, et al., Enzymatic
- M. Barth, R. Wei, I. Oeser, J. Ineh, J. Schmidt, F. Wohigemuth, et al., Enzymatic hydrolysis of polyethylene terephthalate films in an ultrafiltration membrane reactor, J. Membr. Sci. 494 (2015) 182–187, http://dx.doi.org/10.1016/j. memsci.2015.07.030.
 S. Yoshida, K. Hiraga, T. Takehana, I. Taniguchi, H. Yamaji, Y. Maeda, et al., A bacterium that degrades and assimilates poly(ethylene terephthalate), Science 351 (80) (2016) 1196–1199, http://dx.doi.org/10.1126/science. 2046356
- aad6359. [5] B. Nowak, J. PajaK, S. Labuzek, G. Rymarz, E. Talik, Biodegradation of
- [5] B. Horriss, J. Fabrica, S. Laburas, G. Kyrinaz, L. Tahr, Boodgiadation of poly(ethylene terephthalate) modified with polyester Bionolle by Penciallium funiculosum, Polymers 56 (2011) 35–44.
 [6] C. Sharon, M. Sharon, Studies on biodegradation of polyethylene terephthalate: a synthetic polymer, J. Microbiol. Biotechnol. Res. 2 (2012) 249 (2017)
- 248–257.
 [7] H.R. Kim, W.S. Song, Lipase treatment of polyester fabrics, Fibers Polym. 7 (2006) 39–343, http://dx.doi.org/10.1108/09556221011008785.
 [8] G.M. Guebitz, A. Cavaco-Paulo, Enzymes go big: surface hydrolysis and functionalisation of synthetic polymers, Trends Biotechnol. 26 (2008) 32–38, http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2007.10.003.
 [9] M. Barthe T. Orgen, B. Wei, L. Thong, L. Chavidt, W. Zimmargmann, Effort of
- Interbination of syntactic polymetry. In this Diversity of 2000 322-30, http://dx.doi.org/10.1016/j.tiblech.2007.10.003.
 M. Barth, T. Oeser, R. Wei, J. Then, J. Schmidt, W. Zimmermann, Effect of hydrolysis products on the enzymatic degradation of polyethylene terephthalate nanoparticles by a polyester hydrolase from Thermobifida fusca, Biochem. Eng. J. 93 (2015) 222-228, http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2014.10.012.
 S. Sulaiman, S. Yamato, E. Kanaya, J.J. Kim, Y. Koga, K. Takano, et al., Isolation of a novel cutinase bomolog with polyethylene terephthalate-degrading activity from leaf-branch compost by using a metagenomic approach, Appl. Environ. Microbiol. 78 (2012) 1556–1562, http://dx.doi.org/10.1128/AEM.06725-11.
 D. Ribisch, S. Heumann, E. Trotscha, E. Herrero Acero, K. Greinel, R. Leber, et al., Hydrolysis of polyethylene terephthalate by *p*-nitrobenzylesterase from Bacillus subtilis, Biotechnol. Prog. 27 (2011) 951–960, http://dx.doi.org/10.1002/htpr.610.
- 610
- [12] R. Wei, T. Oeser, J. Schmidt, R. Meier, M. Barth, J. Then, et al., Engineered bacterial polyester hydrolases efficiently degrade polyethylene terephthalate due to relieved product inhibition, Biotechnol. Bioeng. (2016), http://dx.doi. org/10.1002/bit.25941 (n/a–n/a.). [13] F. Kawai, M. Oda, T. Tamashiro, T. Waku, N. Tanaka, M. Yamamoto, et al., A
- novel Ca2+-activated, thermostabilized polyesterase capable of hydrolyzing polyethylene terephthalate from Saccharomonospora viridis AHK190, Appl.

