

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA

LEONARDO FERREIRA MEDEIROS

**IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMA EM FIBRAS DE POLIAMIDA PARA DEGRADAÇÃO
DE PETRÓLEO EM AMBIENTES AQUÁTICOS CONTAMINADOS**

Porto Alegre
2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA

LEONARDO FERREIRA MEDEIROS

**IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMA EM FIBRAS DE POLIAMIDA PARA DEGRADAÇÃO
DE PETRÓLEO EM AMBIENTES AQUÁTICOS CONTAMINADOS**

Trabalho de conclusão de curso apresentado junto à atividade de ensino “Trabalho de Conclusão de Curso - QUI” do Curso de Química Industrial, como requisito parcial para a obtenção do grau de Bacharel em Química Industrial.

Prof^a. Roberta da Silva Bussamara Rodrigues
Orientadora

Prof^a. Andreia Neves Fernandes
Coorientadora

Porto Alegre
2021

CIP - Catalogação na Publicação

Medeiros, Leonardo Ferreira
Imobilização de enzima em fibras de poliamida para
degradação de petróleo em ambientes aquáticos
contaminados / Leonardo Ferreira Medeiros. -- 2021.
83 f.
Orientadora: Roberta da Silva Bussamara Rodrigues.

Coorientadora: Andreia Neves Fernandes.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) --
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto
de Química, Curso de Química Industrial, Porto Alegre,
BR-RS, 2021.

1. Enzima. 2. Petróleo. 3. Remediação. 4. Lipase.
5. Derramamento de Petróleo. I. Rodrigues, Roberta da
Silva Bussamara, orient. II. Fernandes, Andreia
Neves, coorient. III. Título.

Dedico este trabalho a minha mãe Jussara,
minha tia Jocemara, minha avó Maria Sueli e
ao meu amor Gabriel.

AGRADECIMENTOS

À Deus e todas as entidades de luz que me acompanham e que nunca me abandonaram nos momentos mais difíceis, obrigado pelos ensinamentos, pela força e por guiarem meu caminho.

Agradeço à minha mãe pela vida, pelo incentivo e por nunca desistir de mim, dos meus sonhos e da minha educação, isso foi fundamental para que eu chegasse até aqui. Tu és meu maior exemplo de força, garra e fé. Como recompensa por tudo o que passamos juntos nessa vida e por todo teu amor, esse trabalho é em homenagem a ti.

À minha avó por ser a rocha da nossa família, a força e o amor, por sempre me apoiar, chorar de alegria com minhas conquistas e sempre se orgulhar de mim. Obrigado por tudo, Vó.

À minha tia Jocemara por ser minha segunda mãe, minha ouvinte e por sempre estar pronta para me orientar, a ti eu dedico o que sou hoje. Obrigado por tudo, tia Nica e tio Paulo.

Ao meu irmão por sonhar que eu chegaria até aqui e por me proteger, conte sempre comigo, essa luta foi minha e a vitória é nossa.

Ao meu amor, a quem sempre esteve ao meu lado, nos momentos de angústia, tristeza, estresse e alegrias. Agradeço imensamente por tudo e principalmente por ser quem és na minha vida. Já te falei inúmeras vezes o quanto tu foi e és essencial em todas as minhas conquistas, mas essa com certeza só foi possível por ter você ao meu lado. Sem você eu não teria chegado até aqui. Obrigado por tudo, pelo amor, pela paciência em momentos de ranço, por entender minha ausências. Te amo e sempre te amarei, Gabriel.

À minha família eu agradeço por todo o apoio, cada um teve seu papel nessa conquista. É com imensa felicidade que agora vocês terão o primeiro graduado da família, e que isso sirva de exemplo para todos os que virão, que eu seja o primeiro de muitos. Sempre acreditem nos seus sonhos.

Aos amigos que criei ao longo deste caminho, em especial a Aline que é minha fiel amiga e confidente, se eu cheguei até aqui é porque tu cruzou meu caminho. À Silvia também agradeço pela amizade adquirida e por todas nossas conversas. Vocês duas terão sempre um espaço reservado na minha vida.

Às minhas orientadoras por todo o conhecimento adquirido. Foi uma sorte ter sido orientado por vocês, Roberta e Andreia. Vocês foram exemplos para mim e foi graças a isso que eu cheguei até aqui, me tornando o químico que sou. Muito obrigado pelo aprendizado e por tudo o que foi vivido no LAPACE e no LAPROMAQ.

Professora Roberta, quem diria que tuas enzimas fossem trazer tanta felicidade para esse aluno que aqui escreve. A professora Andreia me abriu as portas da pesquisa, me aceitando como aluno e guiando meus primeiros passos e a senhora abriu as janelas do horizonte para uma área que me encanta tanto e que me fez caminhar largos passos científicos. Obrigado por ter me apresentado as enzimas.

Aos amigos do LAPACE e LAPROMAQ, obrigado pela amizade e troca de conhecimentos. Nossas comemorações, cafés, conversas e reuniões foram essenciais.

Ao POLIBIO e LAMAT e seus coordenadores, Rosane e Daniel. Obrigado pelo empréstimo de equipamentos e do espaço.

Àqueles que partiram e deixaram exemplos de vida e de luta. Obrigado por tudo, Everton, Rozânia e Ida (*in memoriam*), vocês são exemplos para mim.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul e ao Instituto de Química pela oportunidade de formação e todo o conhecimento adquirido.

Aos docentes pela troca de conhecimentos e todo o aprendizado adquirido.

Por fim, agradeço a fé, a qual sempre foi e será minha bandeira de vida. Não somente a fé espiritual, mas a fé em mim, nas pessoas, na vida. Ter fé é crer que as coisas são possíveis e que os sonhos podem ser alcançados. Nunca desista dos seus sonhos.

Obrigado à vida que tem me dado tanto!

“...Sou como a haste fina,
que qualquer brisa verga,
mas nenhuma espada corta
Não mexe comigo, que eu não ando só...”

Carta de Amor, Maria Bethânia

RESUMO

O petróleo e sua exploração podem ser a causa de inúmeros problemas, como é o caso dos derramamentos e vazamentos. Vários são os relatos históricos destes acontecimentos e de consequências para o meio ambiente e saúde humana. Alguns métodos de remediação são propostos, sendo que na sua maioria apresentam relativa ineficiência, sendo assim necessária a discussão de novas alternativas.

Nesse trabalho é discutida a obtenção e caracterização de fibras poliméricas produzidas por meio da técnica de eletrofiação, seguido da imobilização de enzima lipase de *Thermomyces lanuginosus*. A aplicação da enzima imobilizada na degradação de petróleo é avaliada, assim como a caracterização do petróleo degradado. Por fim, é avaliado o custo de produção em escala laboratorial da fibra e a possibilidade de incubação junto à Rede de Incubadora Tecnológicas da UFRGS. Assim, foi possível a imobilização da enzima nas fibras de poliamida 6, com rendimento de cerca de 60% e eficiência de até 155%. A caracterização das fibras foi importante para a compreensão morfológica e estrutural do material, possibilitando a observação das estruturas nanomicrométricas, assim como suas características químicas. Em relação ao armazenamento foi possível observar que a enzima apresenta atividade tanto na forma livre quanto imobilizada por até 25 dias de armazenamento. Observou-se a degradação do petróleo pela enzima imobilizada quando os ensaios foram realizados em água ultrapura. Além disso, foi realizado um estudo para possível aplicação industrial, baseado em avaliação de custos e também ampliação em larga escala. Como resultado observou-se a possibilidade de implantação industrial no que se refere à incubação de uma empresa por meio da REINTEC e do Parque Zenit da UFRGS.

Palavras-chave: enzima; lipase; petróleo; derramamento de petróleo; remediação.

ABSTRACT

Oil and its exploitation can be the cause of numerous problems, such as spills and leaks. There are several historical accounts of these events and consequences for the environment and human health. Some remediation methods are proposed, most of which are relatively inefficient, thus making it necessary to discuss new alternatives.

This work discusses the obtainment and characterization of polymeric fibers produced through the electrospinning technique, followed by the immobilization of lipase enzyme from *Thermomyces lanuginosus*. The application of the immobilized enzyme in oil degradation is evaluated, as well as the characterization of the degraded oil. Finally, the cost of production of the fiber on a laboratory scale and the possibility of incubation with the UFRGS Technological Incubator Network is evaluated. Thus, it was possible to immobilize the enzyme on polyamide 6 fibers, with a yield of around 60% and efficiency of up to 155%. The characterization of the fibers was important for the morphological and structural understanding of the material, enabling the observation of nanomicrometric structures, as well as their chemical characteristics. Regarding storage, it was possible to observe that the enzyme has activity both in free and immobilized form for up to 25 days of storage. The degradation of oil by the immobilized enzyme was observed when the tests were carried out in ultrapure water. In addition, a study was carried out for possible industrial application, based on cost evaluation and also large-scale expansion. As a result, the possibility of industrial implantation was observed regarding the incubation of a company through REINTEC and the Zenit Park of UFRGS.

Keywords: enzyme; lipase; petroleum; oil spill; remediation.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Principais constituintes do petróleo e suas subclasses.	20
FIGURA 2 - Diagrama ternário demonstrando a composição bruta de 636 amostras de petróleo bruto: hidrocarbonetos saturados, hidrocarbonetos aromáticos, e resinas e asfaltenos (em peso percentual na fração com ebulição acima de 210°C).	20
FIGURA 3 - Importação e exportação de petróleo, segundo regiões geográficas (mil barris)	21
FIGURA 4 - Reservas de petróleo, segundo regiões geográficas (bilhões de barris).	21
FIGURA 5 - Produção de petróleo, segundo regiões geográficas (milhões de barris/dia).	22
FIGURA 6 - Distribuição percentual das reservas de petróleo, segundo unidades da federação.	24
FIGURA 7 - Localização das bacias produtoras de petróleo no Brasil - terra e mar .	24
FIGURA 8 - Distribuição dos oleodutos, terminais aquaviários e demais unidades da produção e movimentação do petróleo e derivados.	25
FIGURA 9 - Acidente na plataforma Deepwater no Golfo do México em 2010.	27
FIGURA 10 - Processos físicos e químicos observados após o vazamento de óleo.	29
FIGURA 11 - Exemplo de barreira de cerca.	32
FIGURA 12 - Exemplo de skimmer.	32
FIGURA 13 - Princípio chave-fechadura proposto por Fischer.	33
FIGURA 14 - Princípio chave-fechadura proposto por Koshland.	34
FIGURA 15 - Estrutura da enzima LTL - fechada e aberta.	37
FIGURA 16 - Principais métodos de imobilização de enzimas.	38
FIGURA 17 - Cone de Taylor.	39
FIGURA 18 - Estrutura fundamental do electrospinning.	40
FIGURA 19- Estrutura química da PA-6.	41
FIGURA 20 - Equipamento de eletrofição.	44
FIGURA 21 - Curva de calibração externa de p-NP.	49
FIGURA 22 - Estabilidade da enzima durante a reutilização em ciclos.	52
FIGURA 23 - Esquema de possível acontecimento durante os ciclos de reutilização.	53

FIGURA 24 - Atividade recuperada durante a estocagem.	54
Figura 25 - Distribuição do diâmetro de fios da fibra	55
FIGURA 26 - Microscopia eletrônica de varredura da fibra pura (a) e da enzima imobilizada (b).	56
FIGURA 27 - Medida de ângulo de contato para a fibra pura (a) e fibra com a enzima imobilizada (b).	57
FIGURA 28 - Espectro de FTIR para a fibra pura (a) e para a enzima imobilizada (b).	57
FIGURA 29 - Cromatogramas para os testes realizados em água ultrapura (a); zoom na faixa de 13-20 min (b); zoom na faixa de 20-34 min (c). Petróleo puro (preto); enzima imobilizada (azul); fibra pura (vermelho); enzima livre (verde)	63
FIGURA 30 - Aproximação na faixa de tempo de retenção entre 13-17 min.....	64
FIGURA 31 – Aproximação no tempo de 13,89 min	64
FIGURA 32 - Aproximação no tempo de 14,36 min	64
FIGURA 33 - Aproximação no tempo de 15,56 min	64
FIGURA 34 - Aproximação no tempo de 16,13 min	65
FIGURA 35 – Picos entre na faixa de tempo de retenção entre 14-20 min.....	65
FIGURA 36 - Cromatogramas referentes a fração 1 dos ensaios realizados em água do mar. Petróleo puro (preto); fibra pura (azul); enzima livre (vermelho); enzima imobilizada (verde).	65
FIGURA 37 - Cromatogramas referentes a fração 2 dos ensaios em água destilada (a) e água do mar (b). Petróleo puro (preto); enzima livre (azul); enzima imobilizada (vermelho) e; fibra pura (verde).....	66
FIGURA 38 – Equipamento Nanospinner 416 Industrial Electrospinning/Spraying...	70
FIGURA 39 - Equipamento Nanospinner 3550 Electrospinning/Spraying	70
FIGURA 40 – Planta Baixa da sala para incubação de empresa	73
FIGURA 41 – Espectro de massas no tempo de retenção de 13,89 min em água destilada (F1).	79
FIGURA 42 - Espectro de massas no tempo de retenção de 14,36 min em água destilada (F1)	79
FIGURA 43 - Espectro de massas no tempo de retenção de 15,56 min em água destilada (F1)	80
FIGURA 44 - Espectro de massas no tempo de retenção de 16,13 min em água destilada (F1)	80

FIGURA 45 - Cromatograma do petróleo puro em água destilada (F1)	81
FIGURA 46 - Cromatograma do petróleo puro em água do mar (F1)	81
FIGURA 47 – Cromatograma da fibra pura + petróleo (F1)	81
FIGURA 48 - Cromatograma do ensaio com enzima livre (F1)	81
FIGURA 49 - Cromatograma do ensaio com a enzima imobilizada - água destilada (F1).....	81
FIGURA 50 - Cromatograma do ensaio com a enzima imobilizada - água do mar (F1)	82
FIGURA 51 - Cromatograma do petróleo puro - água destilada (F2).....	82
FIGURA 52 - Cromatograma do petróleo puro - água do mar (F2).....	82
FIGURA 53 - Cromatograma do ensaio com a fibra pura + petróleo (F2)	82
FIGURA 54 – Cromatograma do ensaio com enzima livre (F2)	82
FIGURA 55 - Cromatograma do ensaio com a enzima imobilizada - água destilada (F2).....	83
FIGURA 56 - Cromatograma do ensaio com a enzima imobilizada - água do mar (F2)	83

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Composição do petróleo.....	19
TABELA 2 - Maiores acidentes de petróleo registrados.....	26
TABELA 3 - Rendimento e eficiência da imobilização de enzima em relação à concentração.....	50
TABELA 4 - Comparação da eficiência de imobilização com demais trabalhos.....	51
TABELA 5 - Atividade recuperada em relação à estocagem.	54
TABELA 6 - Resultados visuais da degradação de petróleo em água ultrapura.	59
TABELA 7 - Resultados visuais da degradação de petróleo em água do mar.....	60
TABELA 8 - Percentual de remoção de óleo.....	60
TABELA 9 - Cotação de valores de produtos permanentes e demais.	68
TABELA 10 - Cotação de valores de consumíveis para a obtenção de 100 fibras. ..	68
TABELA 11 - Percentual de royalties sobre o valor líquido das notas fiscais	72

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AEL - atividade da enzima livre

ANP - Agência Nacional de Petróleo e Gás Natural

Asob - atividade do sobrenadante

E - enzima

Efic - eficiência

EI - enzima imobilizada

EL - enzima livre

ES - enzima-substrato

F1 - fração 1

F2 - fração 2

FP - fibra pura

FTIR-ATR - infravermelho com transformada de Fourier no modo de refletância total atenuada

HPA - hidrocarboneto policíclico aromático

LTL - lipase de *Thermomyces lanuginosus*

MEV - microscopia eletrônica de varredura

P - produto

PA-6 - poliamida-6

PCL - policaprolactona

PLA - poliácido láctico

p-NP - p-nitrofenol

p-NPP - p-nitrofenilpalmitato

PP - petróleo puro

REINTEC - Rede de Incubadoras Tecnológicas

Rend - rendimento

S - substrato

Sob - sobrenadante

Tris-HCl - tampão hidroximetil aminometano- HCl

U - unidade de enzima

WCA - ângulo de contato em água (Water Contact Angle)

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	17
2.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1.Petróleo	19
2.1.1.Exploração e economia	21
2.1.2.Meio ambiente: acidentes e remediação	25
2.2. Enzimas	32
2.2.1.Lipases	35
2.2.2.Lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i>	36
2.2.3.Imobilização de enzimas	37
2.3.Fibras produzidas por eletrofiação	38
3.OBJETIVOS	42
3.1. Objetivos específicos	42
4.PARTE EXPERIMENTAL	43
4.1. Materiais e Reagentes	43
4.2. Eletrofiação	43
4.3. Imobilização das enzimas nas fibras	44
4.4. Determinação da atividade enzimática	44
4.5. Reutilização da fibra com a enzima imobilizada	45
4.6. Estabilidade de armazenamento	46
4.7. Caracterização da fibra	46
4.8. Ensaio de degradação do petróleo	46
4.9. Caracterização do petróleo degradado	47
5.RESULTADOS	49
5.1. Imobilização da enzima LTL	49
5.2. Reutilização e armazenamento da fibra	51
5.3. Caracterização da fibra	54
5.5. Caracterização preliminar do petróleo degradado	61
6.AVALIAÇÃO DE IMPACTO AMBIENTAL	67
7.AVALIAÇÃO DE CUSTOS	67
7.1. Custos para obtenção da fibra e imobilização	67
7.2. Incubação	70

8.CONCLUSÃO	74
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75
APÊNDICE.....	79

1. INTRODUÇÃO

O petróleo é uma das maiores economias mundiais, sendo responsável pelo desenvolvimento econômico e industrial. A sua exploração é uma das maiores riquezas dos países desenvolvidos e alvo de interesse mundial. Sua aplicação se dá desde em combustíveis até soluções farmacológicas. Caracteriza-se como uma mistura de hidrocarbonetos e está presente na crosta terrestre em profundidades variadas. Entre as principais formas de extração de petróleo pode-se citar o modo *offshore* e *onshore*, que são as extrações realizadas em ambiente marítimo e terrestre, respectivamente. Durante esta exploração vários riscos são iminentes, como é o caso dos vazamentos e derramamentos, principalmente em ambientes aquáticos. Esses acidentes são responsáveis por sérios danos ao meio ambiente e a população próxima, causando danos severos à saúde. Vários são os relatos de acidentes com vazamento de petróleo, sendo o mais recente ocorrido no Golfo do México em 2010. Este acidente durou aproximadamente 87 dias e causou a morte de inúmeros animais devido ao lançamento de milhões de barris de petróleo ao mar.

Várias são as técnicas de remediação e contenção do ambiente contaminado, seja por meio de barreiras, materiais absorventes, uso de agentes químicos ou combustão em alto mar. Como é de se imaginar, vários são os problemas recorrentes de tais ações, tornando o processo ambientalmente não amigável. Devido aos problemas enfrentados, é clara a necessidade do desenvolvimento de novas técnicas e práticas com a finalidade de obtenção de materiais e soluções ambientalmente corretas. Entre as soluções propostas está a biorremediação. A biorremediação consiste na utilização de materiais a base de organismos ou seus derivados, os quais são capazes de gerar benefícios ao ambiente. Entre os principais agentes podemos citar os fungos, bactérias, plantas e conseqüentemente, as enzimas que são em grande parte produzidas por estes agentes.

As enzimas são capazes de catalisar reações, transformando reagentes em produtos que podem ser então melhor utilizados pelo ambiente em questão. Porém, as enzimas possuem certas dependências a fatores externos e sua utilização na forma livre pode causar desnaturação ou perda reacional. Devido a isso, se faz necessário a imobilização destas biomoléculas em suportes. Entre os suportes podemos citar as fibras produzidas por meio de eletrofiação, que apresentam alta área superficial, presença de poros e possível adaptação morfológica, além de composição variável

conforme a aplicação desejada. Com a finalidade de aplicação em derramamentos de petróleo sugere-se a utilização de enzimas que atuem em substratos semelhantes ao mesmo. Logo, a enzima lipase pode desempenhar papel fundamental na degradação de petróleo.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Petróleo

A origem do petróleo se dá a milhões de anos atrás. O acúmulo de matéria orgânica (plantas, animais e outros organismos) em contato com lama e areia deram origem a rochas sedimentares. Durante esse processo ocorreu a degradação da matéria orgânica, formando assim petróleo. Esse petróleo formado acabou migrando para rochas porosas e permeáveis, formando grandes reservatórios, os quais quando em conjunto formam os chamados campos de petróleo¹.

O petróleo ou óleo bruto é uma mistura complexa de hidrocarbonetos e outros compostos como enxofre, nitrogênio e oxigênio. O petróleo está presente na crosta terrestre, em profundidades e pressões variadas, o que confere características físicas e químicas diferentes ao mesmo. Em geral a composição de petróleo não pode ser descrita de forma exata, porém uma faixa de concentração de elementos é encontrada na maioria das amostras como pode-se observar na **Tabela 1**.

Tabela 1 - Composição do petróleo.

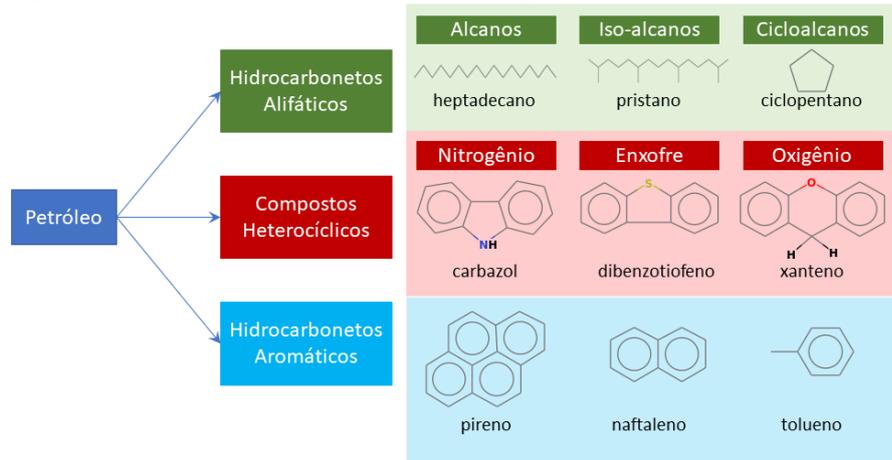
Elemento	Percentual em peso (%)
Carbono	83-87
Hidrogênio	11-14
Enxofre	0,05-2,5
Nitrogênio	0,1-2
Oxigênio	0-2

Adaptado de: Abdel *et al*, 2003².

