

ENZIMA LIPASE DE *Thermomyces lanuginosa* (LTL) IMOBILIZADA EM NANOFIBRA POLIMÉRICA PARA DEGRADAÇÃO DE PETRÓLEO EM MEIO AQUOSO

SILIVA MOREIRA FERREIRA¹; LEONARDO FERREIRA MEDEIROS²;
ROBERTA DA SILVA BUSSAMARA³

¹Universidade Federal de Pelotas – silviaferreira92@gmail.com

²Universidade Federal do Rio Grande do Sul – leofm0710@hotmail.com

³Universidade Federal do Rio Grande do Sul – rbussamara@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O petróleo, é uma substância natural não-renovável. É uma matéria prima resultante da mistura de hidrocarbonetos que pode ser encontrada nos estados sólido, líquido ou gasoso, dependendo das condições de temperatura e pressão a que está sujeita (SEABRA, 2005; VECCHIA 2010). É a principal fonte de energia da atualidade, estando presente não só em combustíveis, como também em fertilizantes, plásticos, tintas, borracha, entre outros. O Brasil possui diversas reservas petrolíferas, sendo a maioria delas em regiões marítimas, segundo a Petrobrás (2015). No ano de 2014, o Brasil alcançou a 12ª posição entre os maiores produtores mundiais, conforme dados apresentados pela Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustível (2015).

O aumento da exploração e produção de petróleo aumentou também o índice de acidentes envolvendo o mesmo. Dentre os acidentes mais comuns, estão o vazamento nos dutos, poços ou plataformas presentes nos mares e que podem causar danos ao meio ambiente (FELLER, 2012). O petróleo, quando derramado em ambientes aquáticos, forma uma película entre o ar e a água, devido a sua característica hidrofóbica. Assim, a oxigenação da água e a realização da fotossíntese por algas ficam dificultadas pela falta de luminosidade (FELLENBERG, 1980). Em relação à poluição crescente causada por indústrias, tem-se a necessidade do desenvolvimento de um meio de remediação, de maneira que minimize o impacto causado no meio ambiente, e a química ambiental está sendo vista como uma forte ferramenta.

Enzimas são comumente conhecidas como biocatalisadores, esses biocatalisadores são utilizados como uma alternativa aos produtos químicos, por apresentarem vantagens, como por exemplo, a elevada velocidade de reação, a compatibilidade com substratos sintéticos e apresentar seletividade ao tipo de reação que catalisam (CAMPBELL, 2000; MUDERHWA 1998). Devido às vantagens apresentadas pelas lipases, estas vêm sendo amplamente empregadas em várias aplicações industriais, como detergentes, na degradação de óleos, produção de biocombustíveis, nas indústrias alimentícia, farmacêutica, cosmética e outras. Porém, as lipases não são extensamente utilizadas devido ao seu custo elevado, sua difícil separação do meio reacional e instabilidade da sua estrutura causada, principalmente, por meios desnaturantes, como por exemplo, pH e temperaturas extremas (MATEO, et al., 2007).

A elaboração de materiais que permitam uma eficiente fixação da enzima e que proporcionem uma maior estabilidade, proteção em ambientes desnaturante e reutilização em aplicações industriais, tornará possível o uso do biocatalisador em indústrias. Nanofibras estão entre os modelos estudados para serem empregados para esta finalidade, obtidas

através da técnica de eletrofiação, estas possuem elevada porosidade, grande área superficial, excelentes propriedades mecânicas e podem ser sintetizadas com funcionalidades específicas (RENEKER, et al. 2008).

Neste contexto, o trabalho teve como objetivo a imobilização da enzima lipase de *Thermomyces lanuginosa* (LTL) em nanofibra de poliamida-6, para utilização na degradação de petróleo em ambientes aquáticos contaminados.

2. METODOLOGIA

O processo de eletrofiação baseou-se na dissolução do polímero poliamida-6 (PA-6) em ácido fórmico (20% m/v), sob agitação, por um período de 24h. Posteriormente, a solução foi transferida para uma seringa e fixada no equipamento de eletrofiação (Instor, Brasil), aplicou-se uma diferença de potencial de +22,5 kV entre a ponta da seringa e a base coletora. Durante o processo, ajustou-se a vazão da solução em $1,7 \text{ mm h}^{-1}$ através da seringa e manteve-se a umidade relativa do ar em torno de 50%.

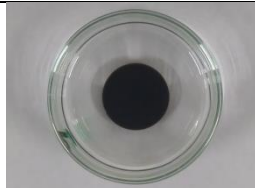
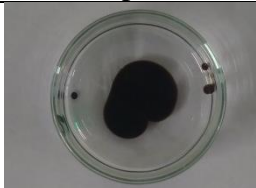