Microbiol. Biotechnol. 98 (2014) 10053-10064, http://dx.doi.org/10.1007/

- [14] J. Then, R. Wei, T. Oeser, M. Barth, M.R. Belisário-Ferrari, J. Schmidt, et al., Ca2+
- J. Ihen, K. Wei, J. Oeser, M. Barth, M.K. Belisano-Ferrari, J. Schmidt, et al., Ca2+ and Mg2+ binding site engineering increases the degradation of polyethylene terephthalate films by polyester hydrolases from Thermobifida fusca, Biotechnol. J. 10 (2015) 592–598, http://dx.doi.org/10.1002/biot.201400620. M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, Anal. Biochem. 72 (1976) 248–254, http://dx.doi.org/10.1016/0003-2607(76)0627.3 [15]
- [16] D.S. Gomes, T. Matamá, A. Cavaco-Paulo, G.M. Campos-Takaki, A.A. Salgueiro. Production of heterologous cutinases by E. coli and improved enzyme
- Production of neterologous cutinases by E. coli and improved enzyme formulation for application on plastic degradation. Electron. J. Biotechnol. 16 (2013) 1–13, http://dx.doi.org/10.2225/vol16issue5-fulltext-12.
 [17] M.C. Brum, L.F.M. Leite, M.L. Dias, C.R. Nascimento. Processo de obtenção de oligômeros de poli(tereftalato de etileno), PI 060520, 2008, 1–0.
 [18] K. Kamide, Y. Miyazaki, H. Kobayashi, Unperturbed chain dimensions of polyettylenet expethalate and polyethylene 1,2-Diphenoxyethane p,p'-Carboxylate, Polym, J. 9 (1977) 317–327, http://dx.doi.org/10.1295/ nolwmi 9 317. ymj.9.317 [19] J. Korpecka, S. Heumann, S. Billig, W. Zimmermann, M. Zinn, J. Ihssen, et al.
- Hydrolysis of cutin by PET-hydrolases, Macromol. Symp. 296 (2010) 342–346, http://dx.doi.org/10.1002/masy.201051047.
 D. Feder, Humicola Insolens Cutinase: a Novel Catalyst for Polymer Synthesis
- 2013
- Reactions, New York University, 2013.
 [21] Å.M. Ronkvist, W. Xie, W. Lu, R.A. Gross, Cutinase-catalyzed hydrolysis of poly(ethylene terephthalate), Macromolecules 42 (2009) 5128–5138, http:// dx.doi.org/10.1021/ma9005318. [22] Novozymes, http://www.novozymes.com/en/solutions/pharmaceuticals/
- biocatalysis/Pages/lipase-enzymes.aspx, (n.d.). http://www.novozymes.com ons/pharmaceuticals/biocatalysis/Pages/l pase-enzymes.
- en/solutions/pharmaceuticals/biocatalysis/Pages/lipase-enzymes.aspx.
 [23] D. Kold, Z. Dauter, A.K. Lautsten, A.M. Brzozowski, J.P. Turkenburg, A.D. Nielsen, et al., Thermodynamic and structural investigation of the specific Sibinding of Humicola insolens cutinase, Protein Sci. 23 (2014) 1023–1035, http://dx.doi.org/10.1002/pro.2489.
 [24] R.-J. Müller, H. Schrader, J. Profe, K. Dresler, W.-D. Deckwer, Enzymatic degradation of polycthylene terephthalate): rapid hydrolyse using a hydrolase from T. fusca, Macromol. Rapid Commun. 26 (2005) 1400–1405, http://dx.doi.org/10.1002/marc.200500410.
 [25] M.A.M.E. Vertommen, V.A. Nierstrasz, M. Van Der Veer, M.M.C.G. Warmoskerben. Pravmatic surface modification of polycthylene cific SDS
- Warmoeskerken, Enzymatic surface modification of poly(ethylene terephthalate), J. Biotechnol. 120 (2005) 376–386, http://dx.doi.org/10.1016/j. ibiotec.2005.06.015.
- [26] B. Pilch-Pitera, Examination of the enzyme resistance of polyurethane powder coatings, J. Polym. Environ. 21 (2013) 215–223, http://dx.doi.org/10.1007/ s10924-012-0519-1.

Apêndice B - Artigo publicado em 2017 no periódico *Journal of Industrial Microbiology* & *Biotechnology*: "Screening of commercial enzymes for poly(ethylene terephthalate) (PET) hydrolysis and synergy studies on different substrate sources".

J Ind Microbiol Biotechnol DOI 10.1007/s10295-017-1942-z BIOCATALYSIS - ORIGINAL PAPER



Screening of commercial enzymes for poly(ethylene terephthalate) (PET) hydrolysis and synergy studies on different substrate sources

Aline Machado de Castro¹ · Adriano Carniel² · José Nicomedes Junior¹ · Absai da Conceição Gomes¹ · Érika Valoni¹

Received: 29 December 2016 / Accepted: 31 March 2017 © Society for Industrial Microbiology and Biotechnology 2017

Abstract Poly(ethylene terephthalate) (PET) is one of the most consumed plastics in the world. The development of efficient technologies for its depolymerization for monomers reuse is highly encouraged, since current recycling rates are still very low. In this study, 16 commercial lipases and cutinases were evaluated for their abilities to catalyze the hydrolysis of two PET samples. Humicola insolens cutinase showed the best performance and was then used in reactions on other PET sources, solely or in combination with the efficient mono(hydroxyethyl terephthalate)converting lipase from Candida antarctica. Synergy degrees of the final titers of up to 2.2 (i.e., more than double of the concentration when both enzymes were used, as compared to their use alone) were found, with increased terephthalic acid formation rates, reaching a maximum of 59,989 $\mu mol/L$ (9.36 g/L). These findings open up new possibilities for the conversion of post-consumer PET packages into their minimal monomers, which can be used as drop in at existing industrial facilities.

Keywords Cutinase · Lipase · Depolymerization · Terephthalic acid · PET recycling

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s10295-017-1942-z) contains supplementary material, which is available to authorized users.

Aline Machado de Castro alinebio@petrobras.com.br

² Falcão Bauer, R. Aquinos111. Água Branca, São Paulo 05036-070, Brazil

Introduction

Poly(ethylene terephthalate) (PET) is a synthetic aromatic polyester composed of ethylene glycol (EG) and terephthalic acid (TPA) units [15], which is extremely versatile and used in a variety of applications, such as clothing and technical textiles [23] and packages (e.g., water and soft drink bottles, salad domes and biscuit trays) [30], with an annual worldwide production over 50 million tons [5]. Efficient PET recycling is an urgent global need from both environmental and economic aspects, since plastics production is expected to grow faster than petroleum production in the next decades and their share on oil use is forecasted to rise significantly, from 6 (in 2014) to 20% (in 2050). This is even more crucial for short first-use materials, as bottles, which accumulates in the environment, damaging ocean's fauna and slowing down the transition to a circular economy [30]. Mechanical PET recycling technologies. although in a higher readiness level, offer limited applicability, such as a rapid and drastic drop in the polyester ductility, which restricts the use of the recycled polymer to low-value uses, as carpets [13]. After decades being considered non-biodegradable, a paradigm change has occurred in the past few years with the publication of studies reporting in vivo or in vitro PET depolymerization to its monomers [4, 22, 26, 32] with faster reaction rates being observed in enzyme-catalyzed processes [32].