Os hidrocarbonetos que constituem o petróleo podem ser classificados em: hidrocarbonetos alifáticos, aromáticos e heterocíclicos. Estes três grandes grupos são separados em subclasses de compostos (**Figura 1**). Os hidrocarbonetos saturados são os mais abundantes e incluem os alcanos ramificados ou não, além dos alcanos cíclicos. Na sua composição estão presentes também os hidrocarbonetos aromáticos, que podem ser monocíclicos (e.g. tolueno) e os policíclicos aromáticos (HPAs), os quais são altamente prejudiciais ao meio ambiente devido a longa persistência em ambientes, assim como alta estabilidade química e baixa solubilidade³. Além destes, também pode-se citar as resinas e asfaltenos, os quais são constituídos pela fração

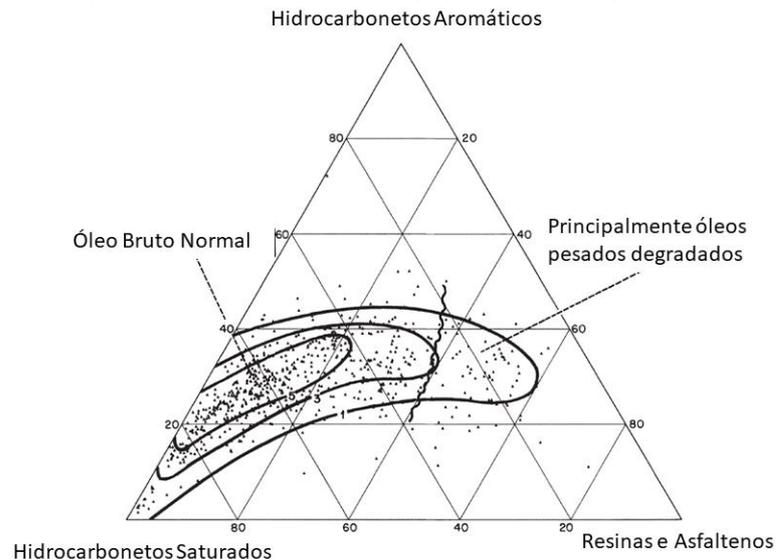
policíclica de alto peso molecular de óleos brutos com átomos de N, S e O⁴. Em geral, como pode-se observar no diagrama ternário (**Figura 2**), em um estudo realizado com 636 amostras de petróleo bruto, que a maior proporção de hidrocarbonetos no petróleo é de saturados (53,3%), seguidos de aromáticos (28,2%) e por fim as resinas e asfaltenos (18,5%)⁴.

Figura 1 - Principais constituintes do petróleo e suas subclasses.



Adaptado de: Pereira, 2018.

Figura 2 - Diagrama ternário demonstrando a composição bruta de 636 amostras de petróleo bruto: hidrocarbonetos saturados, hidrocarbonetos aromáticos, e resinas e asfaltenos (em peso percentual na fração com ebulição acima de 210°C).

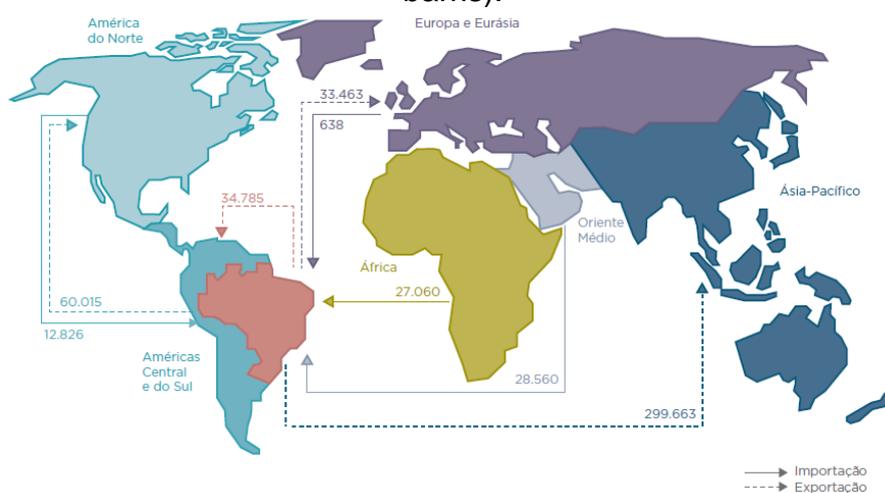


Adaptado de: Tissot e Welte, 1978⁴.

2.1.1. Exploração e economia

O petróleo apresenta papel fundamental na economia mundial, sendo ao lado do gás natural as principais *commodities* comercializadas internacionalmente⁵. Sua importação e exportação é de grande importância econômica, visto que várias são as rotas de saída e entrada de petróleo entre os continentes (**Figura 3**). Vale ressaltar o grande volume de exportação de petróleo do Brasil para o Ásia-Pacífico.

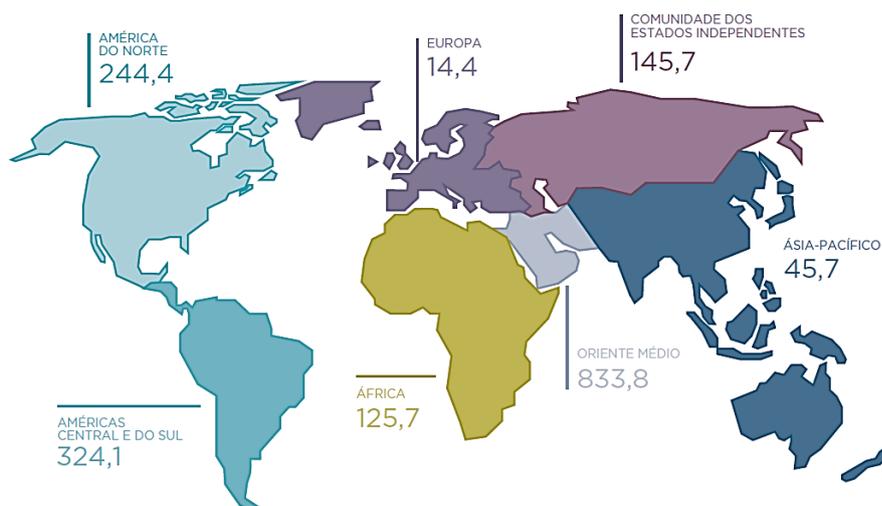
Figura 3 - Importação e exportação de petróleo, segundo regiões geográficas (mil barris).



Fonte: ANP, 2020.

Em 2019, foi atingido o valor de 1,7 trilhão de barris de petróleo em reservas provadas de petróleo no mundo. Já o Oriente Médio, que concentra a maior parte das reservas mundiais, atingiu 833,8 bilhões de barris, o equivalente a 41,8% do total mundial. A Venezuela figura como a maior detentora de volume de reservas petrolíferas, seguida da Arábia Saudita (303,8 e 297,6 bilhões de barris, respectivamente). Por outro lado, o Brasil aparece na 15ª posição mundial com o volume de 12,7 bilhões de barris, em 2019⁶. Na **Figura 4**, observa-se o quantitativo das reservas de petróleo por regiões geográficas (valores em bilhões de barris).

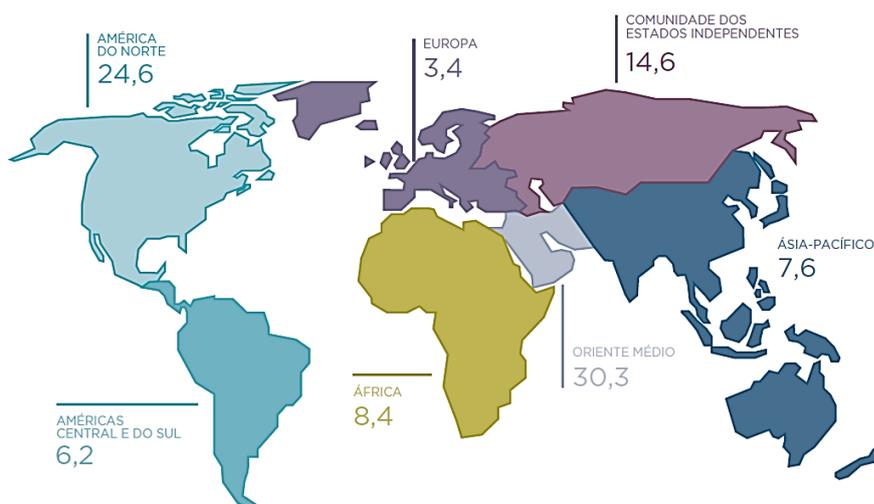
Figura 4 - Reservas de petróleo, segundo regiões geográficas (bilhões de barris).



Fonte: ANP, 2020.

Em relação à produção, os EUA figuram como o maior produtor de petróleo, com volume médio de 17 milhões de barris ao dia, seguido da Arábia Saudita, Rússia, Canadá e Iraque. O Brasil se situou na 10ª posição em 2019⁶. Na **Figura 5**, observa-se a produção de petróleo conforme as regiões cartográficas (valores em milhões de barris/dia).

Figura 5 - Produção de petróleo, segundo regiões geográficas (milhões de barris/dia).



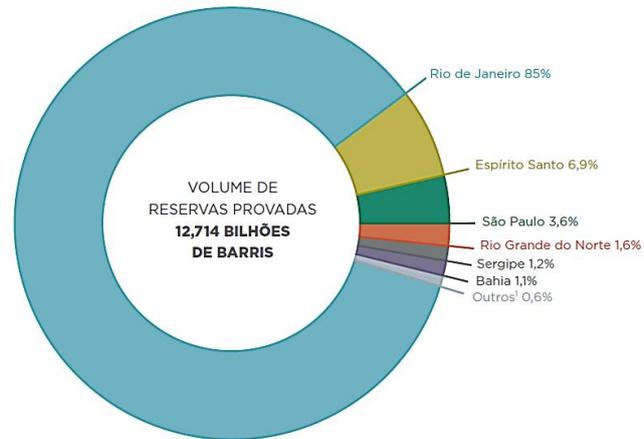
Fonte: ANP, 2020.

Segundo o Departamento de Energia dos Estados Unidos, cerca de 80% da energia consumida no país provem de petróleo, gás natural ou carvão. Além disso, no início de 2020, a indústria de óleo e gás foi responsável por 12,3 milhões de empregos

nos Estados Unidos⁷. No Brasil, segundo a Lei nº 9.478 de 6 de agosto de 1997, foi criada a Agência Nacional de Petróleo (ANP). A ANP tem por finalidade promover a regulação, a contratação e a fiscalização das atividades econômicas integrantes da indústria do petróleo. Entre essas contratações está a licitação para concessão de blocos de petróleo para exploração, desenvolvimento e produção. Segundo dados do Anuário Estatístico Brasileiro do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis de 2020, das 729 áreas que estavam sobre contrato, 272 encontravam-se na fase de exploração, 77 campos em desenvolvimento de produção e 380 campos na etapa de produção. Dos blocos em exploração, vale salientar que 141 se localizavam em mar e 130 em terra, e 1 em terra e mar. Os campos na etapa de desenvolvimento são 34 marítimos e 43 terrestres e os de produção são 101 em mar e 279 em terra.

A principal empresa responsável pela concessão de exploração de petróleo no Brasil é a Petrobras, responsável pela exploração de 113 blocos, seguida da Petra Energia, Rosneft, Eneva e Tog Brasil, sucessivamente. Por outro lado, quando se fala na fase de produção, a Petrobras é a única empresa contratada em 250 dos 380 campos. Em 2019, as reservas totais foram contabilizadas em 21,8 bilhões, enquanto as provadas 12,7 bilhões de barris, sendo 457,6 milhões de barris em terra e 12,3 bilhões em mar. Reservas provadas são as quais se estima recuperar por meio de dados geológicos e de engenharia, enquanto as reservas totais representam a soma das reservas provadas, prováveis e possíveis. Entre os estados produtores, o Rio de Janeiro se destaca como primeiro colocado, representando cerca de 85% do total, seguido de Espírito Santo, São Paulo e Rio Grande do Norte (**Figura 6**). Na **Figura 7** observa-se os locais onde se encontram as principais Bacias produtoras de petróleo em território nacional. Entre as principais estão a Bacia de Campos, do Espírito Santo e a de Santos, sendo boa parte das reservas em ambiente marítimo, assim como a movimentação, seja por oleodutos ou terminais aquaviários (**Figura 8**).

Figura 6 - Distribuição percentual das reservas de petróleo, segundo unidades da federação.



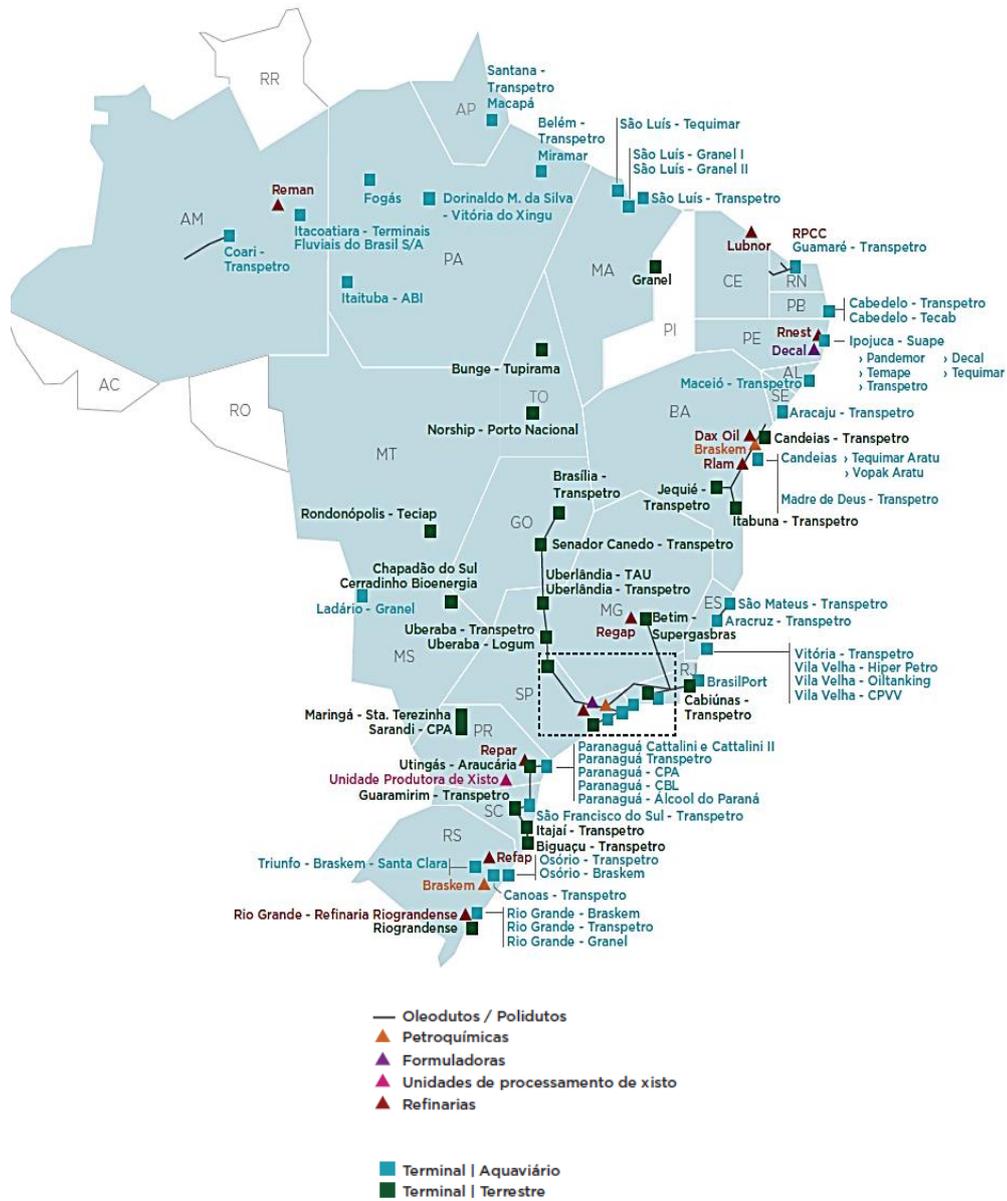
Fonte: ANP, 2020.

Figura 7 - Localização das bacias produtoras de petróleo no Brasil - terra e mar.



Fonte: Petrobrás.

Figura 8 - Distribuição dos oleodutos, terminais aquaviários e demais unidades da produção e movimentação do petróleo e derivados.



Fonte: Petrobrás.

2.1.2. Meio ambiente: acidentes e remediação

O risco de acidentes ambientais está fortemente entrelaçado com a exploração de petróleo. Os acidentes podem ocorrer tanto na extração em terra (*onshore*) como em mar (*offshore*). Neste tópico será discutido os perigos, acidentes e formas de remediação direcionados a exploração *offshore*. Os riscos na exploração estão desde a perfuração do solo marítimo, vazamento dos dutos, acidentes em plataformas e, por

fim, acidentes com o transporte até a terra. Os danos destes acidentes são severos, prejudicando o meio ambiente por inteiro.

Vários são os acidentes com derramamento de petróleo no mar, sendo os maiores datados de 1979 a 1992 (**Tabela 2**). O mais recente acidente é o ocorrido no Golfo do México em 20 de abril de 2010, onde a plataforma marítima Deepwater Horizon da BP explodiu na Louisiana (**Figura 9**). Vários foram os estados americanos afetados pelo derramamento, como Alabama, Texas, Mississippi e Flórida. Durante o acidente que durou cerca de 87 dias, foram lançados aproximadamente 5 milhões barris de petróleo ao mar, afetando cerca de 800 mil aves, 170 mil tartarugas e mais de 8 milhões de ostras ^{8,9}.

Tabela 2 - Maiores acidentes de petróleo registrados.

Acidente	Local	Data	Quantidade de Petróleo (toneladas)
Guerra do Golfo	Golfo Pérsico	Janeiro/1991	1 milhão e 360 mil
Ixtoc I	Golfo do México	Junho/1979	454 mil
Poço Fergana Valley	Uzbequistão	Março/1992	285 mil
Atlantic Empress	Caribe	Julho/1979	287 mil
Nowruz	Golfo Pérsico	Fevereiro/1983	260 mil

Fonte: Babosa, 2021 ..

Figura 9 - Acidente na plataforma Deepwater no Golfo do México em 2010.



Fonte: Greenpeace Brasil, 2021.⁹

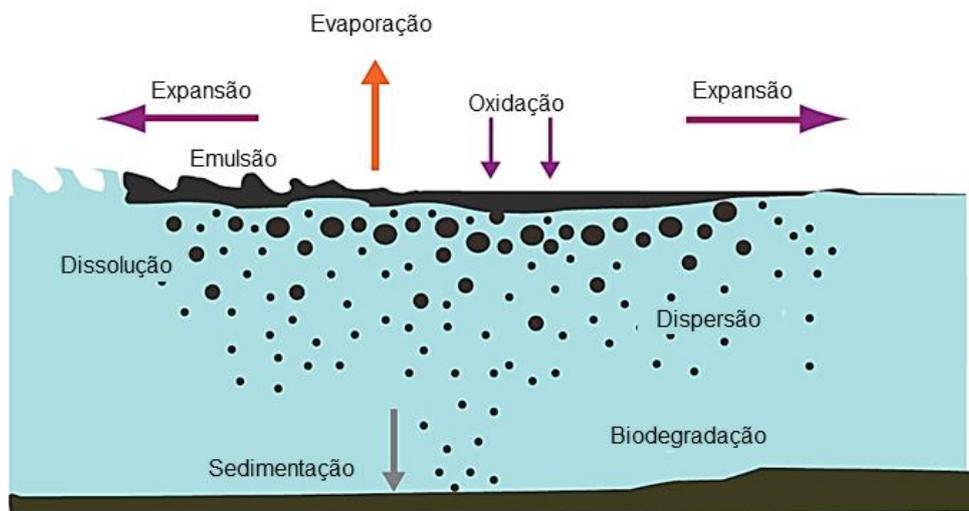
Quando ocorre o vazamento em alto mar, alguns fenômenos passam a ocorrer, cada um com tempos específicos (**Figura 10**)¹¹. Entre os principais, podemos citar 12,13:

- Evaporação: um dos processos mais importantes de intemperismo, no qual boa parte do óleo é evaporado em um período de vários dias, como é o caso da gasolina e de óleo com componentes mais voláteis. Porém em óleos mais pesados o processo é lento e ocorre por longos períodos e temperaturas mais elevadas;
- Emulsão: ocorre a dispersão de gotículas de um líquido em outro, geralmente no caso de óleo e água, o segundo fica em uma forma estável na camada de óleo. A emulsão é um processo consequente da evaporação dos hidrocarbonetos aromáticos de baixo peso molecular, com isso ocorre o aumento da viscosidade até o valor crítico onde passam a se formar emulsões de água com os asfaltenos e resinas presentes no petróleo;
- Dispersão: se dá pela transferência de pequenas gotículas de petróleo para a coluna d'água por meio da ação de ondas e turbulência do mar. Está intimamente ligada com as características do mar no momento do

acidente, podendo ser irrelevante em mares tranquilos ou de extrema importância em mares agitados;

- Dissolução: ocorre por meio da dissolução de componentes solúveis do óleo, como compostos aromáticos de baixo peso molecular e compostos polares. Geralmente é pouco representativa, porém devido a característica dos componentes que serão solubilizados, devido a toxicidade, pode ser de extrema preocupação, principalmente em águas rasas;
- Oxidação: entre os processos de oxidação, a foto-oxidação apresenta maior relevância, fazendo com que o oxigênio do ar e o carbono proveniente do óleo reajam formando novos produtos, geralmente resinas. Estas resinas serão altamente susceptíveis a formação de emulsão;
- Expansão: devido ao movimento da corrente marítima, dos ventos e outros fatores ambientais ocorre a expansão do óleo sob a superfície;
- Sedimentação: esse processo é um dos mais preocupantes, a sedimentação do óleo no fundo do mar leva à diminuição da capacidade de degradação dele. Geralmente, este processo ocorre em regiões costeiras, devido ao fato de ocorrer a interação do óleo com sedimentos presentes na água. Em alguns derramamentos estudados, cerca de 10% do óleo foi sedimentado no fundo do mar¹³;
- Biodegradação: algumas espécies de microrganismos como bactérias, fungos e leveduras são capazes de metabolizar os hidrocarbonetos de petróleo como fonte de energia alimentar.