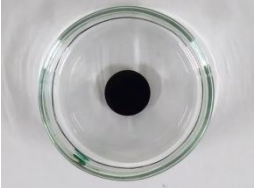



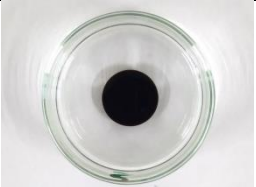

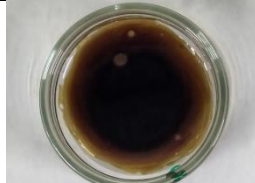



Após a obtenção das nanofibras, foram realizados os processos de imobilização da enzima lipase de *Thermomyces lanuginosa* (LTL). Para isso, foram adicionados, em placas de Petri, diferentes volumes (0,5, 0,75, 1, 2 e 3 mL), separadamente, da solução do tampão de fosfato de sódio com pH 7,5, contendo a enzima LTL. As nanofibras foram então cortadas, submersas na solução e incubadas a uma temperatura de 5°C por um período de 24h. Após o processo de imobilização, as nanofibras contendo as enzimas foram lavadas por duas vezes com 1 mL da solução tampão de fosfato de sódio com pH 7,5, a fim de retirar a lipase não imobilizada ao suporte.

Os testes para a degradação do petróleo foram realizados em meio aquoso. Para isso, foram colocados em placas Petri, 2 mL de água ultrapura e a adição de aproximadamente 0,03 g de petróleo. Em seguida, realizou-se, por dois métodos, os testes de degradação do petróleo com as nanofibras impregnadas com a enzima. No primeiro método, apenas pegou-se as nanofibras após o processo de imobilização (via úmida) e utilizou-se no teste de degradação do petróleo. No segundo método, as nanofibras, após o processo de imobilização, foram secas em estufa a 30°C durante um período de 2h (via seca) para posteriormente serem aplicadas no teste de degradação do petróleo.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os ensaios de degradação do petróleo, inicialmente, foram avaliados qualitativamente através de análise visual, e as imagens obtidas estão apresentadas na Tabela 1. Observou-se durante o processo a degradação instantânea do petróleo. De acordo com as imagens, pode-se observar que os testes realizados com as nanofibras obtidas por via úmida foram as que apresentaram uma maior degradação visual deste.

Tabela 1. Resultado do teste de degradação comparando as nanofibras úmidas e secas em relação à quantidade de enzima utilizada na imobilização.

Nanofibras úmidas		Nanofibras secas	
Imobilização de 0,5 mL de enzima			
Antes	Depois	Antes	Depois
			
Imobilização de 0,75 mL de enzima			
Antes	Depois	Antes	Depois
			
Imobilização de 1,0 mL de enzima			
Antes	Depois	Antes	Depois
			
Imobilização de 2,0 mL de enzima			
Antes	Depois	Antes	Depois
			
Imobilização de 3,0 mL de enzima			
Antes	Depois	Antes	Depois
			

Conforme o aumento da quantidade de enzima utilizada no processo de imobilização, houve um aumento gradativo na degradação do petróleo. Entretanto, este aumento foi observado até a quantidade de 1 mL de solução

de imobilização da enzima, após essa quantidade, a degradação com nanofibras obtidas por via úmida, permaneceu constante. Isso também foi observado para a degradação com nanofibras obtidas por via seca, onde a partir de 1 mL de solução, não foi observada uma degradação significativa. Além disso, para a nanofibra seca, foi observada a ocorrência de adsorção do petróleo ao material, o que pode sugerir a aplicação deste como um material promissor para degradação e adsorção de contaminantes, na remediação de acidentes de derramamento.

4. CONCLUSÕES

A nanofibra se demonstrou um eficiente suporte para fixação da enzima, quando esta foi aplicada para a degradação do petróleo. Observou-se os melhores resultados por via úmida, quando comparados por via seca, onde os melhores resultados foram obtidos quando o volume de imobilização se aproxima de 1 mL. Por via seca, também observou-se que o petróleo permanecia adsorvido após o processo de degradação, o que indica que este suporte também pode ser utilizado como um material adsorvente em remediações de acidentes.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGENCIA NACIONAL DO PETRÓLEO GAS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS (ANP). Anuário Estatístico Brasileiro do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. Rio de Janeiro, 2015.

CAMPBELL, M. K. Bioquímica, 3ª ed., Artmed Ed. Ltda: Porto Alegre, 2000.

FELLENBERG, G. Introdução aos problemas da produção ambiental. Editora Springer, São Paulo, P. 70-89, 1980.

FELLER, R. Estudo do vazamento e captura de óleo em ambientes subaquático. Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina para obtenção o título de Mestre em Engenharia Química. Santa Catarina, 2012.

MATEO, C., PALOMO, J. M., FERNANDEZ-LORENTE, G., GUISAN, J. M., FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme and Microbial Technology*, Vol. 40, P. 1451 – 1463, 2007.

MUDERHWA, J.; PINA, M.; GRAILLE, J. J. *Oléagineux* 1998, 43, 385.

RENEKER, D. H. & YARIN, A. L. – *Polymer*, 49, p2387, 2008.

SEABRA, P. N. C. Aplicação de Biopilhas na biorremediação de solos argilosos contaminados com petróleo. Tese submetida ao programa de Pós-Graduação de Engenharia da Universidade Federal do Rio de Janeiro para obtenção do grau Doutor em Engenharia Química. Rio de Janeiro, 2005.

VECCHIA, R. *O meio ambiente e as energias renováveis*. Editora Manole, 360 P., 2010