The enzymes reported for PET hydrolysis belong to the sub–sub class carboxylic acid hydrolases (EC 3.1.1-) [7], such as cutinases (EC 3.1.1.74) [3, 15, 28], lipases (EC 3.1.1.3) [15, 17], serine esterases (EC 3.1.1.56, 3.1.1.12) [14] and carboxylesterases (EC 3.1.1.1) [23]. However, previous works have demonstrated that enzymes may show different specificities during the depolymerization process,

¹ Biotechnology Division, Research and Development Center, PETROBRAS, Av. Horácio Macedo, 950. Ilha do Fundão, Rio de Janeiro 21941-915, Brazil

being more capable to attack certain substrates. For example, Yoshida et al. [32] identified two different catalytic properties from Ideonella sakaiensis enzymes, defining them as PETase and MHETase. PETase was shown to efficiently breakdown PET to mono(hydroxyethyl) terephthalate (MHET), whereas MHETase catalyzed the conversion of MHET to TPA and EG. Similar properties were observed by Carniel et al. [8], who demonstrated that the Humicola insolens cutinase and the Candida antarctica lipase B act synergistically to convert PET into its final monomers. Also, Barth et al. [2] reported a dual enzyme reaction system consisted with a polyester hydrolase, LCcutinase, hydrolyzing PET film chains and an immobilized carboxylesterase, TfCa KW3 from Thermobida fusca, as the second enzyme applied to eliminate inhibitory intermediates produced from PET hydrolysis. These studies were still preliminary, but opened up a range of possibilities for the development of efficient technologies for PET depolymerization.

Therefore, the objective of the present study was to compare the catalytic performance of several enzymes from microbial (bacterial, fungal) and plant sources for PET depolymerization, and to investigate the synergy behavior of selected biocatalysts during hydrolysis of different PET samples from industrial facilities.

Materials and methods

Substrates and enzymes

PET bottle film used was from post-consume non-carbonated mineral water bottles (brand Crystal[®]). It was cut into squares of aprox. 0.5 cm and it presented 0.1 mm thickness. Amorphous, Mineral Water (MW), Carbonated Soft Drink (CSD), CSD-Plus and CSD-Low Intrinsic Viscosity (CSD-LIV) PET resins were generously provided as chips by the industrial PET production plant PetroquímicaSuape (Suape, Brazil). All these PET chips grades were coldmilled in a blade mill (Ika). PET flakes from a local plastic industrial recycling plant (PIRP) were milled in a knife mill and provided by Professor Marcos Lopes (Federal University of Rio de Janeiro).

Lipases from Aspergillus oryzae (AoL), Burkholderia cepacia (BcL), Candida antarctica (CaL), porcine pancreas (PPL), Candida rugosa (CrL), Mucor miehei (MmL), Pseudomonas fluorescens (PfL), Rhizomucor miehei (RmL), Rhizopus niveus (RnL), Rhizopus oryzae (RoL), Thermomyces lanuginosus (TIL) and wheat (WL—Triticum aestivum) as well as high-purity standards of BHET and TPA were purchased from Sigma–Aldrich. RmL and TIL were purchased as liquid preparations. All the other enzymes above were obtained as powder and were

Deringer

solubilized in sodium phosphate buffer 200 mM pH 7.0 prior to their applications. *C. antarctica* lipase B (CALB, product Lipozyme[©] CALB L), *Humicola insolens* cutinase (HiC, product Novozym[©] 51,032), Lecitase Ultra[©] (LU) and Lipozyme TL[©] 100L (LTL) were liquid preparations kindly provided by Novozymes (Araucária, Brazil).

Screening of enzymes for PET hydrolysis

All enzymes were screened on PET bottle films and milled amorphous PET. 10 mL phosphate buffer 200 mM pH 7.0 with 200 mg initial PET (PET bottle films and amorphous PET granules) and enzyme amount of 0.01 g_{protein}/g_{PET} were incubated in a hybridization incubator (Combi-D24, FINEPCR) at 37 °C under an agitation speed of 25 rpm. Control reactions (with no enzyme addition) were carried out at the same conditions used in each experiment. Protein amount was determined according to Bradford method [6].

Application of the selected enzymes for the hydrolysis of different PET samples

The two best enzymes from screening reactions were applied to catalyze hydrolysis of different milled PET samples, either in separate or simultaneously. Reactions were carried out in a hybridization incubator (Combi-D24, FINEPCR) at 60 °C, 25 rpm in 10 mL phosphate buffer 200 mM pH 7.0 with 200 mg initial PET (bottle, amorphous, MW, CSD, CSD-Plus, CSD-LIV and PIRP). The enzyme loading was 0.01 g_{protein}/g_{PET} in the reactions carried out with each biocatalyst in separate and 0.02 g_{protein}/g_{PET} when both enzymes were used (being 0.01 g/g of each enzyme).