Figura 10 - Processos físicos e químicos observados após o vazamento de óleo.



Adaptado de: De La Huz, 2011.

A toxicidade do óleo na biota pode ser separada em quatro causas gerais. A primeira se refere ao contato direto do óleo com o corpo do animal. Isso se dá quando o óleo penetra na plumagem das aves e no pelo dos animais, causando a suscetibilidade dos animais às flutuações de temperatura devido a perda de isolamento térmico e a diminuição da flutuabilidade em água, afetando diretamente o voo das aves. A segunda se dá pela ingestão do óleo ou derivados no momento que o animal tenta limpar seus pelos ou penas, causando danos severos aos rins, disfunção hepática e irritação digestiva. Por terceiro, são citados os danos a longo prazo devido a exposições a resíduos que não são letais, mas que afetam significativamente a reprodução dos animais. E por fim, as lesões cerebrais e desorientações causadas pela inalação de vapores tóxicos. Os danos não se limitam às aves e outros animais. É observada também a mortalidade, por exemplo, de microalgas e invertebrados devido a combinação da toxicidade química do óleo e deslocamento físico causado por meios de remediação utilizados, como é o caso da água pressurizada. Além disso, a camada de óleo que flutua sobre a água faz com que a luz não penetre na água afetando a fotossíntese das plantas marinhas e plânctons, afetando assim toda a cadeia alimentar do ecossistema¹⁴.

Os métodos de remediação dos locais afetados, no caso o mar, podem ser divididos em 4 grupos: físicos, térmicos, químicos e biológicos¹⁵. Abaixo serão descritos os métodos mais conhecidos e suas características:

1. **Métodos Físicos:** chamados também de métodos mecânicos, são utilizados para a contenção do derramamento por meio de barreiras. São exemplos de métodos físicos:
 1. **Barreiras (*blooms*) (Figura 11):** agem como barreiras físicas que envolvem o óleo flutuante evitando que ele se espalhe. Basicamente existem dois tipos de barreiras, as de cortina e as de cerca, sendo que a primeira atinge maior profundidade na água em relação a segunda. Entre as barreiras, se destacam àquelas que são direcionadas a incineração do óleo contido, ou seja, o óleo envolto na barreira é queimado para que boa parte seja eliminada do ambiente marinho. Os principais problemas enfrentados na aplicação das barreiras são a baixa flexibilidade, estabilidade em ondas altas e ventos fortes no caso da barreira de cerca e a dificuldade de limpeza e armazenamento no caso da barreira de cortina.
 2. **Skimmers:** são equipamentos utilizados em conjunto com as barreiras, agindo na sucção ou retenção do óleo para o seu interior, podendo reaproveitar o petróleo sem danos a sua composição física e química. O maior problema enfrentado por este método se dá em águas agitadas e em derramamentos com elevado teor de detritos. Na **Figura 12** é exemplificado um tipo de *skimmer*.
 3. **Materiais absorventes:** os principais materiais absorventes utilizados são a turfa, o feno, as fibras vegetais, a serragem, a palha, a vermiculita, a lã, o vidro e a areia. Em geral, estes materiais podem absorver cerca de 3 a 20 vezes o seu peso, porém apresentam desvantagem principalmente na dificuldade de coleta após o uso. Dentre outros materiais utilizados estão os sintéticos, como é o caso das fibras de nylon que podem absorver até 100 vezes seu peso em óleo, porém apresentam baixa biodegradabilidade.
2. **Método Térmico:** baseado na queima do óleo logo após o vazamento, é um método bastante controverso devido aos danos que podem ocorrer com o seu uso. Alguns possíveis danos observados são os incêndios secundários, destruição da fauna e flora adjacente ao local, além do risco à saúde humana devido a geração de gases da combustão térmica.

3. **Métodos Químicos**: basicamente são utilizados dispersantes ou solidificadores para o tratamento do derramamento, alterando as propriedades físicas e químicas do óleo.
- 3.1. **Dispersantes**: são utilizados para transformar as manchas de óleo em gotículas que facilmente são submergidas na água e degradadas. Sua aplicação se dá borrifando-o sobre a água por embarcações ou aeronaves, podendo ser aplicados em quaisquer condições ambientais (vento e corrente). São eficientes na diminuição da aderência de óleo em superfícies e aceleram a biodegradação natural. Porém apresentam problemas principalmente na sua característica inflamável.
- 3.2. **Solidificadores**: são polímeros capazes de interagir com o óleo formando uma espécie de borracha sólida que possui a característica de flutuar e que pode ser facilmente removida por meios físicos. São eles os sorventes de polímero, agentes de reticulação e polímeros com agentes de reticulação. Apresentam a desvantagem quanto ao problema sobre o descarte desse polímero após o uso.
4. **Método Biológico**: se baseia no uso de organismos vivos e plantas ou compostos provenientes deles para a degradação dos componentes do óleo. Caracteriza-se por ser um meio de baixo custo e sustentável, onde nutrientes são adicionados para estimular o crescimento desses organismos vivos. Esse método é altamente afetado pela disponibilidade de nutrientes, concentração de óleo, tempo e a extensão da biodegradação natural.

Figura 11 - Exemplo de barreira de cerca.



Adaptado de Ndimele *et al*, 2018 ¹⁵.

Figura 12 - Exemplo de skimmer.



Adaptado de Ndimele *et al.*, 2018.

2.2. Enzimas

Enzimas são proteínas, que podem catalisar reações químicas e bioquímicas, podendo ser extraídas de microrganismos, plantas e outros seres vivos. Em geral, o termo catalisador se refere a capacidade de acelerar uma reação química sem que faça parte dos produtos finais ou seja consumido durante o processo. As enzimas são catalisadores que atuam diminuindo a energia de ativação da reação. Em relação aos catalisadores inorgânicos, as enzimas apresentam maior especificidade, ou seja, são capazes de atuar de forma específica em uma reação e, além disso, apresentam alta seletividade, fazendo assim a distinção entre diferentes substâncias e até mesmo isômeros ópticos de uma mesma espécie química¹⁶.

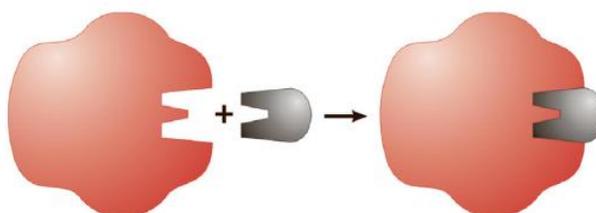
As substâncias catalisadas pelas enzimas são denominadas de substrato. Durante a reação entre enzima (E) e substrato (S) ocorre a formação de um complexo de transição enzima-substrato (ES), que logo em seguida dá a formação ao produto (P) e a enzima se libera do complexo de transição na forma inalterada (E):



A interação entre a enzima e o substrato se dá no denominado sítio ativo, região da enzima altamente específica ao substrato. Os aminoácidos presentes no sítio ativo são convergidos então para uma área restrita em posições apropriadas que garantam o dobramento e a torção da cadeia polipeptídica da enzima, permitindo assim a exposição dos grupos que farão parte da reação. Essas reações se caracterizam como ligações não covalentes, ligações de hidrogênio, atrações iônicas e interações de Van der Waals¹⁶.

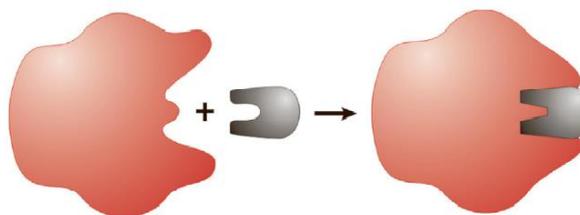
Por volta do final do século XIX, Emil Fischer propôs o chamado Princípio Chave-Fechadura para explicar a combinação entre enzima e substrato (**Figura 13**). O sítio ativo da enzima pode ser comparado com uma cavidade na qual o substrato se encaixa com precisão, logo a referência a chave-fechadura. Após a inserção do substrato nesta cavidade, outras moléculas semelhantes não mais poderão interagir. Vale salientar que devido a esta questão, em muitos casos ocorre a denominada inibição competitiva, onde uma molécula semelhante ocupa o sítio ativo, fazendo com que não seja possível a interação com o substrato desejado¹⁷. Este mecanismo é aceito até os dias atuais, com algumas alterações, como é o caso proposto por Koshland (**Figura 14**). A hipótese proposta por Koshland é de que o sítio ativo, ou seja, a cavidade, não mais é rígido mas sim elástico, fazendo assim com que haja adaptabilidade durante a formação do complexo ES¹⁶.

Figura 13 - Princípio chave-fechadura proposto por Fischer.



Adaptado de Blanco *et al.*, 2017.

Figura 14 - Princípio chave-fechadura proposto por Koshland.



Adaptado de Blanco *et al.*, 2017.

As enzimas são altamente dependentes de certos fatores, como temperatura, pH e concentração do substrato. A temperatura tem papel fundamental para a reação enzimática, sendo o fator mais importante a ser observado. Com o aumento da temperatura da reação ocorre o aumento das colisões intermoleculares e logo a taxa de formação de produto é elevada, porém deve-se atentar para o fato de possível desnaturação da enzima. Para tanto é determinada sempre a denominada temperatura ótima para a ação da enzima sem prejudicar suas características químicas.

Em relação ao pH, as enzimas são altamente dependentes pelo fato de possuírem grupos aminos ionizáveis. Geralmente o pH ótimo de trabalho é determinado por uma curva, na qual determina-se o ponto onde a atividade enzimática é maximizada, ponto este ideal para a reação.

Quando a questão é a concentração de substrato observa-se que em valores baixos ocorre o aumento da velocidade de reação. O gradual aumento de concentração de substrato leva ao atingimento de um patamar de velocidade, chegando-se à velocidade máxima da reação que se torna independente do aumento da concentração de substrato no meio¹⁸.

Aproximadamente 3000 enzimas são conhecidas, porém apenas cerca de 150-170 são utilizadas em aplicações industriais. As enzimas tem papel fundamental na evolução industrial dos dias atuais devido ao fato de ser economicamente viável e ambientalmente amigável¹⁹. Segue alguns exemplos de aplicações industriais envolvendo enzimas:

- Degradação de amido em glicose (glucoamilase);
- Coagulação da proteína do leite (quimosina);
- Desengomagem de fibras têxteis (amilases);
- Detergentes (amilases, lipases e proteases);

- Remoção de gordura do couro bovino (lipases);
- Produção de óleo da biomassa (celulases).
-

No ano de 2008, o mercado de enzimas representava cerca de U\$ 2,1 bilhões, cobrindo uma variedade de produtos, como alimentos, bebidas, detergentes, diagnóstico e alternativas ambientalmente amigáveis. Já em 2010 o mercado de enzimas foi estimado em U\$ 3,3 bilhões. Entre os países com maior consumo estão os Estados Unidos e a Europa. Coincidentemente os maiores produtores de enzimas são os mesmos locais e o Japão. Entre as empresas, destacam-se a Novozymes, Danisco, Genencor, DSM e BASF¹⁹. No ano de 2020, o mercado de enzimas está avaliado em cerca de U\$ 5,9 bilhões, mas as perspectivas até o ano de 2026 sugerem aumento significativo até o patamar de U\$ 8,7 bilhões²⁰. O mercado global está constituído de inúmeras enzimas, das quais podemos citar as carboidrases, proteases, lacases, hidrolases e lipases.

2.2.1. Lipases

As lipases são enzimas que catalisam a hidrólise da ligação éster de substratos lipídicos formando ácidos graxos e glicerol. Bem como, as lipases podem catalisar reações em meio não aquoso como: esterificação, interesterificação, e transesterificação²¹. Em geral, as lipases atuam entre a interface de um substrato lipídico hidrofóbico em um meio aquoso hidrofílico²².

No ano de 2016, o mercado de enzimas foi avaliado em USD 5 bilhões, desse montante cerca de 10% se referia ao comércio de lipases. Esse expressivo montante se refere a aplicação das lipases em vários setores da indústria, como é o caso de emulsificantes e surfactantes, desenvolvimento de saborizantes e aromas, ingredientes farmacêuticos e a indústria oleoquímica²³. Entre as principais lipases produzidas em escala industrial podemos citar: Lipopan®, Lipozyme®, Novazym® 27007, Palatase e Novozyme® 871.

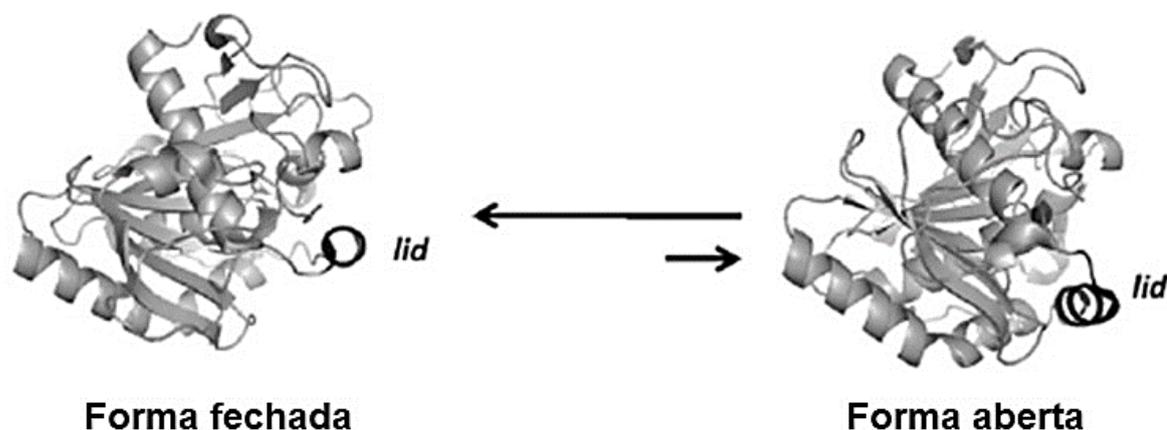
Vários são os meios de obtenção das lipases, sendo produzidas por animais, plantas e microrganismos. Porém as enzimas produzidas por microrganismos apresentam maior vantagem na aplicação industrial. Isso se deve ao fato de apresentarem maior pureza, estabilidade e características únicas, comparadas às lipases produzidas por animais e plantas²⁴. Destas enzimas produzidas por microrganismos podemos citar²⁵:

- Espécies fúngicas:
 - *Candida antarctica*;
 - *Candida rugosa*;
 - *Aspergillus flavus*;
 - *Penicillium abeanum*;
 - *Thermomyces lanuginosus*.
- Espécies bacteriológicas:
 - *Pseudomonas mendocina*;
 - *Staphylococcus pasteurii*;
 - *Bacillus sp.*;
 - *Pseudomonas aeruginosa* HFE733;
 - *Pseudomonas cepacia*;
 - *Pseudomonas sp.*

2.2.2. Lipase de *Thermomyces lanuginosus*

A enzima lipase de *Thermomyces lanuginosus* (LTL) apresenta peso molecular de 31.700 g/mol e ponto isoelétrico de 4,4. Como característica bastante interessante dessa enzima e em geral de muitas lipases, tem-se a presença de uma estrutura tipo tampa, na qual ocorre a abertura (conformação aberta) expondo o sítio ativo e fechamento (conformação fechada) conforme as reações ocorrem (**Figura 15**)²⁶. O fato interessante e muito importante é o de que quando esta enzima está na sua forma livre, ou seja, sem estar fixada em algum suporte (imobilizada) a mesma pode ser encontrada tanto na conformação aberta como na fechada, e enquanto imobilizada, pode haver um maior número de moléculas da enzima na conformação aberta e mais ativa²⁷. Outra característica é que a fixação da enzima em um suporte pode propiciar a permanência da atividade enzimática em temperaturas de até 60°C e em pHs em torno de 9.

Figura 15 - Estrutura da enzima LTL - fechada e aberta.



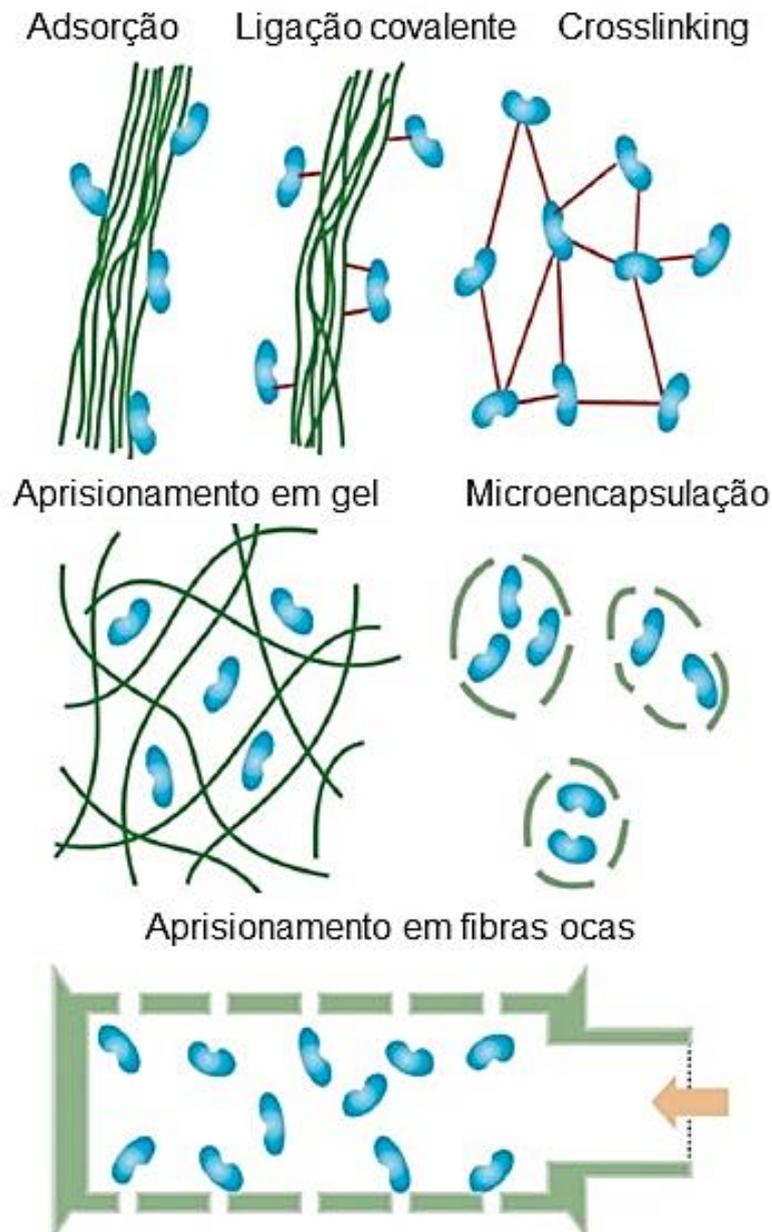
Adaptado de Fernandez-Lafuente, 2010.

2.2.3. Imobilização de enzimas

A imobilização de enzimas tem um papel fundamental na aplicação industrial. Isso se deve ao fato de quando realizada a imobilização da biomolécula, torna-se possível o seu reuso, aumento de estabilidade e melhora da atividade enzimática¹⁷. Algumas metodologias são adaptadas e comumente sugeridas para a imobilização de enzimas, seja por meio químico, que é o caso da imobilização por ligação covalente e *crosslinking* ou por meio físico ou mecânico como adsorção, aprisionamento em gel, microencapsulação e outros (**Figura 16**). Ainda, outras metodologias podem ser citadas, como encapsulação em matrizes orgânicas, inorgânicas e em matrizes híbridas e por ligação covalente uni e multipontual em suportes previamente ativadas²⁸.

Devido a simplicidade, a imobilização por adsorção é comumente utilizada. Basicamente, a enzima se adsorve na superfície do suporte, ficando aderida, garantindo maior estabilidade e possibilidade de reutilização. Estudos indicam que a enzima LTL, quando imobilizada em materiais com características poliméricas e hidrofóbicas, apresenta um aumento da atividade em até 45 vezes para o segundo caso²⁹. Logo, torna-se interessante o estudo da imobilização da enzima lipase de LTL em materiais que possuam relativa facilidade de preparação, baixo custo, biossegurança, características que propiciem boa interação e baixa toxicidade. Entre os mais variados materiais, neste trabalho foi utilizado fibras poliméricas de poliamida-6 obtidas por meio da técnica de eletrofiação.

Figura 16 - Principais métodos de imobilização de enzimas.



Adaptado de Dawkins, 2017 .

