

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**USO DE ENZIMAS PARA DEGRADAÇÃO DE PETRÓLEO EM  
EMULSÕES SINTÉTICAS DO TIPO ÓLEO EM ÁGUA**

MARIANNE SILVA SCHAEFFER

Porto Alegre, abril de 2024

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Marianne Silva Schaeffer

**USO DE ENZIMAS PARA DEGRADAÇÃO DE PETRÓLEO EM  
EMULSÕES SINTÉTICAS DO TIPO ÓLEO EM ÁGUA**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a  
obtenção do grau de Mestre em Química.

Prof<sup>a</sup>. Dra. Juliana Severo Fagundes Pereira  
Orientadora

Porto Alegre, abril de 2024

CIP - Catalogação na Publicação


Schaeffer, Marianne Silva  
Uso de enzimas para degradação de petróleo em emulsões sintéticas do tipo óleo em água / Marianne Silva Schaeffer. -- 2024.  
109 f.  
Orientadora: Juliana Severo Fagundes Pereira.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Química, Programa de Pós-Graduação em Química, Porto Alegre, BR-RS, 2024.

1. Petróleo. 2. Degradação. 3. Lipase. 4. Imobilização. 5. Nanopartículas. I. Pereira, Juliana Severo Fagundes, orient. II. Título.


A presente dissertação foi realizada inteiramente pela autora, exceto as colaborações as quais serão devidamente citadas nos agradecimentos, no período entre novembro de 2020 e abril de 2024, no Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul sob orientação da Professora Doutora Juliana Severo Fagundes Pereira. A dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de Mestre em Química pela seguinte banca examinadora:

### Comissão Examinadora:

Documento assinado digitalmente  
 **SILMA ALBERTON CORREA**  
Data: 18/04/2024 11:13:06-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>


---

Profa. Dra. Silma Alberton Corrêa

Documento assinado digitalmente  
 **MARCO FLORES FERRAO**  
Data: 22/04/2024 08:38:57-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>


---

Prof. Dr. Marco Flores Ferrão

Documento assinado digitalmente  
 **MILTON KATSUMI SASAKI**  
Data: 24/04/2024 08:09:59-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>


---

Prof. Dr. Milton Katsumi Sasaki

Documento assinado digitalmente  
 **JULIANA SEVERO FAGUNDES PEREIRA**  
Data: 18/04/2024 10:43:43-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Profa. Dra. Juliana Severo Fagundes Pereira

Documento assinado digitalmente  
 **MARIANNE SILVA SCHAEFFER**  
Data: 25/04/2024 20:36:15-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Marianne Silva Schaeffer

Dedico este trabalho aos meus pais,  
Roselane e Eduardo, por sempre terem  
sido os primeiros a me incentivar e apoiar.

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul e ao Programa de Pós-Graduação em Química (PPGQ) por todos os anos de educação pública e de qualidade. À Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo fomento às pesquisas realizadas no PPGQ.

Ao Programa de Recursos Humanos PRH 50.1 e à Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP) pela concessão da bolsa de estudos, pelo auxílio financeiro que permitiu o desenvolvimento desta pesquisa e pelas oportunidades de desenvolvimento ao longo desses anos.

À Profa. Dra. Juliana Severo Fagundes Pereira pela oportunidade de executar esse projeto, pelas novas perspectivas sugeridas e por todas as trocas que tivemos ao longo desses anos.

Aos membros da banca examinadora, Prof. Dr. Marco Flores Ferrão, Prof. Dr. Milton Katsumi Sasaki e Profa. Dra. Silma Alberton pela participação e contribuições para aprimorar este trabalho.

À Profa. Dra. Roberta da S. Bussamara Rodrigues pela troca de conhecimento em relação às enzimas e por ter cedido seu laboratório para execução dos experimentos. Ao Leonardo Medeiros por todo auxílio e paciência ao me apresentar o mundo das enzimas.

Ao Prof. Dr. Marco Flores Ferrão pela colaboração e dedicação nas análises de Infravermelho. À Dra. Marina González por toda parceria no desafio que foi analisar pequenas quantidades de amostra, paciência e por ter me ensinado que este grãozinho de areia vai ajudar a mudar o mundo.

À Profa. Dra. Jacqueline Ferreira Leite Santos pela colaboração e parceria entre os grupos de pesquisa para a síntese de nanopartículas. Ao Arturo, por ter me ensinado e explicado como executar a síntese das nanopartículas.

À Profa. Dra. Tânia Mara Pizzolato por ter cedido espaço em seu laboratório para a execução desse trabalho.

À Paolla Hermann por ter sido tão receptiva e parceira para as mais diversas atividades que executamos juntas. Obrigada por ter contribuído na minha jornada e pelo apoio incansável em todos os momentos.

Aos integrantes do NUQA pelos debates científicos e por toda ajuda na execução desse trabalho. Ao Prof. Dr. Diogo Pompéu de Moraes, pelas

discussões científicas e pelo auxílio na hora de resolver problemas. Larissa Oliveira, obrigada pelas análises no Titrino. Luan Passos, que chegou no finalzinho do meu trabalho, mas nunca mediu esforços para me ajudar e estar presente. Obrigada pelos cafés, desabafos e experiências compartilhadas.

À Rafaela Bergman, minha primeira IC, obrigada por ter sido quem tu foste nesse processo. Palavras não são capazes de expressar toda gratidão que eu tenho por ti, principalmente, nos dias em que saímos às 20h do Vale.

À Camila Reginatto e ao Cláudio Backes, obrigada por me fazerem sentir pertencente no mundo da Pós-Graduação, pela amizade, por todos os cafés e por todos debates que tivemos nesse período.

Ao Guilherme Gössling, mesmo que nosso reencontro tenha acontecido no final da nossa jornada de mestrado, é valioso poder contar contigo.

Aos meus pais, Roselane e Eduardo, que nunca mediram esforços para que eu pudesse ter a melhor educação possível e para que eu pudesse ter a oportunidade de experimentar os caminhos profissionais e científicos. Obrigada por todo incentivo e suporte. Aos meus avós Elma e Elmar, que sempre me incentivaram, à sua maneira, para que eu seguisse firme e em frente nos estudos. Aos meus tios, Rogéria e Valmor, por sempre terem uma palavra certa de apoio, nos momentos em que eu mais precisei. Aos meus primos Lucas e Luísa, por sempre estarem disponíveis e presentes para os momentos de diversão e descontração.

À Isabela Steffens e Tayane Nunes, obrigada por nunca terem soltado a minha mão e sempre terem acreditado em mim, mesmo nos dias que eu não conseguia e que tudo parecia tão impossível e inalcançável. À Júlia Sbroglia, exemplo de pesquisadora, pelo apoio e por todas as discussões científicas, mesmo atuando em áreas tão diferentes.

Aos meus amigos, Frederico Damiani, Gabriela Fortes, Lucas Gomes, Rafael Ferreira, William Xavier e Yuri Schäffer por terem sido, mesmo sem nem imaginarem, meu refúgio quase que semanal.

Ninguém chega à lugar algum sozinho e inúmeras pessoas não foram citadas. Por isso, agradeço a todos que, em algum momento da minha trajetória, me deram apoio, amparo, incentivo e afeto. Para que, mesmo que diante das dificuldades momentâneas, eu tivesse força para seguir sempre em frente e chegar até aqui.

“Quem nunca teve medo de largar tudo e partir? No meio do oceano, ver o barco naufragar. O risco do fracasso é o preço que eu escolhi, pois o preço de nunca ir eu não podia suportar.”

(César MC)



## Resumo

Apesar do avanço na área dos biocombustíveis, o petróleo permanece como uma das fontes de energia mais utilizada. Atrelada à exploração e ao transporte, há inúmeros registros de vazamentos e derramamentos que causam enormes problemas para o meio ambiente. Por isso, há necessidade de avaliar novas metodologias para a remediação do petróleo. No presente trabalho, foi avaliado o uso de enzimas lipase imobilizadas em nanopartículas magnéticas na degradação de petróleo presente em emulsões sintéticas do tipo óleo em água (O/A). As enzimas avaliadas no trabalho foram utilizadas na forma de solução e as condições de uso foram otimizadas. O pH ótimo para atuação das lipases de *Aspergillus oryzae*, de *Candida antarctica* e de *Pseudomonas cepacia* foi de 6,5, 7,0 e 8,0, respectivamente. Entre as temperaturas avaliadas, as enzimas apresentaram melhor atividade à 40 °C. Essas condições, foram utilizadas na imobilização das enzimas em nanopartículas magnéticas, onde a solução enzimática ficou em contato com as nanopartículas de forma a promover uma adsorção física durante 75 horas. A confirmação da imobilização foi realizada pela técnica de espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR-ATR) e pela medida da atividade das enzimas imobilizadas por espectrofotometria na região do visível. Para o ensaio de degradação, as enzimas ficaram em contato com as amostras por 20 minutos. Avaliando os resultados obtidos nas análises, verificou-se que nas condições avaliadas as lipases de *Aspergillus oryzae* e de *Candida antarctica* foram capazes de degradar o petróleo e que quando as amostras foram emulsionadas, os resultados obtidos foram melhores. Já a lipase de *Pseudomonas cepacia*, nas condições avaliadas, não foi tão eficaz quanto as demais enzimas. A acidez residual das fases aquosas das três enzimas não apresentou alteração significativa, mas houve aumento no teor de carbono orgânico dissolvido, em relação a amostra sem adição de enzima, para as amostras em que foram utilizadas as lipases de *Aspergillus oryzae* e de *Candida antarctica* indicando que a utilização dessas enzimas possivelmente degradou o petróleo em cadeias menores.

**Palavras-chave:** Petróleo, degradação, lipase, imobilização, nanopartículas.

## Abstract

Despite advancements in the field of biofuels, petroleum remains one of the most widely used energy sources. Associated with exploration and transportation, there are numerous records of leaks and spills that are extremely toxic to the environment. Therefore, there is a need to evaluate new methodologies for petroleum remediation. In the present study, the use of lipase enzymes immobilized onto magnetic nanoparticles was evaluated for the degradation of petroleum present in oil-in-water (O/W) synthetic emulsions. The enzymes evaluated in this study were used in solution form, and the conditions of use were optimized. The optimum pH for lipases from *Aspergillus oryzae*, *Candida antarctica*, and *Pseudomonas cepacia* were 6.5, 7.0, and 8.0, respectively. Among the temperatures evaluated, the enzymes showed better activity at 40°C. These conditions were used for the immobilization of the enzymes onto magnetic nanoparticles, where the enzyme solution was in contact with the nanoparticles to promote physical adsorption for 75 hours. Confirmation of immobilization was performed using Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR-ATR) and by measuring the activity of the immobilized enzymes. For the degradation assay, the enzymes were in contact with the samples for 20 minutes. Evaluating the results obtained in the analyzes, it was found that under the optimized conditions, the lipases from *Aspergillus oryzae* and *Candida antarctica* are capable of degrading petroleum, and when the samples were emulsified, the results obtained were better. However, the lipase from *Pseudomonas cepacia*, under the evaluated conditions, was not as effective as the other enzymes. The residual acidity of the aqueous phases of the three enzymes showed no significant alteration, but there was an increase in the content of dissolved organic carbon compared to the sample without enzyme addition, for the samples in which the lipases from *Aspergillus oryzae* and *Candida antarctica* were used, indicating that the use of these enzymes possibly degraded the petroleum into smaller chains.

**Keywords:** Petroleum, degradation, lipase, immobilization, nanoparticles.

## Lista de Figuras

<b>Figura 1.</b> Esquema ilustrativo dos compostos constituintes do petróleo .....	22
<b>Figura 2.</b> Mapa mundial com os registros de derramamento por navios petroleiros no período de 1970-2021.. .....	25
<b>Figura 3.</b> Representação das transformações relacionadas ao movimento do óleo e ao intemperismo em um óleo derramado no mar. ....	27
<b>Figura 4.</b> Classificação dos métodos de remediação e seus respectivos exemplos. ....	30
<b>Figura 5.</b> Representação do modelo chave-fechadura (metade superior) e modelo de ajuste induzido (metade inferior). ....	34
<b>Figura 6.</b> Representação das reações catalisadas por lipases.....	37
<b>Figura 7.</b> Representação dos métodos físicos e químicos de imobilização de enzimas. ....	39
<b>Figura 8.</b> Representação do processo de síntese por microemulsão das nanopartículas magnéticas (Ni-Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> ). ....	52
<b>Figura 9.</b> Fluxograma dos procedimentos experimentais realizados no presente trabalho. ....	56
<b>Figura 10.</b> Avaliação visual da influência do tempo de preparo na formação da emulsão com o dispersor: (A) 2 min, (B) 4 min e (C) 8 min com a velocidade fixa em 30000 rpm.. .....	58
<b>Figura 11.</b> Resultado obtido no preparo da emulsão ao avaliar a velocidade de 11500 rpm. ....	59
<b>Figura 12.</b> Avaliação visual da influência da velocidade do dispersor na formação da emulsão: (A) 11500 rpm, (B) 20500 rpm e (C) 30000 rpm com o tempo de preparo fixo em 4 minutos. ....	60
<b>Figura 13.</b> Presença das bolhas geradas no processo de emulsificação com a sonda de ultrassom devido à cavitação acústica. ....	61
<b>Figura 14.</b> Avaliação visual da influência do tempo de preparo na formação da emulsão com a sonda de ultrassom: (A) 2 min, (B) 4 min e (C) 8 min com a amplitude fixa em 40%. ....	62
<b>Figura 15.</b> Avaliação visual da influência da amplitude na formação da emulsão com a sonda de ultrassom: (A) 20%, (B) 30% e (C) 40% com o tempo de preparo fixo em 4 minutos. ....	63

<b>Figura 16.</b> Avaliação da influência da temperatura na atividade para as enzimas lipase de <i>Aspergillus oryzae</i> (■), de <i>Candida antarctica</i> (■) e de <i>Pseudomonas cepacia</i> (■) com o pH fixo em 6,5, 7,0 e 7,0, respectivamente. As barras verticais indicam o desvio padrão (n=2).....	65
<b>Figura 17.</b> Avaliação da influência do pH na atividade para as enzimas lipase de <i>Aspergillus oryzae</i> (■), de <i>Candida antarctica</i> (■) e de <i>Pseudomonas cepacia</i> (■) com a temperatura fixa em 40 °C. As barras verticais indicam o desvio padrão (n=2).....	67
<b>Figura 18.</b> Soluções sobrenadantes resultantes das imobilizações contendo nanopartículas: A) lipase de <i>Pseudomonas cepacia</i> e B) lipase de <i>Candida antarctica</i> .....	69
<b>Figura 19.</b> Exemplo de nanopartículas com enzima imobilizada em contato com a solução de p-NPP. ....	70
<b>Figura 20.</b> Resultado obtido para as atividades enzimáticas das lipases imobilizadas por adsorção física durante 75h. As barras verticais indicam o desvio padrão (n=2). ....	71
<b>Figura 21.</b> Avaliação da reutilização das enzimas lipase de <i>Aspergillus oryzae</i> (■), de <i>Candida antarctica</i> (■) e de <i>Pseudomonas cepacia</i> (■) através da atividade relativa obtida. As barras verticais indicam o desvio padrão (n=2). ..	73
<b>Figura 22.</b> Espectro de FTIR-ATR da nanopartícula pura. ....	75
<b>Figura 23.</b> Espectro de FTIR-ATR da lipase de <i>Candida antarctica</i> pura com destaque para os sinais relevantes. ....	75
<b>Figura 24.</b> A) Espectro das nanopartículas (–) e lipase de <i>Candida antarctica</i> (–) não imobilizadas (3650 – 650 cm <sup>-1</sup> ) e B) espectro das nanopartículas (–) e lipase de <i>Candida antarctica</i> (–) não imobilizadas com enfoque na região de <i>fingerprint</i> do espectro (1650 – 650 cm <sup>-1</sup> ).....	77
<b>Figura 25.</b> Espectro FTIR-ATR A) da nanopartícula pura (–), da mistura física (–) e da lipase de <i>Aspergillus oryzae</i> (–), B) da nanopartícula pura (–), da mistura física (–) e da lipase de <i>Candida antarctica</i> (–) e C) da nanopartícula pura (–), da mistura física (–) e da lipase de <i>Pseudomonas cepacia</i> (–). ....	78
<b>Figura 26.</b> Comparação dos espectros FTIR- ATR da mistura física (–) e da enzima imobilizada (–) para a lipase de <i>Aspergillus oryzae</i> . ....	79
<b>Figura 27.</b> Comparação dos espectros FTIR-ATR da mistura física (–) e da enzima imobilizada (–) para a lipase de <i>Candida antarctica</i> . ....	80

<b>Figura 28.</b> Comparação dos espectros FTIR-ATR da mistura física (–) e da enzima imobilizada (–) para a lipase de <i>Pseudomonas cepacia</i> .....	80
<b>Figura 29.</b> Efeito visual da adição da lipase de <i>Aspergillus oryzae</i> imobilizada em amostras não emulsionadas. A-C controle e D – F amostra. ....	82
<b>Figura 30.</b> Efeito visual da adição da lipase de <i>Candida antarctica</i> imobilizada em amostras não emulsionadas. A-C controle e D – F amostra. ....	83
<b>Figura 31.</b> Efeito visual da adição da lipase de <i>Pseudomonas cepacia</i> imobilizada em amostras não emulsionadas. A-C controle e D – F amostra. ..	84
<b>Figura 32.</b> Efeito visual da adição da lipase de <i>Aspergillus oryzae</i> imobilizada em amostras não emulsionadas. A-C controle e D – F amostra. ....	85
<b>Figura 33.</b> Efeito visual da adição da lipase de <i>Candida antarctica</i> imobilizada em amostras não emulsionadas. A-C controle e D – F amostra. ....	86
<b>Figura 34.</b> Efeito visual da adição da lipase de <i>Pseudomonas cepacia</i> imobilizada em amostras não emulsionadas. A-C controle e D – F amostra. ..	86
<b>Figura 35.</b> Espectros de FTIR-ATR das amostras A) não emulsionadas e B) emulsionadas após o ensaio de degradação. ....	89
<b>Figura 36.</b> Gráfico resultante da HCA dos espectros na região do infravermelho das amostras de petróleo bruto, controle não emulsionada e controle emulsionado, amostra não emulsionada degradada e amostra emulsionada degradada pela lipase de <i>Aspergillus oryzae</i> imobilizada. Onde: a) dendrograma relativo à degradação de amostras não emulsionadas e B) dendrograma relativo à degradação de amostras emulsionadas.....	90
<b>Figura 37.</b> Gráfico resultante da HCA dos espectros na região do infravermelho das amostras de petróleo bruto, controle não emulsionada e controle emulsionado, amostra não emulsionada degradada e amostra emulsionada degradada pela lipase de <i>Candida antarctica</i> imobilizada. Onde: a) dendrograma relativo à degradação de amostras não emulsionadas e B) dendrograma relativo à degradação de amostras emulsionadas.....	91
<b>Figura 38.</b> Gráfico resultante da HCA dos espectros na região do infravermelho das amostras de petróleo bruto, controle não emulsionada e controle emulsionado, amostra não emulsionada degradada e amostra emulsionada degradada pela lipase de <i>Pseudomonas cepacia</i> imobilizada. Onde: a) dendrograma relativo à degradação de amostras não emulsionadas e B) dendrograma relativo à degradação de amostras emulsionadas. ....	93

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1.</b> Classificação do petróleo conforme ° API .....	20
<b>Tabela 2.</b> Composição elementar do petróleo em percentual de peso.....	21
<b>Tabela 3.</b> Classes de enzimas conforme classificação da Comissão Internacional de Enzimas e alguns exemplos para cada classe.....	35
<b>Tabela 4.</b> Condições utilizadas nas análises de FTIR-ATR para sólidos e para líquidos.....	44
<b>Tabela 5.</b> Atividades enzimáticas das soluções de enzima livre utilizadas na imobilização e das respectivas soluções sobrenadantes. ....	69
<b>Tabela 6.</b> Relação entre as principais bandas das lipases segundo a literatura e as bandas obtidas nos espectros de FTIR-ATR para as enzimas avaliadas. ..	76
<b>Tabela 7.</b> Resultados da redução de massa de petróleo após o ensaio de degradação enzimática das amostras não emulsionadas. ....	87
<b>Tabela 8.</b> Resultados de carbono orgânico dissolvido para as amostras não emulsionadas após o ensaio de degradação. ....	94
<b>Tabela 9.</b> Resultados de carbono orgânico dissolvido para as amostras emulsionadas após o ensaio de degradação. ....	95

## Lista de Abreviaturas

**AOT** – Dioctilsulfosuccinato de sódio

**API** – Do inglês, *American Petroleum Institute*

**ASTM** – Do inglês, *American Society for Testing and Materials*

**CANE1** – Amostra controle 1 do ensaio de degradação não emulsionado

**CANE2** – Amostra controle 2 do ensaio de degradação não emulsionado

**COEM1** – Amostra controle 1 do ensaio de degradação emulsionado

**COEM2** – Amostra controle 2 do ensaio de degradação emulsionado

**CPNE1** – Amostra não emulsionada 1 degradada pela lipase de *Pseudomonas cepacia* imobilizada

**CPNE2** – Amostra não emulsionada 2 degradada pela lipase de *Pseudomonas cepacia* imobilizada

**DAEM1** – Amostra emulsionada 1 degradada pela lipase de *Aspergillus oryzae* imobilizada

**DAEM2** – Amostra emulsionada 1 degradada pela lipase de *Aspergillus oryzae* imobilizada

**DANE1** – Amostra não emulsionada 1 degradada pela lipase de *Aspergillus oryzae* imobilizada

**DANE2** – Amostra não emulsionada 2 degradada pela lipase de *Aspergillus oryzae* imobilizada

**DCEM1** – Amostra emulsionada 2 degradada pela lipase de *Candida antarctica* imobilizada

**DCEM2** – Amostra emulsionada 2 degradada pela lipase de *Candida antarctica* imobilizada

**DCNE221** – Amostra não emulsionada 1 degradada pela lipase de *Candida antarctica* imobilizada

**DCNE222** – Amostra não emulsionada 2 degradada pela lipase de *Candida antarctica* imobilizada

**DCNE241** – Amostra não emulsionada 3 degradada pela lipase de *Candida antarctica* imobilizada

**DCNE242** – Amostra não emulsionada 4 degradada pela lipase de *Candida antarctica* imobilizada

**DPEM1** – Amostra emulsionada 1 degradada pela lipase de *Pseudomonas cepacia* imobilizada

**DPEM2** – Amostras emulsionada 2 degradada pela lipase de *Pseudomonas cepacia* imobilizada

**E.C.** – Comissão enzimática do inglês, *Enzymatic comission*

**FTIR-ATR** – Espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier, do inglês *Fourier transform infrared-attenuated total reflectance*

**HCA** – Análise de Agrupamento por Métodos Hierárquicos, do inglês *Hierarchical cluster analysis*

**ITOPF** – Do inglês, *The International Tanker Owners Pollution Federation Limited*

**O/A** – Emulsão do tipo óleo em água

**°API** – grau API

**PB1, PB2** – Amostras de petróleo bruto analisadas por FTIR-ATR

**p-NP** – p-nitrofenol

**p-NPP** – p-nitrofenilpalmitato

**PS** – Poliestireno

**PU** – Poliuretano

**PVA** – Poliacetato de vinila

**RA** – Acidez residual, do inglês *Residual acidity*

**RSD** – Desvio Padrão Relativo

**U** – Unidade referente à atividade enzimática



## Sumário

<b>1 Introdução</b> .....	17
<b>2 Revisão Bibliográfica</b> .....	19
<b>2.1 Petróleo</b> .....	19
2.1.1 <i>Classificação</i> .....	19
2.1.2 <i>Composição</i> .....	20
2.1.3 <i>Economia</i> .....	24
2.1.4 <i>Petróleo no meio ambiente</i> .....	24
2.1.5 <i>Processos de intemperismo do petróleo</i> .....	26
2.1.6 <i>Métodos de remediação do petróleo</i> .....	29
<b>2.2 Enzimas</b> .....	32
2.2.1 <i>Lipases</i> .....	36
2.2.2 <i>Imobilização de enzimas</i> .....	38
2.2.3 <i>Uso de lipases na degradação de óleos</i> .....	40
<b>3 Objetivos</b> .....	42
<b>4 Materiais e métodos</b> .....	43
<b>4.1 Instrumentação</b> .....	43
<b>4.2 Reagentes e soluções</b> .....	45
<b>4.3 Otimização no preparo das emulsões para avaliação da incorporação do óleo</b> .....	46
<b>4.4 Análise gravimétrica</b> .....	47
<b>4.5 Determinação da atividade enzimática</b> .....	48
4.5.1 <i>Avaliação da influência do pH e da temperatura na atividade enzimática</i> .....	50
4.5.2 <i>Método da determinação da atividade enzimática para a enzima imobilizada</i> .....	50
4.5.3 <i>Atividade enzimática da solução sobrenadante</i> .....	51

<b>4.6 Síntese de nanopartículas .....</b>	<b>51</b>
<b>4.7 Imobilização das enzimas nas nanopartículas .....</b>	<b>53</b>
4.7.1 <i>Avaliação da imobilização pela Espectroscopia na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier.....</i>	53
<b>4.8 Ensaio de degradação enzimática do petróleo .....</b>	<b>53</b>
4.8.1 <i>Análise gravimétrica do petróleo após a degradação.....</i>	54
4.8.2 <i>Avaliação da degradação pela espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier.....</i>	54
4.8.3 <i>Medida de acidez residual.....</i>	55
4.8.4 <i>Determinação de carbono orgânico dissolvido.....</i>	55
<b>5 Resultados e Discussões .....</b>	<b>57</b>
<b>5.1 Otimização no preparo das emulsões sintéticas .....</b>	<b>57</b>
5.1.1 <i>Otimização dos parâmetros do dispersor mecânico.....</i>	57
5.1.2 <i>Otimização dos parâmetros da sonda de ultrassom .....</i>	60
<b>5.2 Avaliação da influência da temperatura e do pH na atividade enzimática .....</b>	<b>64</b>
5.2.1 <i>Avaliação do efeito da temperatura na atividade enzimática .....</i>	64
5.2.2 <i>Avaliação da influência do pH na atividade enzimática.....</i>	65
<b>5.3 Processo de imobilização das enzimas nas nanopartículas .....</b>	<b>67</b>
<b>5.4 Avaliação da imobilização das enzimas nas nanopartículas.....</b>	<b>68</b>
5.4.1 <i>Avaliação da solução sobrenadante.....</i>	68
5.4.2 <i>Avaliação da atividade das lipases imobilizadas.....</i>	70
5.4.3 <i>Avaliação do reuso das enzimas imobilizadas .....</i>	72
5.4.4 <i>Avaliação da imobilização por FTIR-ATR.....</i>	74
<b>5.5 Degradação enzimática do petróleo.....</b>	<b>81</b>
5.5.1 <i>Avaliação gravimétrica do petróleo após a degradação.....</i>	87
5.5.2 <i>Avaliação das HCAs.....</i>	88
5.5.3 <i>Acidez residual.....</i>	93

5.5.4 <i>Determinação de carbono orgânico dissolvido</i> .....	94
<b>5.6 Perspectivas</b> .....	95
<b>6 Conclusões</b> .....	96
<b>7 Referências</b> .....	99

## 1 Introdução

O uso mundial de combustíveis fósseis ainda é expressivo apesar do crescimento e incentivo ao uso de combustíveis renováveis. Devido a isso, a demanda pela exploração e refino de petróleo é significativa, o que faz com que grandes quantidades sejam diariamente transportadas nos mares e oceanos. Há diversos registros de acidentes que envolvem o derramamento de petróleo em mares e oceanos.<sup>1</sup> Um exemplo relativamente recente, foi o acidente que ocorreu no Brasil no ano de 2019 onde mais de 3000 km da costa litorânea do Nordeste foram contaminados. A extensão dos danos é extremamente variável e dependente da quantidade derramada e do plano de contingência adotado. Sendo assim, os impactos no meio ambiente, na saúde de quem teve contato com o petróleo e socioeconomicamente por vezes perduram por muitos anos e, em alguns casos, podem ser irreversíveis.<sup>2</sup>

Visto que muitas vezes não há como garantir que acidentes não irão ocorrer, é crescente o interesse em diversificar as técnicas de remediação já existentes uma vez que a tomada de decisão de quais técnicas devem ser utilizadas pode ser demorada já que é necessário entender o ecossistema afetado, a composição do óleo derramado bem como avaliar questões técnicas como acesso ao local, equipamentos disponíveis e possíveis de serem utilizados além de todo o custo de operação. É imprescindível que deva ser analisado caso-a-caso, o que dificulta a possibilidade de existir um sistema de resposta já previsto e planejado. Além disso, as técnicas já consolidadas possuem algumas desvantagens, como: se for utilizado o jateamento há riscos de espalhar o petróleo para alguma área não atingida e permitir maior penetração de óleo nessas regiões. Já o resultado do uso de dispersantes pode ser pior e mais tóxico causando danos adicionais após a contaminação do ambiente com o petróleo derramado. O uso de absorventes é problemático quando não há possibilidade de recuperá-lo de locais de difícil acesso.<sup>3</sup>

A biorremediação por micro-organismos já é um dos processos de intemperismo que ocorre após um derramamento tanto no solo quanto nos oceanos de maneira natural. Além disso, já é amplamente difundida na remediação de solos contaminados onde um dos métodos adotados é a bioaugmentação que consiste em adicionar micro-organismos exógenos à biota

do local a ser remediado.<sup>1</sup> Diversos estudos atentaram-se em isolar micro-organismos de locais contaminados com os mais diversos óleos para serem avaliados. Diversas enzimas são secretadas dependendo do tipo de micro-organismo e a enzima lipase frequentemente é excretada por micro-organismos envolvidos na degradação de óleos.<sup>4</sup>

As lipases têm a capacidade de atuar em óleos porque catalisam a hidrólise de triacilglicerol, preferencialmente, em uma interface óleo-água. Além disso, podem catalisar reações de interesterificação, esterificação, aminólise e alcoólise. As lipases apresentam uma característica valiosa que é a capacidade de serem seletivas quimicamente, regioquimicamente e enantiosseletivamente.<sup>5</sup> Por isso, o potencial de aplicação de diferentes lipases nos mais diversos tipos de óleos vem sendo avaliado, seja na hidrólise de algum óleo ou na avaliação da sua capacidade em degradar rejeitos oleosos nas indústrias.<sup>6</sup>

Apesar dos benefícios, o uso de enzimas livres muitas vezes é indesejado devido à sua instabilidade e por não haver possibilidade de reuso. Uma alternativa que vem sendo amplamente aplicada na indústria, é a imobilização das enzimas em algum tipo de suporte a fim de otimizar tanto a sua estabilidade quanto a sua possibilidade de reuso. Além de diminuir custos, o uso de enzimas imobilizadas pode ser uma alternativa mais sustentável em muitos casos devido à remoção da enzima do meio.<sup>7</sup>

Nesse contexto, no presente trabalho, foi proposta uma alternativa em escala laboratorial para a remediação de petróleo disperso em águas salinas empregando três diferentes tipos de lipase imobilizadas em nanopartículas magnéticas. Para isso, foram avaliadas a formação de emulsões sintéticas, as condições otimizadas de pH e temperatura para melhor atividade das enzimas, a síntese de nanopartículas magnéticas e a imobilização das lipases nas mesmas para então avaliar a capacidade das lipases imobilizadas na degradação do petróleo.