Analyses

The quantification of TPA, MHET and BHET (bis(hydroxyethyl terephthalate)) was carried out in a Thermo Scientific Dionex UltiMate 3000 HPLC using an Agilent Zorbax SB-C18 pre-column and an Eclipse Plus C18 column (at 30 °C). A gradient mixture of acetonitrile (TEMED) and 0.05% formic acid (Sigma–Aldrich) was used as mobile phase at a flowrate of 0.5 mL/min. An UV detector was used for the detection of the hydrolysis product, at a wavelength of 254 nm. TPA and BHET peak areas were correlated to the ones of high-purity analites, whereas for MHET a high-purity (>99%) powder obtained from a quantitative BHET hydrolysis with HiC was used.

For the observation of the samples using scanning electron microscopy (SEM), PET substrates were metallized with Au/Pd in a Quorum Q150TES coater. The images of the prepared samples were then captured in a Zeiss EVO-LS15 microscope, using 1 kV voltage.

J Ind Microbiol Biotechnol

Crystallinity of PET substrates was determined in a Perkim-Elmer DSC8000 calorimeter, according to the standard ASTM D 3418-2012, employing heating (to 290 °C) and cooling (to 0 °C) rates of 10 °C/min. The heat of fusion (DH_m) of each sample was correlated to the one of a 100% crystalline polymer (estimated as 140 J/g) [14, 16], for the determination of their degree of crystallinity.

Intrinsic viscosity (iv) was determined using a mixture of phenol/1,1,2,2-tetrachoroethane (PTCE) as solvent and it was correlated to the polymer molar mass using Mark-Houwink-Sakurada equation [17].

Analysis of surface area and particles diameter of selected PET samples was performed in a Mastersizer 2000 analyzer (Malvern Instruments).

Calculations

 $\chi_i =$

Mole fraction of each reaction component (χ_{I} , where i = BHET, MHET or TPA) was expressed as a ratio between the mole concentration (n) of the component and the sum of the mole concentrations of the three measured products, as shown in Eq. 1. The calculation of PET conversion into released TPA (%) was according to Eq. 2 where TPA and PET concentrations used were in mass basis (mg/L) and the theoretical yield is 0.8643 $\rm mg_{TPA}/\rm mg_{PET}.$ The synergy degree (SD) between the two selected enzymes in the PET depolymerization reaction was defined as the ratio between TPA mole concentration (n_{TPA}) when the two selected enzymes (E1, E2) were used simultaneously and the sum of TPA mole concentration when the enzymes were used in separate, at the same reaction conditions, as shown in Eq. 3.

n_i



$$Synergy \ degree \ (SD) = \frac{(n_{TPA}E_1 + E_2)}{(n_{TPA}E_1) + (n_{TPA}E_2)} \tag{3}$$

Results and discussion

Screening of enzymes for PET hydrolysis

Enzymes were first screened for their ability to catalyze the hydrolysis of either bottle or amorphous PET. For this study, it was prioritized a condition in which all enzymes could be active and stable, more than an ideal condition of PET availability, such as near to its glass transition temperature. Although not at the highest hydrolysis rates, such mild condition would be effective to show the potential of possibly enzymes with low thermal stability. As shown in Figs. 1 and 1S, HiC lead to significantly higher amounts of TPA and MHET (up to 98 and 199 µmol/L in PET bottle and 402 and 950 µmol/L in amorphous PET, respectively) than the other 15 biocatalysts, which use resulted in no more than 20 µmol/L of each of these compounds. On the other hand, BHET concentrations in the reaction media were very similar for all biocatalysts, including HiC. In most cases, it was accumulated during the first 7 days of reaction and afterward converted into the final monomers. The exception was when HiC was employed for amorphous PET hydrolysis, yielding a continuously increasing BHET profile. MHET was the predominant depolymerization product during all the reaction time investigated, on both substrates, when HiC was used.



(1)

Fig. 1 Profiles of TPA released from screening of PET bottle and amorphous PET hydrolysis reactions at 37 °C catalyzed by HiC (time course a) and maximum TPA concentrations in the reactions catalyzed by all the other 15 enzymes over PET bottle (b) and amorphous PET (c)

Interestingly, cutinases usually show lower molecular weight (20–30 kDa) than lipases [19], in accordance to the results we found in this present study, with up to 70 kDa bands (from RnL) (Table 1S). This suggests that the mobility of smaller proteins along PET chains may play an important role for hydrolysis rate, being necessary more specific experiments to prove this hypothesis, since other enzyme structure characteristics, such as the catalytic triad, the flexibility of the active site and key residues in the oxyanion hole are related to the specific ability of each enzyme for the biocatalysis [9, 14]. As reviewed by Ferrario et al. [10] from a large list of microbial sources, cutinases present molar mass of up to 40 kDa. Yang et al. [31] reported a low mass cutinase (~25.3 kDa) from Thielavia terrestris which demonstrated to be more efficient to hydrolyze several polyesters than higher enzymes, such as the wild-type Thermobifida fusca cutinase (~33.8 kDa). Moreover, glvcosylation patterns have been reported in the literature to influence hydrolysis rates due to steric hindering that difficult the access of the catalytic site to the PET chains [27].