2.3. Fibras produzidas por eletrofiação

Várias são as técnicas de obtenção de fibras ou membranas poliméricas, tais como fiação a seco (*dry spinning*), fiação úmida (*wet spinning*) e fiação via gel (*gel spinning*) e também por fiação eletrostática (*electrospinning*). Dentre as técnicas citadas, a eletrofiação se apresenta como uma técnica simples, baixo custo e com potencial para aumento de escala e então possível aplicação industrial. Entre as principais características observadas nas fibras produzidas por eletrofiação, pode-se

citar a área específica elevada, a alta porosidade, o controle do tamanho de poros e a possibilidade de alterações de grupos funcionais³⁰. Lembrando que esses fatores são de extrema importância no processo de imobilização de enzimas, citado anteriormente. As principais aplicações das fibras são na área biomédica como *drug delivery*, na engenharia de tecidos, como sensores, como membranas de filtração de água, ar e separação água-óleo, além de diversas aplicações em catálise, como é o caso da catálise enzimática e fotocatalise^{31,32}.

O processo de eletrospinning consiste basicamente de 4 componentes principais: a) fonte de alta tensão (0 a 40 kV); b) compartimento para a solução (seringa com agulha); c) base coletora (plana ou tambor) e; d) bomba ou embolo automático de injeção da seringa³⁰. Ao aplicar uma alta voltagem sobre a ponta da agulha, onde se encontra a gota da solução polimérica, a gota torna-se instantaneamente carregada e sofre repulsão eletrostática que faz com que a tensão superficial seja neutralizada, fazendo com que ocorra a formação da espécie de um cone, denominado Cone de Taylor (**Figura 17**). Após a formação do cone, ocorre a emissão das fibras ultrafinas em direção ao coletor aterrado, fibras essas que por forças eletrostáticas e coulômbicas são prolongadas até o coletor onde chegam com características muito finas. Nesse processo, entre a ponta da agulha até a base coletora, o solvente utilizado é evaporado (**Figura 18**).

Figura 17 - Cone de Taylor.



Adaptado de Zheng, 2019³⁰.

Figura 18 - Estrutura fundamental do electrospinning.



Fonte: autor.

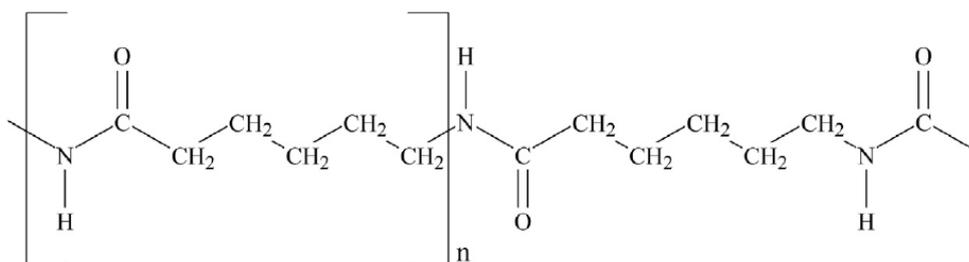
Vários são os parâmetros operacionais e físicos ou químicos que devem ser avaliados para uma obtenção adequada de fibras por eletrospinning³⁰:

- 1) Voltagem aplicada: é necessária a aplicação de tensão suficiente para que ocorra a neutralização da tensão superficial da gota, fazendo com que haja a formação das fibras;
- 2) Taxa de alimentação da solução: a taxa de alimentação não deve ser baixa para que não ocorra a formação de espécies de jatos que não garantam a formação do cone ou nem muito rápidas, que fazem com que ocorra a formação de gotas sobre o coletor devido a pouca evaporação do solvente durante o trajeto;
- 3) Distância entre seringa e coletor: a distância deve ser ajustada para que ocorra a devida formação de fibras com diâmetros apropriados e que garanta a completa evaporação do solvente durante o percurso. Quando a distância entre o coletor é pouca pode ser observada a formação de fibras mais espessas. Quando a distância é elevada, ocorre a formação dos denominados *beads*, que são estruturas semelhantes a gotas e que se formam na base coletora;

- 4) Design do coletor: o design do coletor está diretamente ligado ao tipo de direção da fibra formada. No caso dos coletores planos ocorre a formação de fibras com direções aleatórias. Já quando é utilizado o coletor do tipo tambor ocorre a formação de fibras alinhadas conforme a rotação aplicada;
- 5) Concentração do polímero: é um fator bastante importante a ser otimizado pois garante a boa uniformidade das fibras formadas, seja pela presença ou não de *beads* em concentrações baixas ou o entupimento em concentrações altas;
- 6) Viscosidade da solução: está intimamente ligada com o tamanho e morfologia das fibras. Baixa viscosidade tende a formar fibras não contínuas e *beads*. Já em viscosidades altas ocorre a formação de fibras longas;
- 7) Solventes: o solvente deve ser selecionado de tal forma que seja garantida sua completa evaporação do trajeto da ponta da agulha até a base coletora.

Vários são os polímeros que podem ser aplicados para eletrofição, tais como: poli(ϵ -caprolactona) (PCL); poli(ácido láctico) (PLA); poli(butileno adipato-co-tereftalato) (PBAT) e a poliamida 6 (PA-6)³⁴. Entre esses a PA-6, popularmente conhecida como Nylon 6 (**Figura 19**), foi selecionada para obtenção de fibras neste trabalho. Sua primeira aplicação industrial ocorreu para substituição da seda. Hoje em dia, figura entre as poliamidas com maior consumo em peças de engenharia, fibras e filmes^{35,36}. As principais propriedades químicas são temperatura de fusão de 216°C e temperatura de transição vítrea de 50°C, além de boa resistência em temperaturas superiores a 100°C. Além disso, apresenta alta resistência mecânica, baixo desgaste a abrasão e boa resistência química^{36,34}.

Figura 19- Estrutura química da PA-6.



3. OBJETIVOS

Obtenção de fibras de poliamida-6 (PA-6) por meio de eletrofiação, imobilização da enzima lipase de *Thermomyces lanuginosus* (LTL), caracterização do material e aplicação na degradação de petróleo em meio aquoso em escala laboratorial. Bem como, avaliar a aplicação industrial da fibra com a enzima LTL imobilizada.

3.1. Objetivos específicos

- Obter a fibra por meio da técnica de eletrofiação empregando o polímero PA-6;
- Otimizar os parâmetros de imobilização da enzima LTL;
- Determinar a atividade enzimática antes e após a imobilização;
- Estudar o período de armazenamento e reutilização da enzima após a imobilização;
- Realizar ensaios de degradação de petróleo em água ultrapura e água do mar;
- Caracterizar as fibras por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV), determinar o ângulo de contato em água (WCA) e espectroscopia na região do infravermelho com transformada de *Fourier* no modo de refletância total atenuada (FTIR-ATR);
- Caracterizar o óleo degradado por meio de cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrofotômetro de massa (GC-MS);
- Avaliar a aplicação industrial da fibra com a enzima LTL imobilizada por meio de pesquisa de valores, estudo de planta industrial e armazenamento.

4. PARTE EXPERIMENTAL

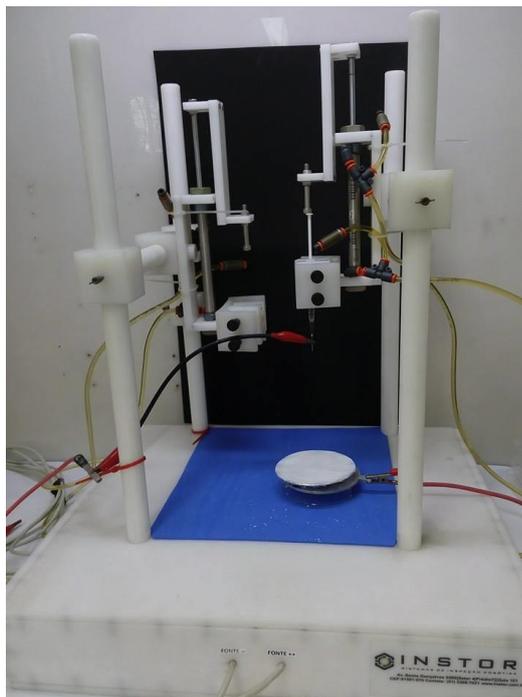
4.1. Materiais e Reagentes

Os materiais utilizados para a produção das nanofibras foram: ácido fórmico obtido da Synth e poliamida-6 (PA-6) obtida da Radilons, ambos de São Paulo, BR. A enzima utilizada foi a lipase de *Thermomyces lanuginosa* (LTL) (LNF, Latino Americana, Rio Grande do Sul). A amostra de petróleo denominada Bazu/Jubart foi obtida da TRANSPETRO S.A., BR. Para os ensaios de atividade enzimática foram utilizados os reagentes p-nitrofenol adquirido da Neon. Os reagentes p-nitrofenol palmitato, triton x-100 e hidroximetil aminometano- HCl (Tris – HCl) da Sigma-Aldrich Co., USA e isopropanol P.A. ACS da Vetech-Sigma. Todos os outros reagentes usados foram de grau analítico e as soluções aquosas foram preparadas com água ultrapura.

4.2. Eletrofiação

O processo de eletrofiação foi baseado pelo método proposto por Xu *et al.*³⁷, que consistiu na dissolução do polímero poliamida-6 (PA-6) em ácido fórmico (20% m/v), sob agitação pelo período de 24h. Posteriormente, a solução foi transferida para uma seringa, a qual foi fixada no equipamento de eletrofiação (Instor, Brasil – Figura 20) a uma distância de 15 cm da base coletora. Um potencial positivo (+24kV) foi aplicado na ponta da seringa fixada e um potencial negativo (-1,5kV) foi aplicado na base coletora fixada abaixo da seringa, obtendo-se uma diferença de potencial. Durante o processo foi controlada a vazão da solução pela seringa ($1,7 \text{ mm h}^{-1}$) e a umidade relativa da atmosfera (~50%). Estes parâmetros são essenciais para a reprodutibilidade das fibras poliméricas formadas.

Figura 20 - Equipamento de eletrofiiação.



Fonte: autor.

4.3. Imobilização das enzimas nas fibras

A imobilização da enzima LTL nas fibras se deu por meio de adsorção. Diferentes quantidades de lipase (50, 100, 140 e 360 U L⁻¹) foram diluídas em solução tampão tris-HCl 50 mM em pH ajustado em 7,5. Logo em seguida, 2 pedaços de fibras de aproximadamente 5cm² foram colocados em contato com 2 mL da solução de enzima, onde um pedaço foi utilizado para o ensaio de degradação e outro para determinação da quantidade de enzima imobilizada. O recipiente foi então armazenado a 5°C pelo período de 24h. Após, a fase líquida (sobrenadante) foi retirada e as fibras foram lavadas com 1 mL da solução tampão. Foram realizados ensaios controle, no qual a fibra foi colocada somente em contato com o tampão sem adição de enzima. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

4.4. Determinação da atividade enzimática

A determinação da atividade enzimática da LTL foi realizada com base no método descrito por Gupta *et al.*³⁸ com modificações. O ensaio está baseado na capacidade da lipase promover a hidrólise do p-nitrofenilpalmitato (p-NPP) em ácido palmítico e p-nitrofenol (p-NP), onde o produto, p-NP, pode ser quantificado pelo aumento da absorbância no comprimento de onda de 410 nm utilizando um

espectrofotômetro UV-visível (modelo UV-1600; PRO-TOOLS). A reação se deu pela adição de 0,1 mL de enzima livre (EL) ou sobrenadante (SOB) em 0,9 mL da solução de substrato (1 mL de p-NPP (8 mM) dissolvido em isopropanol e 9 mL de Triton X-100 (8 mM) dissolvido em tampão tris-HCl no pH 7,5). Já no caso da enzima imobilizada (EI), 2,7 mL de substrato foram adicionados em 5 cm² do suporte. Com isso pode ser determinada a unidade de lipase (U), a qual foi definida como a quantidade de enzima capaz de hidrolisar 1 μmol de p-NP por minuto nas condições de ensaio. A curva de calibração foi preparada usando p-NP como padrão (100 μmol mL⁻¹). Os experimentos foram realizados em triplicata.

A atividade enzimática da solução enzima livre (AEL), atividade do sobrenadante (ASob) e atividade da enzima imobilizada (AEI) foram determinadas por meio das equações 1, 2 e 3, respectivamente. O rendimento da imobilização (Rend) e a eficiência de imobilização (Efic) foram determinadas pelas equações 4 e 5, respectivamente.

$$AEL = \left(\frac{(\text{absorvância da solução de enzima}) \times (\text{fator de diluição})}{(c.\text{angular}) \times (\text{tempo})} \right) \times v. \text{ da imobilização} \quad (1)$$

$$Asob = \left(\frac{(\text{absorvância do sobrenadante}) \times (v.\text{total do ensaio})}{(c.\text{angular}) \times (\text{tempo}) \times (\text{alíquota usada no ensaio})} \right) \times v. \text{ da imobilização} \quad (2)$$

$$AEI = \frac{(\text{absorvância da EI}) \times (v.\text{aprox. restante da imobilização})}{(c.\text{angular}) \times (\text{tempo})} \quad (3)$$

$$Rend = \frac{(\text{atividade EL} - \text{atividade SOB})}{(\text{atividade EL})} \times 100 \quad (4)$$

$$Efic = \frac{(\text{atividade EI})}{(\text{atividade EL} - \text{atividade SOB})} \times 100 \quad (5)$$

4.5. Reutilização da fibra com a enzima imobilizada

Foi determinada a possibilidade de reutilização das fibras com a enzima imobilizada por meio da medida de atividade da enzima imobilizada nos ciclos de reação de hidrólise do p-NPP. Para isso, a EI foi removida da primeira hidrólise, lavada com 1,0 mL de água ultrapura, seguida de 1,0 mL de tampão para remoção de eventual substrato residual na fibra. Logo então, a EI foi adicionada a um novo

substrato e a atividade foi medida. A primeira atividade foi interpretada como 100%. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

4.6. Estabilidade de armazenamento

A estabilidade da EL e da EI foi avaliada pelo período de 21 dias. Para isso, as amostras foram armazenadas em temperatura de 4°C ao abrigo da luz. A cada 8 dias de armazenamento, uma amostra de EI era lavada com 1,0 mL de água ultrapura e 1,0 mL de tampão e a sua atividade medida conforme mencionado no item 4.4.

4.7. Caracterização da fibra

A avaliação da morfologia das fibras foi realizada por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV) usando um microscópio de mesa Hitachi, modelo JSM 6060 operando à 10 keV. A amostra foi previamente revestida com uma fina camada de cobre em um sistema de pulverização de diodo durante 10 min, antes da análise. As imagens obtidas foram analisadas em relação ao diâmetro dos fios por meio do software ImageJ.

A medida de hidrofobicidade da fibra sem imobilização (FP) e da EI foi realizada por meio do ângulo de contato em água (WCA). O equipamento utilizado foi o OCA20 (Dataphysics). As amostras foram cortadas em tamanhos de aproximadamente 1 cm². Sob as fibras foi gotejado 3 µL de água deionizada, a qual foi mensurado o ângulo de contato com um equipamento KRÜSS Drop Shape Analyser (DSA 100S/2014).

A espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier foi realizada no equipamento Bruker Alpha Series FTIR equipado com o espectrômetro de refletância total atenuada (ATR). Os espectros foram medidos por meio de 16 scans na faixa de 4000-400 cm⁻¹.

4.8. Ensaio de degradação do petróleo

O ensaio foi realizado com a EL e com a EI, além do controle com a FP. Os experimentos foram realizados com dois meios diferentes, água ultrapura e água do mar (coletada no município de Arroio do Sal, RS, Brazil – pH em torno de 7). Em placas petri de aproximadamente 5 cm de diâmetro foram adicionados 2 mL de água e aproximadamente 15 mg de petróleo. Logo em seguida foram adicionados sob o petróleo a EL ou EI (1,0 mL, nas concentrações de 50, 100, 140 ou 360 U L⁻¹). O sistema foi mantido em agitação manual a 25°C pelo período de 1 min. Foram

realizados controles com a mistura água e petróleo sem a presença da fibra ou enzima nas mesmas condições. Após o período de agitação o óleo remanescente foi separado da água por meio da adição de diclorometano, seguido de evaporação do solvente a temperatura ambiente e, então pesado e caracterizado. O percentual de petróleo removido foi calculado pela equação 6.

$$\text{Remoção de óleo (\%)} = \frac{\text{massa inicial} - \text{massa remanescente}}{\text{massa inicial}} \times 100 \quad (6)$$

4.9. Caracterização do petróleo degradado

O petróleo degradado foi caracterizado por meio de cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrômetro de massas (GC-MS). O óleo degradado foi extraído por meio de extração líquido-líquido com 1,0 mL do solvente diclorometano. Após, o sistema foi mantido em banho ultrassônico por 1 min para a devida separação das fases. Em seguida, a mistura foi centrifugada a 3000 rpm por 5 min, sendo coletada a fase orgânica no final do processo. Foram realizadas duas extrações consecutivas que foram agrupadas no final. O solvente foi evaporado e passou a realizar-se a separação do óleo em duas frações com base nos procedimentos realizados por Quadros *et al.*³⁹: fração 1 (F1) contendo os hidrocarbonetos alifáticos e fração 2 (F2) contendo hidrocarbonetos aromáticos.

O procedimento para obtenção das frações se deu da seguinte forma: o óleo foi levado a uma coluna de sílica e óxido de alumínio (1,5 g de sílica gel 60 e 3,0 g de óxido de alumínio 90 ativo neutro), sulfato de sódio anidro foi adicionado para retirada de água residual. Primeiramente, a coluna foi eluída com 20 mL de hexano, onde então foi coletada a F1. Em seguida, foi eluído 20 mL da mistura hexano/tolueno na proporção de 3:2 v/v com a finalidade de se obter a fração 2. Após as frações foram evaporadas em temperatura ambiente e redissolvidas com 2 mL de diclorometano, que por fim foi evaporado até 1,5 mL para análise por GC-MS.

As amostras foram analisadas em cromatógrafo Agilent 6890 *Series* acoplado a espectrômetro de massas Agilent 5973 *Network*. A temperatura do ensaio foi de 40°C até 100°C, com tempo máximo de 48 min. O modo de injeção foi *splitless* utilizando os gases He e H₂. Foram injetados 1,0 µL de amostra e a coluna utilizada

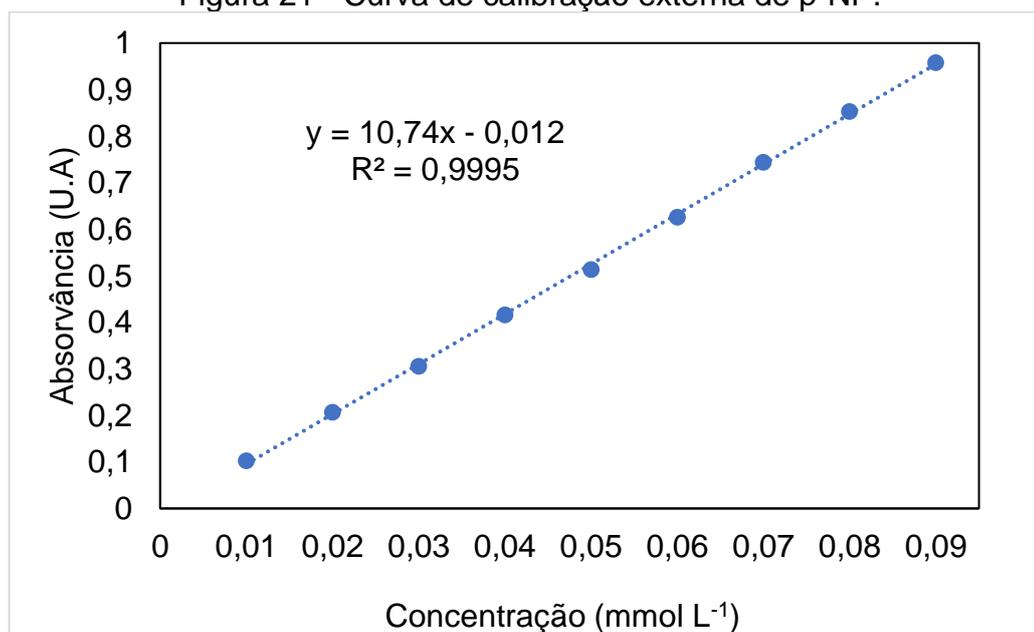
foi a HP-5MS 5% metil fenil polisiloxano com comprimento de 30 m e diâmetro interno de 250 μm . Os cromatogramas foram adquiridos no modo *scan*.

5. RESULTADOS

5.1. Imobilização da enzima LTL

Para fins de quantificação da atividade da enzima imobilizada foi construída uma curva de calibração por padronização externa com o produto formado pela enzima quando em contato com o substrato p-NPP. Logo, a curva foi construída com solução padrão de p-nitrofenol (p-NP) na faixa de concentrações de 0,01 a 0,09 mmol L⁻¹ (**Figura 21**). A curva apresentou comportamento linear em relação à concentração e absorvância, com coeficiente de determinação (R²) igual a 0,9995, indicando ajuste adequado ao modelo linear proposto. A curva, assim como sua equação foram essenciais para a determinação da concentração de enzima por meio da absorvância medida em equipamento UV-Vis.

Figura 21 - Curva de calibração externa de p-NP.



Após, foram determinados os valores referentes ao rendimento de imobilização e a eficiência de imobilização. O valor de rendimento de imobilização se refere ao total de enzima que foi imobilizada na fibra. Neste caso até mesmo enzimas que não apresentem atividade são determinadas. Por outro lado, o valor de eficiência de imobilização se refere às enzimas que foram imobilizadas e que apresentam atividade aparente. Observa-se que os valores de rendimento e eficiência foram inversamente proporcionais aos valores de concentração da enzima (**Tabela 3**). Quando o valor de concentração de enzima foi de 50 U L⁻¹ ocorreu o máximo de rendimento e eficiência

(60 e 155%, respectivamente), onde observa-se que mais da metade da enzima adicionada a fibra foi conseqüentemente imobilizada. Com relação a eficiência observou-se um valor maior que 100%, justificado possivelmente pela possibilidade de imobilização da enzima preferencialmente na sua forma ativa facilitando sua ação quando em contato com o substrato.