## 2 Revisão Bibliográfica

### 2.1 Petróleo

Há milhões de anos ocorreu a formação de petróleo na Terra. A teoria orgânica sugere que houve decomposição de materiais de origem animal e vegetal e, devido ao acúmulo desses à estratos sedimentares, houve formação de matéria orgânica. A soma dos efeitos de calor e pressão sobre a matéria orgânica conduziu a formação de petróleo.<sup>8</sup> Já os reservatórios de petróleo são formados quando o petróleo migra de sua rocha matriz, onde foi gerado, através da ação de pressões do subsolo até uma rocha porosa. Quando essa rocha é envolta por uma rocha impermeável, há o aprisionamento do petróleo entre as rochas. A partir desses reservatórios, ocorre a exploração.<sup>9</sup>

#### 2.1.1 Classificação

O petróleo, conforme a definição D-4175 da *American Society for Testing and Materials* (ASTM), é definido como uma mistura de hidrocarbonetos de ocorrência natural que também pode conter compostos de enxofre, nitrogênio, oxigênio, metais e outros elementos. Além disso, geralmente o petróleo é encontrado no estado líquido nas condições normais de temperatura e pressão.<sup>10</sup>

O reservatório de origem do petróleo influencia em suas características. Portanto, petróleos obtidos a partir de diferentes reservatórios possuem propriedades diferentes como cor, odor, viscosidade, densidade, entre outros. De modo a conhecer a constituição do petróleo, o *American Petroleum Institute* (API), através de análises de diversos petróleos, com origens distintas, definiu que:

- i) Os petróleos possuem em suas constituições, os mesmos hidrocarbonetos, mas em diferentes quantidades.
- ii) Entre os diversos tipos de petróleos, há grande variação na quantidade relativa dos grupos de hidrocarbonetos, o que ocasiona as diferentes características entre os tipos de petróleos.<sup>11</sup>

Além dessas definições, a fim de classificar os diferentes petróleos, o API desenvolveu uma medida conhecida como Grau API ( $^{\circ}$ API). O valor, expresso

em termos de ° API, é baseado na densidade relativa dos derivados de petróleo em relação à água e é determinado através da Equação 1:

$$^{\circ} \text{API} = \frac{141,5}{d_{15,6/15,6^{\circ} \text{C}}} - 131,5 \quad (1)$$

Onde  $d_{15,6/15,6^{\circ} \text{C}}$  representa a razão entre a densidade do óleo e da água a 15,6 °C.<sup>12</sup>

A densidade é inversamente proporcional ao °API portanto os petróleos de baixa densidade, denominados leves, possuem elevados valores de °API. Enquanto os petróleos mais densos, conhecidos como pesados, possuem valores de °API menores.<sup>13</sup> A classificação dos tipos de petróleo conforme o °API está apresentada na Tabela 1.

**Tabela 1.** Classificação do petróleo conforme ° API.

° API	Classificação
API < 10	Extrapesado
10 < API < 30	Pesado
30 < API < 40	Médio
API > 40	Leve

Adaptado de Al-Dahhan *et al*, 2019.<sup>14</sup>

### 2.1.2 Composição

Independentemente da origem dos petróleos, todos possuem hidrocarbonetos como seus componentes principais. Apesar da diferença de composição entre os diversos petróleos, salvo poucas exceções, a proporção dos elementos (C, H, N, O, S e metais) que os constituem varia dentro dos limites determinados para cada elemento apresentados na Tabela 2.<sup>12</sup>

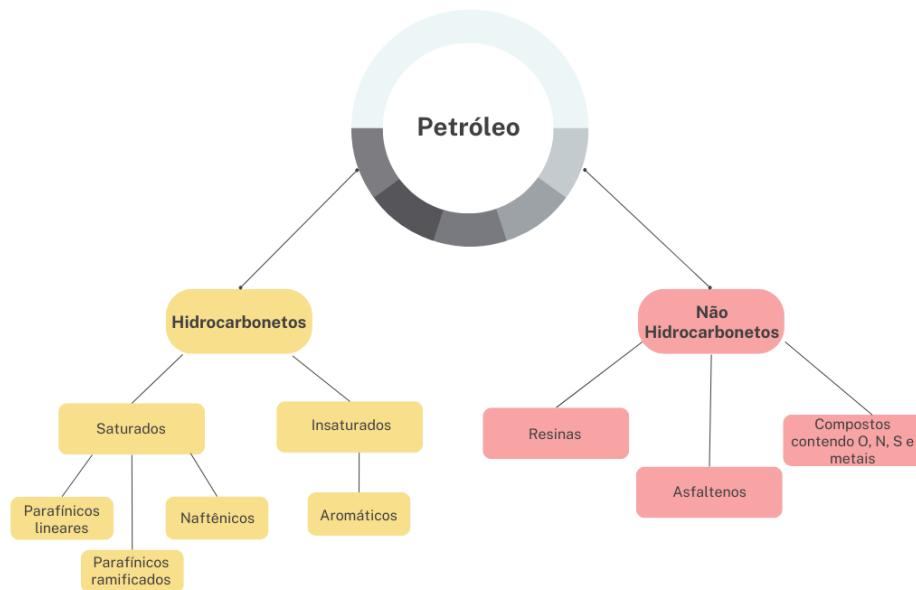
**Tabela 2.** Composição elementar do petróleo em percentual de peso.

<b>Elemento</b>	<b>Percentual em peso (%)</b>
Carbono	83 – 87
Hidrogênio	10 – 14
Nitrogênio	0,1 – 2
Oxigênio	0,05 – 1,5
Enxofre	0,05 – 6
Metais	< 1000 ppm

Fonte: Adaptado de Speight.<sup>12</sup>

Os compostos formados pelos elementos no petróleo são classificados em duas categorias: hidrocarbonetos e não hidrocarbonetos. Os hidrocarbonetos presentes no petróleo são divididos entre hidrocarbonetos saturados e insaturados. Sendo que os saturados podem ser de cadeia normal, ramificada ou cíclica e os insaturados são essencialmente aromáticos uma vez que olefinas são estruturas praticamente ausentes no petróleo. Outra classificação comumente adotada para os hidrocarbonetos é dividi-los entre parafínicos, naftênicos e aromáticos.<sup>15</sup> Na categoria dos não hidrocarbonetos estão incluídos os asfaltenos, as resinas, os compostos sulfurados, os compostos oxigenados, os compostos nitrogenados e os compostos organometálicos.<sup>16</sup> A Figura 1 apresenta um esquema dos grupos constituintes do petróleo divididos em hidrocarbonetos e não hidrocarbonetos.





**Figura 1.** Esquema ilustrativo dos compostos constituintes do petróleo. Fonte: Adaptado de Farah.<sup>16</sup>

As cadeias de hidrocarbonetos que constituem o petróleo possuem tamanhos moleculares que variam, usualmente, de um a sessenta carbonos em sua estrutura. Em função disso, as temperaturas de ebulição dos hidrocarbonetos também são variáveis e, nas frações com maiores temperaturas de ebulição, a separação dos hidrocarbonetos é complexa e difícil.<sup>17</sup>

Os hidrocarbonetos parafínicos são alcanos de cadeia normal (linear) ou ramificada e não contém qualquer anel em sua estrutura.<sup>5</sup> Cerca de 15 a 20% do petróleo bruto corresponde à n-alcanos lineares de  $C_1$  a  $C_{40}$ <sup>15</sup> e, nas frações leves com temperaturas de ebulição até 120 °C, são predominantes em relação aos parafínicos ramificados. A partir dessa temperatura, há equilíbrio entre os dois tipos de parafínicos e os parafínicos ramificados terão predominância em frações com temperaturas de ebulição a partir de 150 °C.<sup>16</sup>

Os hidrocarbonetos naftênicos são alcanos saturados contendo em sua estrutura pelo menos um anel com pelo menos uma cadeia lateral parafínica.<sup>5</sup> Os naftênicos correspondem a cerca de 30 a 60% dos componentes do petróleo bruto e fazem parte das frações que contém pelo menos cinco carbonos.<sup>17</sup>

Os aromáticos são hidrocarbonetos que contém pelo menos um anel aromático na estrutura. Como substituintes do anel, podem existir cadeias parafínicas e naftênicas. Os aromáticos são pouco presentes nas frações leves

e médias do petróleo, mas são nas frações pesadas e residuais que aparecem em maiores quantidades.<sup>16</sup>

Nem todos não hidrocarbonetos presentes na composição do petróleo podem ser considerados como contaminantes, uma vez que as resinas e os asfaltenos têm suma importância para o óleo combustível e o asfalto, ambos derivados do petróleo. Já os contaminantes estão atrelados a diversos problemas, por isso, na maioria das vezes, devem ser removidos do petróleo. Além disso, podem ocorrer em toda a faixa de ebulição do petróleo, mas usualmente, quanto maiores as temperaturas de ebulição, maiores as concentrações de contaminantes.<sup>16</sup>

O enxofre, conforme a Tabela 2, é o heteroátomo mais frequentemente encontrado no petróleo bruto, até 6% em peso. A presença dos compostos de enxofre é indesejada dado que esses compostos apresentam propriedades indesejáveis como odor e possibilidade de envenenamento do catalisador devido à formação de SO<sub>2</sub> por combustão. Para sanar esses problemas, são necessários processos de refino para eliminar os compostos contendo enxofre.<sup>18</sup>

Apesar dos compostos oxigenados não serem abundantes no petróleo bruto, conforme a Tabela 2, até 1,5% em peso, esses compostos são os responsáveis pela acidez do petróleo. O principal problema relacionado à compostos oxigenados é devido à presença de ácidos naftênicos, pois podem causar corrosão nos equipamentos de refino. Os compostos nitrogenados são encontrados principalmente nas frações de petróleo com ponto de ebulição acima de 250 °C. A piridina é um potencial veneno para catalisadores ácidos uma vez que pode conferir caráter básico ao petróleo bruto.<sup>18</sup>

As resinas e os asfaltenos são os constituintes de maior peso molecular do petróleo bruto. São formados por camadas de anéis aromáticos policíclicos ou por núcleos nafteno-aromáticos condensados ligados através de cadeias saturadas. Há presença de heteroátomos de oxigênio, nitrogênio e enxofre e também de metais, principalmente níquel e vanádio.<sup>15</sup>

Os metais, por sua vez, são os componentes minoritários do petróleo bruto e estão, geralmente, presentes em níveis traços. Os metais que podem ser encontrados são V, Ni, Fe, Na, Ca, Cu e U.<sup>17</sup> Os metais devem ser removidos do petróleo quando deseja-se convertê-lo em combustíveis uma vez que os metais envenenam os catalisadores empregados nos processos de refino.<sup>12</sup>

### 2.1.3 Economia

O petróleo ainda é considerado como um insumo essencial devido à extrema dependência dos seus derivados na matriz energética mundial. É necessário para os setores agrícola, industrial, de mineração e de comércio. O petróleo, gás natural e demais fontes de energia são *commodities* e seus preços influenciam diretamente a economia mundial devido à dependência e a desigualdade da distribuição geográfica das reservas.<sup>19</sup>

A produção mundial de petróleo em 2022 foi de 93,8 milhões de barris/dia apresentando um crescimento de 4,2% em relação ao ano de 2021. Sendo os Estados Unidos responsáveis pela maior produção mundial, média de 17,8 milhões de barris/dia, representando 18,9% do petróleo produzido no mundo. A Arábia Saudita foi a segunda maior produtora mundial, com média de 12,1 milhões de barris/dia, sendo 12,9% do total mundial. Já o Brasil foi o 9º maior produtor de petróleo sendo responsável por 3,3% da produção mundial 3,1 milhões de barris/dia.

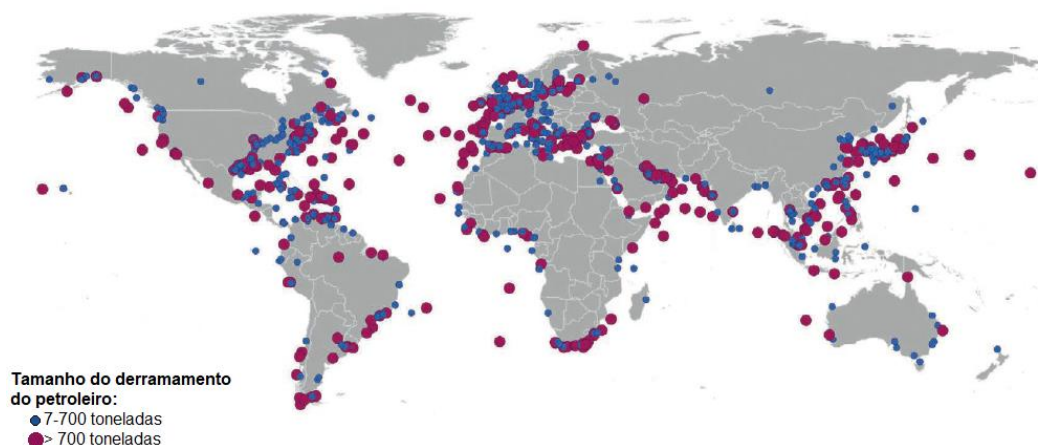
O consumo mundial de petróleo foi de 97,3 milhões de barris/dia. Também houve crescimento do consumo de petróleo mundial no ano de 2022, 3,1% em relação a 2021, totalizando 97,3 milhões de barris/dia. Assim como é o maior produtor, os Estados Unidos são os maiores consumidores de petróleo, 19,1 milhões de barris/dia sendo responsáveis pelo consumo de 19,7% do total mundial. O segundo maior consumidor mundial foi a China, consumindo a média de 14,3 milhões de barris/dia, representando 14,7% do total mundial. O Brasil, assim como em 2021, manteve-se em nono lugar consumindo cerca de 2,5 milhões de barris/dia, representando 2,6% do total mundial. Entretanto, houve um aumento no consumo brasileiro de 4,9% em relação ao ano de 2021. Esses dados indicam que ainda há enorme dependência mundial de petróleo.<sup>20</sup>

### 2.1.4 Petróleo no meio ambiente

Devido à grande dependência mundial por petróleo e seus derivados, existem diversos tipos de infortúnios relacionados à extração e transporte dos mesmos. Há registros mundiais de vazamento de oleodutos, de plataformas *offshore*, plataformas de perfuração e poços, derramamentos de petroleiros, de

caminhões tanques, nas refinarias de óleos, que ocasionam não só perdas de petróleo, mas também inúmeros prejuízos ambientais e sociais. No Delta do Niger, na Nigéria, ocorrem vazamentos regulares nos oleodutos e, estima-se que em um período de 50 anos, 1,5 milhões de toneladas foram alastradas. As maiores contaminações ocorrem em campos agrícolas e nas fontes de água potável, afetando diretamente a saúde da população local.<sup>21</sup>

Os derramamentos acarretados por navios petroleiros equivalem a cerca de 13% da poluição de petróleo nos oceanos.<sup>22</sup> Na Figura 2 estão representados os derramamentos que ocorreram no período compreendido entre 1970 – 2021. Nesse período, cerca de 5,87 milhões de toneladas de óleo foram derramadas nos oceanos. Entre as possíveis causas, as mais comuns são colisões e aterramentos dos navios.<sup>23</sup> As consequências ambientais e ecológicas estão diretamente correlacionadas ao tipo e volume de óleo alastrado, bem como às condições do meio que podem induzir a mistura do óleo com a água, a quebra dos hidrocarbonetos ou à dispersão deste para áreas inicialmente não atingidas. Em consequência disso, há variação dos prejuízos para a vida marinha que também dependem da vulnerabilidade das espécies frente ao óleo derramado.<sup>24</sup>



**Figura 2.** Mapa mundial com os registros de derramamento por navios petroleiros no período de 1970-2021. Adaptado de ITOPF.<sup>23</sup>

Os corais são amplamente afetados uma vez que a interação com o óleo derramado provoca à intoxicação e morte dos mesmos. Com isso, os efeitos são observados à longo prazo uma vez que a redução da abundância dos mesmos reduz a sua capacidade reprodutiva. Os mamíferos marinhos e os peixes são suscetíveis à inalação ou ingestão do óleo que podem provocar efeitos agudos.

Se houver persistência do óleo no meio, há tendência de mortalidade contínua.<sup>22,24</sup> Em suma, a contaminação e a bioacumulação associada, comprometem os sistemas ecológicos marinhos porque há alterações nas comunidades ecológicas, nas funções dos ecossistemas, além de afetar a fisiologia dos organismos contaminados.

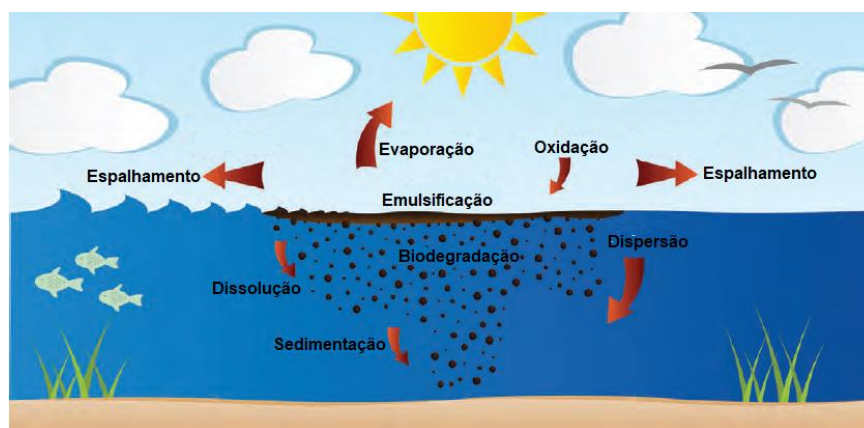
Os derramamentos afetam não só a vida marinha, mas também em aspectos socioeconômicos e a saúde das comunidades locais e costeiras. Para as comunidades locais, as consequências são proporcionais ao grau da exposição ao óleo e podem ter efeitos imediatos na saúde devido à contaminação. Os sintomas físicos imediatos mais comuns são irritações cutâneas, sintomas respiratórios, dores abdominais e náuseas. Ainda, efeitos irreversíveis podem se manifestar a longo prazo, como o câncer. Já os impactos econômicos associados aos derramamentos podem ser a contaminação de culturas agrícolas, redução nas vendas de frutos do mar e menor atividade no setor de turismo alterando o fluxo econômico da região contaminada.<sup>25</sup>

O acidente que ocorreu na costa do Nordeste do Brasil em 2019 é um exemplo negativo na tomada de decisões que deve acontecer após um derramamento. Houve negligência e, por isso, não houve a implementação de um bom plano de mitigação acarretando no envolvimento voluntário de moradores da região para a remoção manual do óleo.<sup>26</sup> Cerca de 12500 m<sup>3</sup> de óleo foram derramados por um petroleiro grego afetando cerca de 3000 km da costa brasileira e pelo menos 55 áreas de proteção ambiental foram contaminadas. O acidente foi considerado como o maior ocorrido na América do Sul devido à extensão e aos impactos ecológicos e sociais.<sup>2</sup> Em vista disso, há extrema necessidade de existir um planejamento eficaz das políticas e ações de limpeza do óleo, além do aprimoramento das técnicas já existentes de remediação e desenvolvimentos de novas possibilidades.<sup>25</sup>

#### *2.1.5. Processos de intemperismo do petróleo*

São diversas as transformações que o óleo sofre após um derramamento e essas podem ser divididas em transformações relacionadas ao movimento do óleo no ambiente e ao intemperismo que reúne uma série de processos que alteram tanto características físicas quanto químicas do óleo após o

derramamento. Ambos os tipos de transformações, ilustrados na Figura 3, podem ocorrer simultaneamente e são influenciados não só pelo tipo de óleo derramado, mas também pelas condições climáticas durante e após o derramamento.<sup>27</sup>



**Figura 3.** Representação das transformações relacionadas ao movimento do óleo e ao intemperismo em um óleo derramado no mar. Fonte: Adaptado de ITOPF.<sup>28</sup>

O espalhamento do óleo na superfície do mar inicia-se imediatamente após um derramamento possuindo maior efeito nas primeiras horas e, no intervalo máximo de dois dias, tem ação reduzida. Usualmente há formação de manchas na superfície com espessuras variáveis, podendo relacionar a variação com o tipo de produto derramado. Por exemplo, produtos mais leves como gasolina, óleo diesel e óleos crus leves promovem manchas muito finas enquanto os petróleos mais pesados geram manchas com alguns centímetros de espessura.<sup>29</sup> A turbulência promovida pelas ondas, o fluxo da maré e as correntes marítimas influenciam fortemente na quebra das manchas em diversos fragmentos e na velocidade do espalhamento.<sup>28</sup>

A evaporação é um dos processos de intemperismo mais importantes porque auxilia na redução da quantidade de óleo presente nas águas através da evaporação dos componentes mais voláteis, geralmente, dos compostos com temperatura de ebulição abaixo de 200 °C. Assim como no espalhamento do óleo, nas primeiras horas após um derramamento é onde ocorre a maior taxa de evaporação dos compostos, com redução considerável do processo ao longo do tempo. Entretanto, podem ocorrer aumentos na densidade e na viscosidade do

óleo remanescente na superfície, podendo afetar tanto os demais processos de intemperismo quanto as técnicas de remoção de óleo a serem utilizadas.<sup>29</sup>

A emulsificação é a mistura do óleo e da água do mar em uma única fase e é um dos processos mais impactantes do intemperismo porque pode aumentar o volume do poluente no meio em até cinco vezes. A estabilidade das emulsões formadas é variável. As emulsões mais instáveis são menos danosas porque com condições marítimas brandas e com aquecimento solar, as fases podem se separar. Entretanto, as emulsões estáveis são persistentes na superfície e na costa marítima e, além de aumentar o volume do óleo, reduzem a disponibilidade do mesmo para os demais processos de intemperismo e interferem na escolha das técnicas de remediação.<sup>28</sup>

A dispersão do óleo é a quebra do mesmo em gotas de diferentes tamanhos. Isso ocorre devido à energia fornecida pelo movimento do mar e dos ventos que é suficiente para ultrapassar a tensão superficial da interface óleo e água permitindo a redução de manchas de óleo a gotas.<sup>30</sup> Quando as condições são favoráveis, a dispersão do óleo é realizada em um grande volume de água e a concentração é rapidamente reduzida. Devido a isso, a área superficial do óleo é ampliada o que favorece a dissolução, sedimentação e biodegradação do óleo.<sup>28</sup> Já a dissolução engloba somente os hidrocarbonetos de baixo peso molecular, geralmente, aromáticos, pois são levemente solúveis na água. Entretanto, devido a volatilidade desses compostos, a dissolução máxima acontece imediatamente após o derramamento sem contribuir significativamente na quantidade de óleo presente.<sup>29</sup>

A luz do sol e a presença de oxigênio, promovem a foto-oxidação do óleo. A reação entre os hidrocarbonetos e o oxigênio pode formar produtos solúveis na água do mar e alcatrão. É um processo lento, mas pode ser prejudicial devido à formação de produtos intermediários que dificultam a remoção do óleo.<sup>28</sup>

A sedimentação é a deposição do óleo no fundo do mar devido à interação das gotas do óleo disperso com partículas de sedimento e matérias orgânicas suspensas na água. É prejudicial porque como a degradação do óleo ocorre no fundo do mar, a biota marinha é diretamente afetada. Além disso, conforme acontecem os processos de intemperismo, o óleo torna-se mais adesivo e sua composição residual torna-se de difícil degradação já que é composta por asfaltenos e aromáticos de maior massa molecular. Por isso, a longo prazo, é

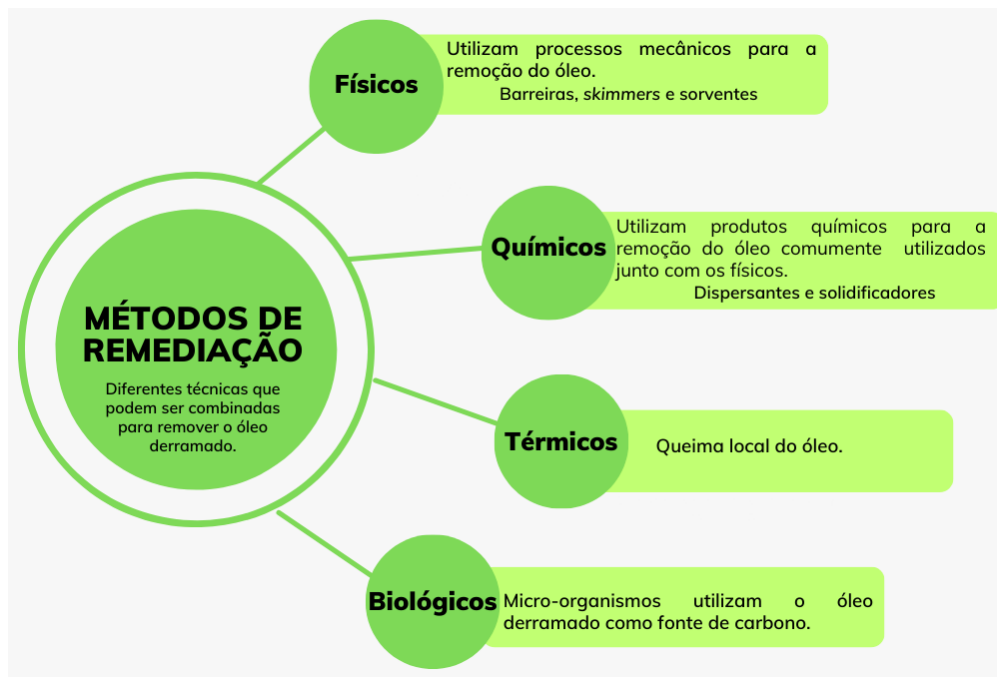
um dos processos de intemperismo que promove maiores acúmulos de óleo derramado no meio ambiente.<sup>29</sup>

A biodegradação do óleo acontece quando micro-organismos presentes nas águas salinas, como fungos, bactérias e leveduras, utilizam o óleo como fonte de carbono e energia onde cada tipo de micro-organismo possui predisposição a atuar em um grupo funcional específico do óleo. Geralmente, a degradação resulta em hidrocarbonetos intermediários aos originais, mas também pode resultar em dióxido de carbono e água. Entretanto o processo é extremamente limitado devido às características do óleo, a área superficial de óleo, a disponibilidade oxigênio e nutrientes como nitrogênio e fósforo bem como é influenciado pela temperatura do meio. No entanto, a biodegradação só ocorre com os micro-organismos presentes na interface da água e do óleo porque os demais que habitam abaixo da superfície da água, obtém oxigênio e nutrientes da própria água do mar. Portanto, a biodegradação natural do óleo derramado ocorre em taxas lentas tornando-se irrelevante frente aos demais processos de intemperismo.<sup>28</sup>

#### *2.1.6 Métodos de remediação do petróleo*

Os métodos de remediação são técnicas utilizadas visando a remoção do óleo derramado dos ambientes contaminados. Os métodos são classificados em quatro categorias conforme seu modo de ação: físicos, químicos, térmicos e biológicos. Na Figura 4, estão apresentadas as categorias bem como os métodos de remediação. Após um derramamento, a resposta dos órgãos responsáveis em avaliar a melhor estratégia de limpeza deve ser rápida e eficiente. Os métodos raramente são utilizados individualmente. Por isso, é necessário avaliar as alterações nas características do óleo bem como as vantagens e desvantagens das técnicas, discutidas abaixo, para permitir que sejam combinadas e proporcionarem uma remediação efetiva.<sup>31</sup>





**Figura 4.** Classificação dos métodos de remediação e seus respectivos exemplos. Fonte: Baseado em Fingas.<sup>27</sup>

As barreiras flutuantes auxiliam na contenção, concentração e deflexão do óleo derramado. A concentração do óleo é uma consequência da contenção já que ao evitar um maior espalhamento na superfície, há concentração do óleo na área delimitada e, conseqüentemente, ocorre um aumento na espessura da mancha de óleo facilitando a posterior recuperação. Além disso, pode-se desviar o óleo de locais biologicamente sensíveis e de locais economicamente importantes para pontos de coletas planejados ao longo da costa onde será posteriormente removido. Essas barreiras são amplamente utilizadas devido à variedade de tamanhos, materiais e configurações que podem ser obtidos. Entretanto, há limitações relacionadas ao espalhamento do óleo na superfície além da influência sofrida pelo movimento da água, permitindo que o óleo escape das barreiras.<sup>32</sup>

A recuperação do óleo contido pelas barreiras é usualmente realizada pelo uso de equipamentos mecânicos chamados *skimmers* que bombeiam o óleo para unidades de armazenamento. Frente à métodos térmicos e químicos, apresenta a vantagem de não alterar a composição do petróleo viabilizando o seu reprocessamento. Entretanto, a eficiência dos *skimmers* está relacionada com a espessura da mancha do óleo. Por isso, a redução da espessura devido aos processos de intemperismo e à emulsificação do óleo com a água impedem

o uso efetivo dos *skimmers*. Ademais, existem problemas relacionados às condições severas do mar bem como ao entupimento dos equipamentos.<sup>31</sup>

Os materiais sorventes de óleo, ou seja, aqueles que absorvem ou adsorvem o mesmo em sua estrutura, são provenientes de diversas fontes como materiais orgânicos (cascas, bagaço de resíduos de cana-de-açúcar, palha, etc.), materiais inorgânicos (vermiculita e pedra pome) e produtos sintéticos (espumas, etc.). Entretanto, apesar da diversidade de sorventes disponíveis parecer atrativa, há dificuldades relacionadas ao controle da área de aplicação, à dificuldade de recuperar os sorventes no mar e ao armazenamento ou descarte dos mesmos. Por isso, para evitar problemas ou contaminações secundárias, o uso de materiais sorventes usualmente ocorre no estágio final de limpeza da costa em conjunto com a lavagem da mesma.<sup>33</sup>

O uso de dispersantes químicos é uma alternativa usual de remediação quando há limitações de recursos ou de condições climáticas que desfavoreçam a aplicação de outras técnicas. A aplicação pode ser realizada a partir de embarcações ou por pulverização e acentua a dispersão que acontece naturalmente, formando gotas de maior área superficial que são diluídas na água e facilitando à biodegradação. Entretanto, o uso de dispersantes pode ser limitado pelas condições do mar. Por exemplo, mares muito agitados tendem a submergir o óleo que, conseqüentemente, não terá contato com o dispersante. Além disso, as características do óleo também afetam a eficácia uma vez que óleos mais viscosos tendem à não dispersar e os demais processos de intemperismo podem alterar as características do óleo sendo necessário determinar uma janela de oportunidade de aplicação de dispersantes que variam de algumas horas do derramamento a alguns dias.<sup>30</sup>