Even when compared at an enzyme molar basis $(\mu mol_{TPA}/\mu mol_{enzyme})$, HiC presented higher performance than the other biocatalysts, being by 29 times higher than the second best enzyme (Table 2S).

At the end of the tests (14 days) on PET bottle and amorphous PET, χ_{MHET} was 0.659 and 0.692, whereas χ_{TPA} at the same conditions was 0.327 and 0.293, respectively. Oppositely, although resulting in very low concentrations, CALB led to the final TPA mole fractions of 1.000 and 0.754, when in contact with PET bottle and amorphous PET, respectively. This is in agreement with the behavior of these enzymes, previously observed by our group [8], which suggested a limiting rate for the hydrolysis of MHET to TPA during catalysis by HiC, especially at lower temperatures, and higher hydrolysis rates of MHET to TPA during catalysis by the enzyme from *C. antarctica*.

TPA release rates were maintained constant throughout hydrolysis of both substrates (PET bottle and amorphous PET) catalyzed by HiC, as follows: 6.9 μ mol/L/d (n = 7, $R^2 = 0.998$) and 29.6 µmol/L/d (n = 7, $R^2 = 0.986$), respectively. These results indicate that the enzyme keeps active during the considered reaction time. Therefore, the experiments with this biocatalyst were continued for over 2 months and continuously increasing TPA and MHET concentrations were still observed, in both substrates (Fig. 3S). It was observed, however, a trend in the proportions of TPA and MHET mole fractions. On bottle PET, χ_{TPA} (0.55 \pm 0.01) surpassed χ_{MHET} (0.44 \pm 0.01) after 52 days of reaction, and the final monomer continued to be the predominant compound until the end of the test. On amorphous PET, MHET mole fraction continuously decreased from 0.74 \pm 0.02 at 3 days of reaction to 0.52 \pm 0.01 at 73 days of reaction, whereas TPA mole

D Springer

fraction increased from 0.22 \pm 0.01 to 0.47 \pm 0.01 during the same period. χ_{BHET} was no more than 0.06 during reactions on both substrates.

In a screening of seven microbial enzymes for PET film hydrolysis, Korpecka et al. [20] observed the highest TPA release in the reaction catalyzed by a Fusarium solani cutinase, followed by H. insolens and T. fusca enzymes. In the reaction carried out with T. lanuginosus enzyme, the highest MHET concentration was found, but TPA was very low, suggesting a similar behavior as noticed in the present study for HiC. The proportions of MHET and TPA found in the study of Korpecka et al. [20] for T. lanuginosus (more MHET than TPA) and P. fluorescens (more TPA than MHET) are in accordance with the final mole fractions observed in the present study, where we found the final $\chi_{TPA} = 0.20$ and $\chi_{MHET} = 0.80$ using TIL for amorphous PET depolymerization and the final $\chi_{TPA}=0.58$ and $\chi_{MHET} = 0.41$ using PfL for amorphous PET hydrolysis (Fig. 2S), although corresponding to very low titers.

In the present screening study, MHET was the predominant product at the end of eight reactions in PET bottle and nine reactions in amorphous PET, attesting that the final hydrolysis step to TPA is commonly limiting. Similarly, a proportion of MHET/TPA of about 2.7 was found after hydrolysis of PET film by a PETase from a newly isolated and promising *Ideonela sakaiensis* strain [32].

Synergy studies on different PET samples

HiC was then selected for further investigations, along with CALB, due to the ability of this latter enzyme to more quickly catalyze the conversion of MHET to TPA [8]. Also, reaction temperature was increased to 60 °C, based on preliminary studies that indicated the thermal tolerance of HiC during PET hydrolysis [8, 24]. As the enzymes present complementary activity profiles at the final stages of PET depolymerization, the synergy between HiC and CALB was investigated on seven different PET samples, being five from an industrial PET production plant, one from an industrial PET recycling plant and one from commercial PET bottle. The enzymes were then used in separate or simultaneously for the hydrolysis of each substrate. Time course of TPA and MHET concentrations is shown in Fig. 2, whereas BHET data are shown in Fig. 4S.

In all substrates, MHET was confirmed as a reaction intermediate, showing decreasing concentrations from the first half of the test. At 14 days of reaction, TPA was the main product of the reactions in the seven substrates ($\chi_{TPA} = 0.552-0.938$), with the only exception being when HiC was used as the only biocatalyst for amorphous PET hydrolysis (χ_{TPA} and χ_{MHET} were 0.494 and 0.495, respectively). Interestingly, the highest amounts of MHET (31,877 µmol/L in 10d) were found in this



Fig. 2 Time course of TPA and MHET release during hydrolysis reaction at 60 °C of amorphous (a), bottle (b), MW (c), CSD (d), CSD-Plus (e), CSD-LIV (f) and PIRP (g) PET samples catalyzed by HiC, CALB or both enzymes simultaneously

condition. Thus, the stabilization of MHET concentration from 10 to 14 days of reaction may suggest that this is a limiting condition for MHET accumulation; however, systematic enzyme kinetic studies are needed to support the hypothesis of inhibition by MHET, as done by Barth et al. [2]. Even by other hydrolysis product, such as EG, may change the active site dynamics, as recently detected by Groß et al. [13]. The enzyme continued acting after this point, since TPA concentration increased from 23,050 to 31,536 µmol/L (i.e., up to 7.45 g/L), but as MHET was stable, the MHET formation and consumption rates must had been very similar. On this substrate, when CALB was used concomitantly, MHET consumption and TPA formation were more intense, reinforcing the role of this enzyme to complement PET hydrolyzing activity of HiC. The impact of this enzyme, however, was not as fast as expected based on previous results obtained at 37 °C [8], and did not depleted MHET from reactional medium, and this may be related to the nominal optimum temperature range of this enzyme (30-60 °C), which is lower than that of HiC (35-70 °C) [21].