O rendimento não foi consideravelmente diferente em relação as demais concentrações de enzima. O ligeiro declínio pode ser justificado pela saturação da superfície e poros da fibra, causando assim dificuldade de adsorção da enzima. Considerando do ponto de vista econômico é favorável o resultado de rendimento obtido para a menor concentração. A eficiência apresentou um valor máximo de 155% na menor concentração, sendo que nas demais concentrações houve significativa diminuição de eficiência. Isso pode ser justificado pela aglomeração de enzimas entre si, ou sobreposição de enzimas sobre a superfície da fibra, o que evitaria a sua livre movimentação e a possibilidade de bloqueio do seu sítio ativo.

Tabela 3 - Rendimento e eficiência da imobilização de enzima em relação à concentração.

Concentração (U L ⁻¹)	Rendimento (%)	Eficiência (%)
50	60 ± 2	155 ± 7
100	51 ± 4	60 ± 6
140	40 ± 0,7	44 ± 2
360	43 ± 4	24 ± 4

A eficiência também é descrita em alguns artigos como a atividade de retenção. Pode-se comparar alguns resultados encontrados na literatura com a melhor condição observada, que é encontrada em concentração de 50 U L⁻¹ (**Tabela 4**). O comparativo se dá em relação à imobilização da enzima lipase de *Candida rugosa* devido a inexistência de resultados de lipase de LTL, porém não perdem a validade pelo fato da semelhança entre as duas enzimas. Observa-se que ocorrem variações significativas em relação a eficiência nas diferentes matrizes. As eficiências encontradas situam-se geralmente na faixa entre 45-50%, com alguns valores atingindo o patamar de 90-110%. Ao compararmos com o resultado para a

concentração de 50 U L⁻¹ pode-se notar que o resultado deste trabalho se destaca, atingindo até mesmo 3 vezes mais eficiência comparada a imobilização em membranas de poliacrilonitrila (PAN) e quitosana modificada. Essa alta eficiência encontrada se justifica pela boa imobilização da enzima ao suporte e sua ótima atividade recuperada.

Tabela 4 - Comparação da eficiência de imobilização com demais trabalhos.

Matriz	Eficiência (%)	Referência
PAN*	81,3 ± 1,1	40
Quitosana/PVA*	49,8 ± 0,5	41
PMMA*	47,8 ± 4,9	42
Pérolas de quitosana	91,5	43
Pérolas de quitosana	111,3	44
Membrana de PAN em folha	50,6 ± 0,9	45
Quitosana modificada com PANCMMA*	45,6 ± 1,8	46
PA-6*	155 ± 7	Este trabalho

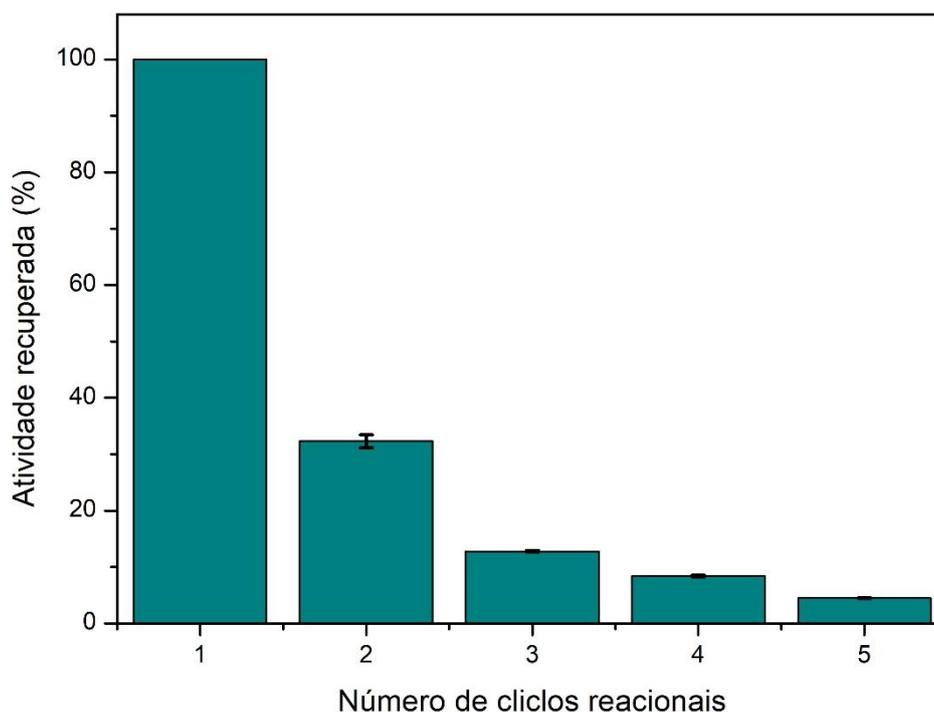
*PAN = poliacrilonitrila; PVA= poliacetato de vinila; PMMA= polimetilmetacrilato; PANCMMA = poli(ácido acrinolitrila-co-maleico)

5.2. Reutilização e armazenamento da fibra

A enzima imobilizada foi avaliada em relação ao número de ciclos possíveis de reutilização. Para isso, foram realizados consecutivos testes de atividade com o substrato p-nitrofenilpalmitato (**Figura 22**). O primeiro ciclo foi determinado como 100% de atividade recuperada e os demais foram calculados com base neste. Observou-se uma diminuição de cerca de 66% de atividade no segundo ciclo de reutilização, chegando ao valor de 32 ± 1% de atividade recuperada. No terceiro ponto a atividade recuperada foi de 13 ± 2%, seguido de 8 ± 2 e 4 ± 0,05%, para os ciclos 4 e 5, respectivamente. Esse resultado corrobora com os de Bezerra *et al.*, onde foi observada a diminuição significativa nos primeiros ciclos quando a enzima LTL foi imobilizada em suportes de divinilsulfona modificados. Huang *et al.* observaram

diminuição semelhante quando a enzima lipase de *Candida rugosa* foi imobilizada em fibras de celulose produzidas pro eletrofiação, chegando à atividade recuperada de cerca de 30% após 8 ciclos. No trabalho de Huang *et al.* a atividade da lipase de *Candida rugosa* imobilizada em nanofibras de PAN apresentou atividade recuperada de aproximadamente 20%. Todos os trabalhos citam a possível causa desta diminuição como sendo a desadsorção da enzima do suporte durante os ciclos ou uma possível inativação da enzima pelo meio utilizado. Isso se deve na maior parte pela fraca ligação entre o suporte e a enzima, devido ao processo de imobilização utilizado, onde agem forças fracas do tipo interações hidrofóbicas, forças de Van der Waals e forças eletrostáticas.

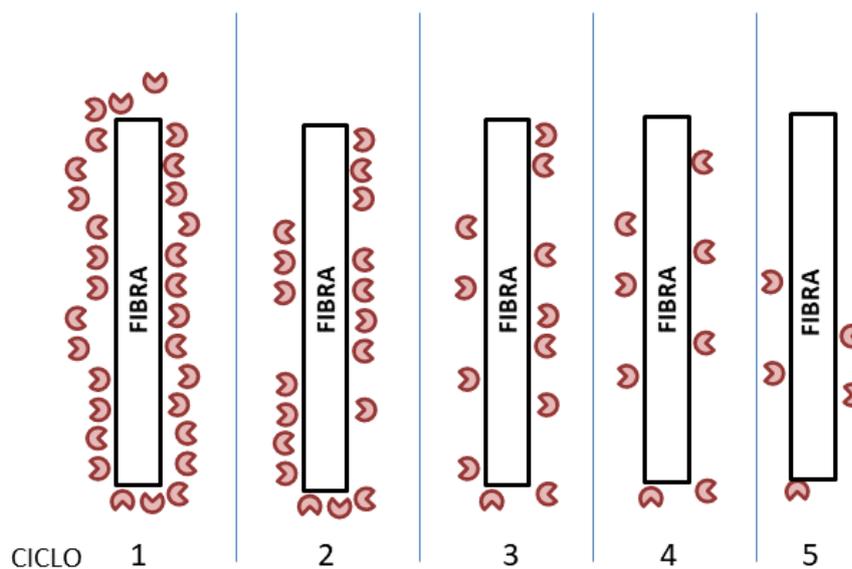
Figura 22 - Estabilidade da enzima durante a reutilização em ciclos.



Segundo Lage *et al.*, o decréscimo de atividade observado na atividade recuperada da lipase de LTL em suporte hidrofóbico pode ser justificado pelo desprendimento da enzima do suporte. Portanto, é proposto o seguinte esquema demonstrado na **Figura 23**. Sugere-se que no primeiro ciclo a superfície da fibra esteja coberta de enzimas imobilizadas, porém boa parte está fracamente adsorvida nesta superfície. Logo, no segundo ciclo passa a ocorrer a perda significativa de porções de enzimas para o meio reacional, ocorrendo então desativação da mesma. Isso ocorre

sucessivamente nos ciclos posteriores, restando apenas uma pouca parcela da enzima adicionada inicialmente após os 5 ciclos de reutilização.

Figura 23 - Esquema de possível acontecimento durante os ciclos de reutilização.



O possível armazenamento da solução estoque de enzima, assim como da enzima imobilizada é de extrema importância para possíveis aplicações industriais. Caso a fibra seja estável em longos períodos ela pode ser estocada e assim utilizada quando necessário em caso de acidentes de derramamento de petróleo. Para isso, a fibra e a solução foram armazenadas pelo período de 25 dias em temperatura controlada de 5°C. Os resultados apresentados na **Figura 24** e **Tabela 5** mostraram o aumento da atividade da enzima após os dias recorrentes de armazenamento. O mesmo é observado para a enzima imobilizada. Esta observação difere de alguns trabalhos relatados na literatura, onde na maioria dos casos a atividade da enzima livre e imobilizada tende a diminuir durante o período de estoque^{49,48,47}.

Em relação à enzima livre, o aumento da atividade recuperada se deve provavelmente pelo rearranjo da enzima na solução de tampão. Durante o período em que se encontra armazenada pode ocorrer mudança estrutural da enzima, fazendo com que seu sítio ativo esteja mais exposto e conseqüentemente a atividade observada será maior. No caso da enzima imobilizada, possivelmente ocorre a melhor disposição da enzima sobre a fibra, garantindo assim maior imobilização e novamente maior porção de sítios ativos expostos. A estabilidade da solução de enzima e da

enzima imobilizada se mostraram eficientes, logo podem ser estocadas com segurança e aplicadas quando necessário.

Figura 24 - Atividade recuperada durante o período de armazenamento.

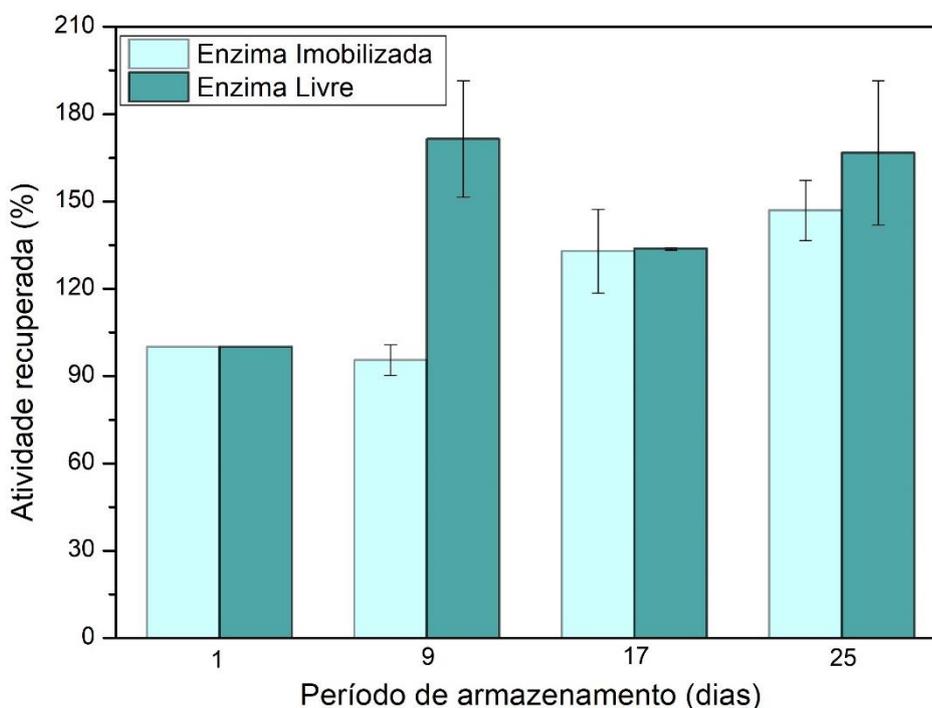


Tabela 5 - Atividade recuperada em relação à estocagem.

Período (dias)	Atividade Recuperada (%)	
	Enzima imobilizada	Enzima Livre
1	100	100
9	95,5 ± 5,3	171,4 ± 20,0
17	132,9 ± 14,4	133,7 ± 0,4
25	146,9 ± 10,3	166,7 ± 24,8

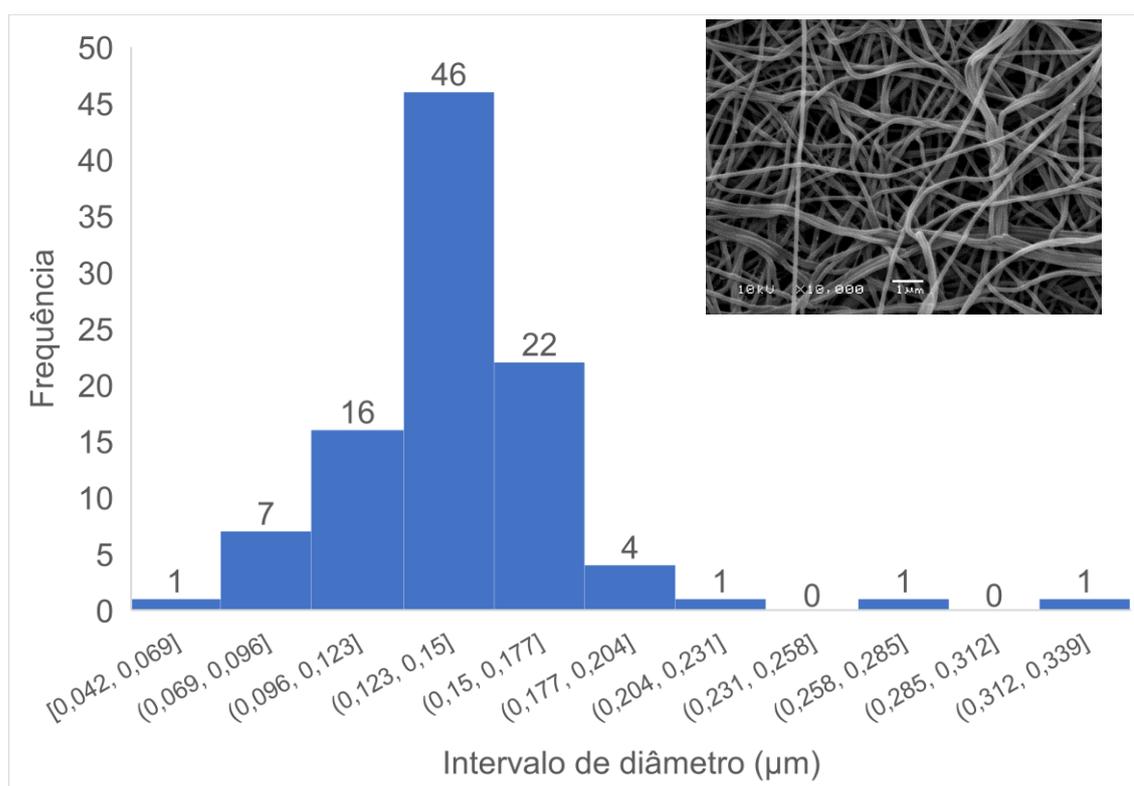
5.3. Caracterização da fibra

Vários parâmetros devem ser ajustados para que ocorra a obtenção de fibras com morfologia adequada, sem a formação de *beads* ou teias entre os fios. Entre os principais parâmetros estão a distância entre a seringa e a base coletora, a vazão de solução polimérica, a viscosidade da solução, concentração e voltagem aplicada. Por meio da microscopia eletrônica de varredura (MEV) (**Figura 26a**) da fibra observaram-se os inúmeros fios que a compõe, todos uniformes em relação a sua estrutura, ou

seja, sem a formação de *beads* ou rompimentos. Isso deixa claro que as condições experimentais utilizadas para a eletrofiação foram adequadas, como foi relatado nos trabalhos de Li *et al.* ^{40, 51}.

A estrutura da fibra se mostrou com arranjo aleatório dos fios, caracterizado pelo método de eletrofiação utilizado (sem o uso de rotor), com diâmetro variado dos fios. A quantificação do diâmetro de cada fio foi obtida por meio de uma imagem do MEV, com 10000 vezes de magnificação e auxílio do *software* ImageJ. Foram realizadas cerca de 100 medidas. O resultado (**Figura 25**) foi uma distribuição normal de diâmetros, sendo que a faixa que apresentou maior frequência foi a de 0,123-0,150 μm , onde foram contabilizados 46 fios. Em geral, os fios apresentaram diâmetro variável entre 0,069-0,204 μm , logo pode-se dizer que a fibra apresenta estruturas de tamanho nanomicrométrico.

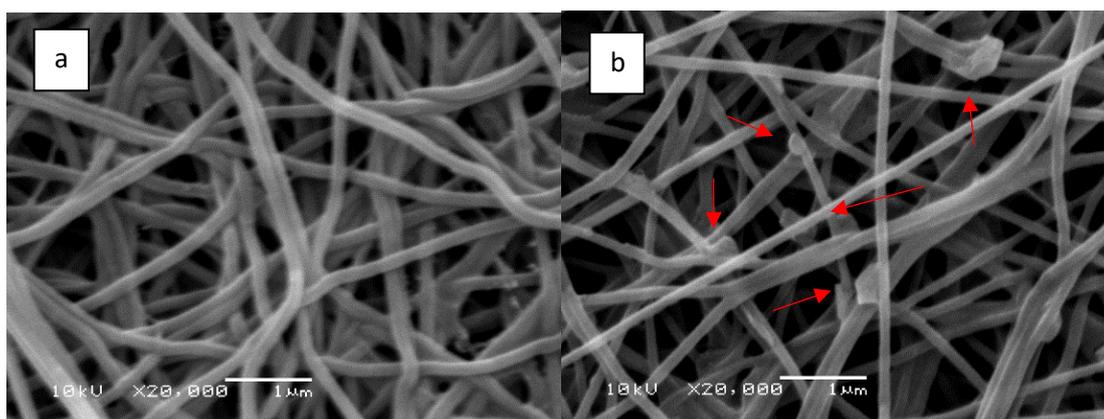
Figura 25 - Distribuição do diâmetro de fios da fibra.



A fibra com a enzima imobilizada também foi avaliada em relação à sua morfologia. Comparando-se a fibra pura (**Figura 26a**) em relação à com enzima imobilizada (**Figura 26b**), observa-se o aparecimento de estruturas aderidas aos fios. Essas estruturas apresentam-se com morfologias variadas. Estudos relatam que

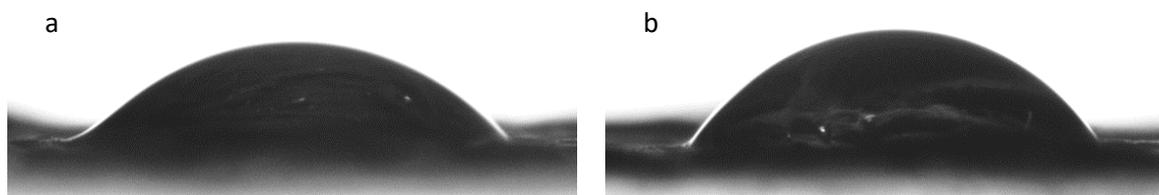
estas estruturas são aglomerados de enzimas que se encontram aderidas a fibras. Isso se deve a uma forte interação de uma enzima a outras, formando agregados de proteínas por interações moleculares^{40,51}.

Figura 26 - Microscopia eletrônica de varredura da fibra pura (a) e da enzima imobilizada (b).



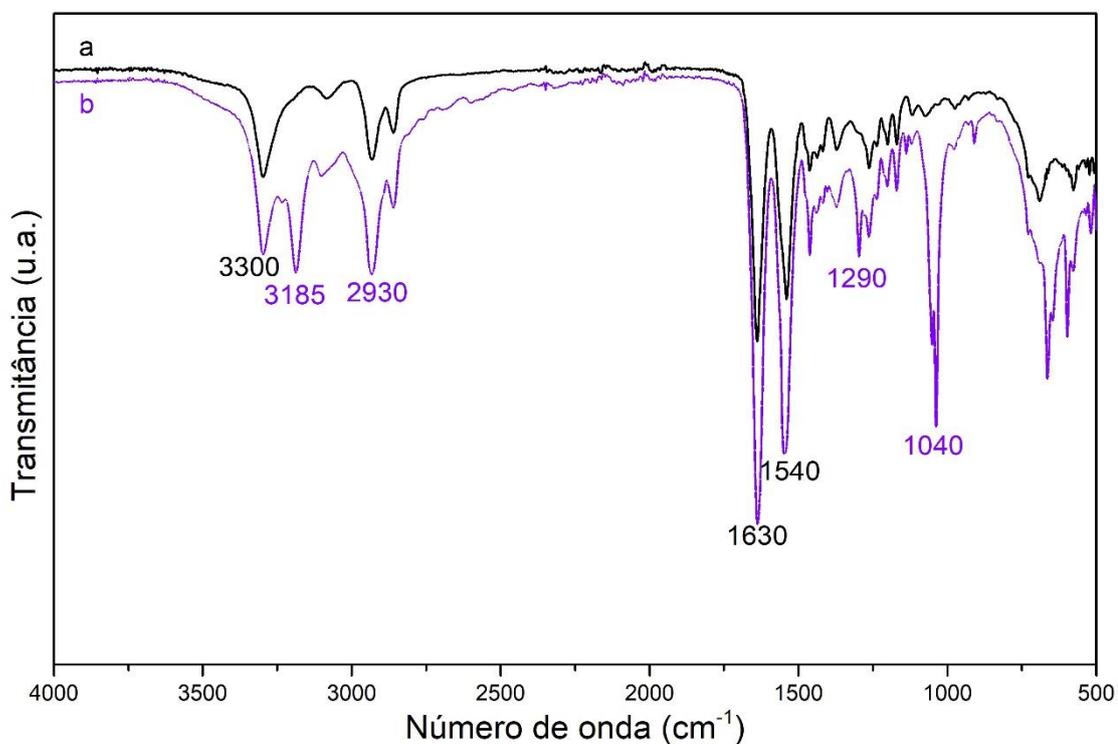
A medida de ângulo de contato em água foi realizada com a finalidade de se obter a afinidade da fibra com água. Vale salientar que quando o valor de ângulo de contato encontrado está entre 0° e 90° caracteriza-se de um material com superfície hidrofílica. Quando o ângulo de contato é entre 90° e 180° caracteriza-se de um material com superfície hidrofóbica. Os resultados obtidos foram de $54,2^\circ \pm 3,4$ para a fibra pura (**Figura 27a**) e $64,4^\circ \pm 1,1$ para a fibra com a enzima imobilizada (**Figura 27b**). Logo, conclui-se que a fibra apresenta características hidrofílicas, sendo o mesmo encontrado no trabalho de Nectoux *et al.* Isso se deve principalmente a ligações de hidrogênio presentes na fibra. Após a imobilização da enzima ocorre um ligeiro aumento da hidrofobicidade da fibra, fato este que pode ser justificado pela presença de grupamentos hidrofóbicos oriundos da enzima.