A solidificação do óleo líquido em um composto sólido ocorre devido ao uso de materiais poliméricos que rapidamente reagem e se misturam ao óleo, o solidificando. Geralmente essa técnica é utilizada para prevenir a propagação de manchas pequenas e evitar a contaminação de áreas e animais selvagens, mas deve ser aplicada logo após o incidente. Entretanto, o material sólido precisa ser rapidamente removido do ambiente contaminado ou dificulta a implantação de outras medidas como o uso de *skimmers* e barreiras.<sup>29</sup>

A queima do óleo no local do derramamento é uma prática que foi adotada como técnica de limpeza no derramamento no Golfo do México em 2010. É uma

técnica controversa, pois apesar de emitir grandes quantidades de fumaça preta e possivelmente tóxica, permite a remoção de grandes quantidades de óleo em áreas extensas e, muitas vezes, de difícil acesso. Além disso, pode ser aplicada simultaneamente com as demais técnicas de limpeza e é considerada uma técnica de um único passo, pois os resíduos a serem recolhidos são praticamente inexistentes e não necessitam de um descarte posterior.<sup>29</sup>

A biorremediação é a técnica em que o potencial em degradar petróleo de micro-organismos como bactérias e fungos, em conjunto com suas enzimas, é explorado para reestabelecer a qualidade do ambiente contaminado. É considerada uma técnica vantajosa e sustentável, pois tem poucos impactos consideráveis ao meio ambiente e a aplicação *in situ* pode ser facilitada. É uma influência externa que auxilia e acelera a biodegradação que ocorre naturalmente no intemperismo do óleo e pode ser realizada de duas formas diferentes: bioestimulação e bioaugmentação. A bioestimulação é a adição de nutrientes, geralmente oxigênio, nitrogênio e fósforo, para favorecer e estimular os micro-organismos já existentes no local a realizarem a biorremediação. Geralmente, é aplicada em solos contaminados. A bioaugmentação é a adição de diferentes micro-organismos que possuem certa afinidade ao óleo para que promovam a biorremediação.<sup>34</sup>

Essa técnica ganhou notoriedade pois foi utilizada na remediação do óleo derramado no acidente de *Exxon Valdez*, no Alasca em 1989, pois até então era utilizada apenas na limpeza de solos contaminados. Esse acontecimento alavancou os estudos em que micro-organismos atuam na degradação de petróleo e outros tipos de óleo. Como diversas enzimas são secretadas por plantas, fungos e bactérias, a avaliação do efeito das mesmas na degradação de petróleo vem ganhando foco.<sup>35</sup>

## **2.2 Enzimas**

As enzimas são constituídas por aminoácidos e, dessa forma, são proteínas com conformações complexas que são classificadas como estruturas: primária, secundária, terciária e quaternária. A integridade da conformação proteica é essencial para que a enzima mantenha a sua atividade catalítica. De modo contrário, se a enzima é desnaturada ou dissociada em subunidades de

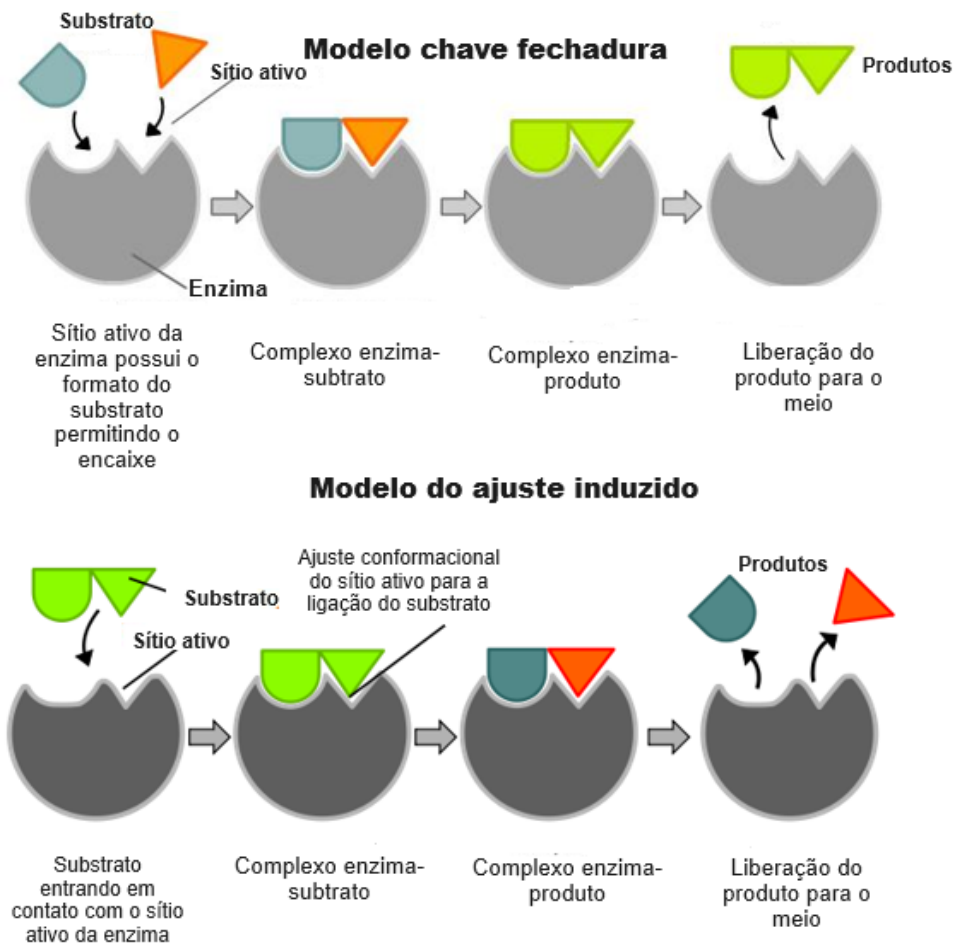
aminoácidos, a atividade catalítica pode ser reduzida a zero. A atividade catalítica das enzimas é a capacidade das mesmas em catalisar reações. Isso ocorre devido a redução da energia de ativação e, conseqüentemente, aumento da taxa da reação. Dessa forma, as reações ocorrem de forma mais rápida e eficaz.<sup>36</sup>

A reação ocorre entre a enzima (E) e o substrato (S), moléculas que são modificadas pelas enzimas, formando um estado de transição (ES) e, como resultado final, há a formação do produto e liberação da enzima para o meio de forma inalterada:



Na estrutura das enzimas, existem resíduos de aminoácidos que formam sítios ativos altamente específicos ao substrato. Para que a ligação ocorra, há a necessidade de que os sítios ativos estejam expostos e disponíveis aos grupos funcionais do substrato. Essa conformação tridimensional altamente específica só é alcançada quando ocorrem dobramentos e torções na cadeia polipeptídica da enzima. Uma vez expostos, acontece a ligação com o substrato por atração iônica, ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas e interações de Van der Waals, formando o estado de transição.<sup>37</sup>

Para justificar a alta especificidade entre as enzimas e os substratos, Emil Fischer propôs o modelo chave-fechadura (Figura 5) que considera que os sítios ativos da enzima são estruturalmente complementares aos substratos e que há um encaixe preciso entre eles, assim como uma chave em sua fechadura correspondente. Mas para isso acontecer, a enzima deveria ser estruturalmente rígida. Como é conhecido que existem dobramentos e torções na estrutura das enzimas, Koshland adaptou o modelo chave-fechadura e propôs o modelo do ajuste induzido. Nesse modelo, a estrutura da enzima é considerada flexível e molda-se para que ocorra o encaixe preciso com o substrato possibilitando que ocorra a atividade enzimática.<sup>37</sup>



**Figura 5.** Representação do modelo chave-fechadura (metade superior) e modelo de ajuste induzido (metade inferior). Fonte: Adaptado de *A level biology*.<sup>38</sup>

As enzimas são extremamente sensíveis às alterações na concentração do substrato, no pH e na temperatura. O aumento da concentração do substrato segue um perfil em que inicialmente, eleva a velocidade da reação, mas que após determinada concentração ocorre a formação de um patamar indicando que, por mais que a concentração continue sendo aumentada, a velocidade da reação seguirá a mesma.<sup>36</sup> Como os aminoácidos contêm grupamentos amino ionizáveis, alterações no pH promovem ionizações nos grupos e a formação de cargas momentâneas que modificam a conformação das enzimas e, como consequência, prejudicam a ligação do substrato com a enzima. O pH ótimo é aquele em que a enzima apresenta atividade máxima e pode ser obtido experimentalmente. O incremento da temperatura, reflete no aumento da energia cinética e, por conseguinte, as enzimas têm mais probabilidade de encontrar o

substrato. Entretanto, é necessário determinar a temperatura ótima, pois elevadas temperaturas promovem o rompimento de ligações de modo irreversível, ocasionando a desnaturação das enzimas e inativação das mesmas.

A Comissão Internacional de Enzimas sistematizou a classificação das mesmas através de seis classes considerando o tipo de reações que catalisam. Além disso, cada enzima possui um número de classificação, precedido pela sigla E.C., *Enzyme Commission*, e é composto por quatro dígitos que indicam a classe, sub-classe, grupos químicos específicos que participam da reação e a enzima específica. Na

Tabela 3, estão apresentadas as classes de enzimas bem como as reações que catalisam e exemplos de cada classe.<sup>39</sup>

**Tabela 3.** Classes de enzimas conforme classificação da Comissão Internacional de Enzimas e alguns exemplos para cada classe.

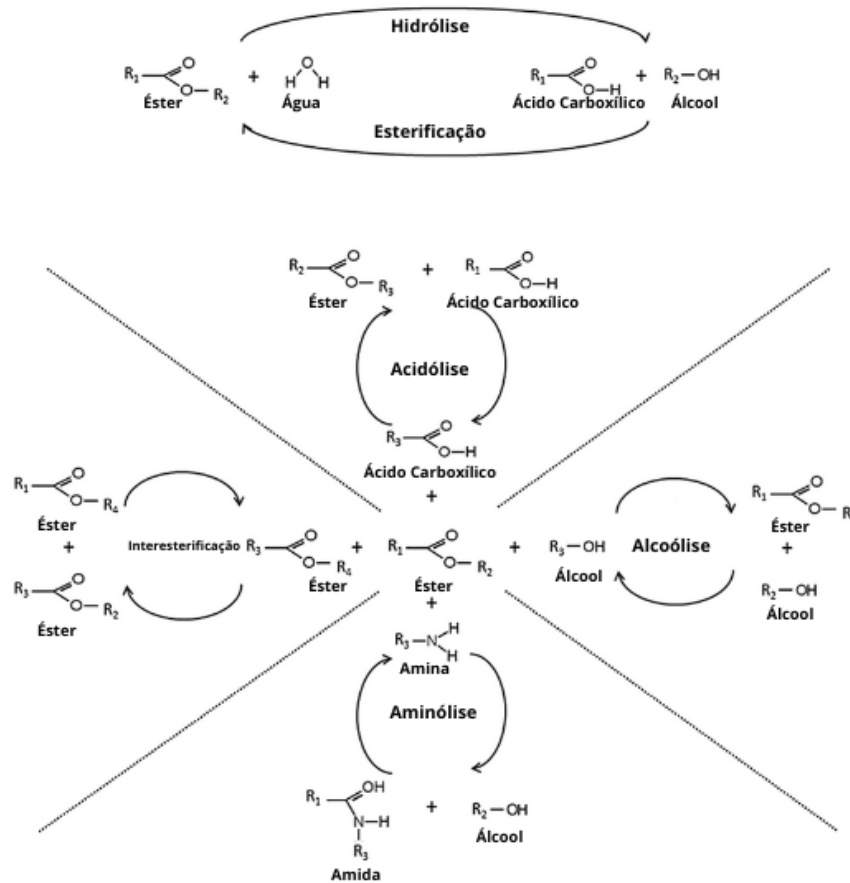
<b>Classe</b>	<b>Reação que catalisa</b>	<b>Exemplos</b>
1. Oxiredutases	Reações de oxidação-redução ou transferência de elétrons.	Oxigenases Oxidases Peroxidases
2. Transferases	Transferem grupos funcionais como amina, fosfato, acil, carboxil, entre moléculas.	Quinases Transaminases
3. Hidrolases	Catalisam reações de hidrólise de ligação covalente.	Lipases Amilases
4. Liases	Adição de grupos a duplas ligações ou remoção de grupos deixando dupla ligação.	Dehidratases Descarboxilases
5. Isomerases	Reações de interconversão entre isômeros óticos ou geométricos.	Epimerases
6. Ligases	Condensação de duas moléculas, sempre às custas de energia, geralmente do ATP	Sintetases

Fonte: Adaptado de McDonald *et al.*<sup>40</sup>

Como a indústria visa melhorar seus processos para reduzir custos e torná-los mais rápidos e eficientes, o uso de enzimas nos mais diversos segmentos industriais vem sendo consolidado e ampliado. Ao utilizar as enzimas nesses processos, há um aumento nas taxas de reações e, conseqüentemente, redução no tempo reacional. Além disso, em alguns processos o uso de enzimas permite o uso de menores temperaturas e pressões. Na indústria alimentícia, por exemplo, a glicose-oxidase é utilizada para melhorar o armazenamento dos alimentos porque remove oxigênio e glicose dos alimentos. Na indústria têxtil, a catalase é empregada no processo de branqueamento de tecidos. Na produção de biocombustíveis, as celuloses são utilizadas para hidrolisar a biomassa celulósica formando glicose que é matéria-prima para a produção de etanol. Já na indústria de detergentes, as proteases, amilases e lipases são empregadas na degradação de gordura promovendo melhor remoção de sujeiras se comparadas com detergentes que não utilizam enzimas em suas formulações.<sup>41</sup>

### *2.2.1 Lipases*

As lipases (E.C.3.1.1.3) pertencem à classe das hidrolases de serina e catalisam a hidrólise da ligação hidroxila de ésteres carboxílicos. Os substratos das lipases são óleos e gorduras que contém triacilgliceróis e podem ser convertidos em diglicerídeos, monoglicerídeos, ácidos graxos e glicerol. Usualmente, a hidrólise acontece na interface do substrato orgânico e da fase aquosa e, é na fase aquosa, em que as lipases permanecem. Além da hidrólise, as lipases podem catalisar reações de esterificação, transesterificação, acidólise, alcoólise e aminólise representadas na Figura 6.<sup>5</sup> O uso de lipases foi altamente disseminado porque suportam altas temperaturas e uma ampla faixa de pH. Além disto, possuem elevada especificidade.<sup>42</sup> As fontes mais comuns de lipase são bactérias e fungos, justamente por apresentarem maior estabilidade e disponibilidade, do que as fontes animais e vegetais além dos menores custos de produção.<sup>5</sup>



**Figura 6.** Representação das reações catalisadas por lipases. Fonte: Adaptado de Facin.<sup>43</sup>

Algumas lipases possuem em sua estrutura uma tampa polipeptídica anfipática que recobre os sítios ativos. Usualmente, em meio aquoso, a tampa encontra-se fechada e, conseqüentemente, os sítios ativos ficam inacessíveis. Portanto, não há interação entre a enzima e o substrato, tornando-a inativa. Entretanto, se a enzima está em contato com uma interface, como uma emulsão, ou com um meio hidrofóbico, acontece a ativação interfacial porque ocorre a abertura da tampa e os sítios ativos ficam expostos ao meio. Como resultado, conforme acontece a abertura da tampa, há aumento da atividade da lipase.<sup>44</sup> Já enzimas como lipase de *Aspergillus oryzae*, lipase de *Candida antarctica* e lipase de *Pseudomonas cepacia*, possuem a tampa em sua estrutura.<sup>45-47</sup>

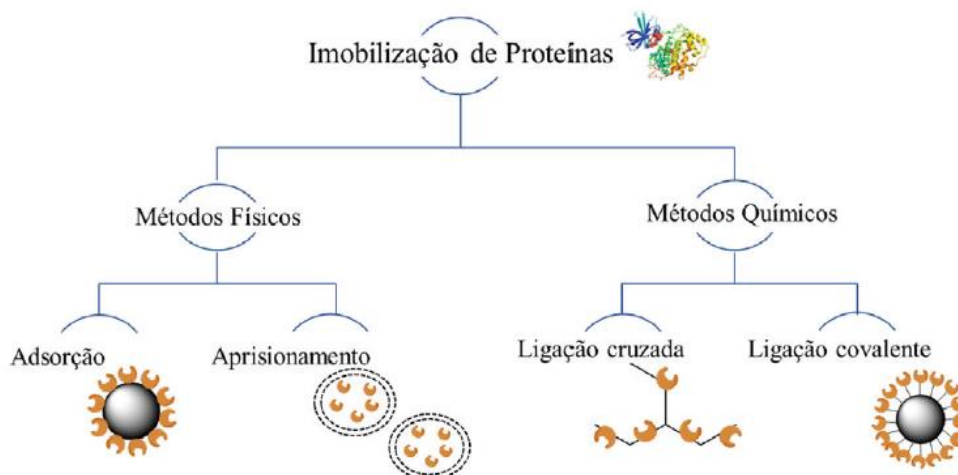


### 2.2.2 Imobilização de enzimas

A fim de melhorar a estabilidade das enzimas durante processos industriais, tornando-os mais favoráveis, bem como aprimorar a recuperação e reutilização das mesmas, quantas vezes forem possíveis, para redução de custos e minimizar danos ao meio ambiente, podem ser utilizadas técnicas de imobilização.<sup>48</sup> A imobilização enzimática envolve a ligação da enzima na superfície de um suporte insolúvel. Por isso, as diferentes técnicas de imobilização são embasadas nos tipos de ligações e/ou interações realizadas entre a enzima e o suporte.<sup>49</sup> O êxito de uma imobilização está atrelado à uma combinação favorável de escolhas do suporte, do método e das condições de imobilização visando as propriedades finais desejadas para a enzima.<sup>48</sup>

A escolha do suporte deve considerar a habilidade do material em proteger a estrutura enzimática de modo a evitar a inativação da enzima. Bem como possuir propriedades como hidrofiliabilidade, baixo custo, resistência à ataque de microrganismos e estabilidade química e física. Os suportes podem ser materiais inorgânicos ou orgânicos e ainda podem ser classificados conforme a sua fonte, natural ou sintética. Os suportes inorgânicos apresentam como vantagens estabilidade química e térmica, além de boa resistência mecânica. Sílica, hidroxiapatita e carvão ativado são os suportes inorgânicos mais usuais. Já os suportes orgânicos apresentam alta afinidade a proteínas e são utilizados polímeros como poliacetato de vinila (PVA), poliestireno (PS) e poliuretano (PU).

Para escolher o método de imobilização devem ser ponderados os fatores desativação da enzima, capacidade de carregamento da enzima no suporte, toxicidade dos reagentes de imobilização, custos do processo e também as características finais da enzima imobilizada.<sup>43</sup> Os métodos de imobilização são divididos conforme o tipo de interação da enzima com o suporte. Nos métodos físicos as interações são mais fracas e não covalentes, ligações de hidrogênio, ligação por afinidade, forças de Van der Waals, interações hidrofóbicas e ligação iônica. Já nos métodos físicos há formação de ligações covalentes devido à formação de ligações de éter, amida ou carbamato. Os métodos de imobilização usuais são adsorção, aprisionamento, ligação cruzada e ligação covalente e estão representados e classificados na Figura 7.<sup>49</sup>



**Figura 7.** Representação dos métodos físicos e químicos de imobilização de enzimas. Fonte: Furlani.<sup>49</sup>

Dentre os métodos de imobilização, a adsorção física é considerada a técnica mais simples, pois necessita apenas do contato entre o suporte e a solução enzimática por tempo suficiente para que seja realizada a adsorção. Uma forma secundária de realizar a imobilização, é a que a solução enzimática é seca sobre a superfície do suporte. Usualmente, para lipases, a adsorção física acontece através interações hidrofóbicas porque há espontaneidade na adsorção no suporte hidrofóbico quando a enzima está na forma de solução aquosa. Como essas interações são fracas, há aleatoriedade da interação enzima com o suporte e existe a possibilidade de dessorção da enzima quando alguns parâmetros são variados, como: pH, força iônica e temperatura. Entretanto, essa dessorção pode ser vantajosa pois permite a reutilização dos suportes e, pode ocorrer de maneira forçada, ao promover alterações brandas nos parâmetros.<sup>43,49</sup>

#### 2.2.2.1 Imobilização de enzimas em nanopartículas magnéticas

Apesar das vantagens relacionadas à imobilização das enzimas, existe um desafio que é a recuperação das enzimas do meio reacional. A recuperação permite que o processo seja contínuo, além da redução de custos porque as enzimas podem ser reutilizadas em outros processos. Por isso, um meio de resolver esse problema, é através da escolha do suporte onde é realizada a imobilização. O uso de nanopartículas magnéticas como suporte permite uma

fácil separação do meio reacional com auxílio de um campo magnético externo com possibilidade de reutilização posterior da enzima.<sup>50</sup>

Além da recuperação e reutilização, há uma vantagem relacionada à maior área superficial das nanopartículas, pois permite que uma maior quantidade de enzima seja carregada por grama de suporte.<sup>51</sup> Huang *et al.*<sup>52</sup> utilizaram como suporte nanopartículas magnéticas, Magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), e a lipase de *Candida rugosa* foi efetivamente ligada covalentemente via ativação de carbodiimida. Além da imobilização ter sido eficiente, a lipase imobilizada apresentou melhora na atividade e estabilidade, bem como demonstrou tolerância às variações de pH, temperatura e concentração do substrato.

### 2.2.3 Uso de lipases na degradação de óleos

As lipases possuem potencial de ação em diferentes tipos de óleos e gorduras. Existem estudos que mostram o efeito das lipases em óleos de cozinha usados e rejeitos contendo óleos.<sup>53</sup> Alguns desses isolam micro-organismos de locais contaminados para avaliar sua produção de enzima bem como a aplicação das mesmas na degradação de óleo. O estudo de Kumar *et al.*<sup>54</sup> é um exemplo em que a partir de um solo contaminado de um galpão de motores a diesel o fungo *Penicillium chrysogenum* SNP5 foi isolado. A partir da cadeia do fungo, a enzima lipase foi extraída e adicionada à um meio que continha óleo de cozinha usado. Como forma de avaliar a degradação, foi medida a acidez residual do óleo antes e após a aplicação da lipase. Como resultado, houve um aumento de até 69% da acidez do óleo tratado.

Preczeski *et al.*<sup>55</sup> avaliaram o uso da lipase de *Aspergillus niger* na hidrólise de óleo de cozinha usado. E obtiveram como resultado que a enzima foi efetiva na hidrólise do óleo pois converteu triglicerídeos em ácidos graxos livres. Dessa forma, a conversão em moléculas menos tóxicas reduz os danos ambientais gerados por resíduos de óleos. Outro tipo de resíduo que já foi avaliado foi o óleo residual do processo do refino que consiste em uma mistura de petróleo, água e de partículas grosseiras. Marchut-Mikolajczyk *et al.*<sup>56</sup> avaliaram a biodegradação do óleo residual empregando a bactéria *Bacillus cereus* EN18 em conjunto com a lipase de *Rhizomucor miehei* buscando ponderar o efeito da lipase. Ao avaliar espectrofotometricamente a degradação

dos hidrocarbonetos aromáticos, constatou-se que as amostras que continham a presença tanto da bactéria quanto da lipase, apresentaram maiores taxas de degradação dos hidrocarbonetos aromáticos do que as amostras que continham somente a bactéria.

Joshi *et al.*<sup>57</sup> produziram lipase de *Fusarium incarnatum* a partir do fungo *Fusarium incarnatum* KU377454. A partir dessa lipase, promoveram a imobilização por adsorção física da mesma em nanopartículas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>. As enzimas imobilizadas em nanopartículas foram utilizadas para promover a degradação de óleo de cozinha usado. Como resultado, a conversão do óleo de cozinha usado aconteceu de forma mais eficiente do que quando comparado com a enzima não imobilizada. Portanto, a imobilização das enzimas é vantajosa porque pode promover melhores taxas de conversão e também, nesse caso, permite a remoção das nanopartículas do meio e posterior reutilização da mesma.

### 3 Objetivos

O objetivo geral desse trabalho foi avaliar, em escala laboratorial, a degradação de petróleo presente em emulsões sintéticas do tipo óleo em água por enzimas lipase de *Aspergillus oryzae*, lipase de *Candida antarctica* e lipase de *Pseudomonas cepacia* imobilizadas em nanopartículas magnéticas.

Os objetivos específicos foram:

- I. Preparar emulsões sintéticas (O/A) com um dispersor e uma sonda de ultrassom. Avaliar a condição otimizada de cada equipamento e comparar a melhor incorporação de petróleo;
- II. Determinar o pH ótimo e a temperatura para a atuação das lipases;
- III. Imobilizar, por adsorção física, as lipases nas nanopartículas magnéticas;
- IV. Aplicar as enzimas imobilizadas no petróleo apenas disperso em água e também em emulsões e avaliar as fases orgânicas e aquosas remanescentes.

## 4 Materiais e métodos

### 4.1 Instrumentação

As alíquotas de petróleo de todos os procedimentos, bem como os reagentes utilizados no procedimento de atividade enzimática foram pesados em balança analítica (XS105 Dual Range, Metler Toledo) com precisão de 0,1 mg e capacidade máxima de 120 g.

As emulsões foram preparadas com um dispersor (Ultra Turrax T10 Basic, IKA) com capacidade de processar volumes na faixa de 1 – 100 mL. Foi utilizado o dispositivo dispersor S10N-10G (IKA). O preparo de emulsão também foi avaliado com sistema ultrassom do tipo sonda (Vibra-Cell Ultrasonic Processor VCX-500, Sonic&Materials) com potência de 500 W e frequência de 20 KHz. Neste caso, o sistema foi equipado com ponteira de 2 mm de diâmetro (630-0423 5/64", Sonic&Materials) com capacidade volumétrica máxima de 5 mL.

A análise gravimétrica do petróleo, foi realizada em dois momentos distintos, primeiro para avaliar a quantidade de óleo incorporada na emulsão e assim, através de testes estatísticos, definir qual dos dois equipamentos de dispersão utilizar para o preparo das emulsões e, no segundo momento, foi utilizada para avaliar a quantidade de óleo presente na emulsão após a adição da enzima. A pesagem foi realizada na balança analítica modelo AUY220, Shimadzu com precisão de 10 mg e capacidade máxima de 220 g. Na etapa de aquecimento foi utilizada uma estufa (400-2ND, Ethik Technology) com temperatura máxima de 200 °C. O solvente foi evaporado em rotaevaporador (Labrota 400, Heidolph) acoplado a uma bomba de vácuo (TE-058, Tecnal).

Nos procedimentos de atividade enzimática, para ajuste do pH das soluções tampão, foi utilizado um pHmetro (781 pH/ion Meter, Metrohm) com eletrodo de pH combinado (LL Unitrode, modelo 6.0258.600), chapa de aquecimento e agitação magnética (C-NAGHS7, IKA). As medidas espectrofotométricas foram realizadas em um espectrofotômetro UV-Visível (UV-1600 PRO-TOOLS) na faixa de 190 - 1100 nm, utilizando cubetas de poliestireno com 1 cm de caminho óptico.

Para a síntese das nanopartículas magnéticas, os reagentes foram pesados em balança analítica modelo AUY220, Shimadzu com precisão de 10 mg e capacidade máxima de 220 g. Para agitação do meio reacional foi utilizada

chapa de agitação magnética (AA-840, Gehaka). A etapa de centrifugação foi realizada em uma centrífuga (Excelsa i 2206, FANEM), a etapa de evaporação do solvente foi realizada em uma estufa (400-2ND, Ethik Technology) com temperatura máxima de 200 °C. A etapa final de calcinação foi realizada em mufla (Sanchis Fornos Industriais).

Nas análises por espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier para amostras sólidas foi utilizado o equipamento Cary 630 (Agilent) acoplado ao acessório Diamante ATR Module (Agilent). Já nas análises de amostras líquidas, foi utilizado o equipamento Cary 630 (Agilent) acoplado ao acessório 5 Bounce ZnSe ATR (Agilent). As condições utilizadas para ambos os métodos estão descritas na Tabela 4.

**Tabela 4.** Condições utilizadas nas análises de FTIR-ATR para sólidos e para líquidos.

<b>Condições do método</b>	<b>Sólidos</b>	<b>Líquidos</b>
Faixa espectral (cm <sup>-1</sup> )	4000 – 650	4000 – 650
Região de impressão digital (cm <sup>-1</sup> )	1800 – 800	1800 – 800
Varredura de fundo ( <i>scans</i> )	32	16
Varredura da amostra ( <i>scans</i> )	32	16
Resolução (cm <sup>-1</sup> )	4	4

O tratamento dos dados obtidos por FTIR-ATR foi realizado da seguinte forma: organização dos resultados das análises em matrizes de sinal x intensidade no Microsoft® Excel® para Microsoft 365 MSO (Versão 2304 Build 16.0.16327.20200) 32 bits e, com os dados nas matrizes, foram enviados ao *software* ChemoStat® para pré-tratamento e posterior aplicação de métodos de reconhecimento de padrões por métodos não-supervisionados. O pré-tratamento realizado foi a normalização *by range* (1-0) e o método não-supervisionado utilizado foi a análise de agrupamentos por métodos hierárquicos (HCA).

A determinação de acidez residual foi realizada por titulação utilizando um titulador automático (905 Titrand, Metrohm) com agitador magnético automático (801 Stirrer, Metrohm) acoplado, bureta com capacidade de 20 mL (Dosino 800, Metrohm) e eletrodo de pH combinado para titulação em meio aquoso (LL

Unitrode, modelo 6.0258.600, Metrohm). As medidas foram obtidas no *software* Tiamo versão 2.5.

A determinação de carbono orgânico dissolvido em solução foi determinada no equipamento Multi N/C 2100 S (Analytik Jena) com detector de infravermelho (Focus Radiation NDIR Detector®) e equipado com auto amostrador AS60.

## 4.2 Reagentes e soluções

O petróleo utilizado é de origem brasileira proveniente da bacia do Espírito Santo e foi cedido pela PETROBRAS. O aspecto físico é de um petróleo pesado. Não foram fornecidas outras informações da amostra por questão de confidencialidade.

Nas emulsões produzidas para a otimização dos parâmetros do dispersor e da sonda de ultrassom foi utilizada água ultrapura, purificada através do sistema Milli-Q (Elix, Merck Millipore) com resistividade final de 18,2 MΩ.cm. Mas, no preparo das emulsões para os testes de degradação, foi utilizado água não purificada.

Na análise gravimétrica, foi utilizado n-hexano PA (Merck), sulfato de sódio PA (Merck) e, para os processos de limpeza relacionado à análise, foram utilizados detergente Extran neutro (Merck) e tolueno PA (Química Moderna).

As enzimas utilizadas foram lipase de *Aspergillus oryzae*, lipase de *Candida antarctica* e lipase de *Pseudomonas cepacia* (Sigma-Aldrich Co.).