Oppositely, on MW and the three CSD PET samples, a lower, but continuous MHET consumption rate was observed from the third day of reaction (18.5–33.6 μ mol/L/d). As in these substrates the reaction occurred at lower extent, MHET concentration was far from limiting conditions.

It can be observed that the combined use of the two enzymes increased substantially TPA and MHET concentrations only when PET bottle was used (684 and 432 µmol/L after 14 days of reaction), and at the end of the test with amorphous PET (44,842 and 12,256 µmol/L, respectively). On CSD PET samples (regular, LIV and Plus), only a marginal positive synergy effect was observed (SD up to 1.10), and not during all reaction time. On MW PET and PIRP, the highest final TPA concentrations were achieved when HiC was used solely (1003 and 8693 µmol/L, respectively), representing a SD below 1 (Fig. 3). It can be noted from almost all profiles that SD tends to decrease during the reaction, being higher in the first half of incubation period. Similar profiles were observed by Arias et al. [1] during synergy studies between cellulolytic cocktails from the fungi Penicillium funiculosum, Aspergillus niger and Trichoderma harzianum, when higher SD (around 1.8, expressed as glucose released) occurred at 12 h of hydrolysis and thereafter decreased to 1.4 by 48 h of reaction.

The simultaneous use of two enzymes for PET film hydrolysis was investigated by Barth et al. [2]. Authors used a *T. fusca* carboxylesterase (TfCa) to complement the good PET depolymerizing activity of either a *T. fusca* cutinase or a metagenome-derived LC-cutinase, and observed that the higher the amount of TfCa, the higher the proportion of TPA over MHET.

J Ind Microbiol Biotechnol

Fig. 4 Time course of products released during hydrolysis of amor phous <1 mm (a), amorphous >1 mm (b) and PIRP (c) PET samples catalyzed by sequential incubation with HiC (at 60 °C) and CALB (at 37 °C)

crystallinity for depolymerization efficiency. This is because they presented relatively similar surface properties, i.e., surface area $(0.0132 \text{ m}^2/\text{g for amorphous} < 1 \text{ mm}$ and 0.0110 m²/g for PIRP PET) and surface weighted mean diameter (454.6 μm for amorphous <1 mm and 545.4 µm for PIRP PET). These samples, however, differed significantly regarding the degree of crystallinity (4.9 \pm 0.9% for amorphous <1 mm and 41.1 \pm 0.3% for PIRP PET), as shown in Table 1. Similarly, amorphous PET powder (12% crystallinity) and semi-crystalline PET powder (24% crystallinity) were employed in depolymerization reactions, under catalysis by a T. cellulosilytica cutinase [11]. Interestingly, higher TPA concentrations were observed during the 72 h of reaction using the semicrystalline sample, which also presented larger particle size (0.5–1.0 $\mu m)$ than the amorphous PET (<0.5 $\mu m).$ Authors supported their findings based on the differences of purity of each sample, since additives may change the glass transition temperature of the polymer and increase its chain mobility.

The addition of CALB was an effective strategy to boost TPA formation, even at lower reaction temperature. Data shown in Table 2 reveal that TPA formation rate was up to 141-fold increased after CALB addition (from 0.61 µmol/(L min) to 85.8 µmol/(L min), for amorphous PET > 1 mm), which sustain the findings previously reported by Carniel et al. [8]. It is worthy to notice also that MHET consumption rate was lower than TPA formation rate for all three reaction conditions. Once the stoichiometry is 1 mol of MHET forming 1 mol of TPA, these results suggest that possibly CALB was further acting on substrates with higher molar mass present in the reaction medium, more rapidly catalyzing the release of MHET, which is still a reaction intermediate. The MHET consumption rates observed are, therefore, a result of its formation rates (from higher substrates) and its conversion rates to TPA

Amorphous PET (as a film) was also the substrate used for depolymerization studies with a *T. fusca* cutinase. The best variant of the engineered enzyme yielded a conversion of 42.6%, considerably higher than that found with the wild-type cutinase (15.9%), and the increase was attributed to relieved product inhibition [29].