Figura 27 - Medida de ângulo de contato para a fibra pura (a) e fibra com a enzima imobilizada (b).



O espectro de infravermelho foi obtido com a finalidade de se avaliar a estrutura química da fibra pura e após a imobilização da enzima. É possível observar no espectro da fibra pura (**Figura 28a**) a presença de bandas características da PA-6 em 1540 cm^{-1} , referente aos grupos NH e CH_2 da amida⁵³; em 2930 cm^{-1} correspondente a vibração não simétrica de CH_2 ; e em 3300 e 1630 cm^{-1} referente ao estiramento NH de amidas⁵⁴. Em relação a fibra com a enzima imobilizada (**Figura 28b**) observa-se em 3185 cm^{-1} o pico característico de NH da enzima (Li *et al.*, 2011); e entre 500 e 1040 cm^{-1} picos referentes a porção peptídica da enzima LTL⁵⁶.

Figura 28 - Espectro de FTIR para a fibra pura (a) e para a enzima imobilizada (b).



5.4. Degradação do petróleo

A degradação do petróleo foi avaliada primeiramente de forma qualitativa. Para isso foram retiradas fotografias anteriormente ao ensaio de degradação, logo após a adição da enzima ou da fibra sob o petróleo e depois da agitação por um minuto. Nas **Tabelas 6 e 7** são apresentados os resultados referentes aos ensaios realizados em água ultrapura e água do mar, respectivamente. No primeiro caso observa-se que ocorre a degradação do petróleo pela enzima tanto na forma livre quanto imobilizada, logo após a aplicação sob o petróleo. Após o tempo de agitação verifica-se que não ocorre relevante degradação do petróleo para enzima livre, enquanto para a degradação com a enzima imobilizada observamos ligeira diminuição da coloração, sugerindo que pode ter ocorrido degradação do petróleo pela enzima e também adsorção do petróleo a fibra. A diminuição da atividade enzimática observada pode ser ocasionada por algum componente presente no ensaio que faz com que ocorra desnaturação da enzima ou mudança conformacional para sua forma fechada.

Quando os ensaios foram realizados em água do mar observou-se resultados semelhantes aos anteriores, porém foi notada diminuição da degradação visual da enzima livre. Isso pode ser justificado também pela salinidade do meio reacional e consequente perda de atividade nessas condições. Além da avaliação visual, foi avaliada a massa de petróleo removido durante o ensaio. A amostra de petróleo remanescente após o ensaio foi separada do meio aquoso, devidamente seca e pesada. Logo então foram comparadas a massa inicial de petróleo adicionada ao ensaio e a massa final (**Tabela 8**).

Tabela 6 - Resultados visuais da degradação de petróleo em água ultrapura.

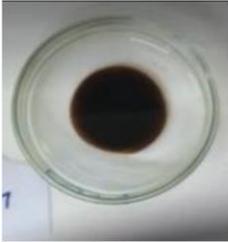
Amostra	Antes	Durante	Depois
Enzima Livre			
Enzima Imobilizada			
Fibra Pura			
Branco (água ultrapura)			

Tabela 7 - Resultados visuais da degradação de petróleo em água do mar.

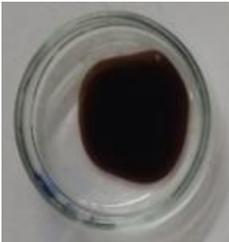
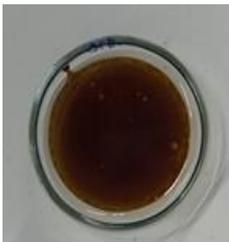
Amostra	Antes	Durante	Depois
Enzima Livre			
Enzima Imobilizada			
Fibra Pura			
Branco (água do mar)			

Tabela 8 - Percentual de remoção de óleo.

	Óleo removido (%)		
	Enzima Livre	Enzima Imobilizada	Fibra Pura
Água ultrapura	34 ± 1	54 ± 1	29 ± 0
Água do mar	17 ± 9	46 ± 6	33 ± 4

Comparando-se os resultados obtidos para a EL em relação aos dois meios estudados, observa-se que houve a diminuição da remoção de petróleo quando os ensaios foram realizados em água do mar, corroborando com a observação visual. No caso da água ultrapura foram removidos $34 \pm 1\%$ da massa de petróleo adicionada em contrapartida com $17 \pm 9\%$ em água do mar. Como citado, isto pode ser decorrente da presença de íons em solução e condições da água, como pH e condutividade. Por outro lado, os dados para a enzima imobilizada não apresentaram diferença significativa. No entanto, a remoção foi maior quando comparada aos resultados da enzima livre. Isso se deve ao fato de a enzima estar mais ativa e protegida à ação de agentes nocivos do meio quando adsorvida na superfície da fibra.

Os resultados da fibra pura foram importantes para evidenciar que a fibra é capaz de absorver o petróleo da solução. Sendo assim pode ser um material promissor não só para a aplicação com as enzimas, mas também na sua forma pura, como material absorvente para petróleo de ambientes contaminados. Comparando-se a enzima imobilizada com a fibra pura é possível observar que a primeira condição apresentou resultados mais relevantes, pois além da absorção do petróleo pela fibra, com o uso da enzima, ocorre a degradação do mesmo.

5.5. Caracterização preliminar do petróleo degradado

A avaliação do petróleo degradado por meio de GC-MS é uma ferramenta essencial para a determinação da eficiência da enzima no objetivo proposto. Neste trabalho foi avaliado qualitativamente o desaparecimento de picos em relação ao petróleo puro (PP). Os resultados ainda precisam ser rigorosamente estudados para determinação precisa dos constituintes, porém uma análise preliminar é possível e será discutida a seguir. Os espectros de massas e os cromatogramas de cada amostra encontram-se no apêndice.

Primeiramente serão apresentados os resultados referentes a fração 1 das amostras de água ultrapura e água do mar. Com relação a água ultrapura, observa-se a complexidade do cromatograma obtido (**Figura 29a**), porém diferenças significativas podem ser observadas na faixa de tempo de retenção situada entre 6 e 20 min (**Figura 29b**) e de 20 a 34 min (**Figura 29c**). Nos menores tempos de retenção observa-se o desaparecimento de alguns picos, principalmente na faixa situada entre 13 e 17 min. Com a aproximação nessa faixa de tempo (**Figura 30**) nota-se que alguns picos representativos desapareceram ou diminuíram significativamente. Sendo assim,

cada pico foi analisado separadamente com a finalidade de determinar o composto químico que sofreu variação.

Com relação ao pico cromatográfico de tempo 13,89 min (**Figura 31**), observa-se o seu desaparecimento quando o ensaio é realizado com a enzima livre (verde) e com a enzima imobilizada (azul), provavelmente devido a degradação do petróleo pela enzima. A partir da análise do espectro de massas, sugere-se que o composto degradado se refere ao 2,6,10 trimetil-tetradecano, composto alifático e ramificado que pode ser encontrado no petróleo.

Para o pico cromatográfico de tempo 14,36 min (**Figura 32**), observa-se o desaparecimento do sinal somente para o teste com a enzima imobilizada, evidenciando a degradação do suposto composto tetratetracontano, hidrocarboneto alifático linear composto por 44 carbonos. No pico de tempo 15,56 min (**Figura 33**), observa-se a degradação somente para o teste com a enzima imobilizada. O composto sugerido é o 10-metil-eicosano, constituído de 21 carbonos e uma ramificação no carbono 10. Por fim, para o tempo de retenção de 16,13 min (**Figura 34**), observa-se a degradação pela enzima imobilizada e o composto sugerido é o 1-cloroeicosano. Nos tempos de retenção subsequentes não foram observadas variações significativas no desaparecimento dos picos e, portanto, não serão avaliados (**Figura 35**).

Em relação aos ensaios realizados em água do mar da fração 1 (**Figura 36**), assim como os resultados da fração 2, não foi possível a determinação de degradação até o presente momento. Como pode-se observar nos cromatogramas (**Figura 37a e b**) a diferença não é visualmente significativa e novas amostras devem ser injetadas para melhor visualização.

Figura 29 - Cromatogramas para os testes realizados em água ultrapura (a); zoom na faixa de 13-20 min (b); zoom na faixa de 20-34 min (c). Petróleo puro (preto); enzima imobilizada (azul); fibra pura (vermelho); enzima livre (verde).

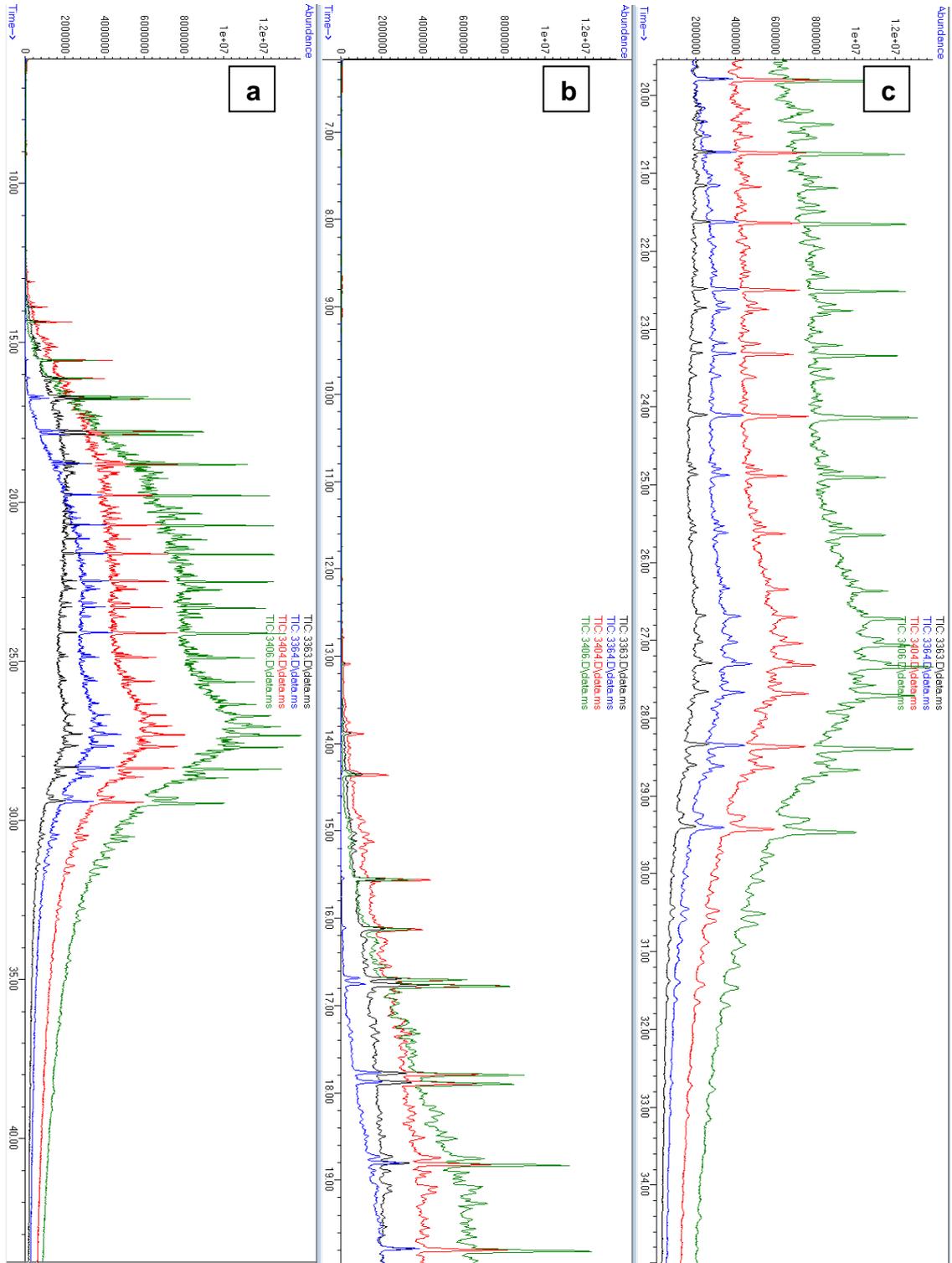


Figura 30 - Aproximação na faixa de tempo de retenção entre 13-17 min.

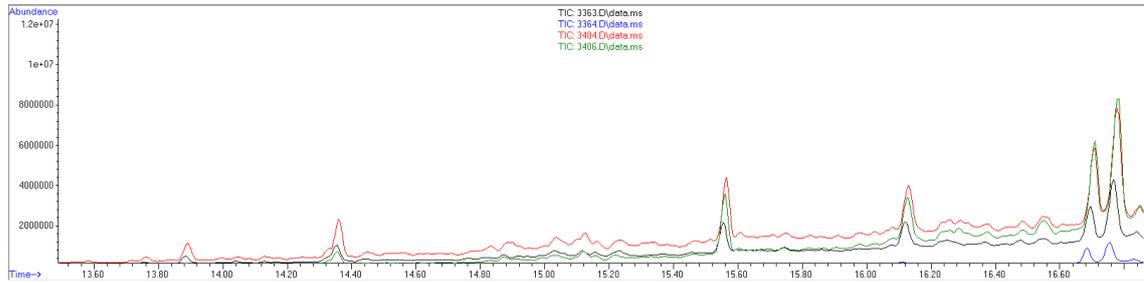


Figura 31 – Aproximação no tempo de 13,89 min.

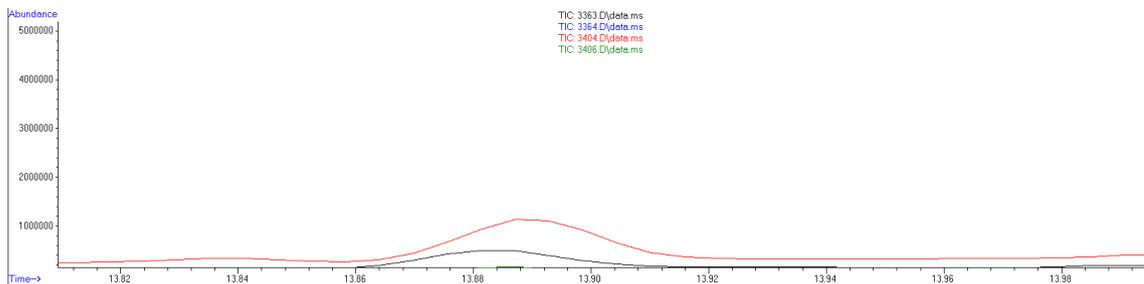


Figura 32 - Aproximação no tempo de 14,36 min.

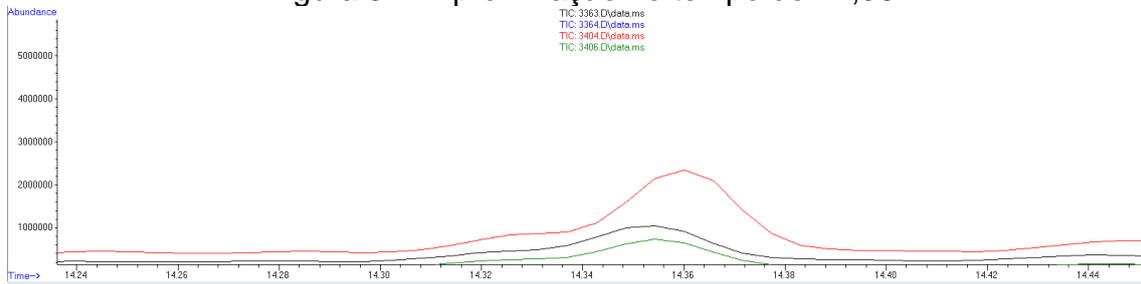


Figura 33 - Aproximação no tempo de 15,56 min.

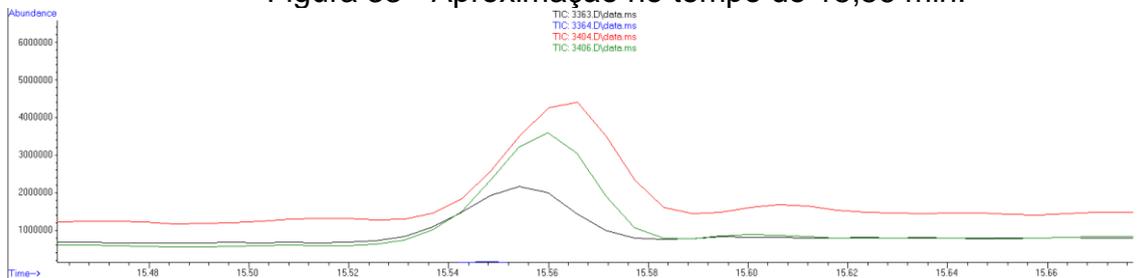


Figura 34 - Aproximação no tempo de 16,13 min.

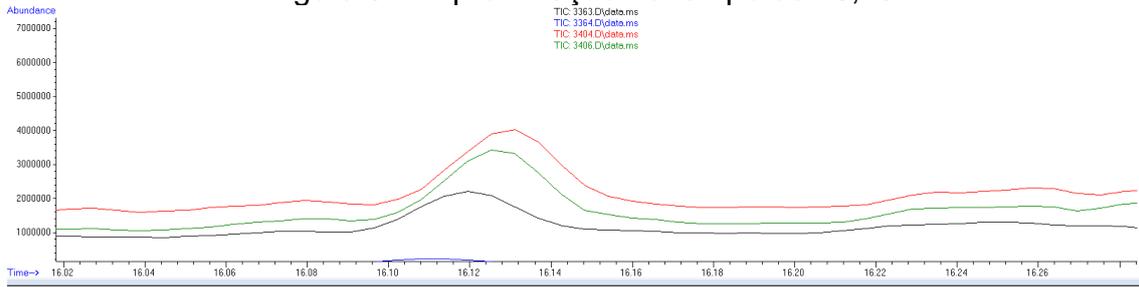


Figura 35 – Picos entre na faixa de tempo de retenção entre 14-20 min.

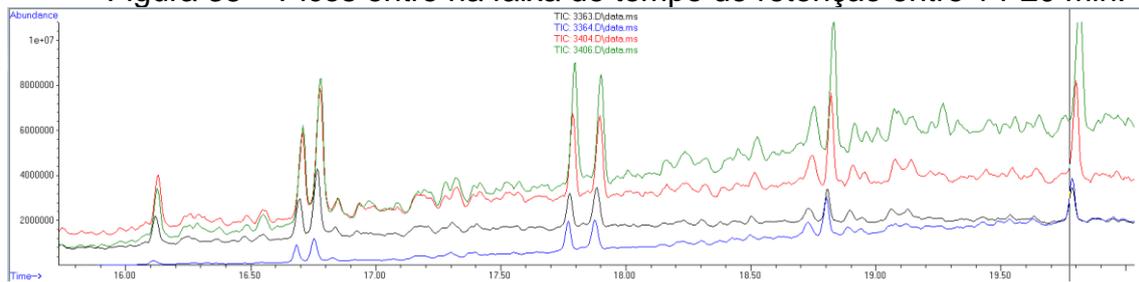


Figura 36 - Cromatogramas referentes a fração 1 dos ensaios realizados em água do mar. Petróleo puro (preto); fibra pura (azul); enzima livre (vermelho); enzima imobilizada (verde).