As soluções da curva de calibração externa de p-nitrofenol (Neon) e a solução tampão Tris-HCl, para as medidas de atividade enzimática, foram preparadas com água ultrapura. Para esses ensaios também foram utilizados p-nitrofenil palmitato (Sigma-Aldrich Co.), Triton X-100 (Sigma-Aldrich Co.), Tris(hidroximetil)-aminometano (Sigma-Aldrich Co.), ácido clorídrico (Merck) diluído com água purificada para ajuste do pH e iso-propanol PA (Tedia).

Na síntese das nanopartículas, foram utilizados surfactante dioctilsulfosuccinato de sódio (AOT, Sigma-Aldrich Co.), iso-octano PA (Synth), hidróxido de amônio 27% PA (Synth) e etanol 95% PA (Química Moderna). As soluções de nitrato de ferro (III) nonahidratado (Sigma-Aldrich Co.) e nitrato de



níquel (II) hexahidratado (Sigma-Aldrich Co.) foram preparadas com água deionizada.

Para a análise de acidez residual, o titulante foi preparado com hidróxido de potássio 99% PA (Vetec) e água ultrapura, purificada através do sistema Milli-Q (Elix, Merck Millipore). A padronização foi realizada preparando uma solução de biftalato de potássio (Synth) com água ultrapura, purificada através do sistema Milli-Q (Elix, Merck Millipore).

### **4.3 Otimização no preparo das emulsões para avaliação da incorporação do óleo**

O preparo das emulsões foi otimizado a fim de incorporar a maior quantidade de óleo possível em água sem a utilização de surfactante. Além disso, a concentração foi escolhida visando evitar desperdício de óleo aderido em recipientes de vidro e nos equipamentos utilizados. Devido a isso, foram produzidas emulsões com, aproximadamente, 5% (m/v) de óleo em água (O/A). Antes das pesagens, o petróleo foi aquecido em estufa à 40 °C, durante 10 minutos. Para as emulsões preparadas com o dispersor, foram adicionados 20 mL de água em um frasco graduado e cerca de 1 g de petróleo foi pesado sobre a água. Após a etapa de pesagem, o dispersor foi inserido no frasco, onde a ponta inferior do mesmo sempre foi posicionada na marca de 10 mL do frasco a fim de padronizar a mesma condição para todas as amostras preparadas, bem como seguir as condições do fabricante de distância segura do frasco. A velocidade foi fixada em 30000 rpm e os tempos de preparo de 2, 4 e 8 minutos foram avaliados. Com o tempo de preparo fixado em 4 minutos, foram avaliadas as velocidades de 11500, 20500 e 30000 rpm do dispersor. As condições otimizadas para o preparo da emulsão com o dispersor foram 4 minutos como tempo de preparo e velocidade de 30000 rpm.

A limpeza do dispersor foi realizada da seguinte forma: o excesso de petróleo foi removido com papel toalha até a remoção expressiva do mesmo. Após, o dispersor foi inserido em um frasco contendo tolueno e foi mantido em funcionamento por cerca de 2 minutos na velocidade mínima. O excesso foi removido com papel toalha e o dispersor foi inserido em um frasco contendo álcool isopropílico e foi mantido em funcionamento por cerca de mais 1 minuto

na velocidade mínima. O dispersor foi então, desmontado, o excesso removido com papel toalha e qualquer resquício de solvente foi evaporado a temperatura ambiente.

Para o preparo das emulsões 5% de óleo em água (m/v) na sonda de ultrassom, foram adicionados 5 mL de água em um frasco graduado e 0,25 g de petróleo foi pesado sobre a água. A ponteira da sonda foi imersa no líquido até a parte inferior da mesma estar posicionada na altura da marcação de 2 mL do frasco utilizado. A fim de avaliar o tempo de preparo, a amplitude foi fixada em 40% da potência de 500 W e os tempos avaliados foram de 2, 4 e 8 minutos. Já para a avaliação da potência, o tempo de preparo foi fixado em 4 minutos e as potências avaliadas foram 20%, 30% e 40% de 500 W. As condições otimizadas para utilizar a sonda de ultrassom no preparo das emulsões foram 4 minutos como tempo de preparo e amplitude de 40% da potência de 500 W.

Após o preparo de cada emulsão, o excesso de petróleo foi removido com papel toalha e a ponteira foi submersa em um frasco contendo álcool isopropílico. A sonda de ultrassom foi acionada na amplitude de 40% e permaneceu em funcionamento por cerca de 2 minutos. O excesso de álcool isopropílico foi removido com papel toalha.

#### **4.4 Análise gravimétrica**

Para determinar a quantidade de petróleo incorporada na emulsão utilizou-se uma adaptação do método de partição gravimétrica para determinação de óleos e graxas da seção 5520 b do *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* que determina a porcentagem de óleo extraído no final do método.<sup>58</sup> Após o preparo da emulsão, o conteúdo foi transferido para um funil de separação e 30 mL de hexano foram adicionados no mesmo. Em seguida, agitou-se suavemente o funil de separação durante 2 minutos. O funil foi posicionado em um suporte para ocorrer a separação das fases durante 4 minutos. A fase aquosa foi drenada para o frasco original da emulsão e a fase orgânica para outro recipiente. O processo de extração foi repetido por mais duas vezes. Na fase orgânica recolhida, foi adicionada quantidade suficiente de sulfato de sódio para remover resquícios de água. A

fase orgânica foi filtrada para um frasco Schott onde permaneceu armazenada até o momento da evaporação do solvente.

A fim de realizar a parte gravimétrica do método, balões de fundo chato foram previamente limpos com detergente especial para laboratório, lavados com água ultrapura, secos em estufa a 105 °C e posteriormente lavados com hexano. Os balões, após limpeza, foram colocados na estufa a 105 °C por 1 hora e foram transferidos para um dessecador onde permaneceram por 1 hora com o objetivo do peso se tornar constante. Os balões foram pesados individualmente ( $P_1$ ) e, a fase orgânica, foi transferida através de um funil para o interior dos balões. Para garantir a transferência efetiva, o frasco Schott foi enxaguado com duas vezes com 10 mL de hexano e a fração resultante foi transferida através do funil para o respectivo balão. O solvente foi evaporado no rotaevaporador com temperatura de 69 °C. Após a completa evaporação do solvente, os balões foram colocados novamente na estufa a 105 °C por 1 hora e foram colocados novamente no dessecador por 1 hora. Após o arrefecimento dos balões, foi realizada a pesagem ( $P_2$ ) dos balões contendo o óleo extraído. O cálculo da porcentagem de óleo extraído foi realizado através da Equação 2:

$$\% \text{ óleo extraído} = \frac{(P_2 - P_1)}{m_{\text{óleo}}} \times 100 \quad (2)$$

onde  $P_2$  corresponde ao peso do balão somado ao peso do óleo extraído;  $P_1$  corresponde ao peso do balão vazio;  $m_{\text{óleo}}$  é a massa de óleo utilizada na produção da emulsão.

A análise de óleos e graxas foi realizado em duplicata para cada condição de preparo de emulsão estudada.

#### **4.5 Determinação da atividade enzimática**

A atividade enzimática foi determinada a partir do método descrito por Gupta *et al.*<sup>59</sup> modificado. As enzimas lipase catalisam a hidrólise do p-nitrofenilpalmitato (p-NPP) em ácido palmítico e p-nitrofenol (p-NP). Ao decorrer da reação, o meio torna-se amarelo devido à formação do p-NP. O princípio do método envolve a quantificação do p-NP formado devido ao aumento da absorbância no comprimento de onda de 410 nm. A quantificação é realizada

por meio de um espectrofotômetro UV-Visível e há necessidade de preparar uma curva de calibração externa de p-NP e de uma solução de substrato contendo p-NPP para a ação da enzima.

Algumas soluções intermediárias foram preparadas para serem utilizadas na determinação da atividade enzimática. A primeira foi a solução tampão Tris-HCl  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ , onde  $3,028 \text{ g}$  de Tris(hidroximetil)-aminometano foram solubilizados em  $500 \text{ mL}$  de água Milli-Q e, o pH da mesma, foi ajustado conforme o requerido em cada ensaio com HCl  $5 \text{ mol L}^{-1}$ . A solução enzimática foi preparada através da diluição da massa pesada de enzima no tampão Tris-HCl. Para preparar a solução de Triton X-100 ( $6,8 \text{ mmol L}^{-1}$ )  $0,44 \text{ g}$  do mesmo foram diluídos em  $100 \text{ mL}$  de tampão Tris-HCl. A solução de p-NPP ( $7,9 \text{ mmol L}^{-1}$ ) foi preparada solubilizando  $3 \text{ mg}$  de p-NPP em  $1 \text{ mL}$  de isopropanol.

A fim de obter a curva de calibração externa de p-NP, foi preparada uma solução primária de p-NP ( $1 \text{ mmol L}^{-1}$ ) dissolvendo  $0,0070 \text{ g}$  de p-NP em  $50 \text{ mL}$  de água. A partir dessa solução, foi realizada a primeira diluição utilizando como diluente a solução de Triton-X100, obtendo a solução secundária de p-NP ( $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ ). Foram realizadas sucessivas diluições a partir da solução secundária, utilizando a solução de Triton-X100 como diluente, para obter os pontos da curva na faixa de  $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$  a  $0,01 \text{ mmol L}^{-1}$  com decréscimo de  $0,015 \text{ mmol L}^{-1}$  a cada ponto. A solução de Triton X-100 foi o branco da curva e ambos foram lidos em  $410 \text{ nm}$  no UV-Vis.

O substrato da enzima é uma mistura da solução de Triton X-100 e da solução de p-NPP na proporção 9:1 (v/v). Foi necessário realizar um aquecimento prévio a mistura, em banho-maria na temperatura a ser utilizada no ensaio, do volume exato a ser utilizado da solução de Triton X-100 e da solução de p-NPP durante 10 minutos. Após o aquecimento, o volume de p-NPP foi adicionado gota-a-gota na solução de Triton X-100 sob agitação vigorosa.

Por fim, para determinar a atividade enzimática, foram misturados, na proporção 9:1, a solução do substrato com a solução da enzima e o frasco foi agitado manualmente para a mistura efetiva. Durante 5 minutos, o frasco foi mantido em banho-maria, na temperatura do ensaio ( $T \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ), e a solução foi transferida para a cubeta onde foi medida a absorbância no comprimento de onda de  $410 \text{ nm}$ . O branco da análise foi realizado com a solução do substrato.

Os experimentos de atividade enzimática foram realizados em duplicata. Neste trabalho, a unidade de lipase (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de hidrolisar 1  $\mu\text{mol}$  de p-NPP em p-NP por minuto nas condições do ensaio.

A atividade enzimática pode ser obtida através da Equação 3:

$$\text{Atividade} \left( \frac{U}{\text{mL}} \right) = \left( \frac{(\text{absorbância obtida}) \times (\text{f.d.})}{(\text{c.angular}) \times (\text{tempo})} \right) \times \left( \frac{\text{volume de enzima}}{\text{volume total do ensaio}} \right) \quad (3)$$

onde f.d. é o fator de diluição, c. angular o coeficiente angular da reta obtida através da curva de calibração e t o tempo do ensaio em minutos

#### 4.5.1 Avaliação da influência do pH e da temperatura na atividade enzimática

A avaliação foi realizada de modo univariado e a concentração das soluções enzimáticas foi de, aproximadamente, 0,5 mg mL<sup>-1</sup>. Para avaliar a temperatura, a temperatura do banho-maria foi ajustada em 20, 30 e 40 °C, e o pH do tampão Tris-HCl foi mantido fixo. Para a enzima lipase de *Aspergillus oryzae* em 6,5, para a lipase de *Candida antarctica* 7,0 e para a lipase de *Pseudomonas cepacia* 7,0.

Para avaliar o pH, a temperatura do banho-maria foi mantida fixa em 40 °C e o pH do tampão Tris-HCl foi modificado. Como resultado, o pH ótimo da lipase de *Aspergillus oryzae*, de *Candida antarctica* e de *Pseudomonas cepacia* foi de 6,5, 7,0 e 8,0, respectivamente. E essas condições foram utilizadas para a imobilização das enzimas nas nanopartículas.

#### 4.5.2 Método da determinação da atividade enzimática para a enzima imobilizada

Para determinar a atividade enzimática da enzima imobilizada, foram adicionadas aproximadamente 0,5 mg de enzima imobilizada em 1 mL da solução do substrato em um frasco que foi manualmente agitado para a mistura efetiva. Durante 5 minutos, o frasco foi mantido em banho-maria, à 40  $\pm$  1°C, e com o auxílio de um ímã posicionado externamente na parte inferior do frasco,

somente a solução foi transferida para a cubeta e a medida da absorbância no comprimento de onda de 410 nm foi realizada. O branco da análise foi realizado com a solução do substrato.

A atividade da enzima imobilizada pode ser obtida pela Equação 4:

$$\text{Atividade} \left( \frac{U}{g} \right) = \left( \frac{(\text{absorbância obtida}) \times (\text{f.d.})}{(\text{c.angular}) \times (\text{tempo})} \right) \times \left( \frac{\text{volume total ensaio}}{\text{massa de enzima}} \right) \quad (4)$$

onde f.d. é o fator de diluição, c. angular o coeficiente angular da reta obtida através da curva de calibração e t o tempo do ensaio em minutos

Além disso, foi realizada a avaliação de ciclos reacionais para cada enzima. Em que, após a medida da atividade imobilizada, as enzimas imobilizadas nas nanopartículas foram adicionadas novamente em 1 mL da solução substrato e o procedimento foi repetido até a inativação das enzimas.

#### 4.5.3 Atividade enzimática da solução sobrenadante

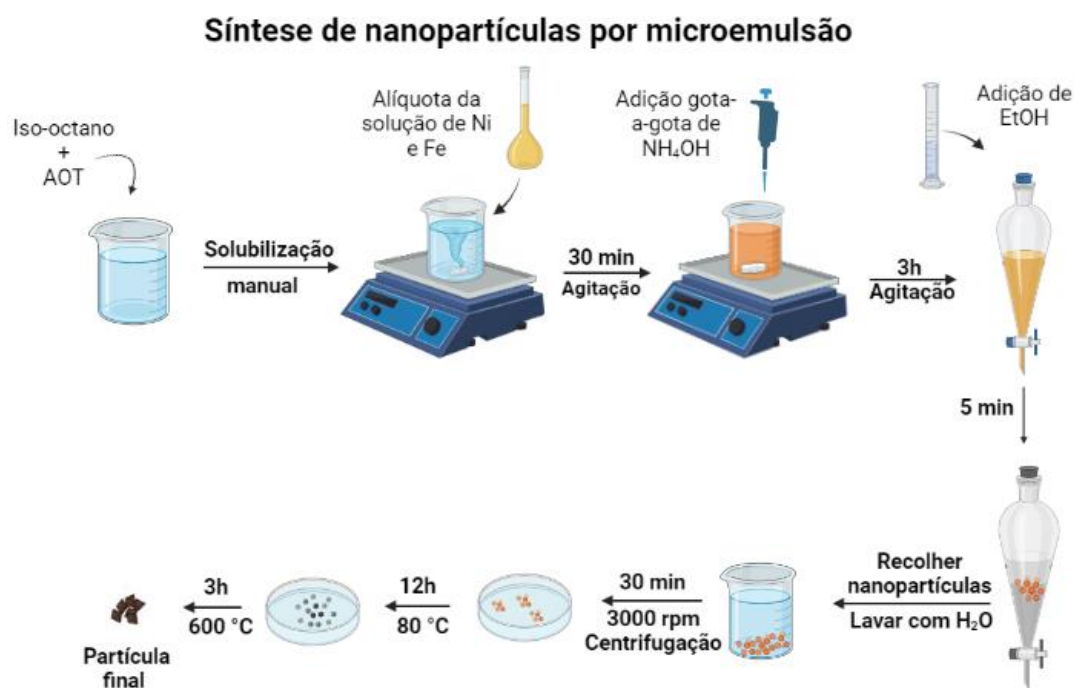
A solução enzimática em que as nanopartículas foram inseridas e posteriormente removidas após o tempo de contato, foi chamada de solução sobrenadante. A atividade da solução sobrenadante foi medida conforme o procedimento descrito acima e com a temperatura do banho configurada em  $40 \pm 1$  °C. A eficiência da imobilização pode ser determinada através da Equação 5:

$$\text{Eficiência (\%)} = \frac{\text{Atividade enzima livre} - \text{atividade sobrenadante}}{\text{Atividade enzima livre}} \times 100 \quad (5)$$

## 4.6 Síntese de nanopartículas

A síntese das nanopartículas pelo método de microemulsão, ilustrada na Figura 8, foi baseada no método descrito por Ghasemi.<sup>60</sup> Inicialmente, 8,89 g do surfactante AOT foram homogeneizados com auxílio de um bastão de vidro em 100 mL de iso-octano em um balão de fundo redondo de 250 mL. Uma alíquota de 3,6 mL de uma solução de sais de ferro e níquel (0,2 M Fe(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>.9H<sub>2</sub>O e 0,1 M Ni(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O) foi adicionada ao meio reacional que foi mantido sob agitação

magnética lenta por 30 minutos. Após essa etapa, 10 mL de  $\text{NH}_4\text{OH}$  foram adicionados gota-a-gota ao meio reacional mantendo a agitação magnética lenta por 3 horas, para formar a microemulsão. Após as 3 horas, a microemulsão foi transferida para um funil de separação onde 100 mL de etanol foram adicionados para a separação das fases. A formação das ferritas ocorre na interface e foram recolhidas separadamente em um *vial* de 50 mL e as fases inferior e superior foram desprezadas. Água deionizada foi utilizada para remover resquícios de ferritas aderidas no funil. As ferritas foram centrifugadas durante 30 minutos à 3000 rpm e posteriormente acomodadas em uma placa de Petri para serem secas à 80 °C durante 12 horas. As nanopartículas foram transferidas para cápsulas de porcelana e foram calcinadas a 600 °C por 3h. Posteriormente, as nanopartículas foram levemente maceradas para redução do tamanho de partícula.



**Figura 8.** Representação do processo de síntese por microemulsão das nanopartículas magnéticas ( $\text{Ni-Fe}_3\text{O}_4$ ). Fonte: Adaptado de Ghasemi.<sup>60</sup>

## 4.7 Imobilização das enzimas nas nanopartículas

Para imobilizar as enzimas nas nanopartículas preparadas, primeiramente foram preparadas soluções enzimáticas nas concentrações de 50 mg mL<sup>-1</sup> para as lipases de *Aspergillus oryzae* e de *Candida antarctica* e de 1 mg mL<sup>-1</sup> para a lipase de *Pseudomonas cepacia*.

Para realizar a imobilização, cerca de 30 mg de nanopartículas foram pesadas em um *ependorf* e 1 mL de solução enzimática, previamente aquecida durante 5 minutos em banho-maria à 40 °C, foram adicionados nas nanopartículas. O *ependorf* foi mantido em banho-maria à 40 °C durante 3 horas e depois acondicionado em um dessecador. A solução enzimática permaneceu em contato com as nanopartículas durante 72 horas. Para remover a solução sobrenadante, um ímã foi mantido na parte inferior do *ependorf* e, com o auxílio de um pipetador, a solução foi pipetada e removida. O *ependorf* com as nanopartículas úmidas foi mantido no dessecador por, em média, dois dias para a evaporação completa dos resquícios do sobrenadante.

### 4.7.1 Avaliação da imobilização pela Espectroscopia na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier

Para avaliar a imobilização das enzimas nas nanopartículas, foram obtidos espectros de FTIR-ATR para as lipases de *Aspergillus oryzae*, de *Candida antarctica* e de *Pseudomonas cepacia* sem estarem imobilizadas no suporte e para as nanopartículas puras. Além disso, foi realizada uma mistura física entre cada enzima e as nanopartículas a fim de obter um espectro de FTIR-ATR da mistura física. Por fim, as lipases de *Aspergillus oryzae*, *Candida antarctica* e *Pseudomonas cepacia*, todas elas imobilizadas nas nanopartículas, foram submetidas à análise. Para indicar se houve a imobilização, os espectros de FTIR-ATR da mistura física e da enzima imobilizada nas nanopartículas foram comparados.

## 4.8 Ensaio de degradação enzimática do petróleo

O ensaio de degradação foi realizado com dois tipos de amostras diferentes: a não emulsionada, onde aproximadamente 0,448 g de petróleo,



previamente aquecido à 40 °C durante 10 min, foram pesadas sobre 20 mL de água não purificada, e a emulsionada, que foi preparada com o dispersor nas condições otimizadas: aquecimento da alíquota de petróleo à 40 °C por 10 min e dispersão de 1 g de petróleo sobre 20 mL de água não purificada durante 4 min na agitação de 30000 rpm.

As amostras foram transferidas para um béquer de 50 mL que foi aquecido em banho-maria, temperatura  $40 \pm 1$  °C, durante 10 min. Após esse período, a 30 mg de enzima imobilizada em nanopartícula foi adicionada ao meio e durante 20 min permaneceu em contato com o meio. Para a remoção da maior quantidade possível de enzima imobilizada em nanopartícula, foi utilizado um ímã. O ensaio de degradação enzimática do petróleo foi realizado em duplicata para cada uma das enzimas avaliadas nesse estudo.

Para as amostras não emulsionadas, a separação da fase aquosa e da fase orgânica das amostras foi realizada da seguinte forma: o béquer contendo a amostra foi colocado em um banho de gelo por 60 min, desse modo a fase aquosa foi recolhida com pipeta Pasteur de vidro e a fase orgânica foi recolhida para a análise de FTIR-ATR.

#### *4.8.1 Análise gravimétrica do petróleo após a degradação*

A redução do petróleo após a degradação enzimática foi avaliada através da análise gravimétrica. O procedimento foi realizado conforme o item 4.4.5 onde as fases orgânicas foram quantificadas e a fase aquosa foi recolhida para a medida de acidez residual e determinação de carbono orgânico dissolvido. O controle do procedimento, sem a adição de enzimas imobilizadas em nanopartículas, foi realizado em triplicata. Já nas amostras em que foram adicionadas as enzimas imobilizadas em nanopartículas, a análise foi realizada em duplicata.

#### *4.8.2 Avaliação da degradação pela espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier*

Para avaliar a degradação, o petróleo puro foi submetido à análise de FTIR-ATR. A fase óleo das amostras não emulsionadas e das emulsionadas

foram analisadas. Os resultados foram avaliados através da interpretação dos resultados do método não-supervisionado HCA.

#### 4.8.3 Medida de acidez residual

A acidez residual (RA) foi medida por volumetria de neutralização. Em um béquer, foram adicionados 10 mL da amostra a ser avaliada e, quando o volume era inferior a este, foi realizada a diluição da amostra com água deionizada. O titulante utilizado foi KOH 0,05 mol L<sup>-1</sup> e as medidas foram realizadas em duplicata. Para obter o RA, foi utilizada a Equação 6:

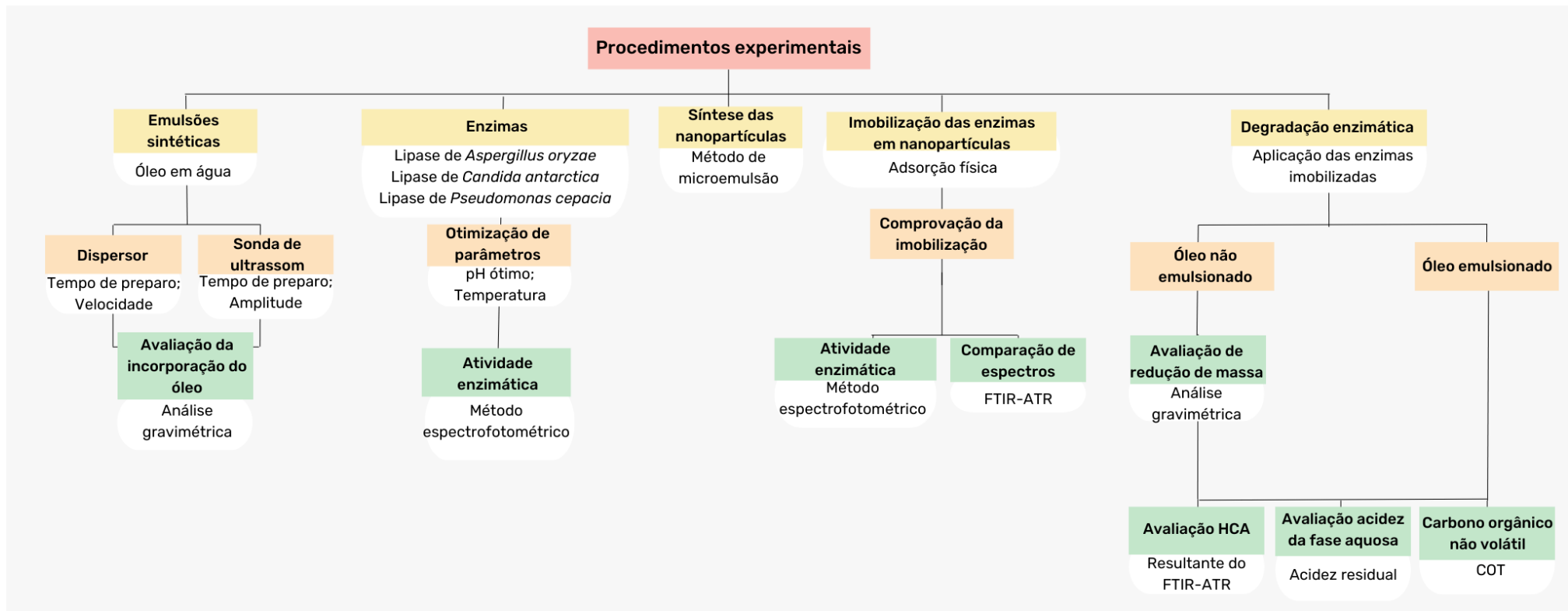
$$\text{Concentração (mol L}^{-1}\text{)} = \frac{M_{\text{titulante}} \times V_{\text{titulante gasto}}}{V_{\text{amostra adicionada}}} \times \text{fator de diluição} \quad (6)$$

onde  $M_{\text{titulante}}$  é a concentração do KOH em mol L<sup>-1</sup>,  $V_{\text{titulante}}$  é o volume de titulante gasto em mL e  $V_{\text{amostra adicionada}}$  é o volume de amostra utilizado em mL.

#### 4.8.4 Determinação de carbono orgânico dissolvido

As amostras foram previamente diluídas e 500 µL foram injetados no equipamento para a análise. As condições de análise foram: temperatura do forno em 850 °C, 3 minutos de purga com O<sub>2</sub> visando remover CO<sub>2</sub> dissolvido e tempo de integração máximo de 10 minutos.

Na Figura 9 é apresentado o fluxograma que sintetiza os procedimentos experimentais realizados no presente trabalho. Também é apresentada a ordem sequencial em que os experimentos foram executados.



**Figura 9.** Fluxograma dos procedimentos experimentais realizados no presente trabalho.

## 5 Resultados e Discussões

A discussão dos resultados obtidos foi dividida em quatro partes. A primeira é sobre a otimização do preparo das emulsões sintéticas pelos dois equipamentos utilizados avaliando a incorporação do óleo através de ensaio gravimétrico. Na segunda parte, estão descritos os resultados obtidos para otimização das condições de uso das enzimas selecionadas a fim de conhecer o pH e a temperatura em que cada enzima possui maior atividade.

Na terceira parte, foi feita a síntese das nanopartículas e avaliação da imobilização das enzimas nas nanopartículas através da determinação da atividade da atividade enzimática na solução sobrenadante, da atividade enzimática das enzimas imobilizadas e dos espectros de FTIR-ATR. Na quarta parte, foram feitos os ensaios de degradação enzimática para as amostras não emulsionadas e emulsionadas com avaliação visual da degradação do óleo e avaliação gravimétrica para as amostras não emulsionadas, bem como outros parâmetros, como HCAs, a acidez residual e carbono orgânico dissolvido para ambas amostras.

### 5.1 Otimização no preparo das emulsões sintéticas

A incorporação do petróleo na água foi realizada sem a adição de nenhum surfactante. Por isso, existe uma limitação da quantidade de petróleo incorporada. Além disso, existiram perdas de petróleo inerentes ao processo, como aderência nas paredes do tubo utilizado e nas ponteiros tanto do dispersor quanto da sonda de ultrassom. Por esses motivos, foi realizada a análise gravimétrica da emulsão resultante visando avaliar efetivamente a massa de óleo incorporada. Os preparos das emulsões foram feitos avaliando diferentes sistemas para formação da emulsão, os quais estão descritos abaixo.

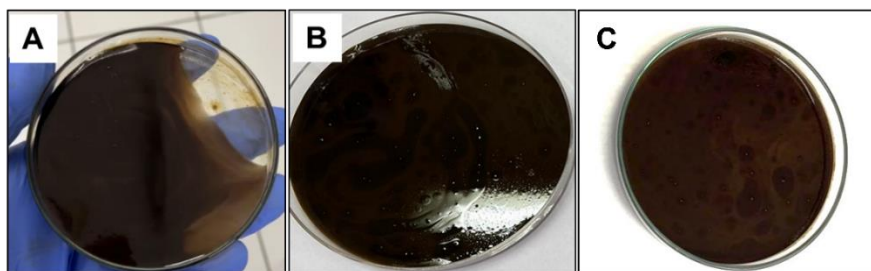
#### 5.1.1 Otimização dos parâmetros do dispersor mecânico

A formação de emulsões ocorre quando há, principalmente, agitação adequada para dispersar um líquido no outro.<sup>61</sup> O instrumento dispersor utilizado no trabalho tem como princípio de funcionamento a agitação rotor/estator, onde, devido a configuração do equipamento, ocorre a dispersão devido à ação de

duas forças principais: o impacto mecânico contra as paredes interiores do elemento dispersor devido à alta velocidade e a força de cisalhamento em que os líquidos são submetidos.<sup>62</sup> Logo, é importante avaliar o tempo de agitação e a velocidade utilizada no preparo da emulsão.

O primeiro parâmetro avaliado para o preparo de emulsões 5% óleo em água (m/v), foi o tempo de preparo das emulsões, ou seja, o tempo em que uma fase líquida leva para ser dispersa em outra. O dispersor utilizado possui duas condições de funcionamento: o aumento da velocidade deve ser progressivo e, para cada 10 minutos de atividade, há a necessidade de cinco minutos de inatividade. Com o intuito de evitar a sobrecarga do equipamento, os tempos de preparo testados foram de 2, 4 e 8 minutos com a velocidade fixa de 30000 rpm.

O aspecto visual das emulsões após o preparo é de uma fase de coloração marrom com algumas manchas de óleo formadas na superfície. Para o tempo de preparo de 2 minutos, Figura 10-a, o aspecto visual resultante foi diferente das demais emulsões, pois o óleo permaneceu concentrado na superfície da fase aquosa indicando que não houve uma boa dispersão. Enquanto para os tempos de preparo 4 minutos e 8 minutos (Figura 10-b e Figura 10-c) ocorreu uma melhor dispersão.



