

## DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE HIDROLÍTICA E DO TEOR DE PROTEÍNAS DE ENZIMAS COM POTENCIAL PARA DESPOLIMERIZAÇÃO DE RESÍDUO TÊXTIL

Letícia M. S. Fernandes<sup>1</sup>; Marcos A. Moreira<sup>1</sup>; Adriana A. Okuma<sup>1</sup>; Ariela V. Paula<sup>2</sup>; Gisele F. M. Nunes<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais, Departamento de Química.

<sup>2</sup> Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências Farmacêuticas.

E-mail: leticiamylena.fernandes@gmail.com

**Palavras-Chave:** Fibras têxteis, lipases, biocatálise

### Introdução

A indústria têxtil é considerada uma das maiores geradoras de resíduos, produzindo cerca de 150 milhões de toneladas de lixo têxtil anualmente em escala global, sendo que grande parte dessa quantidade é descartada de forma indevida em aterros ou por incineração (Grando, 2022). O maior obstáculo para a reciclagem desses resíduos é a complexidade do tecido e a separação dos componentes das fibras têxteis, principalmente no que diz respeito às fibras mistas, como dos polímeros poli(tereftalato de etileno) (PET) e a celulose. Esses dois polímeros atingem 88% da produção global de fibras têxteis, sendo, portanto, fundamental a busca por processos eficientes de separação dessas fibras (EGAN, 2023). Por ser amplamente utilizado na produção de fibras têxteis, há uma crescente investigação de métodos de reciclagem do PET e, dentre eles, a hidrólise enzimática tem ganhado espaço nesses estudos (Enking, 2025).

As enzimas são moléculas compostas majoritariamente por proteínas que estão presentes em todos os seres vivos e que atuam como catalisadores biológicos. Essas moléculas aumentam a velocidade de reações químicas por meio da diminuição da energia de ativação. As lipases são uma classe de enzimas que catalisam a hidrólise de ligações ésteres de triacilgliceróis, liberando ácidos graxos e glicerol, e podem, em condições específicas, catalisar reações de síntese através da esterificação, transesterificação e interesterificação. Além disso, como são caracterizadas pela sua versatilidade reacional e diversidade catalítica, as lipases têm apresentado ampla aplicabilidade industrial, além da capacidade de modificar a superfície de fibras PET (Carniel, 2020).

Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar quatro enzimas comerciais (lipase pancreática de porco, lipase de *Rhizopus oryzae*, lipase de *Candida antarctica* e lipase de *Aspergillus oryzae*) quanto à sua atividade hidrolítica e teor de proteína, a fim de verificar o potencial dessas enzimas para atuarem na reciclagem de fibras mistas de PET e algodão.

### Material e Métodos

Os experimentos nesse trabalho foram executados utilizando lipase de *Candida antarctica* (CALB) (Novozymes, líquida), lipase Eversa Transform 2.0 de *Aspergillus oryzae* (Novozymes, líquida), lipase de pâncreas de porco (LPP) (Sigma-Aldrich, sólida), lipase de *Rhizopus oryzae* (ROL) (Prozyn, sólida), albumina do soro bovino (BSA) (Sigma-Aldrich), corante Coomassie Brilliant Blue G-250 (Sigma-Aldrich), azeite de oliva extra virgem (Carbonel), goma arábica em pó P.A. (Êxodo científica).

A dosagem de atividade hidrolítica foi realizada de acordo com Pacheco (2024). O ensaio foi realizado em triplicata e com um branco para cada lipase. Primeiramente, com auxílio de um mixer, preparou-se uma emulsão contendo 12,5 g de azeite, 12,5 mL de água destilada, 20 mL de solução tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0, e 0,875 g de goma arábica. Uma alíquota de 9 mL foi transferida para cada erlenmeyer e colocado em um shaker durante 10 minutos sob agitação constante, 120 rpm, e a temperatura de 37 °C. Depois, 1 mL do extrato enzimático (para enzimas na forma líquida) ou da solução de enzima (para enzimas na forma sólida) foi

adicionado na emulsão a cada 30 segundos. A reação foi mantida sob agitação constante durante 5 minutos a 37°C e cessada agregando-se 10 mL da mistura de etanol, acetona e água a cada 30 segundos.

Posteriormente, adicionaram-se três gotas de solução indicadora de fenolftaleína e hidróxido de sódio até o surgimento da coloração rosa. Por último, o excesso de hidróxido de sódio foi titulado com ácido clorídrico.