In the two-step depolymerization reactions, the highest TPA-specific production (achieved on amorphous <1.0 mm) was 3565 μ/μ_{enzyme} , which is 98.6 times higher than the initial specific production using solely HiC, observed during the screening studies. This



Deringer

Table 1 Properties of the seven PET samples used in the synergy study

The interpreters of the second per sumples used in the synergy study								
PET sample	Intrinsic viscosity (dl/g)	Molar mass (g/mol)	Polymerization degree	Crystallinity (%)				
Amorphous (all granulometric grades)	0.6022 ± 0.0141	$30,762 \pm 1109$	160.1 ± 5.8	12.9 ± 3.0				
Amorphous (<1 mm)	0.6090 ± 0.0002	$31,296 \pm 17$	162.8 ± 0.1	4.9 ± 0.9				
Amorphous (>1 mm)	0.6039 ± 0.0019	$30,\!892\pm150$	160.7 ± 0.8	6.3 ± 2.0				
Bottle	0.7453 ± 0.0032	$42,\!737\pm288$	222.4 ± 1.5	36.6 ± 0.5				
MW	0.8283 ± 0.0061	$50{,}305\pm576$	261.7 ± 3.0	39.4 ± 1.7				
CSD	0.8178 ± 0.0112	$49,325 \pm 1046$	256.6 ± 5.4	38.4 ± 2.3				
CSD-Plus	0.8491 ± 0.0017	$52,262 \pm 161$	271.9 ± 0.8	45.0 ± 2.6				
CSD-LIV	0.7812 ± 0.0049	$45,959 \pm 442$	239.1 ± 2.3	36.2 ± 0.2				
PIRP	0.7525 ± 0.0028	$43,\!379\pm245$	225.7 ± 1.3	41.1 ± 0.3				

Table 2 Initial reaction rates of TPA formation and MHET formation/consumption during reactions at 60 °C and 37 °C

Initial rates			
At 37 °C (after CALB addition)			
= 0.9694)			
$^{2} = 0.9591$)			
0.9847)			
= 0.9337)			
0.9778)			
= 0.9787)			

indicates that the overall process strategy here described was very effective to a better utilization of the commercial enzyme.

At the end of incubation with CALB at 37 °C, remaining particles of the substrates were used for SEM analysis. Images shown in Fig. 5 reveal vast morphological changes in the two amorphous PET samples (Fig. 5b, d), as compared to their corresponding controls (Fig. 5a, c). PIRP PET was also visualized presenting degraded surface, but less extensively than in the other samples. The deep erosion pattern, however, was similar to that previously observed in PET bottle [8]. The extent of degradation was in agreement with the conversion of PET to TPA found at the end of the reactions in amorphous <1 mm, amorphous >1 mm and PIRP PET: $57.6 \pm 1.4\%$, $27.0 \pm 1.8\%$ and $13.6 \pm 0.8\%$, respectively.

Conclusions

In this study, 16 commercial enzymes were screened for their ability to catalyze the depolymerization of PET bottle and amorphous PET samples. In many cases, the hydrolysis intermediate mono(hydroxyethyl) terephthalate (MHET) was the predominant product, confirming

Deringer

a common behavior reported in the literature regarding its inhibition effect to cutinases. In this step of the study, the cutinase from Humicola insolens (HiC) stood out as the best biocatalyst, and terephthalic acid (TPA) titers of up to 3377 µmol/L were found at the end of an extended test performed during over 2 months, in which the enzyme was shown to be active all along. Although not effective for PET depolymerization, based on previous knowledge that the Candida antarctica lipase (CALB) can efficiently catalyze the hydrolysis of MHET to TPA, synergy studies between these enzymes were conducted, over five industrial PET resin and two post-consumer PET samples. When the enzymes were used simultaneously at 60 °C, the highest effective synergy degrees (SD) were observed in amorphous and in the two postconsumer PET (SD up to 2.2) and they decreased during the reaction, as similarly observed in synergy studies with cellulases. When the enzymes were employed sequentially, time course of products release with predominant MHET concentrations was observed during incubation solely with HiC, but after CALB addition and temperature reduction to 37 °C, it was rapidly converted to TPA, resulting in up to 141-times higher reaction rates and yielding a 1.7-fold higher titer than that found when the two enzymes were used at the same temperature in

polyester hydrolase from *Thermobifida fusca*. Biochem Eng J 93:222–228. doi:10.1016/j.bej.2014.10.012