**Figura 10.** Avaliação visual da influência do tempo de preparo na formação da emulsão com o dispersor: (A) 2 min, (B) 4 min e (C) 8 min com a velocidade fixa em 30000 rpm. Fonte: Da autora, 2024.

Além da comparação visual, obteve-se a média da quantidade de óleo incorporada para os tempos de preparo de 2, 4 e 8 minutos de  $27,5 \pm 0,1\%$  (n=2),  $37,7 \pm 0,1\%$  (n=2) e  $31,4 \pm 0,1\%$  (n=2), respectivamente. Os resultados de incorporação obtidos diferiram entre si (teste ANOVA, intervalo de confiança de 95%) e, portanto, o tempo de preparo foi definido em 4 minutos porque apresentou a melhor incorporação de óleo.

Com o tempo de preparo fixo em 4 minutos, pode-se avaliar o efeito da velocidade na formação da emulsão. Foram comparadas as velocidades de 11500, 20500 e 30000 rpm. Quando a velocidade de 11500 rpm foi utilizada, foi averiguado que não houve dispersão efetiva para a formação da emulsão. Visualmente, conforme mostrado na Figura 11, foi constatado que não ocorreu a incorporação do óleo, pois não há formação de fase homogênea e esse comportamento também é observado na Figura 12-a.

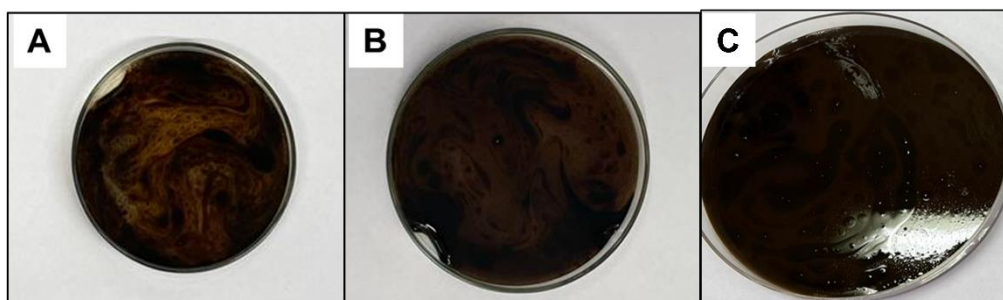


**Figura 11.** Resultado obtido no preparo da emulsão ao avaliar a velocidade de 11500 rpm. Fonte: Da autora, 2024.

Portanto, a velocidade de 11500 rpm demonstrou-se ineficaz para formar a emulsão e, por isso, as amostras referentes à essa condição não foram submetidas à análise gravimétrica para avaliação da incorporação do óleo. Devido a essa ineficiência, as velocidades menores disponíveis no equipamento não foram avaliadas.

Já as velocidades de 20500 rpm e 30000 rpm foram suficientes para a formação de emulsão. Para ambas velocidades, foi observada a formação de uma fase homogênea, Figura 12-b para 20500 rpm e Figura 12-c para 30000 rpm. Como a incorporação foi visualmente efetiva, foi realizada a análise gravimétrica para verificar a massa de petróleo incorporada e as quantidades obtidas para 20500 rpm e 30000 rpm foram de  $32,4 \pm 0,1\%$  ( $n=2$ ) e  $37,7 \pm 0,1\%$  ( $n=2$ ), respectivamente. Não há diferença estatística entre os resultados (teste T, intervalo de confiança de 95%) e para selecionar a velocidade, as amostras foram comparadas visualmente, onde foi constatado que as emulsões preparadas com velocidade de 30000 rpm aparentemente são mais

homogêneas do que as preparadas com velocidade de 20500 rpm. Desse modo, para as emulsões preparadas com o dispersor, as condições otimizadas são tempo de preparo de 4 minutos e velocidade de 30000 rpm. Isto significa que, nessas condições, apesar da concentração de óleo em água inicial ser de 5% (m/v), foram produzidas emulsões com concentração de, aproximadamente, 1,9% (m/v) O/A.



**Figura 12.** Avaliação visual da influência da velocidade do dispersor na formação da emulsão: (A) 11500 rpm, (B) 20500 rpm e (C) 30000 rpm com o tempo de preparo fixo em 4 minutos. Fonte: Da autora, 2024

Para avaliar a repetibilidade da incorporação do petróleo, na condição otimizada do dispersor, foram realizadas ao total, seis replicatas do preparo da emulsão seguido pela análise gravimétrica em diferentes dias. O resultado obtido para a incorporação de óleo na água foi de  $36,5 \pm 0,1\%$  e, foi considerado, que existe repetibilidade no preparo da emulsão tendo em vista o baixo desvio padrão relativo entre as medidas.

### 5.1.2 Otimização dos parâmetros da sonda de ultrassom

Uma técnica alternativa para o preparo de emulsões é a utilização de sonda de ultrassom que apresenta como diferenciais: uma elevada eficiência energética e a possibilidade de formar emulsões mais estáveis devido ao princípio da cavitação acústica.<sup>63</sup> Esse princípio refere-se à formação de bolhas que ao atingirem um tamanho máximo, devido à coalescência entre bolhas, colapsam e auxiliam na formação da emulsão, em virtude das forças de cisalhamento geradas no processo. Isso ocorre devido à interação das ondas de ultrassom com o meio líquido e o gás dissolvido no mesmo.<sup>64</sup>

Inicialmente, foram avaliados os tempos de preparo de 2, 4 e 8 minutos com amplitude fixa em 40%. Posteriormente, para estudar o efeito da amplitude, foram comparadas as amplitudes de 20, 30 e 40% com o tempo de preparo fixo na melhor condição avaliada. A concentração de óleo em água utilizada foi de 5% (m/v).

Os tempos de preparo avaliados foram de 2, 4 e 8 minutos com a amplitude fixa em 40%. A formação das bolhas, Figura 13, pode ser observada durante a emulsificação quando a combinação de parâmetros foi eficiente. Além disso, o aspecto visual das emulsões formadas é de uma fase com coloração marrom claro e com uma borda superior de óleo que não foi emulsionado. Esse comportamento é semelhante ao das emulsões formadas com o dispersor nas velocidades de 20500 e 30000 rpm com tempo de preparo de 4 minutos.

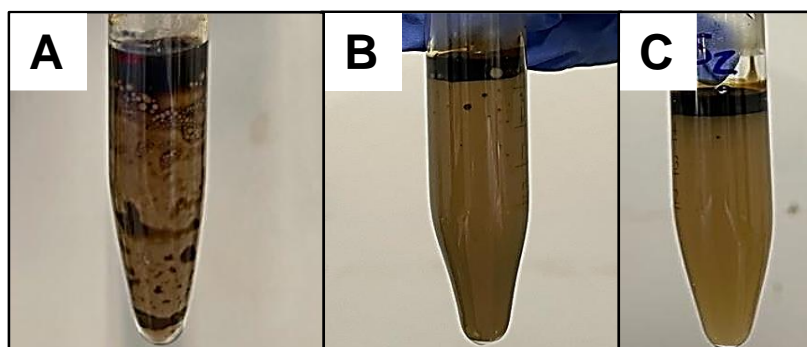


**Figura 13.** Presença das bolhas geradas no processo de emulsificação com a sonda de ultrassom devido à cavitação acústica. Fonte: Da autora, 2024.

Quando o tempo de preparo avaliado foi de 2 minutos, Figura 14-a, foi observada uma diferença entre os demais tempos de preparo. Havia óleo não disperso na fase emulsionada, enquanto nos demais tempos o mesmo ficava localizado na borda superior da fase aderido ao frasco e na ponteira do US. Por isso, foram preparadas quatro emulsões para realizar a análise gravimétrica, onde a média de óleo incorporado foi de  $31,0 \pm 0,2\%$  ( $n=4$ ) e o desvio padrão relativo (RSD) das amostras foi de 61,2% indicando que esse tempo de preparo foi insuficiente para promover uma emulsificação eficaz entre as replicatas. Os demais tempos de preparo, 4 e 8 minutos, possuíram aspectos visuais

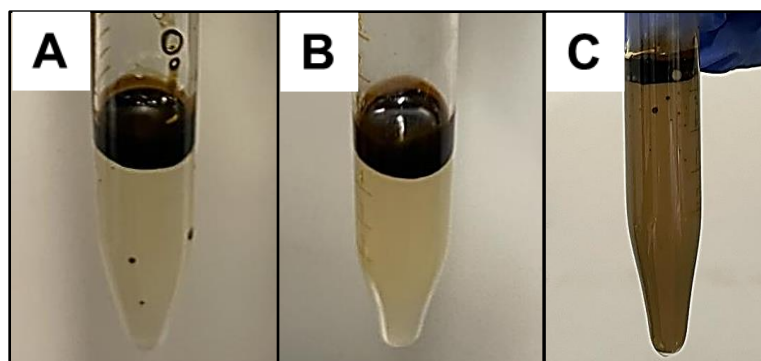


semelhantes e esperados Figura 14-b e Figura 14-c, respectivamente. A média de óleo incorporado foi de  $23,7 \pm 0,1\%$  ( $n=2$ ) e  $17,2 \pm 0,1\%$  ( $n=2$ ), para 4 e 8 minutos. As médias não diferiram significativamente entre si (teste ANOVA, intervalo de confiança de 95%), mas devido ao elevado RSD o tempo de preparo de 2 minutos foi desconsiderado. Portanto, a fim de reduzir o tempo de preparo e minimizar possíveis desgastes do equipamento, este foi definido como 4 minutos.



**Figura 14.** Avaliação visual da influência do tempo de preparo na formação da emulsão com a sonda de ultrassom: (A) 2 min, (B) 4 min e (C) 8 min com a amplitude fixa em 40%. Fonte: Da autora, 2024.

Com o tempo de preparo fixo em 4 minutos, foram avaliadas as amplitudes de 20, 30 e 40% da potência de 500 W. Ao aplicar menores amplitudes, 20 e 30%, foi observado que as ondas ultrassônicas geradas não foram suficientes para formar a emulsão, Figura 15-a e Figura 15-b, respectivamente, uma vez que não houve alteração visual na coloração da fase aquosa. Como não houve emulsificação, as amostras referentes a estas amplitudes não foram submetidas à análise gravimétrica. Portanto, as condições otimizadas para a formação de emulsão com o US foram tempo de preparo de 4 minutos e amplitude de 40% da potência de 500 W. Nessas condições, apesar da concentração de óleo em água inicial ser de 5% (m/v), foram preparadas emulsões O/A de concentração 1,2% (m/v).



**Figura 15.** Avaliação visual da influência da amplitude na formação da emulsão com a sonda de ultrassom: (A) 20%, (B) 30% e (C) 40% com o tempo de preparo fixo em 4 minutos. Fonte: Da autora, 2024.

A comparação da eficiência do dispersor e do US foi realizada com as condições otimizadas de cada equipamento. A comparação das médias de óleo incorporado com o dispersor,  $37,7 \pm 0,1\%$  ( $n=2$ ), e do US,  $23,7 \pm 0,1\%$  ( $n=2$ ), possuem diferença estatística. Com isso, concluiu-se que a incorporação com o dispersor, nas condições estudadas, pode ser considerada melhor do que com a sonda de ultrassom. Além dessa diferença, há a vantagem de que o volume de emulsão produzido com o dispersor é maior do que o pode ser produzido com a sonda. Em vista disso, as emulsões sintéticas utilizadas no presente trabalho foram preparadas com o dispersor, nas condições otimizadas, 4 minutos como tempo de preparo e 30000 rpm de velocidade.

A fim de evitar a inativação das enzimas ao serem adicionadas em emulsões com pH fora da faixa recomendada, houve a necessidade de avaliar a substituição da água ultrapura (pH 5,5) por água não purificada (pH 6,7). Além disso, também foi avaliado o aquecimento prévio do petróleo como preparo de amostra, pois em baixas temperaturas ambientes a viscosidade aumenta dificultando o manuseio do mesmo.

As mudanças no processo foram avaliadas também pela análise gravimétrica onde a média de óleo incorporado obtida foi de  $44,8 \pm 0,1\%$  ( $n=4$ ). Ao comparar com a média obtida sem as modificações,  $36,5 \pm 0,1\%$  ( $n=6$ ), as médias são estatisticamente diferentes (teste T, intervalo de confiança de 95%). As alterações não foram positivas somente por facilitar o manuseio do óleo e por promover um ambiente favorável para as enzimas, mas também porque proporcionou maior incorporação de óleo na emulsão. Em consequência disso,

as emulsões foram produzidas com água não purificada e o aquecimento do petróleo foi adotado como preparo de amostra de todas as emulsões produzidas no presente trabalho. Com isso, a concentração das emulsões foi de 2,3% (m/v) O/A.

## 5.2 Avaliação da influência da temperatura e do pH na atividade enzimática

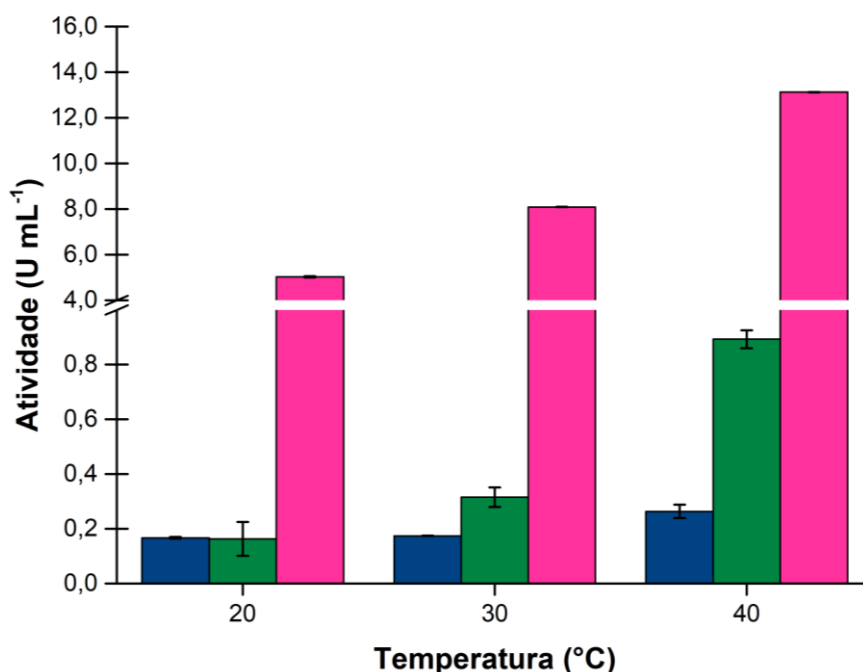
Com o propósito de maximizar o efeito das enzimas na etapa de degradação do petróleo, avaliou-se a influência do pH e da temperatura na atividade enzimática.

### 5.2.1 Avaliação do efeito da temperatura na atividade enzimática

Com objetivo de escolher a temperatura onde as enzimas possuem máxima atividade, a temperatura do ensaio de atividade enzimática foi avaliada. As temperaturas avaliadas foram 20, 30 e 40 °C. Para avaliar o efeito da temperatura, para a lipase de *Aspergillus oryzae* o pH foi fixado em 6,5 e para as lipases de *Candida antarctica* e de *Pseudomonas cepacia* foi fixado em 7,0. Esses valores de pH foram escolhidos de forma arbitrária dentro da faixa recomendada de uso pelo fabricante (pH 6,5 – 7,5). Na Figura 16, estão apresentadas as atividades enzimáticas para cada temperatura e para as enzimas estudadas.

O efeito da temperatura na atividade enzimática é perceptível para as três enzimas uma vez que o aumento da temperatura promoveu um aumento na atividade enzimática. O aumento de 20 °C para 30 °C não alterou significativamente as atividades das lipases de *Aspergillus oryzae* e *Candida antarctica*. Avaliando a variação da atividade quando a temperatura foi modificada de 30 °C para 40 °C, a enzima lipase de *Candida antarctica* foi a que obteve um aumento mais significativo, de aproximadamente 2,8 vezes. Enquanto isso, as lipases de *Aspergillus oryzae* e de *Pseudomonas cepacia*, possuíram um aumento de similar a 1,5 vezes e 1,6 vezes, respectivamente. Por consequência, a temperatura para o ensaio de atividade enzimática e para aplicação nos testes de degradação foi definida como 40 °C. As temperaturas acima de 40 °C não foram avaliadas devido ao potencial de aplicação do trabalho

em derramamentos em mares e oceanos e no ambiente costeiro de um acidente, ou seja, em temperaturas próximas à temperatura ambiente. Além disso, houve necessidade de utilizar as enzimas de forma racional devido à pouca quantidade disponível para realizar todos os testes que foram planejados.



**Figura 16.** Avaliação da influência da temperatura na atividade para as enzimas lipase de *Aspergillus oryzae* (■), de *Candida antarctica* (■) e de *Pseudomonas cepacia* (■) com o pH fixo em 6,5, 7,0 e 7,0, respectivamente. As barras verticais indicam o desvio padrão (n=2).

### 5.2.2 Avaliação da influência do pH na atividade enzimática

Na Figura 17, estão apresentados os perfis de cada enzima avaliada nesse trabalho em diferentes valores de pH. As três enzimas avaliadas possuem indicação de uso na faixa de pH 6,5 – 7,5, por isso essa faixa foi o ponto de partida do estudo. Para cada pH avaliado, uma nova solução de enzima foi preparada e o ajuste do pH foi realizado na etapa de preparo do tampão Tris-HCl, que foi utilizado como diluente da enzima sólida.

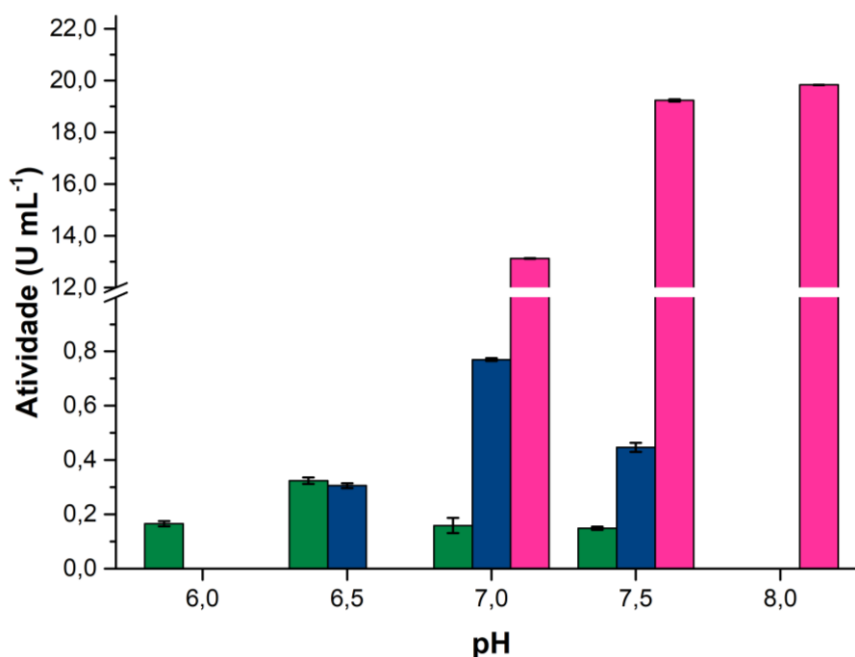
A lipase de *Aspergillus oryzae* apresentou atividade máxima ( $0,324 \pm 0,012$  U mL<sup>-1</sup>) no pH 6,5. As médias das atividades foram comparadas estatisticamente e, em um intervalo de confiança de 95%, diferem estatisticamente (teste ANOVA). Além disso, foi a única enzima com o pH ótimo

na faixa ácida. Song *et al*<sup>65</sup>., apesar de medirem a atividade por um método titulométrico utilizando azeite de oliva como substrato, observaram o mesmo comportamento para lipases derivadas de fungos, inclusive para a lipase de *Aspergillus oryzae*, que também apresentou como pH ótimo o valor de 6,5.

A lipase de *Candida antarctica* teve atividade máxima ( $0,771 \pm 0,006$  U mL<sup>-1</sup>) no pH 7,0 diferindo estatisticamente (ANOVA, intervalo de confiança 95%) do pH 6,5 e 7,5. Yu *et al.*<sup>66</sup> também avaliaram a influência do pH na atividade enzimática utilizando um método baseado na hidrólise do óleo de oliva e, para determinar a atividade, foi realizada titulação ácido-base. Os autores obtiveram que há influência do pH na atividade e que a lipase de *Candida antarctica B* apresentou pH ótimo 7,0.

A lipase de *Pseudomonas cepacia* apresentou um perfil diferente das demais enzimas. Para os valores de pH de 7,0, 7,5 e 8,0, as atividades foram de  $13,1 \pm 0,1$  U mL<sup>-1</sup> (RSD 0,763%),  $19,2 \pm 0,1$  U mL<sup>-1</sup> (RSD 0,521%) e  $19,8 \pm 0,1$  U mL<sup>-1</sup> (RSD 0,505%), respectivamente. Os resultados não diferiram estatisticamente, teste ANOVA intervalo de confiança de 95%. Portanto, para definir o pH ótimo dentre os estudados, foi utilizado o menor RSD como parâmetro e, desta forma, nas condições estudadas, foi escolhido o pH 8,0 para a lipase de *Pseudomonas cepacia*. Apesar de não ter sido encontrado na literatura artigos que avaliem a influência do pH na atividade desta enzima, foi relatado na literatura o uso da enzima lipase de *Pseudomonas cepacia* em um tampão Tris-HCl em pH 8,0.<sup>67</sup>

Através da Figura 17, considerando a atividade no pH ótimo de cada enzima, observa-se que a lipase de *Aspergillus oryzae* apresentou menor atividade e que a lipase de *Pseudomonas cepacia* é muito mais ativa que as demais.



**Figura 17.** Avaliação da influência do pH na atividade para as enzimas lipase de *Aspergillus oryzae* (■), de *Candida antarctica* (■) e de *Pseudomonas cepacia* (■) com a temperatura fixa em 40 °C. As barras verticais indicam o desvio padrão (n=2).

### 5.3 Processo de imobilização das enzimas nas nanopartículas

O método de deposição das enzimas nas nanopartículas escolhido foi a adsorção física onde as enzimas, sob forma de solução, permaneceram em contato com as nanopartículas. Um teste preliminar com a lipase de *Candida antarctica* foi realizado onde a enzima ficou em contato durante 2h com as nanopartículas sob agitação magnética à temperatura de 40 °C. A solução sobrenadante foi removida e o *ependorf* foi mantido em dessecador até a completa evaporação da solução remanescente. Isso foi avaliado visualmente e com o auxílio de um ímã, pois quando estão úmidas as nanopartículas não acompanham o movimento do mesmo. O tempo de secagem adotado foi de dois dias.

No segundo teste, as soluções enzimáticas permanecerem em contato com as nanopartículas por 3 h, à 40 °C e sob agitação magnética, e por mais 72 h sem agitação e aquecimento acondicionadas no dessecador. Após esse tempo, a solução sobrenadante foi removida e o processo de secagem ocorreu por mais dois dias.

## 5.4 Avaliação da imobilização das enzimas nas nanopartículas

### 5.4.1 Avaliação da solução sobrenadante

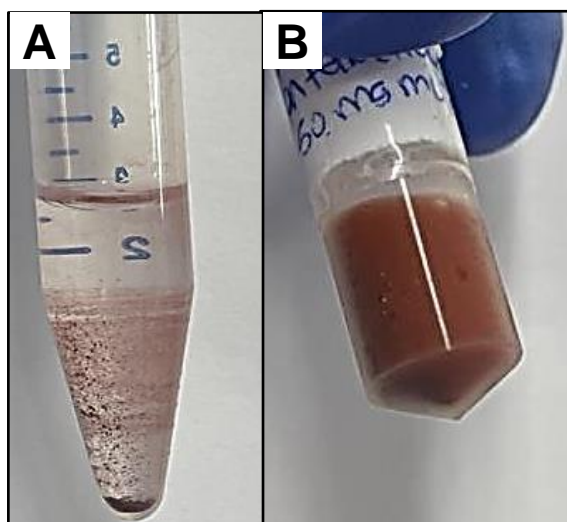
A primeira avaliação a ser realizada para verificar se houve imobilização das enzimas nas nanopartículas é através da comparação das atividades da solução inicial contendo a enzima livre, utilizada para a imobilização, e do sobrenadante removido após o período de imobilização. A medida da atividade da solução sobrenadante indica a quantidade de enzima livre remanescente após o processo de imobilização e, com isso, é possível avaliar a eficiência da imobilização. Teoricamente, quanto menor a atividade do sobrenadante, menor é a quantidade de enzima livre na solução após a imobilização indicando uma maior efetividade no processo e nas condições da imobilização.<sup>68,69</sup>

Na Tabela 5 estão apresentados os resultados citados para as enzimas avaliadas no presente trabalho na condição de 75 h de imobilização. Para as lipases de *Aspergillus oryzae* e *Candida antarctica*, as concentrações utilizadas para a imobilização foram de 50 mg mL<sup>-1</sup> e para a lipase de *Pseudomonas cepacia* 1 mg mL<sup>-1</sup> porque nas condições otimizadas, essa enzima na forma livre é muito mais ativa que as demais.

Ao contrário do esperado, para as enzimas lipase de *Candida antarctica* e lipase de *Pseudomonas cepacia*, a atividade do sobrenadante foi maior que a atividade da enzima livre. Possivelmente, ao remover o sobrenadante, algumas nanopartículas foram removidas e mantidas em contato com o mesmo até o momento da medida (Figura 18). A presença de enzimas imobilizadas pode ser vista na Figura 18-a, onde a solução sobrenadante da lipase de *Pseudomonas cepacia* inicialmente possuía coloração rosada e após alguns minutos houve decantação de partículas. Ao colocar um ímã ao lado do tubo, houve movimento das partículas indicando a presença de nanopartículas. O mesmo aconteceu com a lipase de *Candida antarctica* (Figura 18-b).

**Tabela 5.** Medidas das atividades enzimáticas das soluções de enzima livre utilizadas na imobilização e das respectivas soluções sobrenadantes resultantes (n=2).

Enzima	Atividade enzima livre (U mL <sup>-1</sup> )	Atividade sobrenadante (U mL <sup>-1</sup> )
Lipase de <i>Aspergillus oryzae</i>	39,6 ± 0,1	36,6 ± 0,1
Lipase de <i>Candida antarctica</i>	23,0 ± 0,1	44,5 ± 0,1
Lipase de <i>Pseudomonas cepacia</i>	42,8 ± 0,1	47,9 ± 0,1



**Figura 18.** Soluções sobrenadantes resultantes das imobilizações contendo nanopartículas: A) lipase de *Pseudomonas cepacia* e B) lipase de *Candida antarctica*. Fonte: Da autora, 2024.

Já a eficiência de imobilização para a lipase de *Aspergillus oryzae* pode ser determinada, pela Equação 5, e foi de 7,6%. Yücel *et al.*<sup>70</sup> avaliaram a imobilização de duas lipases de *Aspergillus oryzae* comerciais em matriz polimérica microporosa contendo grupos funcionais por adsorção física e por ligação covalente para aplicá-las na produção de ésteres metílicos de ácidos graxos a partir do óleo de canola. Como resultado, obtiveram que a imobilização por ligação covalente é mais efetiva do que a pôr adsorção física para ambas as enzimas, mas em termos de atividade, a maior quantidade de enzima no suporte



pode inativar os sítios ativos das enzimas e, com isso, há redução da atividade na imobilização por ligações covalentes. Diante disso, mesmo com menores valores de eficiência, 23,7% para a *Lipozyme* TL-100L e 11,7% para a *Novozyme* 388 – sendo esse resultado relativamente próximo ao obtido nesse trabalho – a adsorção física pode apresentar a vantagem de apresentar maiores atividades das lipases imobilizadas quando comparadas à imobilização por ligação covalente, além de ser um procedimento muito mais simples de ser feito.

#### 5.4.2 Avaliação da atividade das lipases imobilizadas

As nanopartículas obtidas após o teste inicial de imobilização durante 2 h da lipase de *Candida antarctica* foram submetidas aos ensaios de atividade enzimática conforme o item 5.3.2. Visualmente, o aspecto da solução de substrato contendo as nanopartículas não foi alterado conforme o esperado (Figura 19), indicando que não houve formação de p-NP. Além disso, o resultado obtido no ensaio de atividade enzimática foi insatisfatório, pois resultou em uma atividade nula.

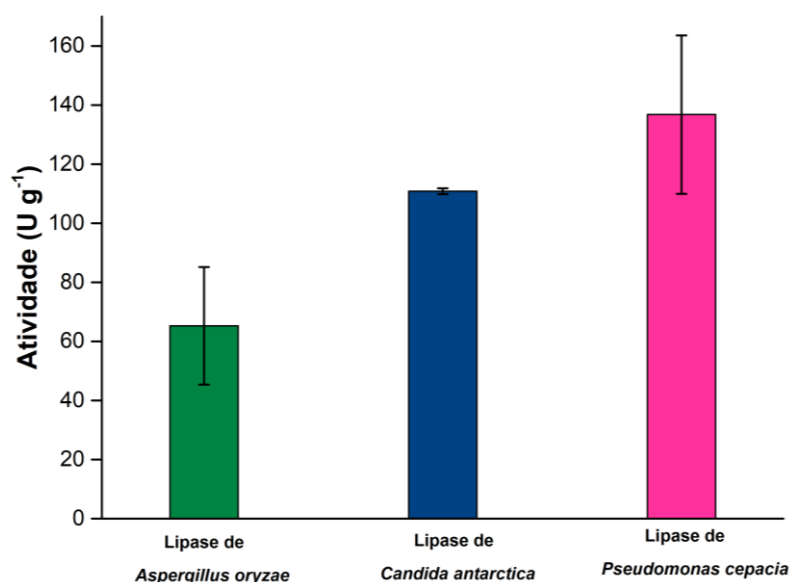
Apesar de não ter sido possível mensurar a eficiência da imobilização pela atividade do sobrenadante, as nanopartículas obtidas pelo processo de imobilização foram submetidas aos ensaios de atividade enzimática conforme o item 5.3.2. O aspecto da solução resultante ao colocar a enzima imobilizada em contato com o e substrato pode ser visto na Figura 19.



**Figura 19.** Exemplo de nanopartículas com enzima imobilizada em contato com a solução de p-NPP. Fonte: Da autora, 2024.

O primeiro indicativo de que houve imobilização das enzimas foi que ao colocá-las em contato com a solução de substrato contendo a molécula de p-NPP instantaneamente a solução adquiriu coloração amarelada, Figura 19, indicando a formação de p-NP. Ao final do tempo reacional, foi possível medir as atividades das três lipases imobilizadas conforme mostrado na Figura 20. Portanto, foi possível mensurar a atividade das enzimas imobilizadas sendo esse um forte indicativo de que ocorreu a imobilização.