O cálculo da atividade hidrolítica foi feito conforme Equação (1).

$$A (U/g) = \frac{(V_b - V_a) \times M \times 1000}{t \times m} \quad (1)$$

Onde U = quantidade de enzima que catalisa 1  $\mu$ mol de substrato por minuto,  $V_b$  = volume de HCl gasto na titulação do branco (mL),  $V_a$  = volume de HCl gasto na titulação da amostra (mL), M = concentração da solução de HCl (mol/L), t = tempo de incubação das amostras (s), m = massa de enzima adicionada (g)

A dosagem de proteínas foi realizada pelo método de Bradford (1976), utilizando solução de albumina bovina a 0,2 mg/mL para construção da curva analítica. Aliquotas foram distribuídas em tubos com água destilada e reagente de Bradford, homogeneizadas e deixadas em repouso por 5 minutos. A absorbância foi medida em espectrofotômetro a 595 nm.

Com a curva construída, as amostras foram analisadas de forma a manter suas concentrações dentro da faixa de trabalho. Para isso, prepararam-se soluções enzimáticas, diluídas quando necessário, de modo que o volume final com água fosse de 1600  $\mu$ L. Em seguida, adicionaram-se 1600  $\mu$ L do reagente de Bradford, homogeneizou-se e aguardaram-se 5 minutos. A absorbância foi medida a 595 nm.

O cálculo para determinar o teor de proteínas nas enzimas foi feito por meio da equação da reta obtida com a construção da curva analítica, conforme descrito na Equação (2).

$$y = ax + b \quad (2)$$

Onde y = absorbância da amostra, x = teor de proteína (mg), a = coeficiente angular, b = coeficiente linear

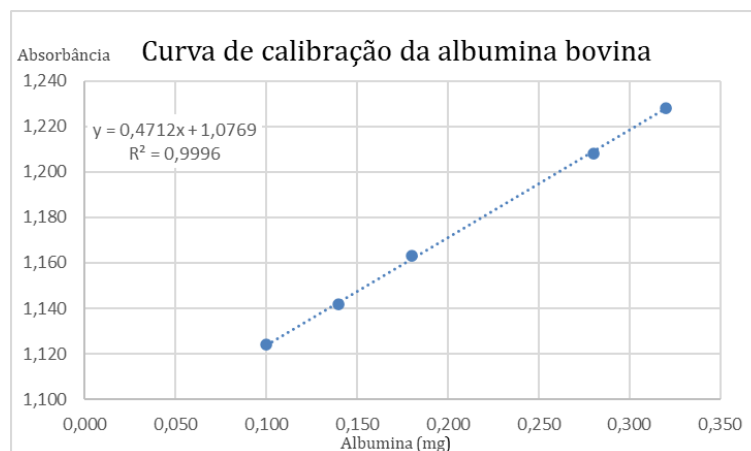
## Resultados e Discussão

Os ensaios de atividade hidrolítica visam analisar a capacidade de cada lipase de degradar o triacilglicerol presente no azeite de oliva, formando ácidos graxos livres e glicerol. Na titulação indireta, a base foi adicionada em excesso para reagir com todo o ácido graxo formado na reação. Posteriormente, o excesso da base foi titulado com o ácido, permitindo calcular a atividade hidrolítica da lipase. Essa análise foi utilizada como um indicativo da eficiência dessas enzimas na quebra do PET, a partir da hidrólise das ligações éster entre seus monômeros constituintes, ácido tereftálico e etilenoglicol.

Os ensaios realizados para determinar o teor de proteína das lipases pelo método de Bradford possibilitam uma quantificação rápida e sensível das proteínas constituintes das enzimas, com menor suscetibilidade a interferentes. O método de Bradford é baseado no fato de que o Coomassie Brilliant Blue G-250 existe em duas formas de cores diferentes, vermelho e azul. A forma vermelha é convertida para a forma azul após a ligação do corante à proteína. O complexo proteína-corante tem uma alta capacidade de absorção de luz, levando assim a uma grande sensibilidade na medição da proteína (Bradford, 1976). Empregando o corante

apresentado, foi possível construir a curva analítica representada na Figura 1 e obter os resultados de teor de proteína demonstrados na Tabela 2.