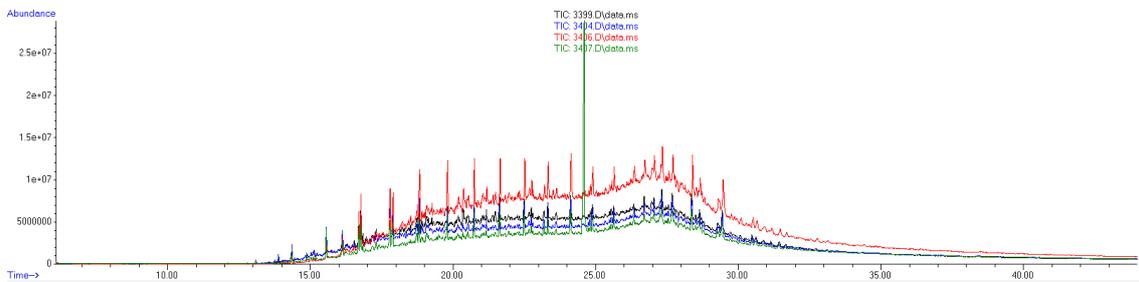
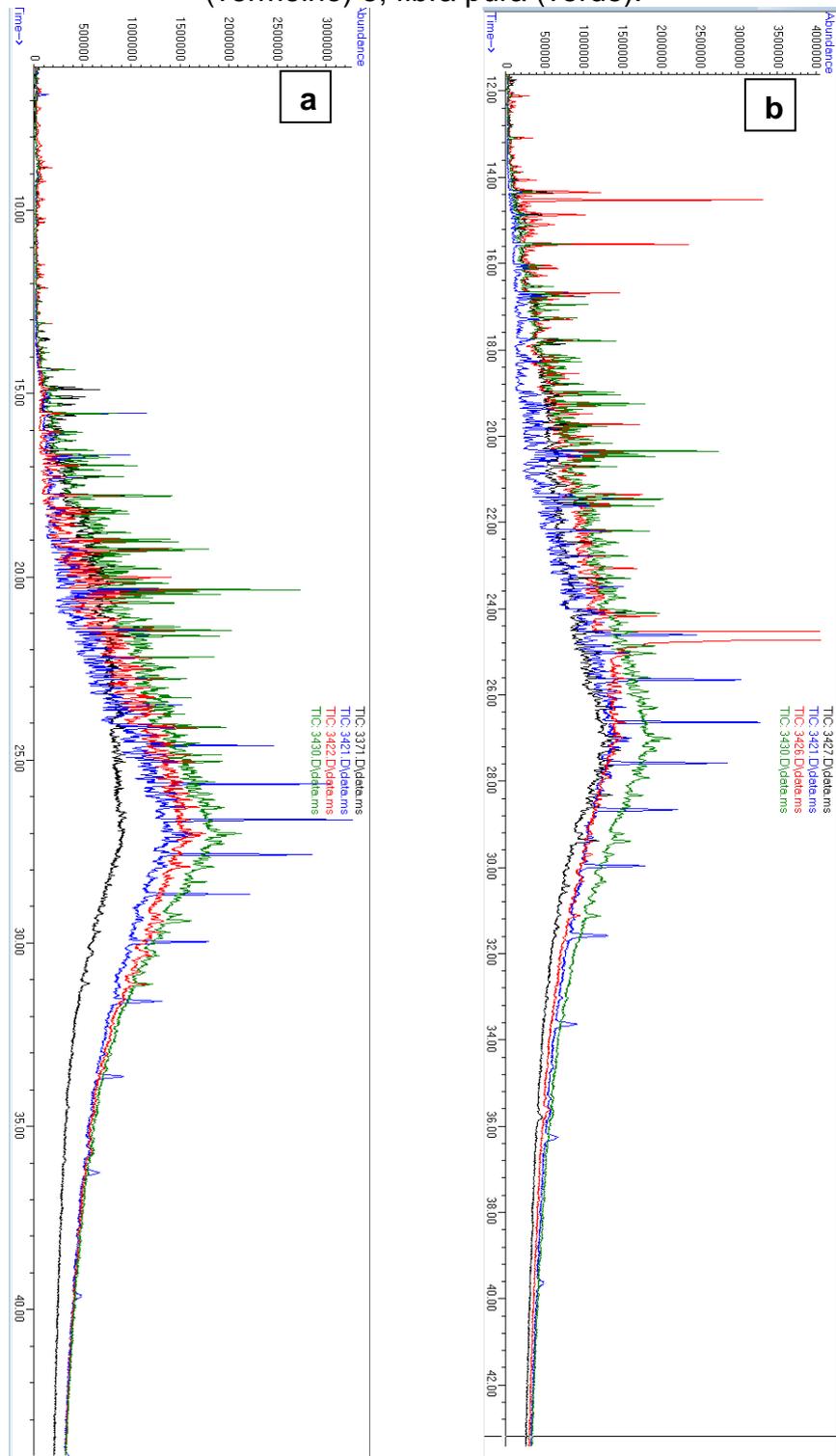


Figura 37 - Cromatogramas referentes a fração 2 dos ensaios em água destilada (a) e água do mar (b). Petróleo puro (preto); enzima livre (azul); enzima imobilizada (vermelho) e; fibra pura (verde).



6. AVALIAÇÃO DE IMPACTO AMBIENTAL

Este trabalho tem por finalidade a aplicação da fibra imobilizada com a lipase de *Thermomyces lanuginosus* como material na degradação de petróleo e consequente beneficiamento ambiental em caso de acidentes em ambiente marítimo. Sua aplicação originaria inúmeros benefícios ambientais em caso de acidentes como: diminuição da quantidade de petróleo no mar; degradação do petróleo e eliminação do mesmo por microrganismos do ambiente; e possibilidade de absorção de petróleo e consequente recolhimento. Entre os possíveis problemas que podem ser encontrados na sua aplicação está a possibilidade de perda no ambiente onde será aplicado devido às condições climáticas como vento e movimento das ondas; rompimento da manta e consequente perda dos pedaços; ingestão por animais marinhos e o desprendimento de enzimas para o ambiente marítimo, porém este último não causaria grandes problemas devido a possível desnaturação da enzima em curto período após sua exposição na forma livre. Para contornar os danos causados pela fibra ao meio ambiente sugere-se o estudo em trabalhos futuros da resistência do material a intempéries, além da utilização de polímeros biodegradáveis.

7. AVALIAÇÃO DE CUSTOS

Serão avaliados neste tópico o custo para produção das fibras e posterior imobilização da enzima. Também serão apresentadas alternativas para a implementação em escala industrial da produção das fibras imobilizadas para posterior comercialização e aplicação em ambientes aquáticos atingidos por derramamentos de petróleo.

7.1. Custos para obtenção da fibra e imobilização

Os custos para a produção laboratorial com estrutura previamente estabelecida, com refrigeradores e espaço alocado podem ser classificados em dois grupos: consumíveis e permanentes e materiais de uso contínuo. Os consumíveis são aqueles destinados ao uso e que possuem tempo curto de utilização, que é o caso

dos materiais e reagentes. Enquanto os permanentes e de uso contínuo são aqueles utilizados por longos períodos, como é o caso dos equipamentos e vidrarias.

Em relação aos equipamentos o custo total avaliado é de cerca de R\$ 56.512,82, conforme a pesquisa realizada em outubro de 2021 (**Tabela 9**). Os custos para os consumíveis foram calculados para a produção de 100 mL de solução e consequente obtenção de cerca de 100 fibras com diâmetros de 10 cm. O custo para a produção das fibras foi de cerca de R\$ 62,05 (**Tabela 10**).

Tabela 9 - Cotação de valores de produtos permanentes e demais.

Produto	Valor (R\$)
Agitador magnético com aquecimento ⁵⁷	1.027,00
Bastão de vidro 10x300 mm ⁵⁸	4,40
Barra magnética (9x25mm) ⁵⁹	39,34
Frasco reagente com tampa azul 50 mL ⁶⁰	54,63
Equipamento de eletrofiação (escala laboratorial) ⁶¹	55.384,50
Vidro de relógio 100 mm ⁶²	3,45
TOTAL	56.512,82

Tabela 10 - Cotação de valores de consumíveis para a obtenção de 100 fibras.

Produto	Valor unitário (R\$)	Valor para 100 mL de solução (R\$)
Ácido fórmico (1,0 L)	200,00	20,00
PA-6 (1,0 kg)	69,72	0,014
Papel alumínio (7,5 m)	2,70	2,70
Seringa de insulina (100 peças)	39,34	39,34
Total		R\$ 62,05

Para a imobilização foi cotado o valor referente a enzima. A enzima comercialmente disponível pela Merck apresenta cerca de 3000 U g⁻¹ e é comercializada na quantidade mínima de 10 g pelo valor de R\$ 959,00. No presente trabalho são imobilizados cerca de 0,05 U de enzima em cada pedaço de 5 cm², considerando uma fibra inteira com diâmetro de 10 cm e área de 78,54 cm² serão necessários cerca de 0,785 U de enzima. Logo o valor total para imobilização da enzima será de aproximadamente R\$ 0,25.

Os valores descritos anteriormente se referem a implantação laboratorial de produção das fibras, porém existem no mercado vários modelos de equipamento de eletrofição com configuração industrial. Entre os modelos os que mais se destacaram foram os da marca *Inovenso*, os quais são comercializados em dois modelos. O primeiro se refere a somente uma unidade de equipamento (**Figura 38**) e o segundo se refere a um equipamento destinado a produção em larga escala, constituído de 3 equipamentos simultâneos (**Figura 39**). O equipamento único será discutido em relação às suas características. O Nanospinner 416 Industrial Electrospinning/Spraying (**Figura 38**) é capaz de produzir fibras com largura de 1 m e diâmetro de fios entre 50-400 nm. Possui 204 agulhas durante a completa operação, 2 bombas peristálticas e uma fonte de alta tensão de 60 kV. O controle é realizado por uma tela situada a frente do equipamento, evitando assim acidentes, como descargas elétricas.

Para uma solução de PA-6 com percentual em massa de 18% (semelhante à nossa solução), a produção chega a ser de 45 m²/min = 2700 m²/h = 63450 m²/dia = 18.273.600 m²/ano = 18,27 km²/ano. Considerando a área de Porto Alegre, que é de cerca de 496,8 km², e a utilização de 3 equipamentos totalizando uma produção de cerca de 54,81 km²/ano, seriam necessários cerca de 9 anos para a produção de fibras que fossem capazes de cobrir a cidade inteira. Considerando que a aplicação da fibra seria em acidentes com área relativamente menor, com cerca de até 4 km², a produção se torna viável.

Figura 38 – Equipamento Nanospinner 416 Industrial Electrospinning/Spraying.



Figura 39 - Equipamento Nanospinner 3550 Electrospinning/Spraying.



7.2. Incubação

A Universidade Federal do Rio Grande do Sul oferece por meio da Rede de Incubadoras Tecnológicas (REINTEC), a possibilidade de instalação de empreendimentos em diversas áreas, denominada popularmente de incubação. O edital nº 1 de 2021 traz ao público informações sobre procedimentos e condições para a seleção de propostas de empreendimentos. A inscrição da proposta deste trabalho seria uma alternativa potencial para instalação industrial em pequena escala e consequente oportunidade de inserção no mercado. No vigente edital são oferecidas quatro possibilidades de incubação, sendo elas⁶³:

- Pré-incubação interna: “Visa oferecer suporte na adequação do modelo de negócios, na revisão dos produtos e serviços propostos e na verificação da viabilidade do negócio, além de completar procedimentos legais referentes à constituição da empresa. Para atingir estes objetivos, os pré-incubados executam atividades assistidas e contam com serviços de acompanhamento. A modalidade de pré-incubação interna oferece: módulo para trabalho, a ser definido por cada incubadora, em ambiente de uso compartilhado ou individual, conforme disponibilidade de cada incubadora; serviços de apoio e infraestrutura de uso comum, acesso à Internet nas dependências físicas da UFRGS, limpeza das áreas comuns; e acesso a facilidades compartilhadas que incluem salas para reuniões, auditório, sanitários, copa-cozinha e biblioteca, conforme condições e disponibilidade de recursos da UFRGS e das incubadoras”;
- Pré-incubação externa: “oferece os mesmos serviços da pré-incubação interna, exceto sala de uso privado ou módulo de trabalho em ambiente de uso compartilhado”;
- Incubação interna: “na modalidade de incubação com opção residente, os empreendimentos têm à sua disposição: módulo para trabalho em ambiente de uso compartilhado ou individual, conforme disponibilidade de cada incubadora; serviços de apoio e infraestrutura de uso comum, acesso à Internet nas dependências físicas da UFRGS, limpeza das áreas comuns; e acesso a facilidades compartilhadas que incluem salas para reuniões, auditório, sanitários, copa-cozinha e biblioteca, conforme condições e disponibilidade de recursos da UFRGS e da incubadora”; Além disso, dispõe de acesso a consultorias, capacitações e acompanhamento da incubadora;
- Incubação externa: “oferece os mesmos serviços da Incubação Interna, exceto sala de uso privado ou módulo de trabalho em ambiente de uso compartilhado”.

A REINTEC é constituído de 6 grandes incubadoras, cada uma dedicada a uma área científica específica. No caso do presente trabalho, sugere-se a incubação nas seguintes incubadoras:

1. Hestia: incubadora dedicada a projetos nas áreas de engenharia, física, geociências, química e pesquisas hidráulicas;

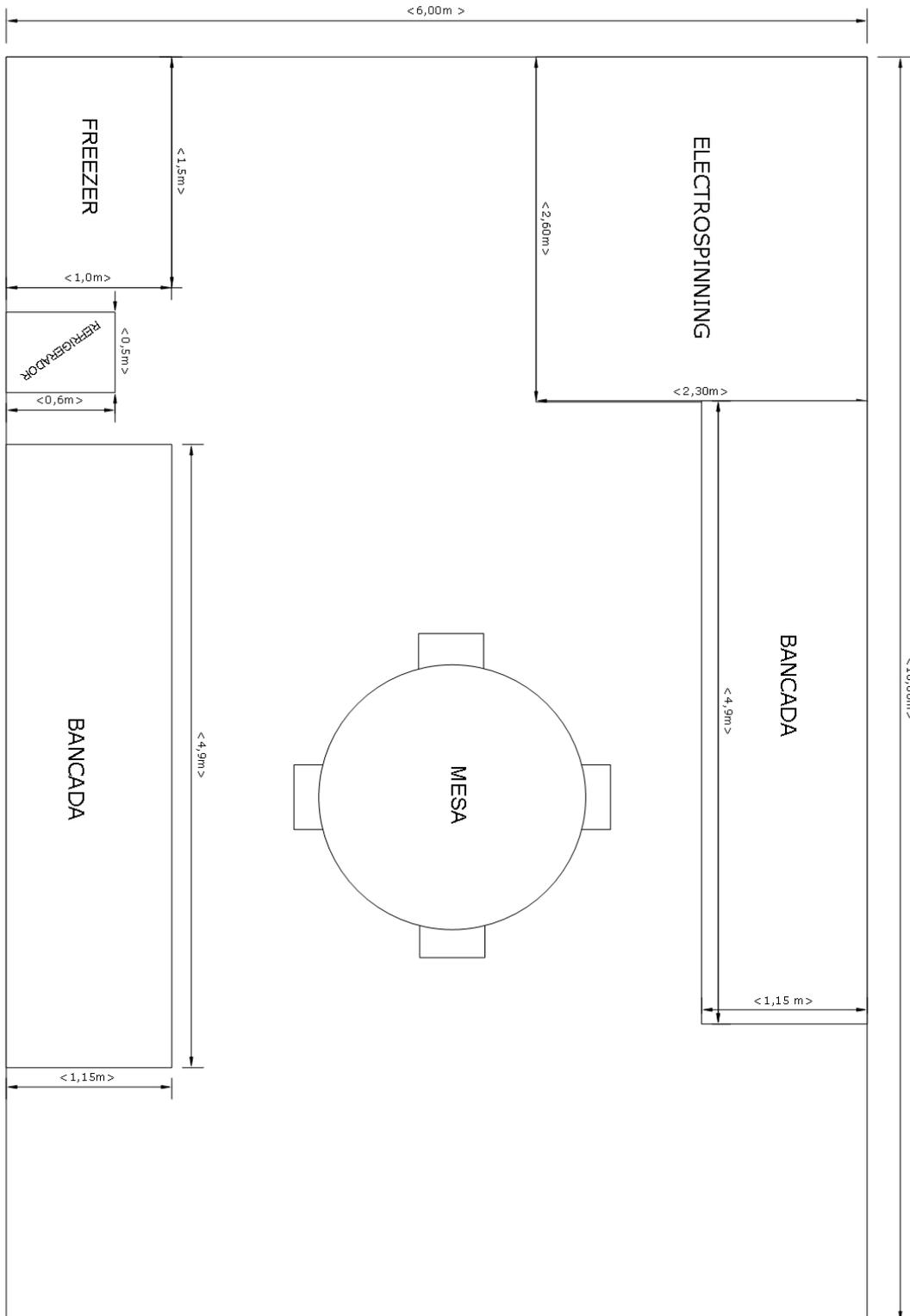
2. Incubadora Empresarial do Centro de Biotecnologia: dedicada a projetos na área de Biotecnologia e afins;
3. Incubadora Multissetorial Germina: dedicada a projetos relacionados à Tecnologia, Meio Ambiente e Sociedade no Litoral Norte.

Em relação aos custos para incubação é exigido o pagamento de inscrição no valor de R\$ 100,00. No caso de incubação interna, que seria a melhor opção, onde seriam oportunizados o local de trabalho com uso de sala privativa equipada com ponto de trabalho o custo seria de R\$ 24,00 por mês por metro quadrado, com valor mínimo de R\$ 480,00. Para a implementação de um equipamento de eletrofiação de escala industrial, instalação de geladeiras e freezers para imobilização e armazenamento, além de pias e bancadas são necessários cerca de 60 m² de área (**Figura 40**), totalizando então o pagamento de aproximadamente R\$ 1.440,00 mensais pela área utilizada. O edital ainda prevê o pagamento de *royalties* após 12 meses de contrato ou até 30 dias após a rescisão contrato. Os valores são descritos na **Tabela 11**.

Tabela 11 - Percentual de *royalties* sobre o valor líquido das notas fiscais.

Faturamento acumulado em 12 meses		Percentual para a Empresa	Percentual para a UFRGS
de	até	-	-
R\$ 0,00	R\$ 100.000,00	97,5%	2,5%
R\$ 100.000,01	R\$ 250.000,00	98,0%	2,0%
R\$ 250.000,01	R\$ 500.000,00	98,5%	1,5%
R\$ 500.000,00		99,0%	1,0%

Figura 40 – Planta Baixa da sala para incubação de empresa.



8. CONCLUSÃO

A fibra de poliamida 6 foi obtida por meio da técnica de eletrofiação e foi possível a imobilização da enzima LTL em diversas concentrações. Dentre as concentrações, a que mais se mostrou relevante devido a eficiência e rendimento foi a de concentração de 50 U L^{-1} . Isso se deve provavelmente pela maior mobilidade enzimática e organização conformacional da enzima na melhor condição. Além disso, os estudos de reaproveitamento sugeriram perda gradativa da atividade enzimática com os seguintes ciclos, o que corrobora com o modelo de imobilização desejado, a adsorção. Os resultados referentes ao armazenamento demonstraram permanência de atividade da enzima em um período de 25 dias à 5°C , garantindo assim que o material possa ser confeccionado e armazenado para futuras aplicações.

Em relação à caracterização física e química da fibra imobilizada com a enzima, observou-se variações desde a mudança de ângulo de contato proveniente da mudança de hidrofobicidade causada pela enzima; a presença das principais bandas no espectro de infravermelho, confirmando a presença química da enzima e da PA-6; assim como a estrutura morfológica da fibra, evidenciando sua estrutura nanomicrométrica e a presença de aglomerados de enzimas.

Em relação à degradação de petróleo, observou-se mudança do aspecto quando os ensaios foram realizados com a enzima livre e imobilizada em água ultrapura, isso corroborou com os resultados encontrados por meio de cromatografia gasosa, onde fica evidente a degradação de compostos nestas condições.