- Barth W, Wei R, Oeser T, Then J, Schmidt J, Wohlgemuth F et al (2015) Enzymatic hydrolysis of polyethylene terephthalate films in an ultrafiltration membrane reactor. J Memb Sci 494:182–187. doi:10.1016/j.memsci.2015.07.030
- Bornscheuer UT (2016) Feeding on plastic. Science 351:1154– 1155. doi:10.1126/science.aaf2853
 Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72:248–254. doi:10.1016/00003-2697(76)90527-3
- Brenda (2017) http://www.brenda-enzymes.org/. Accessed 27 March 2017
- Carniel A, Valoni E, Nicomedes N Jr, Gomes AC, Castro AM (2016) Lipase from *Candida antarctica* (CALB) and cutinase from *Humicola insolens* act synergistically for PET hydrolysis to terephthalic acid. Proc Biochem. doi:10.1016/j. procbio.2016.07.023
- Chen S, Su L, Chen J, Wu J (2013) Cutinase: chacacteristics, preparation and application. Biotechnol Adv 31:1754–1767. doi:10.1016/j.biotechadv.2013.09.005
- Ferrario V, Pellis A, Cespugli M, Guebitz GM, Gardossi L (2016) Nature inspired solutions for polymers: will cutinase enzymes make polyesters and polyamides greener? Catalysts 6:205. doi:10.3390/catal6120205
- Gamerith C, Zartl B, Pellis A, Guillamot F, Marty A, Acero EH, Guebitz GM (2017) Enzymatic recovery of polyester building blocks from polymer blends. Proc Biochem. doi:10.1016/j. procbio.2017.01.004
- García JM (2016) Catalyst: design challenges for the future of plastics recycling. Chem 1:813–819. doi:10.1016/j. chempr.2016.11.003
- Groß C, Hamacher K, Schmitz K, Jager S (2017) Cleavage product accumulation decreases the activity of cutinase during PET hydrolysis. J Chem Inf Model 57:243–255
- Guebiz GM, Cavaco-Paulo A (2008) Enzymes go big: surface hydrolysis and functionalisation of synthetic polymers. Trends Biotechnol 26:32–38. doi:10.1016/j.tibtech.2007.10.003
- Hansen F, Atwood KB (2005) Polyester Fibers. In: Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology, Wiley, New York. doi:10. 1002/0471238961.1615122508011419.a01.pub2
- Kaisersberger E, Möhler H. (1991) DSC on polymeric materials. In: NETZSCH annual for science and industry, vol. 1. Selb: ©NETZSCH-Gerätebau GmbH, D 8672
- Kamide K, Miyazaki Y, Kobayashi H (1977) Unperturbed chain dimensions of polyethylene terephthalate and polyethylene 1,2-diphenoxyethane p, p'-carboxylate. Polym J 9:317–327. doi:10.1295/polymj.9.317
- Kim HR, Song WS (2006) Lipase treatment of polyester fabrics. Fibers Polym 7:39–343. doi:10.1108/09556221011008785
- Kold D, Dauter Z, Laustsen AK, Brzozowski AM, Turkenburg JP, Nielsen AD et al (2014) Thermodynamic and structural

investigation of the specific SDS binding of *Humicola insolens* cutinase. Protein Sci 23:1023–1035. doi:10.1002/pro.2489

- Korpecka J, Heumann S, Billig S, Zimmermann W, Zinn M, Ihssen J et al (2010) Hydrolysis of cutin by PET-hydrolases. Macromol Symp 296:342–346. doi:10.1002/masy.201051047
- Novozymes[®] Lipases enzymes. http://www.novozymes.com/en/ solutions/pharmaceuticals/biocatalysis/Pages/lipase-enzymes. aspx. Accessed 05 April 2016
- Nowak B, Pajak J, Labuzek S, Rymarz G, Talik E (2011) Biodegradation of poly(ethylene terephthalate) modified with polyester "Bionolle" by *Penicillium funiculosum*. Polimery/Polymers. 56:35–44
- Ribitsch D, Heumann S, Trotscha E, Herrero Acero E, Greimel K, Leber R et al (2011) Hydrolysis of polyethylene terephthalate by p-nitrobenzylesterase from *Bacillus subtilis*. Biotechnol Prog 27:951–960. doi:10.1002/btpr.610
- Ronkvist AM, Xie W, Lu W, Gross RA (2009) Cutinase-catalyzed hydrolysis of poly(ethylene terephthalate). Macromolecules 42:5128–5138. doi:10.1021/ma9005318
- Schmidt J, Wei R, Oeser T, Belisário-Ferrari MR, Barth M, Then J, Zimmermann W (2016) Effect of Tris, MOPS, and phosphate buffers on the hydrolysis of polyethylene terephthalate films by polyester hydrolases. FEBS OpenBio 6:919–927
 Sharon C, Sharon M (2012) Studies on biodegradation of poly-
- Sharon C, Sharon M (2012) Studies on biodegradation of polyethylene terephthalate: a synthetic polymer. J Microbiol Biotechnol Res 2:248–257
- Shirke AN, Basore D, Holton S, Su A, Baugh E, Butterfoss GL, Makhatadze G, Bystroff C, Gross RA (2016) Influence of surface charge, binding site residues and glycosylation on *Thielavia terrestris* cutinase biochemical characteristics. Appl Microbiol Biotechnol 100:4435–4446
- Sulaiman S, Yamato S, Kanaya E, Kim JJ, Koga Y, Takano K et al (2012) Isolation of a novel cutinase homolog with polyethylene terephthalate-degrading activity from leaf-branch compost by using a metagenomic approach. Appl Environ Microbiol 78:1556–1562. doi:10.1128/AEM.06725-11
- Wei R, Oeser T, Schmidt J, Meier R, Barth M, Then J, Zimmermann W (2016) Engineered bacterial polyester hydrolases efficiently degrade polyethylene terephthalate due to relieved product inhibition. Biotechnol Bioeng 113:1658–1665
 World Economic Forum[®] (2016) The New Plastics Economy—
- World Economic Forum[©] (2016) The New Plastics Economy— Rethinking the future of plastics, http://www3.weforum.org/ docs/WEF_The_New_Plastics_Economy.pdf. Accessed 05 April 2016
- Yang S, Xu H, Yan Q, Liu Y, Zhou P, Jiang Z (2013) A low molecular mass cutinase of *Thielavia terrestris* efficiently hydrolyze polu(esters). J Ind Microbiol Biotechnol 40:217–226
- Ýoshida S, Hiraga K, Takehana T, Taniguchi I, Yamaji H, Maeda Y et al (2016) A bacterium that degrades and assimilates poly(ethylene terephthalate). Science 351:1196–1199. doi:10.1126/science.aad6359