As médias das atividades obtidas para as lipases de *Aspergillus oryzae*, de *Candida antarctica* e de *Pseudomonas cepacia* foram de  $65,3 \pm 19,9$  U g<sup>-1</sup>,  $110,8 \pm 0,1$  U g<sup>-1</sup> e  $136,8 \pm 26,8$  U g<sup>-1</sup>, respectivamente.



**Figura 20.** Resultado obtido para as atividades enzimáticas das lipases imobilizadas por adsorção física durante 75h. As barras verticais indicam o desvio padrão (n=2).

Yücel *et al.*<sup>70</sup> após imobilizarem as lipases comerciais de *Aspergillus oryzae* na matriz polimérica microporosa com grupos funcionais por adsorção física, determinaram a atividade das mesmas pelo método espectrofotométrico com p-NPP como substrato onde a absorbância da formação de p-NP foi monitorada a 410 nm. As atividades obtidas foram de  $22,2$  U g<sup>-1</sup> para a *Lipozyme* TL-100L e  $20,3$  U g<sup>-1</sup> para a *Novozyme* 388. Ao comparar com o resultado obtido no trabalho,  $65,3 \pm 19,9$  U g<sup>-1</sup>, pode-se inferir que a lipase de *Aspergillus oryzae*

imobilizada em nanopartículas, apresentou maior atividade que as citadas acima.

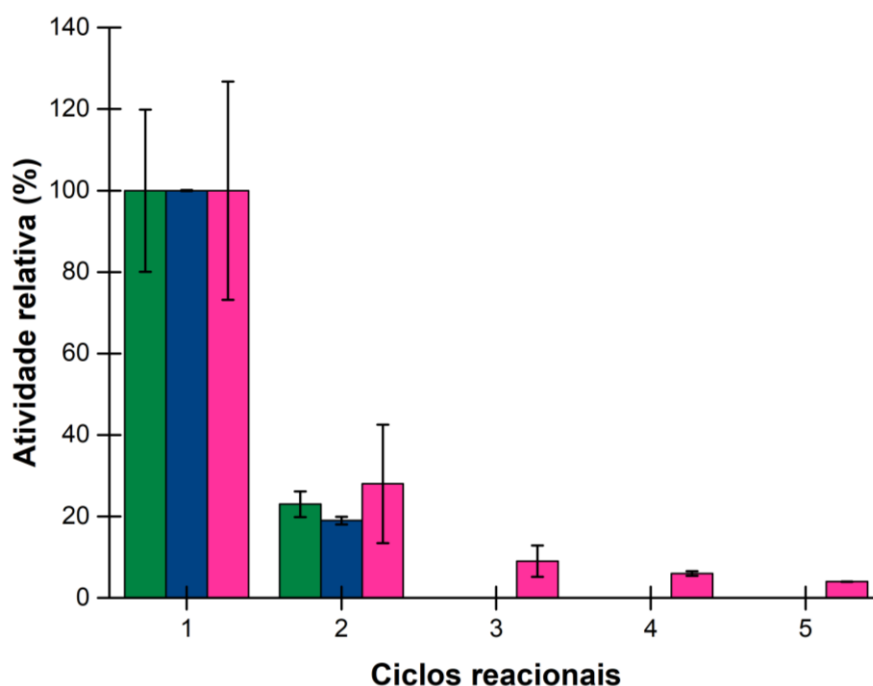
Em relação a lipase de *Candida antarctica*, Nicoletti *et al.*<sup>71</sup> imobilizaram a lipase de *Candida antarctica* B por diversas técnicas, sendo a adsorção física uma das analisadas, em espumas de poliuretano. A avaliação da atividade também foi realizada pelo aumento da absorbância em 410 nm devido a formação do p-NP através da hidrólise do p-NPP. O contato entre a enzima e o suporte durou 2h e a atividade obtida foi de  $2,3 \pm 0,3 \text{ U g}^{-1}$ . Apesar dos suportes utilizados serem diferentes, há um indicativo de que a adsorção física, mesmo que com um tempo de contato longo em relação à literatura, 75 h, foi efetiva porque a atividade da lipase de *Candida antarctica* imobilizada no presente trabalho foi de  $110,8 \pm 0,1 \text{ U g}^{-1}$  sendo aproximadamente 48 vezes maior que o relatado na literatura. Como um teste preliminar de imobilização foi realizado entre a solução enzimática e as nanopartículas com o mesmo tempo de contato de 2 h e foi obtida atividade nula nas condições avaliadas, infere-se que o tempo de contato influenciou de fato na efetividade da adsorção física.

Há registros na literatura de adsorção física da lipase de *Pseudomonas cepacia* em diversos suportes e, nos mesmos, são utilizados maiores tempos de contato para a efetividade da imobilização. Ou *et al.*<sup>72</sup> promoveram a imobilização efetiva da enzima por adsorção física na superfície e, majoritariamente no interior dos poros do MOF do tipo ZIF-8 com um tempo de contato de 24h para imobilização. Sakai *et al.*<sup>73</sup> comprovaram que há como imobilizar a enzima por adsorção física com tempo de contato de 11h em fibras de poliacrilonitrilo e podem ser aplicáveis na produção de butil-biodiesel. Entretanto não há como comparar as atividades imobilizadas desse trabalho com os dados encontrados na literatura porque nenhum trabalho até o presente momento utilizou o método para a medida da atividade baseado na hidrólise do p-NPP.

#### 5.4.3 Avaliação do reuso das enzimas imobilizadas

Uma das grandes vantagens de aplicar enzimas imobilizadas em processos, é a possibilidade de remoção do meio e a reutilização das mesmas visando a redução de custos. Por isso, é importante realizar o estudo que indica quantas vezes a enzima imobilizada pode ser reutilizada.<sup>74</sup> Na Figura 21, foram

apresentadas as atividades relativas de cada enzima *versus* o número de ciclo reacionais que cada uma atingiu.



**Figura 21.** Avaliação da reutilização das enzimas lipase de *Aspergillus oryzae* (■), de *Candida antarctica* (■) e de *Pseudomonas cepacia* (■) através da atividade relativa obtida. As barras verticais indicam o desvio padrão (n=2).

Avaliando o gráfico apresentado na Figura 21, a lipase de *Aspergillus oryzae* pode ser utilizada duas vezes e, no segundo uso, apresentou apenas  $23,1 \pm 3,2$  % da atividade do primeiro ciclo. A lipase de *Candida antarctica* também apresentou atividade em apenas dois ciclos reacionais e, ao ser submetida ao segundo ciclo reacional, apresentou atividade de  $19,2 \pm 1,0$  % da atividade do primeiro ciclo. Já a lipase de *Pseudomonas cepacia*, foi ativa durante cinco ciclos reacionais onde, no quinto ciclo, apresentou  $3,5 \pm 0,1$  % da atividade do primeiro ciclo. As três enzimas imobilizadas tiveram o mesmo comportamento indicando que são completamente ativas somente no primeiro uso. Conforme esperado, com o aumento no número de ciclo reacionais, há redução da atividade enzimática até que não apresente mais atividade.

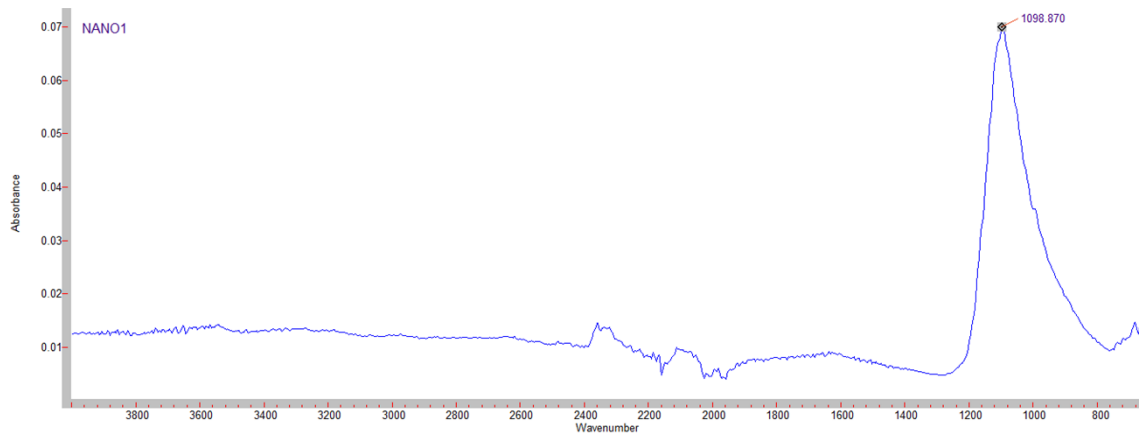
Cai *et al.*<sup>75</sup>, avaliaram a imobilização da lipase de *Aspergillus oryzae* em dois diferentes suportes através da adsorção física, em uma matriz de sílica e

em matriz de sílica-celulose. Para ambos os suportes, foi observado o mesmo comportamento de decréscimo da atividade enzimática conforme o aumento do ciclo reacional. Possivelmente, isso ocorre porque a adsorção física é considerada como um método de imobilização reversível, ou seja, à medida que as enzimas imobilizadas são reutilizadas ocorre a lixiviação da enzima das nanopartículas devido às fracas ligações entre as mesmas.<sup>73</sup>

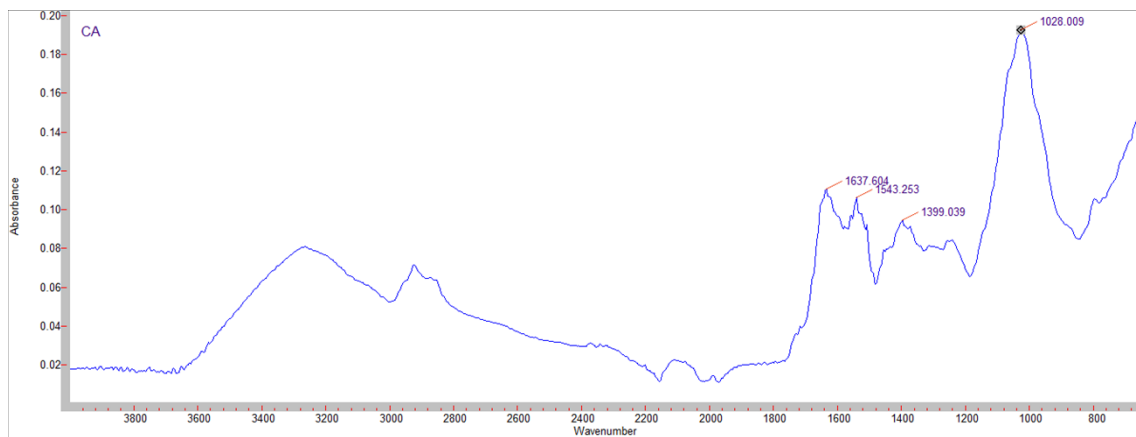
#### 5.4.4 Avaliação da imobilização por FTIR-ATR

Para conseguir analisar eficientemente a imobilização das enzimas nas nanopartículas através do espectro da enzima imobilizada foram adquiridos espectros individuais tanto da nanopartícula, Figura 22, quanto da enzima para obter os sinais característicos de cada uma. Na Figura 23, o espectro de FTIR-ATR da enzima lipase de *Candida antarctica*.

Na Figura 22, observa-se uma única banda expressiva em aproximadamente  $1098\text{ cm}^{-1}$ . Já na Figura 23, observam-se as bandas mais proeminentes para a lipase de *Candida antarctica*. Conforme a literatura<sup>76</sup>, a banda entre  $1700 - 1600\text{ cm}^{-1}$  é devido ao modo de alongamento da carbonila das ligações peptídicas dos aminoácidos que constituem as lipases. Já a banda com centro em aproximadamente  $1547\text{ cm}^{-1}$  corresponde às deformações angulares das ligações N-H. Na região localizada entre  $1400 - 1200\text{ cm}^{-1}$ , a banda é uma combinação da vibração de deformação dos grupos NH e CN. Por fim, a banda em  $\sim 1028\text{ cm}^{-1}$  representa a ligação C-O presente nas lipases.<sup>77</sup> Como as lipases de diferentes fontes possuem composição similar, as bandas obtidas para as enzimas avaliadas foram relacionadas com as regiões descritas acima e foram apresentadas na Tabela 6.



**Figura 22.** Espectro de FTIR-ATR da nanopartícula pura.

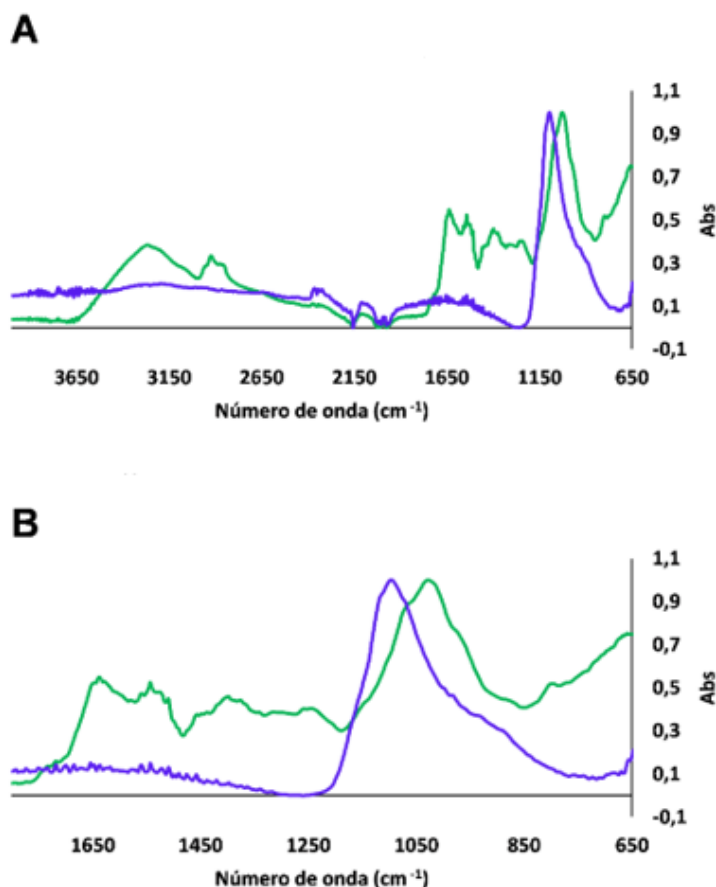


**Figura 23.** Espectro de FTIR-ATR da lipase de *Candida antarctica* pura com destaque para os sinais relevantes.

**Tabela 6.** Relação entre as principais bandas das lipases segundo a literatura e as bandas obtidas nos espectros de FTIR-ATR para as enzimas avaliadas.

Região	Caracterização das bandas	Lipase de <i>Aspergillus oryzae</i>	Lipase de <i>Candida antarctica</i>	Lipase de <i>Pseudomonas cepacia</i>
1700 – 1600 $\text{cm}^{-1}$	Alongamento da carbonila referente às ligações peptídicas dos aminoácidos <sup>76</sup>	1635 $\text{cm}^{-1}$	1637 $\text{cm}^{-1}$	1147 $\text{cm}^{-1}$
~ 1547 $\text{cm}^{-1}$	Deformações angulares da ligação NH <sup>76</sup>	1524 $\text{cm}^{-1}$	1543 $\text{cm}^{-1}$	1076 $\text{cm}^{-1}$
1400 – 1200 $\text{cm}^{-1}$	Deformações dos grupos NH e CN <sup>76</sup>	1385 $\text{cm}^{-1}$	1399 $\text{cm}^{-1}$	990 $\text{cm}^{-1}$
~1028 $\text{cm}^{-1}$	Ligação C-O <sup>77</sup>	1032 $\text{cm}^{-1}$	1028 $\text{cm}^{-1}$	928 $\text{cm}^{-1}$

A fim de avaliar se houve alguma sobreposição entre bandas dos espectros de FTIR-ATR das nanopartículas e das enzimas, ambas puras, sem imobilização, os espectros foram sobrepostos (Figura 24). Ao sobrepor os espectros das nanopartículas sem imobilização e da enzima livre, Figura 24-a, houve sobreposição da banda referente à nanopartícula em 1098  $\text{cm}^{-1}$  e da enzima em 1028  $\text{cm}^{-1}$ . A região entre 1800 – 650  $\text{cm}^{-1}$  é chamada de região *fingerprint*, Figura 24-b. Nessa região há um enfoque dessa sobreposição porque é a região onde estão as bandas significativas das lipases, pois a região entre 3500 – 3100  $\text{cm}^{-1}$  corresponde à vibração de estiramento dos hidrogênios ligados a grupo hidroxilas.<sup>77</sup> Essa proximidade das bandas, dificultou a avaliação da imobilização da enzima pelo espectro de FTIR-ATR.

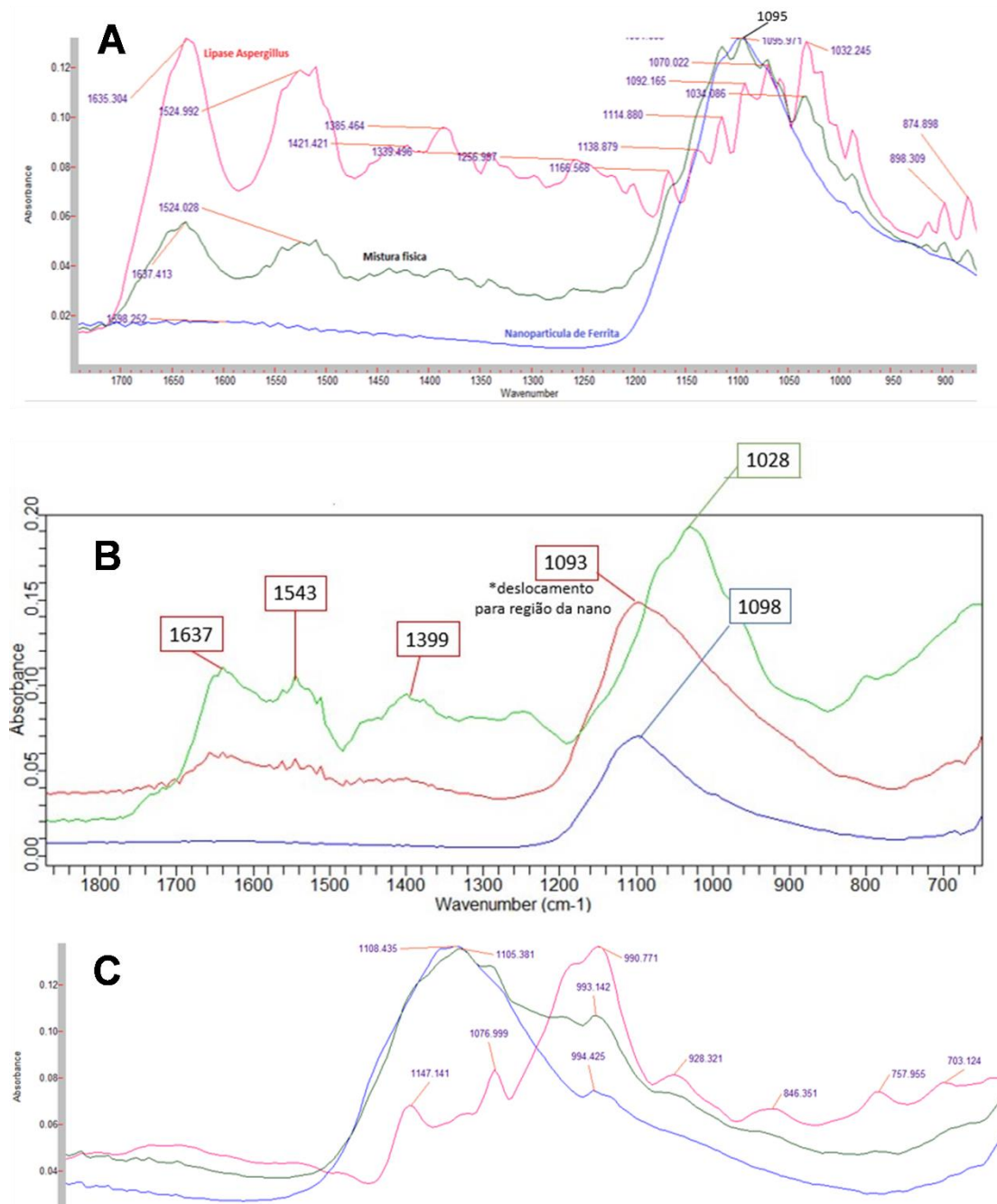


**Figura 24.** A) Espectro das nanopartículas (—) e lipase de *Candida antarctica* (—) não imobilizadas (3650 – 650  $\text{cm}^{-1}$ ) e B) espectro das nanopartículas (—) e lipase de *Candida antarctica* (—) não imobilizadas com enfoque na região de *fingerpint* do espectro (1650 – 650  $\text{cm}^{-1}$ ).

Como alternativa para a avaliação da imobilização, foi realizada uma mistura física entre a nanopartícula e a lipase. Foi realizada a comparação entre o espectro da nanopartícula pura, da lipase pura e da mistura física entre nanopartícula e a respectiva lipase e estão apresentados na Figura 25-a para a lipase de *Aspergillus oryzae*, na Figura 25-b para a lipase de *Candida antarctica* e na Figura 25-c para a lipase de *Pseudomonas cepacia*. A avaliação dos espectros de mistura física indica que, quando a nanopartícula está em contato com a enzima em questão, há a presença de uma banda deslocada para a região da banda da nanopartícula pura (1098  $\text{cm}^{-1}$ ). Essa banda está localizada na mistura física em 1095  $\text{cm}^{-1}$ , 1093  $\text{cm}^{-1}$  e 1105  $\text{cm}^{-1}$  para as lipases de *Aspergillus oryzae*, de *Candida antarctica* e de *Pseudomonas cepacia* (Figura 25-a, Figura

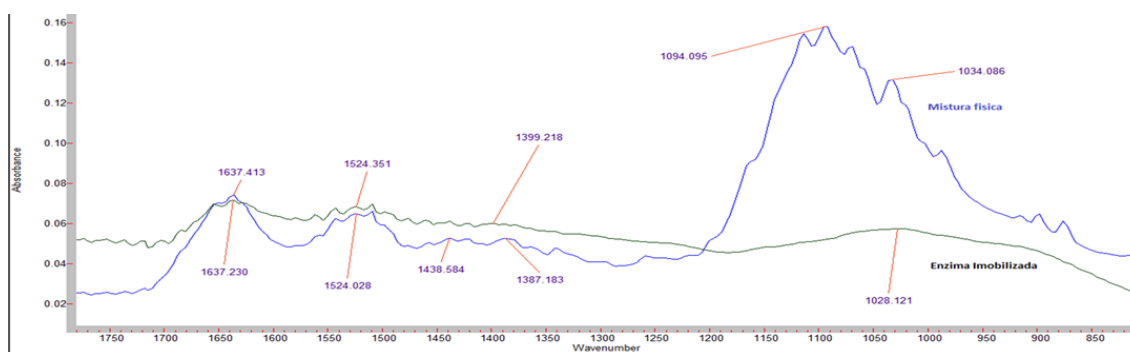


25-b e Figura 25-c, respectivamente). Sendo a presença dessa banda no espectro da enzima imobilizada um indicativo de possível imobilização.



**Figura 25.** Espectro FTIR-ATR A) da nanopartícula pura (—), da mistura física (—) e da lipase de *Aspergillus oryzae* (—), B) da nanopartícula pura (—), da mistura física (—) e da lipase de *Candida antarctica* (—) e C) da nanopartícula pura (—), da mistura física (—) e da lipase de *Pseudomonas cepacia* (—).

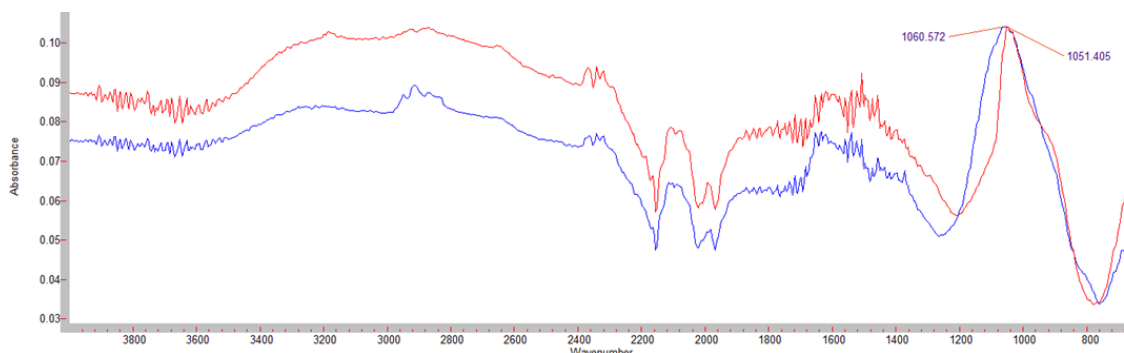
Para a lipase de *Aspergillus oryzae* imobilizada, Figura 26, ao comparar os espectros de FTIR-ATR da mistura física e da enzima imobilizada, observa-se que na mistura física há a presença dos picos característicos da lipase na região de 1700 – 1350  $\text{cm}^{-1}$  e da banda da lipase em 1028  $\text{cm}^{-1}$ . Portanto, não foi observada a banda deslocada para a região da nanopartícula conforme o observado na mistura física (Figura 25-a). Entretanto, a presença das bandas referentes à lipase no espectro da lipase de *Aspergillus oryzae* imobilizada e o resultado obtido no ensaio de atividade enzimática para a enzima imobilizada, indicam que houve a imobilização da lipase de *Aspergillus oryzae* nas nanopartículas.



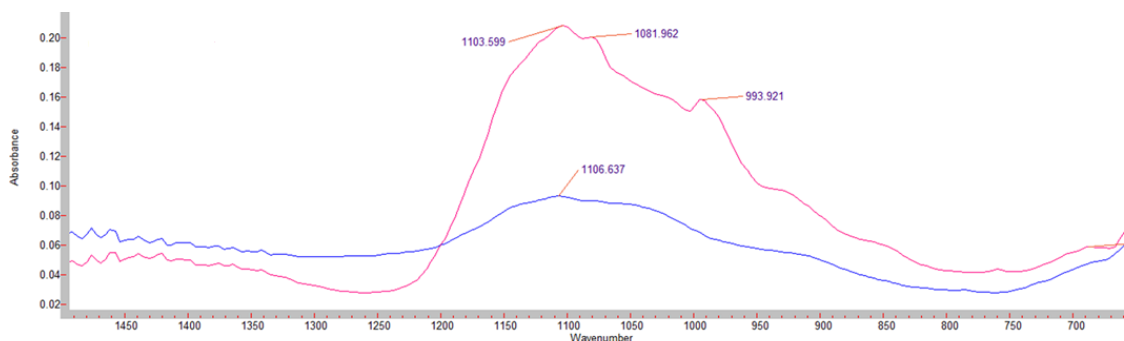
**Figura 26.** Comparação dos espectros FTIR- ATR da mistura física (—) e da enzima imobilizada (—) para a lipase de *Aspergillus oryzae*.

Nessa avaliação da lipase de *Candida antarctica* imobilizada, Figura 27, foi realizada uma nova mistura física e o deslocamento da banda para a região da nanopartícula, na mistura física, foi identificado no comprimento de onda de 1060  $\text{cm}^{-1}$ . Já no espectro obtido para a enzima imobilizada, foi detectada a presença desse deslocamento no comprimento de onda de 1051  $\text{cm}^{-1}$ . Portanto, o deslocamento da banda centrada em 1051  $\text{cm}^{-1}$  da enzima imobilizada coincide com o deslocamento da banda centrada em 1060  $\text{cm}^{-1}$  da mistura física, indicando que houve a imobilização da lipase de *Candida antarctica*. O deslocamento da banda e o resultado da atividade da enzima imobilizada confirmam a imobilização da lipase de *Candida antarctica* nas nanopartículas. No espectro referente a lipase de *Pseudomonas cepacia* imobilizada, Figura 28, há a presença da banda deslocada em 1103  $\text{cm}^{-1}$  que corresponde à banda

deslocada em  $1105\text{ cm}^{-1}$  presente na mistura física (Figura 25-c). Esse resultado e a atividade da enzima imobilizada indicam que houve imobilização da lipase de *Pseudomonas cepacia* nas nanopartículas.



**Figura 27.** Comparação dos espectros FTIR-ATR da mistura física (—) e da enzima imobilizada (—) para a lipase de *Candida antarctica*.



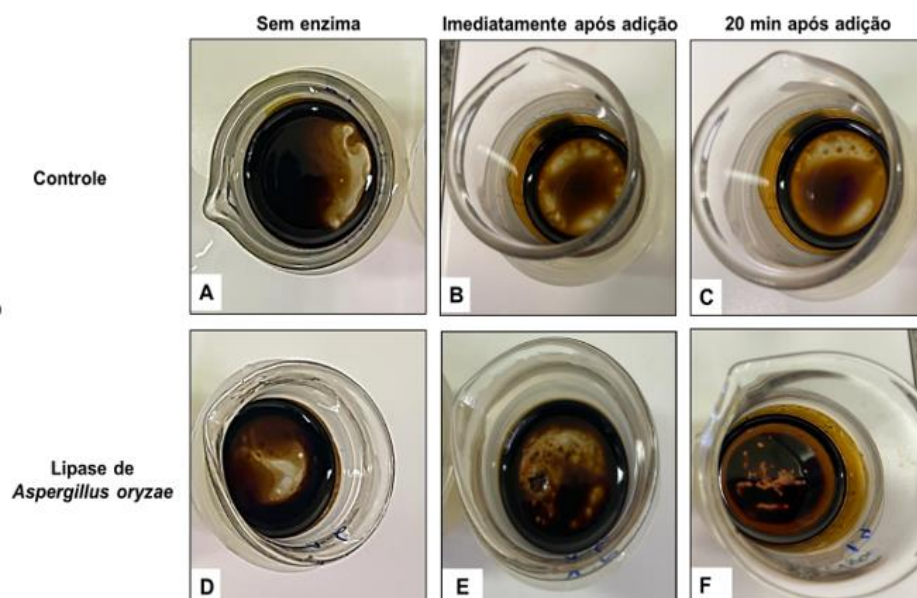
**Figura 28.** Comparação dos espectros FTIR-ATR da mistura física (—) e da enzima imobilizada (—) para a lipase de *Pseudomonas cepacia*.

As informações obtidas a partir dos espectros de FTIR-ATR para as três lipases corroboram com aqueles obtidos na avaliação da atividade das enzimas imobilizadas. Nas condições utilizadas no presente trabalho, as lipases de *Aspergillus oryzae*, de *Candida antarctica* e de *Pseudomonas cepacia* foram eficientemente imobilizadas nas nanopartículas.