Figura 1: Curva analítica da albumina de soro bovina



Por meio dessa quantificação, juntamente com a atividade hidrolítica, tornou-se viável calcular a atividade específica de cada enzima. A atividade específica relaciona a unidade de atividade enzimática pela quantidade de proteína em miligramas. Esse parâmetro permite realizar uma análise sobre a pureza enzimática. Os resultados dos ensaios executados e da atividade específica calculada estão expressos na Tabela 2.

Tabela 2: Resultados de atividade hidrolítica, teor de proteínas e atividade específica das lipases em estudo

Enzima	Atividade hidrolítica (U/g)	Proteína (mg/g)	Atividade específica (U/mg)
LPP	4178,7 ± 278,4	189,7 ± 34,1	23,1 ± 3,8
ROL	8211,7 ± 683,1	46,7 ± 1,8	175,9 ± 6,7
Eversa	642,4 ± 65,0	15,6 ± 5,0	44,4 ± 14,8
CalB	4,6 ± 0,7	3,8 ± 1,0	1,3 ± 0,3

Com base nos resultados obtidos, observou-se que as lipases Eversa e CalB apresentaram uma atividade hidrolítica consideravelmente inferior comparadas a LPP e ROL. Acredita-se que como a Eversa e CalB estão na forma líquida de extrato, as mesmas apresentem menor grau de pureza, em relação a LPP e ROL que, como são sólidas, apresentam um grau de pureza mais elevado. Além disso, o baixo teor de proteínas dessas enzimas reforça a condição de pureza inferior.

É notório também que a ROL apresenta um alto grau de pureza em relação às demais enzimas, visto que apresentou uma atividade específica maior, indicando que grande parte das proteínas que a constituem corresponde a lipase. No caso da LPP, a baixa atividade específica e alto teor de proteína, demonstra que nem toda proteína presente nessa enzima corresponde à lipase. Em decorrência do preparo da lipase, a LPP apresenta em sua constituição outras enzimas como contaminantes que não necessariamente possuem atividade hidrolítica, mas que equivalem à proteína (Mendes, 2012). A respeito da Eversa, a alta atividade específica indica que as proteínas presentes em seu extrato são lipases, ainda que estejam em menor quantidade. Por último, a CalB apresentou em geral valores inferiores de proteína, atividade hidrolítica e específica, demonstrando que não é ideal para a hidrólise de triacilglicerol.



## Conclusões

Com base no estudo feito, torna-se evidente que a LPP, ROL e Eversa apresentaram resultados satisfatórios na hidrólise de triacilglicerol. Além disso, a determinação da atividade específica, com auxílio do teor de proteínas, permite definir as quantidades de enzimas a serem aplicadas no meio reacional contendo PET, levando em consideração o quanto dessas enzimas equivalem a lipase e o seu potencial hidrolítico. Assim, esse estudo contribui como uma etapa essencial para selecionar e caracterizar as lipases com potencial para aplicação na despolimerização de PET.

## Agradecimentos

Os autores agradecem a FAPEMIG e ao CEFET/MG pelo apoio concedido para o desenvolvimento e apresentação deste trabalho.

## Referências

- 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**. 72, 248- 254, 1976.
- CARNIEL, A. 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.
- EGAN, J.; WANG, S.; SHEN, J.; BAARS, O.; MOXLEY, G.; SALMON, S. Enzymatic textile fiber separation for sustainable waste processing. **Resources, Environment and Sustainability**. 13, 2023.
- ENKING, J.; BECKER, A.; SCHU, G.; GAUSMANN, M.; CUCURACHI, S.; TUKKER, A.; GRIES, T. Recycling processes of polyester-containing textile waste—A review. **Resources, Conservation and Recycling**. 219, 2025.
- GRANDO, F.S.; SETTE, S.K.; BATISTON, E.R.; COLPANI, G.L.; MELLO, J.M.M.; SILVA, L.L. Reciclagem de resíduos têxteis: uma revisão. **Brazilian Journal of Development**. 8 (8), 57050-57067, 2022.
- MENDES, A.A.; Oliveira, P.C.; De Castro, H.F. Properties and biotechnological applications of porcine pancreatic lipase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. 78, p. 119–134, 2012.
- PACHECO, B.J.S.; ANDRADE, G.S.S.; PAULA, A.V. Lipase from *Rhizopus oryzae* immobilized on corn cob powder: a new approach for dietetic triglyceride synthesis in a fixed bed reactor. **Química Nova**. 47 (7), 2024.