## 5.5 Degradação enzimática do petróleo

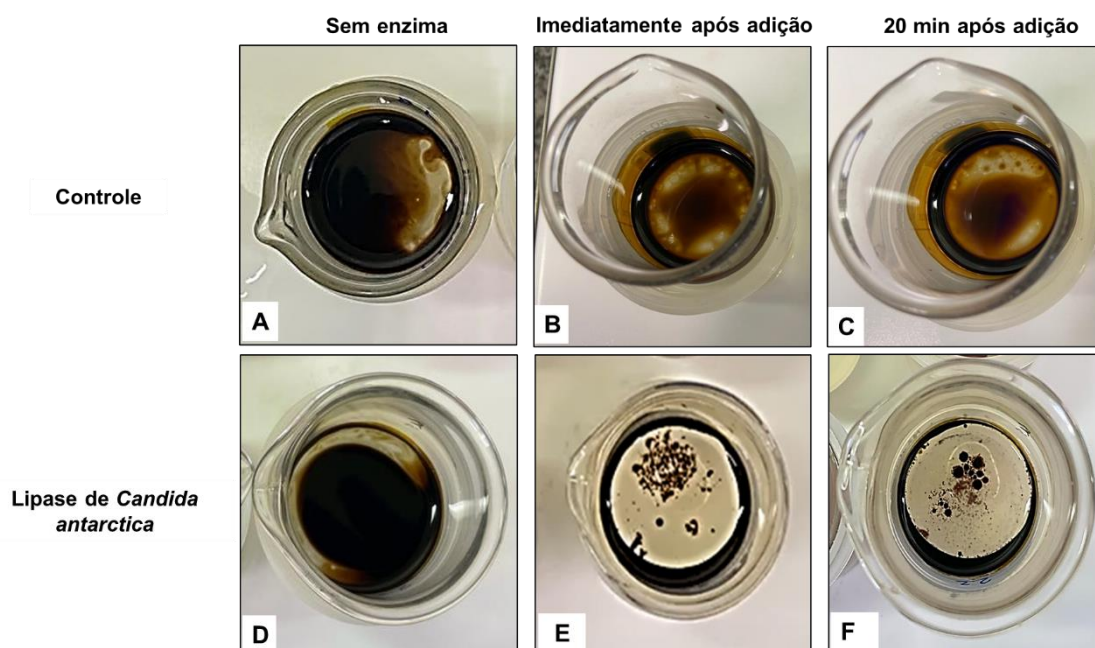
As enzimas imobilizadas foram avaliadas individualmente para o petróleo na forma não emulsionada e na forma emulsionada. A análise gravimétrica foi realizada nas amostras não emulsionadas para garantir que a redução observada fosse exclusivamente efeito das enzimas imobilizadas e não relativas às perdas nas paredes dos frascos utilizados ou na ponteira do dispersor utilizado para a formação das emulsões. Na Figura 29, foi avaliado o aspecto visual da adição da lipase de *Aspergillus oryzae* em amostra não emulsionada em comparação à amostra controle em que não foi adicionada a enzima registrada no mesmo tempo.

As lipases imobilizadas apresentaram efeito visual distintos quando comparadas com a amostra controle (Figura 29-a após o aquecimento da amostra e Figura 29-d após os 20 min do ensaio de degradação). Foi observado que ao longo do tempo do ensaio, uma parte do petróleo concentrou-se nas paredes do béquer. Quando a lipase de *Aspergillus oryzae* imobilizada foi adicionada (Figura 29-e) inicialmente as nanopartículas ficaram aglomeradas e, visualmente, não houve diferença expressiva quando comparada à amostra inicial (Figura 29-d). Ao final do ensaio (Figura 29-f), as nanopartículas desaglomeraram, ocorreu o acúmulo de petróleo nas bordas do béquer e a formação de uma mancha concêntrica e, possivelmente, houve degradação porque em alguns pontos no meio da mancha não há óleo.



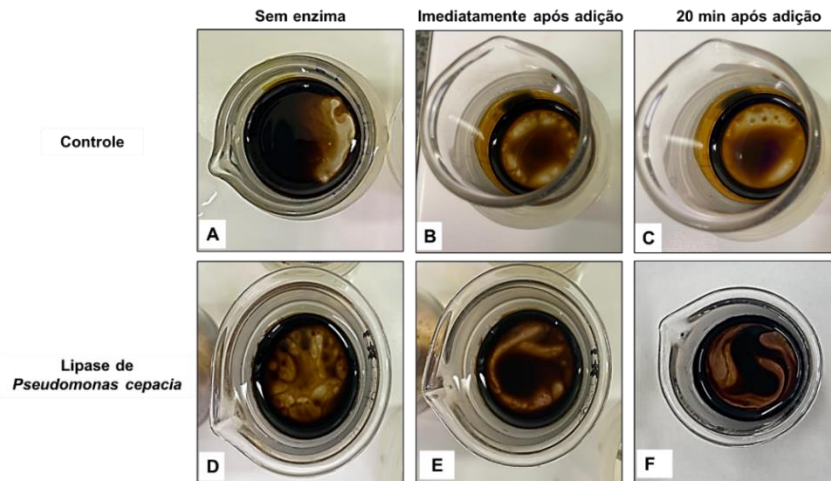
**Figura 29.** Efeito visual da adição da lipase de *Aspergillus oryzae* imobilizada em amostras não emulsionadas. A-C controle e D – F amostra.

Já a adição da lipase de *Candida antarctica* imobilizada nas amostras não emulsionadas acarretou no melhor efeito visual dentre as três enzimas, conforme Figura 30. Sem a adição da lipase de *Candida antarctica*, o petróleo formou uma grande mancha na superfície da água (Figura 30-d). Enquanto ocorria a adição da enzima (Figura 30-e), parte do petróleo ficou aderida nas nanopartículas que ficaram agitando durante o processo. Ao final do ensaio (Figura 30-f), aparentemente as nanopartículas imobilizadas foram mais agrupadas e com menor quantidade de petróleo aderida. O aspecto final da amostra, é de que há menos petróleo na superfície do que no início.



**Figura 30.** Efeito visual da adição da lipase de *Candida antarctica* imobilizada em amostras não emulsionadas. A-C controle e D – F amostra.

Ao contrário das demais enzimas, a lipase de *Pseudomonas cepacia* não apresentou nenhum efeito visual significativo nas amostras não emulsionadas conforme representado na Figura 31. As enzimas imobilizadas nas nanopartículas não foram observadas na superfície (Figura 31-e e Figura 31-f) e a única diferença visual foi que a mancha de petróleo ficou mais concentrada quando comparada com a amostra inicial (Figura 31-d).

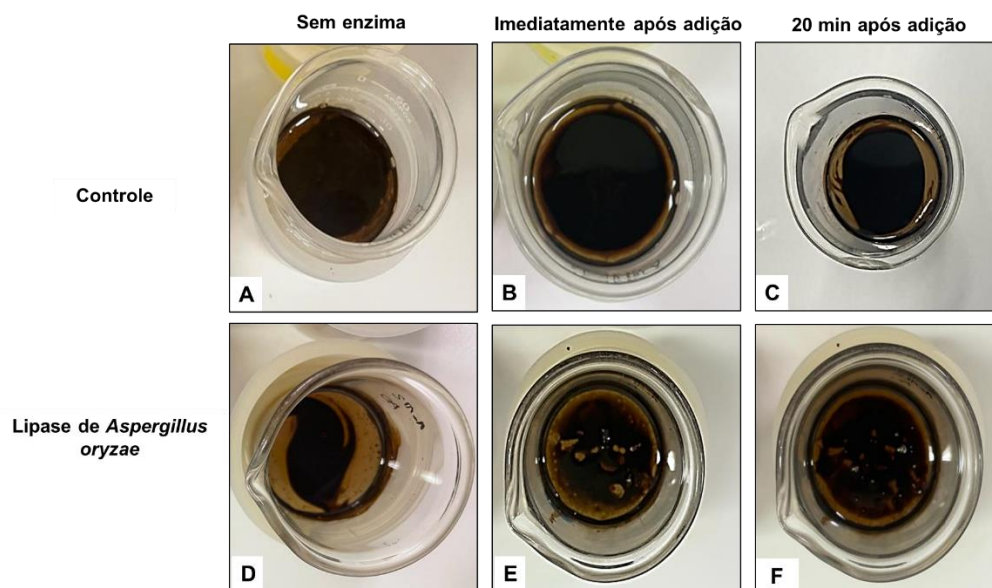


**Figura 31.** Efeito visual da adição da lipase de *Pseudomonas cepacia* imobilizada em amostras não emulsionadas. A-C controle e D – F amostra.

As adições das lipases imobilizadas nas nanopartículas nas amostras emulsionadas apresentaram efeitos visuais similares aos das amostras não emulsionadas que podem ser vistos em Figura 32 para lipase de *Aspergillus oryzae*, Figura 33 para lipase de *Candida antarctica* e Figura 34 para lipase de *Pseudomonas cepacia*.

As amostras iniciais apresentam menor mancha de petróleo na superfície devido a formação da emulsão e que, diferente das amostras não emulsionadas, a fase aquosa adquiriu coloração marrom claro. A amostra controle em todos os estágios (Figura 32 a-c, Figura 33 a-c, e Figura 34 a-c) também apresentaram o comportamento de concentrar o petróleo nas bordas do béquer, entretanto, em menor quantidade quando comparadas com as amostras não emulsionadas de controle (Figura 29 a-c, Figura 30 a-c, e Figura 31 a-c) e manteve a mancha de óleo na superfície durante o ensaio.

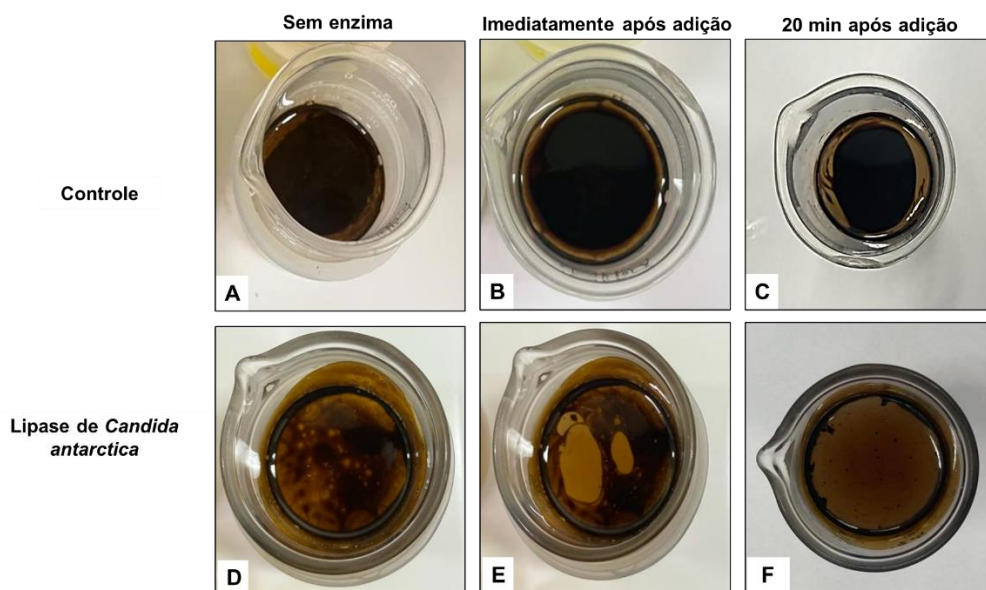
A adição da lipase de *Aspergillus oryzae* imobilizada na emulsão (Figura 32-e), diferentemente da adição na amostra não emulsionada (Figura 29-e), já demonstrou efeito visual instantaneamente ao abrir fendas na superfície do óleo. Além disso, algumas nanopartículas permaneceram agitando no fundo do béquer. Ao final do ensaio (Figura 32-f), aparentemente houve um aumento na quantidade de fendas abertas na superfície do petróleo.



**Figura 32.** Efeito visual da adição da lipase de *Aspergillus oryzae* imobilizada em amostras não emulsionadas. A-C controle e D – F amostra.

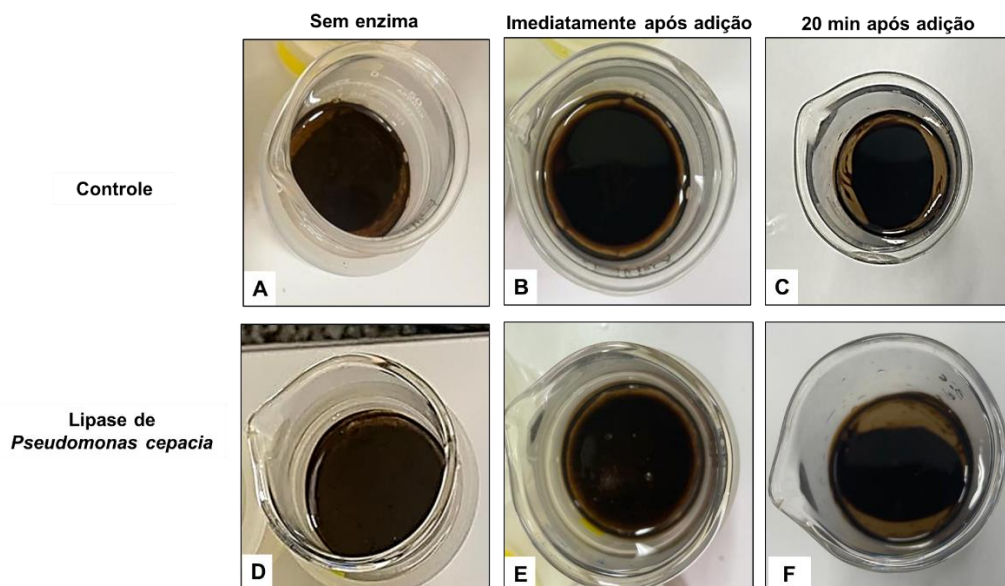
A lipase de *Candida antarctica* imobilizada ao ser adicionada (Figura 33) não apresentou o mesmo comportamento da amostra não emulsionada. Assim que entrou em contato com o petróleo, provocou a repulsão dele para as bordas do béquer (Figura 33-e). Ao invés disso, abriu fendas na mancha alocada na superfície do petróleo e algumas nanopartículas foram para o fundo do béquer, mesmo comportamento observado quando a lipase de *Aspergillus oryzae* imobilizada entrou em contato com a emulsão. Entretanto, ao final do ensaio (Figura 33-f), na superfície da emulsão, não existia mais a mancha de petróleo. Apenas um pouco desse concentrado nas paredes do béquer, o que também foi observado na amostra controle (Figura 33-c) e algumas nanopartículas imobilizadas recobertas com petróleo. Novamente, analisando visualmente, a lipase de *Candida antarctica* imobilizada apresentou o maior efeito, pois é a que mais limpa a superfície da emulsão.





**Figura 33.** Efeito visual da adição da lipase de *Candida antarctica* imobilizada em amostras não emulsionadas. A-C controle e D – F amostra.

Já a lipase de *Pseudomonas cepacia* imobilizada foi adicionada à emulsão (Figura 34-e) e nenhum efeito visual foi observado. Tanto que o aspecto ao final do ensaio (Figura 34-f), onde ocorreu uma pequena redução da mancha, é similar ao aspecto final da amostra controle (Figura 34-g).



**Figura 34.** Efeito visual da adição da lipase de *Pseudomonas cepacia* imobilizada em amostras não emulsionadas. A-C controle e D – F amostra.

### 5.5.1 Avaliação gravimétrica do petróleo após a degradação

A avaliação do óleo resultante da degradação após a aplicação das enzimas imobilizadas pelo método gravimétrico permite, através da diferença de massa, avaliar se houve redução de massa do óleo residual. Essa avaliação pode indicar a eficácia do processo de degradação.

Através da diferença da massa adicionada e da massa obtida na análise gravimétrica, para as amostras controle (sem adição das enzimas), foi determinada a média de massa perdida no processo de degradação das amostras não emulsionadas  $0,0768 \pm 0,0014$  g. Portanto, para os cálculos da redução de massa foi subtraída a massa média de petróleo perdida devido ao processo de separação entre as fases aquosa e orgânica. O resultado da redução de massa de cada enzima está apresentado na Tabela 7.

Ao comparar as médias pelo teste ANOVA, intervalo de confiança de 95%, as médias são significativamente diferentes. A lipase de *Pseudomonas cepacia* teve a menor redução de petróleo dentre as enzimas estudadas, resultado este que condiz com o observado na avaliação visual do processo de degradação. Apesar da lipase de *Candida antarctica* ter apresentado o melhor efeito visual, foi a lipase de *Aspergillus oryzae* que exprimiu a maior porcentagem de redução da massa de petróleo. Ao analisar concomitantemente os resultados visuais e gravimétricos, as lipases de *Aspergillus oryzae* e de *Candida antarctica* imobilizadas dentre as avaliadas e nas condições aplicadas, são as enzimas que possuem um melhor efeito para a degradação de petróleo.

**Tabela 7.** Resultados referentes à redução de massa de petróleo após o ensaio de degradação enzimática das amostras não emulsionadas.

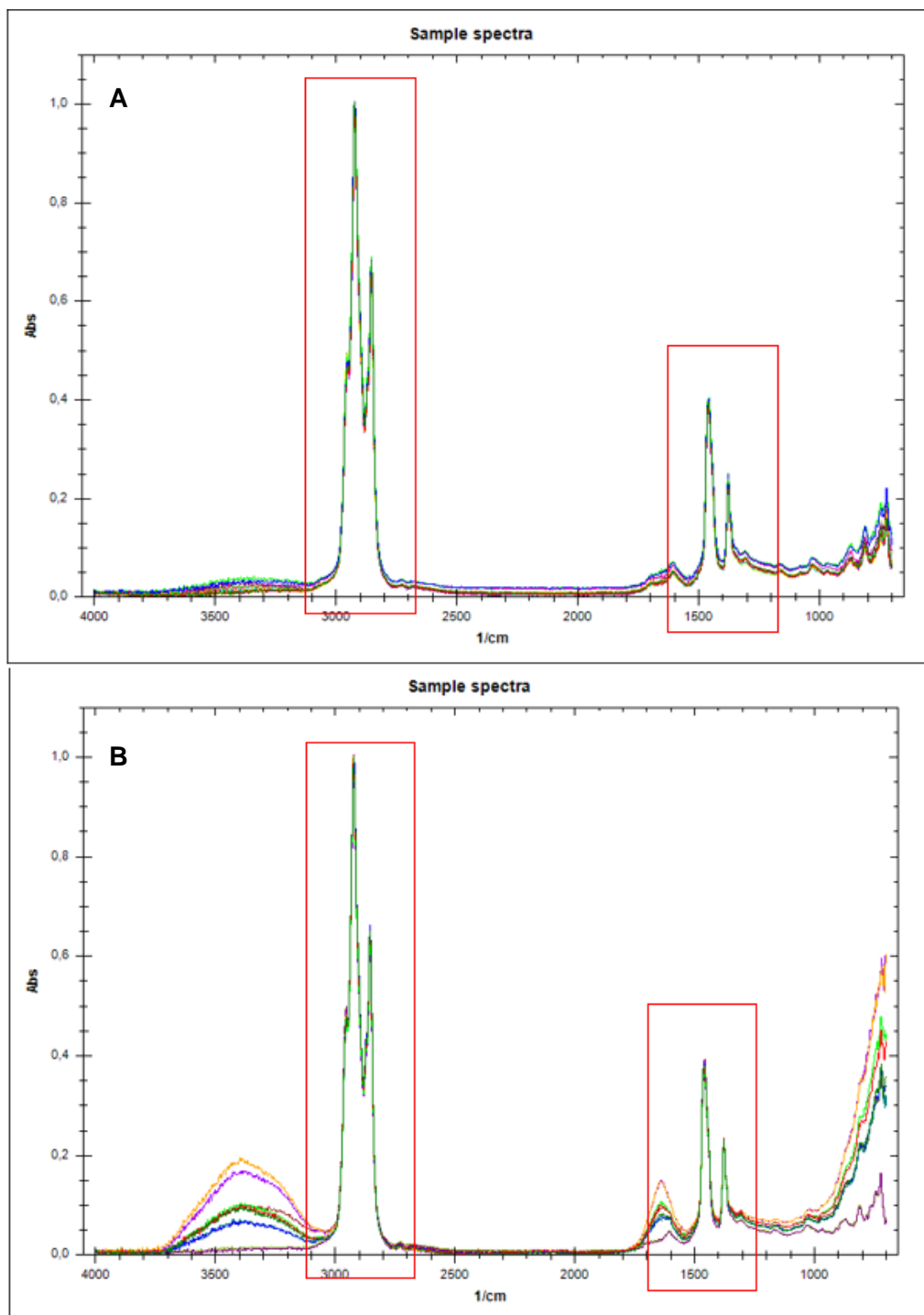
Enzima*	Redução de massa de petróleo $\pm$ desvio padrão (%)	RSD (%)
Lipase de <i>Aspergillus oryzae</i>	$7,7 \pm 0,1$	1,30
Lipase de <i>Candida antarctica</i>	$5,5 \pm 0,1$	1,82
Lipase de <i>Pseudomonas cepacia</i>	$4,0 \pm 0,1$	2,50

\* n = 2

### 5.5.2 Avaliação das HCAs

Como outra forma de avaliar a degradação promovida pelas enzimas, foram realizadas análises de FTIR-ATR no óleo após a aplicação das enzimas. Devido a quantidade de bandas referentes aos componentes do petróleo nos espectros de FTIR-ATR e a dificuldade de caracterizá-lo, optou-se por realizar a avaliação por HCA. Foram gerados dendrogramas individuais para cada enzima imobilizada avaliada e em cada tipo de amostra, não emulsionada e emulsionada. Na Figura 35 foram apresentados os espectros de FTIR-ATR das amostras após degradação tanto para as amostras não emulsionadas quanto para as amostras emulsionadas.

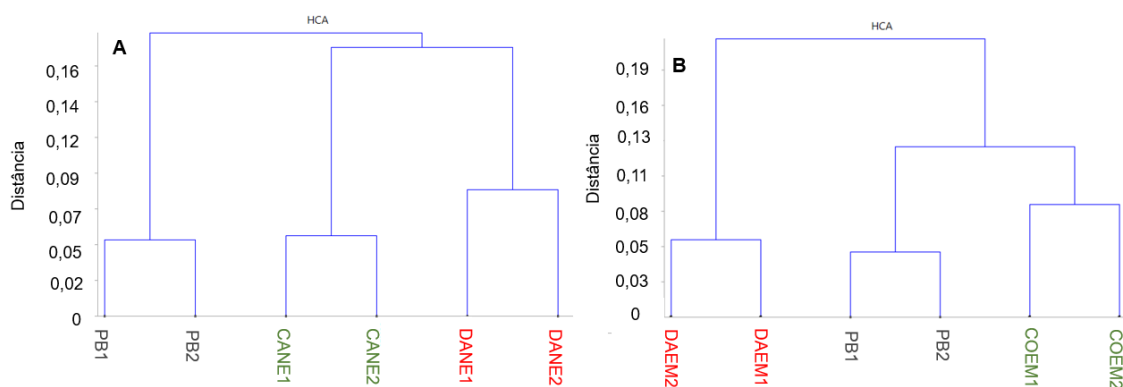
Na Figura 35-a foram sobrepostos os espectros de FTIR-ATR das amostras não emulsionadas para as três enzimas imobilizadas e na Figura 35-b foram sobrepostos os espectros de FTIR-ATR das amostras emulsionadas para as três enzimas imobilizadas. A sobreposição, em ambos os processos, foi realizada para distinguir em quais regiões seriam obtidas informações relevantes quanto à composição após a degradação. Após a análise da sobreposição resultante para cada processo, foram selecionadas duas regiões em que as informações relevantes estão concentradas. As regiões selecionadas foram indicadas em vermelha, em ambas as figuras, e foram identificadas como região alta ( $3000 - 2800 \text{ cm}^{-1}$ ) e região baixa ( $1490 - 1350 \text{ cm}^{-1}$ ).



**Figura 35.** Espectros de FTIR-ATR das amostras A) não emulsionadas e B) emulsionadas após o ensaio de degradação.

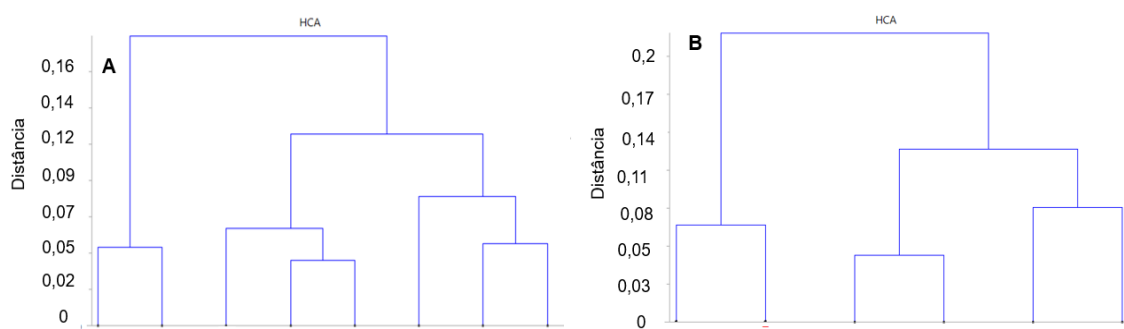
Os primeiros resultados analisados foram os referentes a degradação da enzima de *Aspergillus oryzae* e o dendrogramas foram apresentados na Figura 36. Nos dendrogramas, as amostras que estão conectadas no mesmo *cluster* são mais similares do que amostras que estejam localizadas no *cluster* adjacente.<sup>78</sup> Para as amostras não emulsionadas, Figura 36-a, o petróleo bruto

(PB1 e PB2) localizou-se em um *cluster* e o controle (CANE1 e CANE2), sem adição de enzimas imobilizadas, estava no mesmo *cluster* que as amostras degradadas (DANEM1 e DANEM2). Isso indica que o controle e as amostras em que houve adição de lipase de *Aspergillus oryzae* imobilizada nas nanopartículas são similares entre si, mas é positivo que as amostras estejam em *subclusters* diferentes e que diferem do petróleo bruto indicando que a enzima promove algum efeito de degradação nas amostras não emulsionadas. Já as amostras emulsionadas apresentaram comportamentos diferentes. Observou-se, Figura 36-b, que os controles emulsionados (COEM1, COEM2) localizaram-se no mesmo *cluster* que o petróleo bruto, ou seja, há indícios de que a degradação na forma emulsionada foi mais eficaz. Como as amostras em que houve a adição de lipase de *Aspergillus oryzae* imobilizada (DAEM1 e DAEM2), localizaram-se em um *cluster* diferente, há indicativos de que alguma componente na composição dessas amostras foi alterada mais significativamente, em comparação ao processo não emulsionado, indicando que o processo de emulsificação favorece à ação das enzimas imobilizadas na degradação do óleo.



**Figura 36.** Gráfico resultante da HCA dos espectros na região do infravermelho das amostras de petróleo bruto, controle não emulsionado e controle emulsionado, amostra não emulsionada degradada e amostra emulsionada degradada pela lipase de *Aspergillus oryzae* imobilizada. Onde: a) dendrograma relativo à degradação de amostras não emulsionadas e B) dendrograma relativo à degradação de amostras emulsionadas.

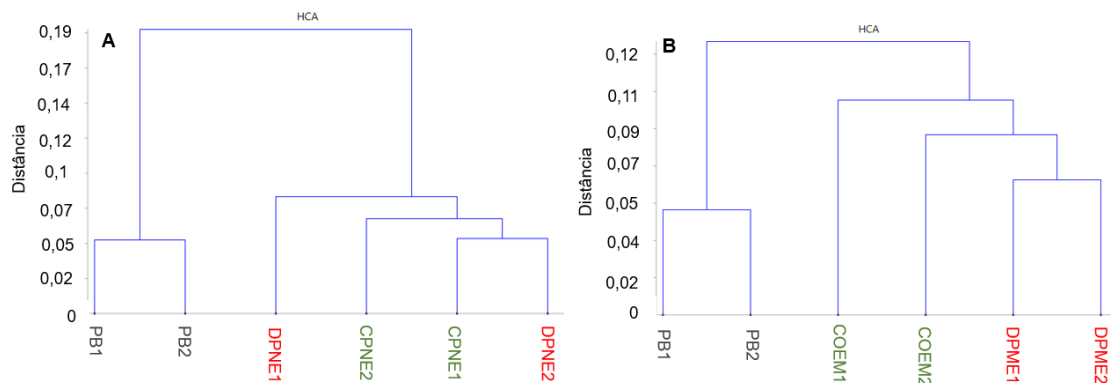
Já para a avaliar a degradação das amostras em que foi adicionada a lipase de *Candida antarctica* imobilizada foram obtidas os dendogramas apresentados na Figura 37. As amostras não emulsionadas que foram submetidas ao ensaio de degradação com a lipase de *Candida antarctica* imobilizada, Figura 37-a, tiveram comportamento similar às amostras não emulsionadas degradadas com a lipase de *Aspergillus oryzae*. Os petróleos brutos ficaram em um *cluster* separado dos controles (CANE1, CANE2) e das amostras degradadas (DCNE222, DCNE221, DCNE242, DCNE241). Entretanto, uma replicata da amostra degradada, DCNE241, ficou no mesmo conjunto de *subclusters* das amostras controle, indicando que o processo pode não ter sido eficaz e reprodutível. Já na análise das amostras emulsionadas, Figura 37-b, possivelmente a degradação foi bem mais eficaz do que nas amostras não emulsionadas. Isto porque, há extrema discrepância nos dendogramas (Figura 37-a e Figura 37-b), e as amostras em que as enzimas imobilizadas foram aplicadas (DCEM1 e DCEM2) estão isoladas em um *cluster* enquanto as amostras controle (COEM1 e COEM2) estão localizadas em outro *cluster*. Novamente, indica que algum grupamento na composição do petróleo degradado foi modificado em relação ao controle e ao petróleo bruto quando as amostras foram emulsionadas antes da aplicação das enzimas.



**Figura 37.** Gráfico resultante da HCA dos espectros na região do infravermelho das amostras de petróleo bruto, controle não emulsionada e controle emulsionado, amostra não emulsionada degradada e amostra emulsionada degradada pela lipase de *Candida antarctica* imobilizada. Onde: a) dendrograma relativo à degradação de amostras não emulsionadas e B) dendrograma relativo à degradação de amostras emulsionadas.

Cineticamente, as lipases são definidas no fenômeno da ativação interfacial e desempenham melhores atividades quando estão inseridas em um super substrato agregado formado acima de seu limite de saturação. Soluções micelares ou emulsionadas são consideradas um supersubstrato agregado. E, quando a lipase entra em contato com a interface de óleo/água, há um rearranjo conformacional na tampa presente na estrutura da lipase e os sítios ativos ficam mais disponíveis e acessíveis ao substrato.<sup>79</sup> Uma hipótese para a diferença de comportamento das lipases de *Aspergillus oryzae* e de *Candida antarctica* nas amostras não emulsionadas e nas emulsionadas, pode ser relativo à abertura da tampa. Possivelmente, as amostras emulsionadas promoveram maior abertura da tampa e, conseqüentemente, maior disponibilidade dos sítios ativos para utilizarem a emulsão como substrato e promoverem a degradação.

A última enzima analisada através das HCAs foi a lipase de *Pseudomonas cepacia* e os resultados foram apresentados na Figura 38. A lipase de *Pseudomonas cepacia*, diferentemente das demais enzimas, apresentou o perfil similar entre as HCAs das amostras não emulsionadas e emulsionadas. Na Figura 38-a, as amostras de petróleo bruto localizaram-se em um *cluster* distinto das demais amostras. Os controles não emulsionados (CPNE1 e CPNE2) e as amostras em que foram adicionadas a lipase de *Pseudomonas cepacia* imobilizada (DPNE1 e DPNE2) não ficaram separadas dentro dos subclusters indicando que há pouca diferença entre a composição do controle e das amostras que foram submetidas ao ensaio de degradação. Para as amostras emulsionadas, Figura 38-b, esperava-se que as amostras que estiveram em contato com a lipase imobilizada (DPEM1 e DPEM2) estivessem em um *cluster* distinto do petróleo bruto e das amostras controle (COEM1 e COEM2). Entretanto, localizaram-se no mesmo *cluster* que o controle, indicando que há alguma diferença na estrutura, mas não muita. Isso pode indicar que mesmo que as lipases tenham melhor desempenho em interface de emulsões, esse comportamento não favoreceu a ação da lipase de *Pseudomonas cepacia*. Esse resultado, corrobora com o resultado da análise gravimétrica onde a mesma enzima apresentou a menor redução gravimétrica.



**Figura 38.** Gráfico resultante da HCA dos espectros na região do infravermelho das amostras de petróleo bruto, controle não emulsionado e controle emulsionado, amostra não emulsionada degradada e amostra emulsionada degradada pela lipase de *Pseudomonas cepacia* imobilizada. Onde: a) dendrograma relativo à degradação de amostras não emulsionadas e B) dendrograma relativo à degradação de amostras emulsionadas.

### 5.5.3 Acidez residual

A acidez residual foi monitorada na fase aquosa proveniente das amostras não emulsionadas e emulsionadas porque pode ocorrer a formação de ácidos graxos e glicerol devido à quebra das ligações de éster carboxílico de óleos e gorduras pelas lipases.<sup>80</sup> Por isso, uma das hipóteses avaliadas é que se houve formação de ácidos graxos livres, a acidez da fase aquosa após a degradação enzimática fosse maior do que da amostra controle.

Os resultados obtidos tanto para as amostras não emulsionadas quanto para as emulsionadas, não foram significativos. Uma vez que não houve diferença significativa entre a acidez das amostras controles e das amostras em que foram adicionadas as enzimas imobilizadas em nanopartículas. Portanto, nas condições avaliadas, não houve a formação de ácidos graxos livres na fase aquosa após o contato das enzimas imobilizadas em nanopartículas com as amostras.



#### 5.5.4 Determinação de carbono orgânico dissolvido

A fim de avaliar se houve conversão do petróleo em cadeias carbônicas menores e que permaneceram na fase aquosa, foi realizada a determinação de carbono orgânico dissolvido. Os resultados para a fase aquosa das amostras não emulsionadas foram apresentados na Tabela 8. Ao comparar o resultado da amostra controle, sem adição de enzima imobilizada, com as fases aquosas em que houve adição de lipase de *Aspergillus oryzae* e de *Candida antarctica* constatou-se um aumento do teor de carbono orgânico dissolvido e, inferiu-se, que há maior concentração de carbono disperso na fase aquosa. Ao comparar o resultado obtido relativo à adição de lipase de *Pseudomonas cepacia*, o teor é praticamente o mesmo da amostra controle, o que corrobora com os resultados anteriores que indicaram que essa lipase não foi tão eficiente na degradação.

**Tabela 8.** Resultados de carbono orgânico dissolvido referente à fase aquosa obtida após o ensaio de degradação enzimática para as amostras não emulsionadas (n=2).

Amostra	Média (mg L <sup>-1</sup> )	RSD (%)
Controle	14,0 ± 2,7	19,29
Lipase de <i>Aspergillus oryzae</i>	84,0 ± 15,8	18,81
Lipase de <i>Candida antarctica</i>	80,9 ± 34,9	43,14
Lipase de <i>Pseudomonas cepacia</i>	21,9 ± 0,7	3,20

Os resultados para as fases aquosas provenientes das amostras emulsionadas foram apresentados na Tabela 9. Os teores obtidos para as fases aquosas em que foram adicionadas as lipases de *Aspergillus oryzae* e de *Candida antarctica* são maiores que o obtido para a amostra controle. Indicando que há maior concentração de carbono disperso na fase aquosa. Já o teor obtido para a fase aquosa após adição da lipase de *Pseudomonas cepacia*, é similar ao teor obtido para a amostra controle, corroborando com os resultados obtidos em que indicaram que a lipase de *Pseudomonas cepacia* não foi tão efetiva na degradação do petróleo nas amostras emulsionadas.

**Tabela 9.** Resultados de carbono orgânico dissolvido referente à fase aquosa obtida após o ensaio de degradação enzimática para as amostras emulsionadas (n=2).

<b>Amostra</b>	<b>Média (mg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>RSD (%)</b>
Controle	40,8 ± 3,8	9,31
Lipase de <i>Aspergillus oryzae</i>	105,4 ± 1,3	1,23
Lipase de <i>Candida antarctica</i>	83,6 ± 21,6	25,84
Lipase de <i>Pseudomonas cepacia</i>	50,4 ± 28,6	56,75

Apesar de não ter sido possível identificar quais os produtos de degradação do petróleo após a ação das enzimas, os resultados obtidos na análise de carbono orgânico dissolvido indicam que há uma diferença, em relação a amostra controle onde foi adicionado óleo, mas não enzima, na concentração de carbono orgânico dissolvido. Indicando que, possivelmente, houve formação de cadeias menores contendo carbono devido à degradação do petróleo. Isso foi observado em ambos os testes, para as amostras não emulsionadas e as emulsionadas, quando foram utilizadas as lipases de *Aspergillus oryzae* e de *Candida antarctica* na imobilização.

## 5.6 Perspectivas

A fim de existir uma continuidade para o presente trabalho, existem algumas possibilidades de estudos a serem realizados. É interessante avaliar a degradação promovida, pelo menos, pelas enzimas lipase de *Aspergillus oryzae* e lipase de *Candida antarctica* quando maior quantidade de enzima for adicionada às amostras de emulsão. Além disso, avaliar o petróleo degradado através de Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas para avaliar quais compostos do petróleo foram degradados e em quais compostos foram transformados. Também é interessante avaliar qual a composição dos petróleos a serem avaliados e avaliar diferentes enzimas que sejam mais específicas aos componentes majoritários do mesmo. Outra alternativa para ampliar o escopo de aplicação é avaliar a eficiência da remoção de óleos dissolvidos em águas de produção e em efluentes de refinarias que possam conter óleos.

## 6 Conclusões

Com base no que foi avaliado nesse trabalho foi possível desenvolver e avaliar, em escala laboratorial, a metodologia que utiliza enzimas imobilizadas em nanopartículas magnéticas para remediação de petróleo disperso em águas salinas.

A fim de mimetizar a emulsão que ocorre nos mares e oceanos quando há um derramamento, dois processos de preparo emulsões sintéticas do tipo O/A foram avaliados, utilizando dois equipamentos. O uso da sonda de ultrassom promoveu a dispersão do óleo em água, mas não foi tão eficaz quanto o dispersor além de possuir um agravante relacionado ao volume máximo a ser utilizado ser de 5 mL. Portanto, as emulsões sintéticas do tipo O/A utilizadas ao longo desse trabalho foram preparadas utilizando o dispersor para incorporar o óleo na água.

As condições para atuação de cada lipase foram determinadas experimentalmente através da comparação da atividade enzimática. Para as três enzimas, a temperatura de uso foi fixada em 40 °C. O pH ótimo das soluções enzimáticas de lipase de *Aspergillus oryzae*, de *Candida antarctica* e de *Pseudomonas cepacia* foi de 6,5, 7,0 e 8,0, respectivamente.

A imobilização das enzimas nas nanopartículas magnéticas foi realizada com sucesso pelo método de adsorção física com o tempo de contato entre solução enzimática e nanopartículas definido em 75 h. Cabe ressaltar a simplicidade da técnica empregada para imobilização. A imobilização foi confirmada através de duas técnicas: medida da atividade enzimática e por FTIR-ATR. As atividades obtidas para as lipases de *Aspergillus oryzae*, de *Candida antarctica* e de *Pseudomonas cepacia* imobilizadas foram de  $65,3 \pm 19,9 \text{ U g}^{-1}$ ,  $110,8 \pm 0,1 \text{ U g}^{-1}$  e  $136,8 \pm 26,8 \text{ U g}^{-1}$ , respectivamente. As informações obtidas a partir dos espectros de FTIR-ATR corroboraram com os resultados de atividade enzimática após imobilização porque observou-se que houve deslocamento da banda para a região da nanopartícula, sendo um indicativo da imobilização.

A avaliação visual das amostras não emulsionadas e emulsionadas foi realizada antes e após a adição das enzimas imobilizadas. Para as lipases de *Aspergillus oryzae* e de *Candida antarctica* em ambos os tipos de processo foi

observada uma redução da mancha de óleo na superfície. Já a adição da lipase de *Pseudomonas cepacia*, não promoveu grandes alterações visuais. Como para as amostras não emulsionadas foi realizada a avaliação gravimétrica do petróleo após a degradação, pode-se avaliar a redução de massa. Para as lipases de *Aspergillus oryzae*, *Candida antarctica* e *Pseudomonas cepacia* os resultados obtidos foram  $7,7 \pm 0,1\%$ ,  $5,5 \pm 0,1$  e  $4,0 \pm 0,1$ , respectivamente e ao relacionar com os resultados visuais, confirma-se que as lipases de *Aspergillus oryzae* e de *Candida antarctica* promoveram uma melhor degradação do petróleo presente nas amostras não emulsionadas.

Os resultados obtidos por FTIR-ATR, avaliados na forma de HCAs confirmaram que a ação da lipase de *Pseudomonas cepacia*, nas amostras não emulsionadas e emulsionadas, não foi eficaz porque não promoveu mudanças significativas na estrutura. Já para as lipases de *Aspergillus oryzae* e de *Candida antarctica*, por mais que não tenham sido identificadas quais mudanças aconteceram, comprovou-se que houve modificação na estrutura do petróleo. Além disso, há indícios de que quando as enzimas imobilizadas foram aplicadas nas amostras emulsionadas, as mudanças foram mais significativas. Possivelmente, devido à maior abertura da tampa na estrutura das enzimas que promoveu maior exposição dos sítios ativos.

Em vista de avaliar a formação de ácidos graxos livres, a acidez residual da fase aquosa resultante das degradações foi medida. Entretanto, os resultados obtidos não foram significativos e inferiu-se que não houve formação de ácidos graxos livres. Na fase aquosa, também foi medido o teor de carbono orgânico dissolvido. Os valores encontrados para a lipase de *Pseudomonas cepacia* são muito próximos das amostras controle, sem adição de enzima, nas amostras não-emulsionadas e nas emulsionadas indicando que não houve formação de nenhum produto de degradação. Tanto para as amostras não emulsionadas quanto as emulsionadas, houve um aumento do teor de carbono orgânico dissolvido, em relação às amostras sem adição de enzima, após a adição das lipases de *Aspergillus oryzae* e *Candida antarctica* imobilizadas. Portanto, há um indício de que foram formados produtos de degradação na fase aquosa.

Dessa maneira, o presente trabalho demonstrou que nas condições avaliadas e nos tipos de amostras estudadas, as lipases de *Aspergillus oryzae* e de *Candida antarctica* imobilizadas possuem um grande potencial para

degradação de petróleos presentes em águas salinas. Além disso, a imobilização em nanopartículas magnéticas permite a recuperação das enzimas sendo essa propriedade de grande valia em aplicações de larga escala nos ambientes marinhos, evitando problemas secundários.

## 7 Referências

1. Andrade, J. D. A.; Augusto, F.; Jardim, I. C. S. F. Biorremediação de Solos Contaminados Por Petróleo e Seus Derivados. *Eclética Química* **2010**, *35* (3), 17–43.
2. Azevedo, R. N. A.; Bezerra, K. M. M.; Nascimento, R. F.; Nelson, R. K.; Reddy, C. M.; Nascimento, A. P.; Oliveira, A. H. B.; Martins, L. L.; Cavalcante, R. M. Is There a Similarity between the 2019 and 2022 Oil Spills That Occurred on the Coast of Ceará (Northeast Brazil)? An Analysis Based on Forensic Environmental Geochemistry. *Environ. Pollut.* **2022**, *314*, 120283.
3. Cantagallo, C.; Milanelli, J. C. C.; Dias-Brito, D. Limpeza de Ambientes Costeiros Brasileiros Contaminados Por Petróleo: Uma Revisão. *Panam J Aquat Sci* **2007**, *2* (1), 1–12.
4. Yusoff, D. F.; Rahman, R. N. Z. R. A.; Masomian, M.; Ali, M. S. M.; Leow, T. C. Newly Isolated Alkane Hydroxylase and Lipase Producing *Geobacillus* and *Anoxybacillus* Species Involved in Crude Oil Degradation. *Catalysts* **2020**, *10* (8), 1–15.
5. Chandra, P.; Enespa; Singh, R.; Arora, P. K. Microbial Lipases and Their Industrial Applications: A Comprehensive Review. *Microb. Cell Fact*, **2020**, *19*, 169.
6. Alabdall, A. H.; Al-Anazi, N. A.; Aldakheel, L. A.; Amer, F. H. I.; Aldakheel, F. A.; Ababutain, I. M.; Alghamdi, A. I.; Al-Khaldi, E. M. Application and Characterization of Crude Fungal Lipases Used to Degrade Fat and Oil Wastes. *Sci Rep* **2021**, *11* (1), 1–10.
7. Ismail, A. R.; Baek, K. H. Lipase Immobilization with Support Materials, Preparation Techniques, and Applications: Present and Future Aspects. *Int J Biol Macromol* **2020**, *163*, 1624–1639.
8. Almeida, A. L. d'. *Indústria Do Petróleo No Brasil e No Mundo: Formação, Desenvolvimento e Ambiência Atual*, 1st ed.; Blucher, 2015, p 295.
9. Kunert, R.; Silva, A. L. F. da; Filho, J. E. de S.; Ramalho, J. B. V. da S.; Melo, M. de V.; Leite, M. de M.; Brasil, N. Í. do; Junior, O. de A. P.; Oliveira, R. C. G. de; Alves, R. P.; Costa, R. F. D.; Kunert, R.; Gomes, W.

- Processamento Primário de Petróleo. *Universidade Petrobras - Escola de Ciências e Tecnologia E&P* **2007**, 53.
10. Annual Book of ASTM Standards, ASTM D 4175-02a (reapproved 2002) Standard Terminology Relating to Petroleum, Petroleum Products, and Lubricants, **2002**.
  11. Thomas, J. E.; Triggia, A. A.; Correia, C. A.; Filho, C. V.; Xavier, J. A. D.; Machado, J. C. V.; Filho, J. E. de S.; Paula, J. L. de; Rossi, N. C. M. de; Pitombo, N. E. S.; Gouvea, P. C. de M.; Carvalho, R. de S.; Barragan, R. V. *Fundamentos Da Engenharia Do Petróleo*, 2nd ed.; Editora Interciência, 2001, p. 271.
  12. Speight, J. G. *The Chemistry and Technology of Petroleum*, 4th ed.; CRC Press, 2006, p 955.
  13. Demirbas, A.; Alidrisi, H.; Balubaid, M. A. API Gravity, Sulfur Content, and Desulfurization of Crude Oil. *Pet Sci Technol* **2015**, 33 (1), 93–101.
  14. Al-Dahhan, W. H.; Mahmood, S. MA. Classification of Crude Oils and Its Fractions on the Basis of Paraffinic, Naphthenic and Aromatics. *Al-Nahrain Journal of Science* **2019**, 22 (3), 35–42.
  15. Tissot, B. P.; Weite, D. H.; Berlin, S.-V.; Gmbh, H. *Petroleum Formation and Occurrence*; 2nd ed.; Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2013, p 715.
  16. Farah, M. A. *Petróleo e Seus Derivados*; Grupo Gen - LTC, 2013, p 282.
  17. Mabery, C. F. Composition of Petroleum. *Transactions of the AIME* **1921**, 65 (01), 505–521.
  18. Wauquier, J. P. *Petroleum Refining V.1: Crude Oil, Petroleum Products, and Process Flowsheets*; Institut Français du Pétrole Publications, 1995, p 473.
  19. Buainain, A. M.; Torres, D. A. P.; Contini, E.; Figueiredo, E.; Vieira, P. A. Petróleo, a Era Das Commodities e a Agricultura Brasileira. *Revista de Política Agrícola* **2015**, 24 (4), 32–45.
  20. Anuário Estatístico Brasileiro Do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis: 2023. Rio de Janeiro: ANP, **2023**.
  21. Jernelv, A. The Threats from Oil Spills: Now, Then, and in the Future. *Ambio* **2010**, 39 (6), 353–366.

22. Chen, J.; Zhang, W.; Wan, Z.; Li, S.; Huang, T.; Fei, Y. Oil Spills from Global Tankers: Status Review and Future Governance. *J Clean. Prod.* **2019**, *227*, 20–32.
23. ITOPF (2022) *Oil Tanker Spill Statistics 2021*; ITOPF LTD, 2021, p 20.
24. Zhang, B.; Matchinski, E. J.; Chen, B.; Ye, X.; Jing, L.; Lee, K. *Marine Oil Spills-Oil Pollution, Sources and Effects*, 2nd ed.; Elsevier Ltd., 2018, p 391.
25. de Oliveira Estevo, M.; Lopes, P. F. M.; de Oliveira Júnior, J. G. C.; Junqueira, A. B.; de Oliveira Santos, A. P.; da Silva Lima, J. A.; Malhado, A. C. M.; Ladle, R. J.; Campos-Silva, J. V. Immediate Social and Economic Impacts of a Major Oil Spill on Brazilian Coastal Fishing Communities. *Mar. Pollut. Bull.* **2021**, *164*, 111984.
26. Zacharias, D. C.; Gama, C. M.; Fornaro, A. Mysterious Oil Spill on Brazilian Coast: Analysis and Estimates. *Mar. Pollut. Bull.* **2021**, *165*, 112125.
27. Fingas, M. *The Basics of Oil Spill Cleanup*: 3rd ed; 2012, p 251.
28. International Tanker Owners Pollution Federation. TIP 02: Fate of Marine Oil Spills. ITOPF LTD, **2011**, No. 2, 12.
29. Fingas, M. *Oil Spill Science and Technology vol. 3*; Gulf Professional Publishing, 2011, p 1156.
30. The International Tanker Owners Pollution Federation Limited, I. Use of Dispersants to Treat Oil Spills. *Impact PR & Design Limited* **2011**, *4*, 12.
31. Dhaka, A.; Chattopadhyay, P. A Review on Physical Remediation Techniques for Treatment of Marine Oil Spills. *J Environ. Manage.* **2021**, *288*, 112428.
32. ITOPF. Use of Booms in Oil Pollution Response. *ITOPF LTD*, **2012**.
33. International Tanker Owners Pollution Federation. Use of Sorbent Materials in Oil Spill Response. *Technical Information Paper* **2012**, 12.
34. Canak, S.; Berezljjev, L.; Borojevic, K.; Asotic, J.; Ketin, S. Bioremediation and “Green Chemistry.” *Fresenius Environ. Bull.* **2019**, *04*, 3056–3064.
35. Hoff, R. Z. Bioremediation an Overview of Its Development and Use for Oil Spill Cleanup. *Mar. Pollut. Bull.* **1993**, *26* (9), 476–481.
36. Nelson, D. L.; Cox, M. M. *Lehninger Princípios de Bioquímica*, 3ª edição.; Sarvier: São Paulo, 2002, p 1009.



37. Blanco, A.; Blanco, G. *Medical Biochemistry*, 1st edition; Academic Press, 2017, p 805.
38. A - Level Biology. Biological Catalysts - Enzymes. Disponível em: <https://alevelbiology.co.uk/notes/biological-catalysts-enzymes/>. Acesso em 18 de abril de 2024.
39. Monteiro, V. N.; Silva, R. do N. Aplicações Industriais Da Biotecnologia Enzimática. *Rev. Process. Quím.* **2009**, 3 (5), 9–23.
40. McDonald, A. G.; Tipton, K. F. Enzyme Nomenclature and Classification: The State of the Art. *FEBS Journal* **2023**, 290 (9), 2214–2231.
41. Singhania, R. R.; Patel, A. K.; Thomas, L.; Goswami, M.; Giri, B. S.; Pandey, A. *Industrial Enzymes*; Elsevier, **2015**, 473-497
42. Messias, J. M.; Costa, B. Z. da; Lima, V. M. G. de; Giese, C.; Dekker, R. F. H.; Barbosa, A. de M. Lipases Microbianas: Produção, Propriedades e Aplicações Biotecnológicas. *Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas* **2011**, 32 (2), 213–234.
43. Facin, B. R.; Melchior, M. S.; Valério, A.; Oliveira, J. V.; Oliveira, D. De. Driving Immobilized Lipases as Biocatalysts: 10 Years State of the Art and Future Prospects. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2019**, 58 (14), 5358–5378.
44. Khan, F. I.; Lan, D.; Durrani, R.; Huan, W.; Zhao, Z.; Wang, Y. The Lid Domain in Lipases: Structural and Functional Determinant of Enzymatic Properties. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2017**, 5 (Mar), 1–13.
45. Liu, L.; Lan, D.; Wang, Q.; Gao, C.; Li, Z.; Yang, B.; Wang, Y. A “Bridge-like” Structure Responsible for the Substrate Selectivity of Mono- and Diacylglycerol Lipase from *Aspergillus Oryzae*. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2013**, 97, 144–149.
46. Jin, Q.; Jia, G.; Zhang, Y.; Yang, Q.; Li, C. Hydrophobic Surface Induced Activation of *Pseudomonas Cepacia* Lipase Immobilized into Mesoporous Silica. *Langmuir* **2011**, 27 (19), 12016–12024.
47. Ericsson, D. J.; Kasrayan, A.; Johansson, P.; Bergfors, T.; Sandström, A. G.; Bäckvall, J. E.; Mowbray, S. L. X-Ray Structure of *Candida Antarctica* Lipase A Shows a Novel Lid Structure and a Likely Mode of Interfacial Activation. *J. Mol. Biol.* **2008**, 376 (1), 109–119.
48. Mohamad, N. R.; Marzuki, N. H. C.; Buang, N. A.; Huyop, F.; Wahab, R. A. An Overview of Technologies for Immobilization of Enzymes and Surface

- Analysis Techniques for Immobilized Enzymes. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* **2015**, *29* (2), 205–220.
49. Furlani, I. L.; Amaral, B. S.; Oliveira, R. V.; Cassa, Q. B. Enzyme Immobilization: Concepts and Effects on Proteolysis. *Quim. Nova* **2020**, *43* (4), 463–473.
  50. Bilal, M.; Asgher, M.; Cheng, H.; Yan, Y.; Iqbal, H. M. N. Multi-Point Enzyme Immobilization, Surface Chemistry, and Novel Platforms: A Paradigm Shift in Biocatalyst Design. *Crit. Rev. Biotechnol.* **2019**, *39* (2), 202–219.
  51. Gupta, M. N.; Kaloti, M.; Kapoor, M.; Solanki, K. Nanomaterials as Matrices for Enzyme Immobilization. *Artif. Cells Blood Substit. Biotechnol.* **2011**, *39* (2), 98–109.
  52. Huang, S. H.; Liao, M. H.; Chen, D. H. Direct Binding and Characterization of Lipase onto Magnetic Nanoparticles. *Biotechnol Prog.* **2003**, *19* (3), 1095–1100.
  53. Basha, P. A. *Chapter 25 Oil Degrading Lipases and Their Role in Environmental Pollution*; Elsevier, 2020.
  54. Kumar, S.; Mathur, A.; Singh, V.; Nandy, S.; Khare, S. K.; Negi, S. Bioremediation of Waste Cooking Oil Using a Novel Lipase Produced by *Penicillium Chrysogenum* SNP5 Grown in Solid Medium Containing Waste Grease. *Bioresour. Technol.* **2012**, *120*, 300–304.
  55. Preczeski, K. P.; Kamanski, A. B.; Scapini, T.; Camargo, A. F.; Modkoski, T. A.; Rossetto, V.; Venturin, B.; Mulinari, J.; Golunski, S. M.; Mossi, A. J.; Treichel, H. Efficient and Low-Cost Alternative of Lipase Concentration Aiming at the Application in the Treatment of Waste Cooking Oils. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **2018**, *41* (6), 851–857.
  56. Marchut-Mikolajczyk, O.; Drożdżyński, P.; Struszczyk-Świta, K. Biodegradation of Slop Oil by Endophytic *Bacillus Cereus* EN18 Coupled with Lipase from *Rhizomucor Miehei* (Palatase®). *Chemosphere* **2020**, 250.
  57. Joshi, R.; Sharma, R.; Kuila, A. Lipase Production from *Fusarium Incarnatum* KU377454 and Its Immobilization Using Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> NPs for Application in Waste Cooking Oil Degradation. *Bioresour. Technol. Rep.* **2019**, *5*, 134–140.

58. APHA; AWWA; WEF. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 20th ed., 1998.
59. Gupta, N.; Rathi, P.; Gupta, R. Simplified Para-Nitrophenyl Palmitate Assay for Lipases and Esterases. *Anal. Biochem.* **2002**, *311* (1), 98–99.
60. Ghasemi, A. Particle Size Dependence of Magnetic Features for Ni<sub>0.6</sub>-XCuXZn<sub>0.4</sub>Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> Spinel Nanoparticles. *J Magn. Magn. Mater.* **2014**, *360*, 41–47.
61. Goodarzi, F.; Zendejboudi, S. A Comprehensive Review on Emulsions and Emulsion Stability in Chemical and Energy Industries. *Can. J. Chem./Eng.* **2019**, *97* (1), 281–309.
62. Maa, Y. F.; Hsu, C. Liquid-Liquid Emulsification by Rotor/Stator Homogenization. *J. Control. Release* **1996**, *38* (2–3), 219–228.
63. Taha, A.; Ahmed, E.; Ismaiel, A.; Ashokkumar, M.; Xu, X.; Pan, S.; Hu, H. Ultrasonic Emulsification: An Overview on the Preparation of Different Emulsifiers-Stabilized Emulsions. *Trends Food Sci. Technol.* **2020**, *105*, 363–377.
64. Silva, M.; Chandrapala, J. Ultrasonic Emulsification of Milk Proteins Stabilized Primary and Double Emulsions: A Review. *Food Rev.Int.* **2021**, *00* (00), 1–23.
65. Song, X.; Qi, X.; Hao, B.; Qu, Y. Studies of Substrate Specificities of Lipases from Different Sources. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2008**, *110* (12), 1095–1101.
66. Yu, D.; Zhang, X.; Wang, T.; Geng, H.; Wang, L.; Jiang, L.; Elfalleh, W. Immobilized *Candida Antarctica* Lipase B (CALB) on Functionalized MCM-41: Stability and Catalysis of Transesterification of Soybean Oil and Phytosterol. *Food Biosci.* **2021**, *40*, 100906.
67. Pencreac'h, G.; Baratti, J. C. Hydrolysis of P-Nitrophenyl Palmitate in n-Heptane by the *Pseudomonas Cepacia* Lipase: A Simple Test for the Determination of Lipase Activity in Organic Media. *Enzyme Microb. Technol.* **1996**, *18* (6), 417–422.
68. Sheldon, R. A.; van Pelt, S. Enzyme Immobilisation in Biocatalysis: Why, What and How. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42* (15), 6223–6235.

69. Boudrant, J.; Woodley, J. M.; Fernandez-Lafuente, R. Parameters Necessary to Define an Immobilized Enzyme Preparation. *Process Biochem.* **2020**, *90*, 66–80.
70. Yücel, Y.; Demir, C.; Dizge, N.; Keskinler, B. Lipase Immobilization and Production of Fatty Acid Methyl Esters from Canola Oil Using Immobilized Lipase. *Biomass Bioenergy* **2011**, *35* (4), 1496–1501.
71. Nicoletti, G.; Cipolatti, E. P.; Valério, A.; Carbonera, N. T. G.; Soares, N. S.; Theilacker, E.; Ninow, J. L.; de Oliveira, D. Evaluation of Different Methods for Immobilization of *Candida Antarctica* Lipase B (CalB Lipase) in Polyurethane Foam and Its Application in the Production of Geranyl Propionate. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **2015**, *38* (9), 1739–1748.
72. Ou, J.; Yuan, X.; Liu, Y.; Zhang, P.; Xu, W.; Tang, K. Lipase from *Pseudomonas Cepacia* Immobilized into ZIF-8 as Bio-Catalyst for Enantioselective Hydrolysis and Transesterification. *Process Biochem.* **2021**, *102*, 132–140
73. Sakai, S.; Liu, Y.; Yamaguchi, T.; Watanabe, R.; Kawabe, M.; Kawakami, K. Production of Butyl-Biodiesel Using Lipase Physically-Adsorbed onto Electrospun Polyacrylonitrile Fibers. *Bioresour. Technol.* **2010**, *101* (19), 7344–7349.
74. Filho, D. G.; Silva, A. G.; Guidini, C. Z. Lipases: Sources, Immobilization Methods, and Industrial Applications. *Appl. Microbiol Biotechnol.* **2019**, *103* (18), 7399–7423.
75. Cai, H.; Li, Y.; Zhao, M.; Fu, G.; Lai, J.; Feng, F. Immobilization, Regiospecificity Characterization and Application of *Aspergillus Oryzae* Lipase in the Enzymatic Synthesis of the Structured Lipid 1,3-Dioleoyl-2-Palmitoylglycerol. *PLoS One* **2015**, *10* (7).
76. Collins, S. E.; Lassalle, V.; Ferreira, M. L. FTIR-ATR Characterization of Free *Rhizomucor Meihei* Lipase (RML), Lipozyme RM Im and Chitosan-Immobilized RML. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2011**, *72* (3–4), 220–228.
77. Ahmad, I.; Kan, C. W.; Yao, Z. Photoactive Cotton Fabric for UV Protection and Self-Cleaning. *RSC Adv.* **2019**, *9* (32), 18106–18114.
78. Schneider, M.; Vacaro, B. B.; Caetano, M.; Marcelo, A.; Ferrãoa, M. F. Exploratory Analysis Methods Applied to the Infrared Spectrometry Teaching. *Rev. Virtual Quím.* **2018**, *10* (2), 229–243.

79. Schmid, R. D.; Verger, R. Lipases: Interfacial Enzymes with Attractive Applications *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37* (12), 1608–1633.
80. Adlan, N. A.; Sabri, S.; Masomian, M.; Ali, M. S. M.; Rahman, R. N. Z. R. A. Microbial Biodegradation of Paraffin Wax in Malaysian Crude Oil Mediated by Degradative Enzymes. *Front. Microbiol.* **2020**, *11*, 1–15.