Por fim, salienta-se a importância do material com potencial aplicação em acidentes causados por vazamentos de petróleo, principalmente em ambientes de água doce, como foi observado até o momento pelos resultados encontrados. E ainda, aponta-se a possibilidade de implantação industrial por meio de incubação ao Parque Tecnológico da UFRGS.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. SPEIGHT, J. G. **The Chemistry and Technology of Petroleum**. 5. ed. Califórnia: CRC Press, 2014.
2. ABDEL-AAL, H.K.; AGGOUR, M.; FAHIM, M. A. **Petroleum and gas field processing**. 1. ed. New York: Marcel Dekker, 2003.
3. PEREIRA, R. M. **Técnicas de imobilização e estabilização de lipases obtidas a partir de diferentes fontes microbianas**. 2014. Trabalho de Conclusão de Curso (Engenharia Química) - Universidade Federal de Alfenas, Poços de Caldas, 2014.
4. T TISSOT, B.P. ; WELTE, D. H. **Petroleum Formation and Occurrence**. 1. ed. New York: Springer-Verlag, 1978. v. 53.
5. ADDISON, T.; ROE, A. The Role of Oil and Gas in the Economic Development of the Global Economy. **Extractive Industries : The Management of Resources as a Driver of Sustainable**. 1. ed. Helsinki: OXFORD, 2018. p. 1–21.
6. AGÊNCIA NACIONAL DE PETRÓLEO. **Anuário Estatístico Brasileiro do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis 2020**. 1. ed. Rio de Janeiro: ANP, 2020.
7. YERGIN, D. **The Economix Benefits of Oil and Gas**. New York: 2020.
8. UOL. **Dez anos após o derramamento de petróleo no Golfo do México, o perigo persiste**. 2020. Disponível em: <https://economia.uol.com.br/noticias/afp/2020/04/17/dez-anos-apos-o-derramamento-de-petroleo-no-golfo-do-mexico-o-perigo-persiste.htm>. Acesso em 14/10/2021.
9. GREENPEACE BRASIL. **Desastre no Golfo do México completa cinco anos**. 2015. Disponível em: <https://www.greenpeace.org/brasil/blog/desastre-no-golfo-do-mexico-completa-cinco-anos/>. Acesso em: 14 out. 2021.
10. BABOSA, V. **Os 10 maiores acidentes petrolíferos da história**. Disponível em: <https://exame.com/mundo/10-maiores-acidentes-petroliferos-historia-556774/>. Acesso em: 14 out. 2021.
11. DE LA HUZ, R.; LASTRA, M.; LÓPEZ, J. Oil Spills. **Encyclopedia of Environmental Health**, p. 251–255, 2011.
12. FINGAS, M. **The Basics Of Oil Spill Cleanup**. 2. ed. London: Lewis Publishers, 2000.
13. FINGAS, M. **The Basics Of Oil Spill Cleanup**. 3. ed. London: CRC Press, 2013. 251 p.
14. OTHUMPANGAT, S.; CASTRANOVA, V. Oil Spills. **Encyclopedia of Toxicology: Third Edition**, v. 3, p. 677–681, 2014.
15. NDIMELE, P. E. *et al.* Remediation of Crude Oil Spillage. *In: The Political Ecology of Oil and Gas Activities in the Nigerian Aquatic Ecosystem*. 1. ed. Nigerian: Elsevier Inc., 2018. p. 369–384.
16. BLANCO, A.; BLANCO, G. Enzymes. *In: Medical Biochemistry*. 1. ed. Academic Press, 2017. p. 153–175.
17. DAWKINS, R. Enzymes - Molecular Supercatalysts for Use at Home and in Industry. *In: Biotechnology for Beginners*. 1. ed. Elsevier Inc., 2017. p. 30.
18. BHAGAVAN, N. V.; HA, C.-E. Enzymes and Enzyme Regulation. *In: Essentials of Medical Biochemistry whith Clinical Cases*. 2. ed. Academic Press, 2011. p. 47–58.
19. PATEL, A. K.; SINGHANIA, R. R.; PANDEY, A. Production, Purification, and Application of Microbial Enzymes. *In: Biotechnology of Microbial Enzymes: Production, Biocatalysis and Industrial*

- Applications**. 1. ed. India: Elsevier Inc., 2017. p. 13–41.
20. MARKETS, M. and. Industrial enzymes market worth \$8.7 bn by 2026. **Focus on Surfactants**, v. 2020, n. 7, p. 3, 2020.
21. SINGH, P.; KUMAR, S. Microbial enzyme in food biotechnology. *In: Enzymes in Food Biotechnology: Production, Applications, and Future Prospects*. India: Elsevier Inc., 2018. p. 19–28.
22. BEN AKACHA, N.; GARGOURI, M. Microbial and enzymatic technologies used for the production of natural aroma compounds: Synthesis, recovery modeling, and bioprocesses. **Food and Bioproducts Processing**, v. 94, n. May 2014, p. 675–706, 2015.
23. LAI, O. M. *et al.* **Lipase/Esterase: Properties and industrial applications**. Georgia: Elsevier, 2018.
24. HOU, C. T.; SHIMADA, Y. Lipases. **Encyclopedia of Microbiology**, p. 385–392, 2009.
25. CHANDRA, P. *et al.* Microbial lipases and their industrial applications: A comprehensive review. **Microbial Cell Factories**, v. 19, n. 1, p. 1–42, 2020.
26. FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Lipase from *Thermomyces lanuginosus*: Uses and prospects as an industrial biocatalyst. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 62, n. 3–4, p. 197–212, 2010.
27. RODRIGUES, R. C. *et al.* Immobilization-stabilization of the lipase from *Thermomyces lanuginosus*: Critical role of chemical amination. **Process Biochemistry**, v. 44, n. 9, p. 963–968, 2009.
28. MENDES, A. A.; DE CASTRO, H. F.; DE L.C. GIORDANO, R. Triagem de suportes orgânicos e protocolos de ativação na imobilização e estabilização de lipase de *Thermomyces lanuginosus*. **Química Nova**, v. 36, n. 2, p. 245–251, 2013.
29. PEREIRA, R. M. **Técnicas de imobilização e estabilização de lipases obtidas a partir de diferentes fontes microbianas**. 2014. Trabalho de Conclusão de Curso (Engenharia Química) - Universidade Federal de Alfenas, Poços de Caldas, 2014.
30. TIJING, L. D. *et al.* Electrospinning for Membrane Fabrication: Strategies and Applications. *In: Comprehensive Membrane Science and Engineering*. Sidney: Elsevier Ltd., 2017. v. 1p. 418–444.
31. XU, H. *et al.* An electrospun chitosan-based nanofibrous membrane reactor immobilized by the non-glycosylated rPGA for hydrolysis of pectin-rich biomass. **Renewable Energy**, v. 126, p. 573–582, 2018.
32. SAGITHA, P. *et al.* Development of nanocomposite membranes by electrospun nanofibrous materials. *In: Nanocomposite Membranes for Water and Gas Separation*. 1. ed. India: Elsevier Inc., 2019. p. 199–218.
33. ZHENG, Y. Fabrication on bioinspired surfaces. *In: Bioinspired Design of Materials Surfaces*. 1. ed. Elsevier Inc., 2019. p. 99–146.
34. NECTOUX, A. da S. **Membranas poliméricas para remoção de desreguladores endócrinos em amostras aquosas**. 2019. 123f. tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2019.
35. ARAÚJO, R. G. **Análise Das Propriedades Micro E Macroscópicas De Blendas De Poliamida 4,6/Poliamida 6**. 2002. 59 f. Dissertação (mestrado em ciência e engenharia de materiais) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2002.
36. FAGUNDES, E. C. M. **Elastômero termoplástico vulcanizado a base de PA/NBR**. 2011. 117 f.

Tese (Doutorado em Ciências dos Materiais) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

37. QI, F. F. *et al.* Nylon 6 electrospun nanofibers mat as effective sorbent for the removal of estrogens: Kinetic and thermodynamic studies. **Nanoscale Research Letters**, v. 9, n. 1, p. 1–10, 2014.
38. GUPTA, N.; RATHI, P.; GUPTA, R. Simplified para-nitrophenyl palmitate assay for lipases and esterases. **Analytical Biochemistry**, v. 311, n. 1, p. 98–99, 2002.
39. Quadros, P. D. *et al.* Oily sludge stimulates microbial activity and changes microbial structure in a landfarming soil. **Int. Biodeterior. Biodegrad. V. 115**, p. 90–101, 2016.
40. LI, S. F. *et al.* Immobilization of *Pseudomonas cepacia* lipase onto the electrospun PAN nanofibrous membranes for transesterification reaction. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 73, n. 1–4, p. 98–103, 2011.
41. HUANG, X. J.; GE, D.; XU, Z. K. Preparation and characterization of stable chitosan nanofibrous membrane for lipase immobilization. **European Polymer Journal**, v. 43, n. 9, p. 3710–3718, 2007.
HUANG, X. jun *et al.* Immobilization and Properties of Lipase from *Candida rugosa* on Electrospun Nanofibrous Membranes with Biomimetic Phospholipid Moieties. **Chemical Research in Chinese Universities**, v. 24, n. 2, p. 231–237, 2008.
42. CHEN, J. P. *et al.* Fabrication of electrospun poly(methyl methacrylate) nanofibrous membranes by statistical approach for application in enzyme immobilization. **Journal of Membrane Science**, v. 340, n. 1–2, p. 9–15, 2009.
43. HUNG, T. C. *et al.* Binary immobilization of *Candida rugosa* lipase on chitosan. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 26, n. 1–2, p. 69–78, 2003.
44. TING, W. J. *et al.* Application of binary immobilized *Candida rugosa* lipase for hydrolysis of soybean oil. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 42, n. 1–2, p. 32–38, 2006.
45. HUANG, X. J. *et al.* Electrospun nanofibers modified with phospholipid moieties for enzyme immobilization. **Macromolecular Rapid Communications**, v. 27, n. 16, p. 1341–1345, 2006.
46. YE, P. *et al.* Chitosan-tethered poly(acrylonitrile-co-maleic acid) hollow fiber membrane for lipase immobilization. **Biomaterials**, v. 26, n. 32, p. 6394–6403, 2005.
47. BEZERRA, R. M. *et al.* A new heterofunctional support for enzyme immobilization: PEI functionalized Fe₃O₄ MNPs activated with divinyl sulfone. Application in the immobilization of lipase from *Thermomyces lanuginosus*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 138, p. 1–11, 2020.
48. HUANG, X. J. *et al.* Immobilization of *Candida rugosa* lipase on electrospun cellulose nanofiber membrane. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 70, n. 3–4, p. 95–100, 2011.
49. HUANG, X. jun *et al.* Immobilization and Properties of Lipase from *Candida rugosa* on Electrospun Nanofibrous Membranes with Biomimetic Phospholipid Moieties. **Chemical Research in Chinese Universities**, v. 24, n. 2, p. 231–237, 2008.
50. LAGE, F. A. P. *et al.* Preparation of a biocatalyst via physical adsorption of lipase from *Thermomyces lanuginosus* on hydrophobic support to catalyze biolubricant synthesis by esterification reaction in a solvent-free system. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 84, p. 56–67, 2016.
51. LI, S. F.; WU, W. T. Lipase-immobilized electrospun PAN nanofibrous membranes for soybean oil hydrolysis. **Biochemical Engineering Journal**, v. 45, n. 1, p. 48–53, 2009.

52. NECTOUX, A. da S. *et al.* Electrospun nanofibrous membranes for solid-phase extraction of estriol from aqueous solution. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 136, n. 11, p. 1–8, 2019.
53. GIDE, A. **Angewandte Chemie International Edition**, p. 5–24, 1967.
54. CAI, Y. *et al.* Structures, thermal stability, and crystalline properties of polyamide6/organic-modified Fe-montmorillonite composite nanofibers by electrospinning. **Journal of Materials Science**, v. 43, n. 18, p. 6132–6138, 2008.
55. LI, S. F. *et al.* Pseudomonas cepacia lipase immobilized onto the electrospun PAN nanofibrous membranes for biodiesel production from soybean oil. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, [S. l.], v. 72, n. 1–2, p. 40–45, 2011.
56. ZHOU, W. *et al.* Surface functionalization of graphene oxide by amino acids for Thermomyces lanuginosus lipase adsorption. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 546, p. 211–220, 2019.
57. 7LAB. **Agitador Magnético com Aquecimento**. Disponível em: https://www.7lab.com.br/equipamentos-para-laboratorio/agitador-magnetico-com-aquecimento/agitador-magnetico-com-aquecimento-7lab-analogico-220v?parceiro=5060&campaignid=10948323807&adgroupid=107551945356&keyword=&network=u&utm_medium=cpc&gclid=Cj0KCQjw5JS. Acesso em: 12 out. 2021.
58. GLASSLAB. **Bastão de vidro**. Disponível em: <https://www.glasslab.com.br/vidrarias/bastao-de-vidro-pontas-polidas-queimada%0A>. Acesso em: 12 out. 2021.
59. GLASS LAB. **Barra Magnética**. Disponível em: <https://www.glasslab.com.br/acessorios/barra-magnetica-com-anel-central%0A>. Acesso em: 12 out. 2021.
60. SYNTH, L. **Frasco Reagente com Tampa Azul**. Disponível em: https://www.lojasynth.com/vidrarias/frascos-reagente/frasco-reagente-graduado-com-tampa-azul-e-dispositivo-anti-gotas?parceiro=2827&gclid=Cj0KCQjw5JSLBhCxARIsAHgO2SfC9AVUuTIHMZxc38q0BPMEJylkuDFxp9T4q64rJ7uaZiAhvgNTAJoaAvjfEALw_wcB%0A. Acesso em: 12 out. 2021.
61. EBAY. **Electrospinning**. Disponível em: https://www.ebay.com/itm/184466055675?_ul=MX&chn=ps&norover=1&mkevt=1&mkrid=21527-161791-684379-7&mkcid=2&itemid=184466055675&targetid=1301274261574&device=c&mktype=pla&googleloc=9102414&poi=&campaignid=13433240304&mkgroupid=125796657480&rlsatarget=pla-13. Acesso em: 12 out. 2021.
62. GLASS LAB. **Vidro de relógio**. Disponível em: <https://www.glasslab.com.br/vidrarias/vidro-de-relogio-lapidado-formato-circular%0A>. Acesso em: 12 out. 2021.
63. UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL. **EDITAL UNIFICADO Nº 01 ZENIT/CEI/HESTIA/IECBiot/GERMINA/ITACA/IMZ 2021**. p. 6, 2021.

APÊNDICE

Figura 41 – Espectro de massas no tempo de retenção de 13,89 min em água destilada (F1).

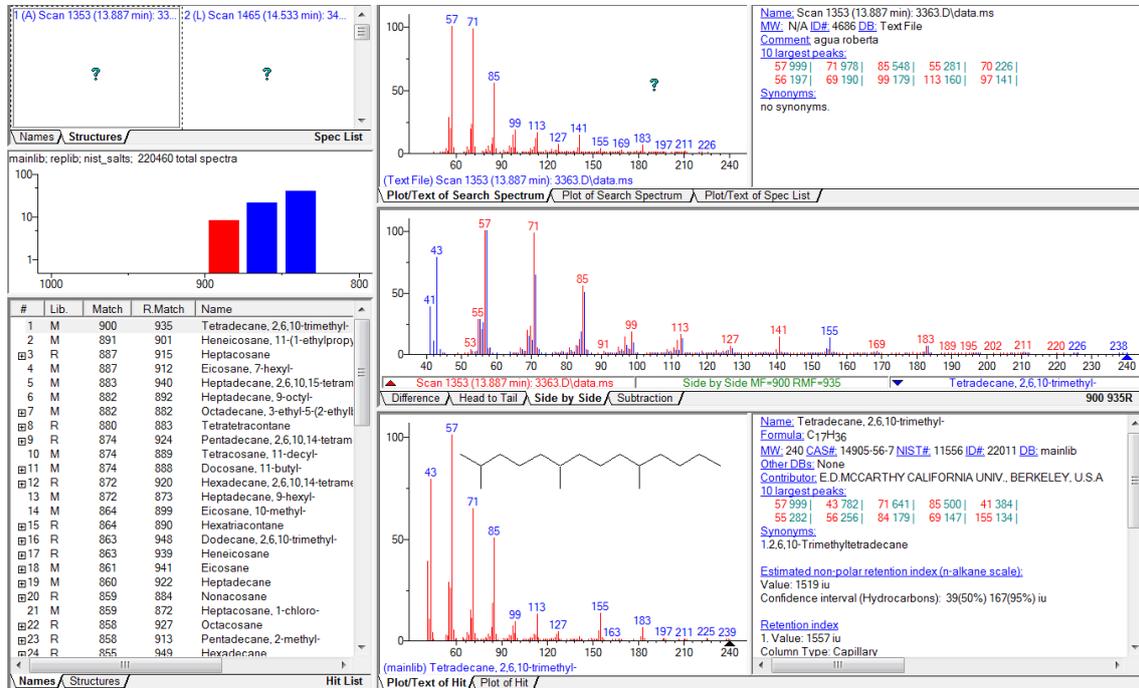


Figura 42 - Espectro de massas no tempo de retenção de 14,36 min em água destilada (F1).

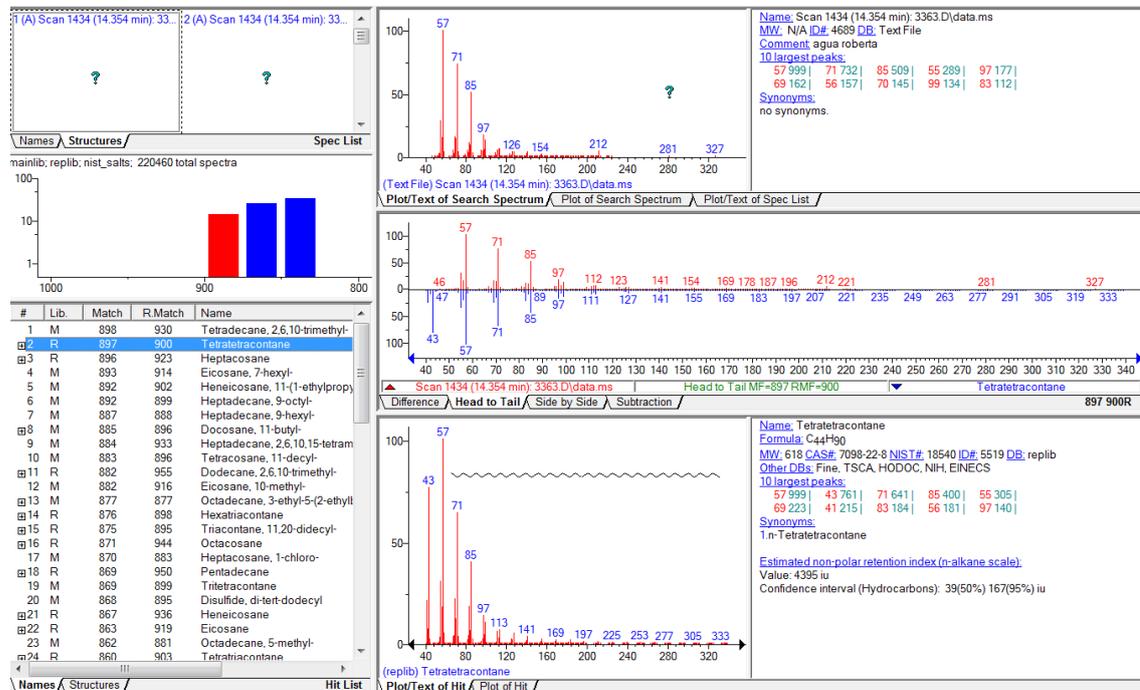


Figura 43 - Espectro de massas no tempo de retenção de 15,56 min em água destilada (F1).

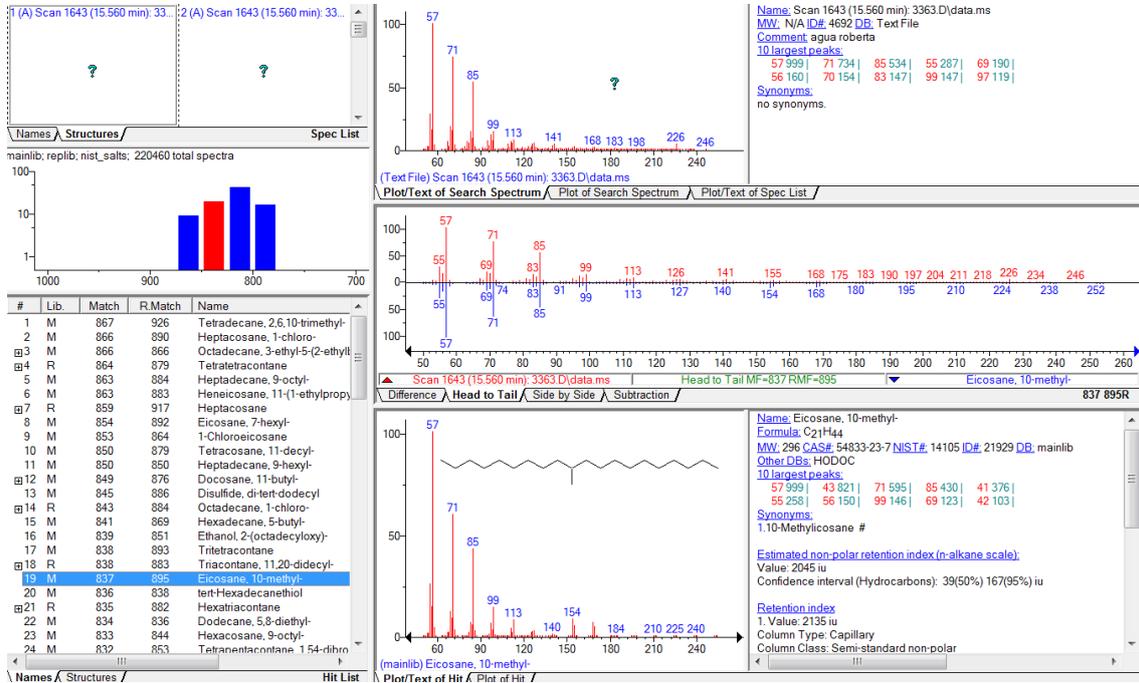


Figura 44 - Espectro de massas no tempo de retenção de 16,13 min em água destilada (F1).

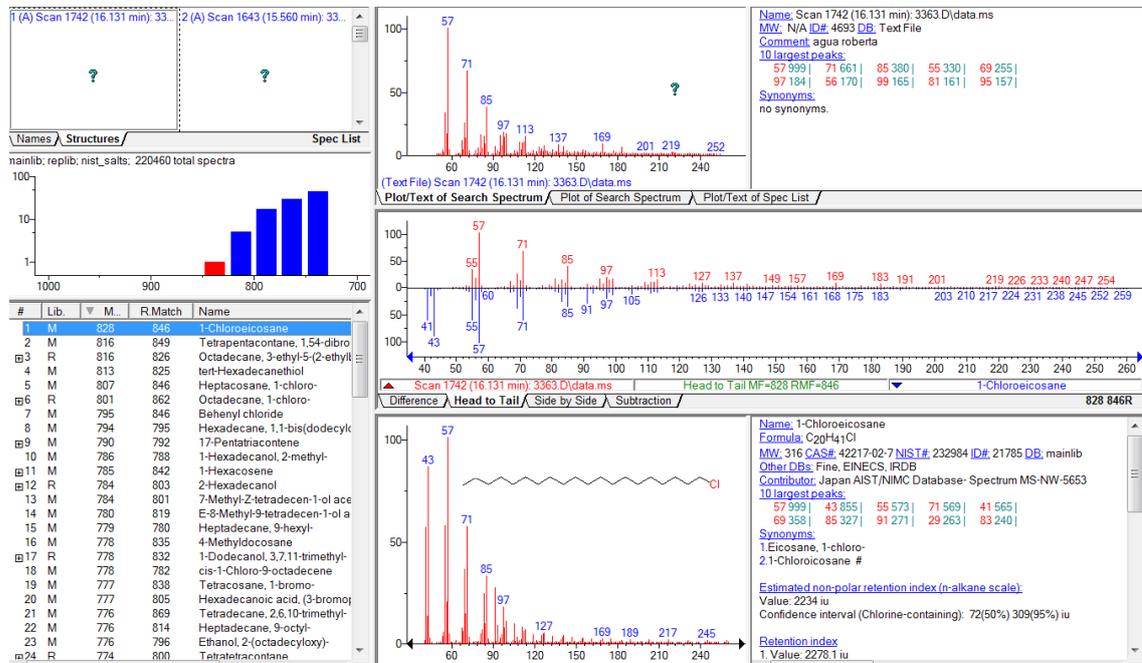


Figura 45 - Cromatograma do petróleo puro em água destilada (F1).

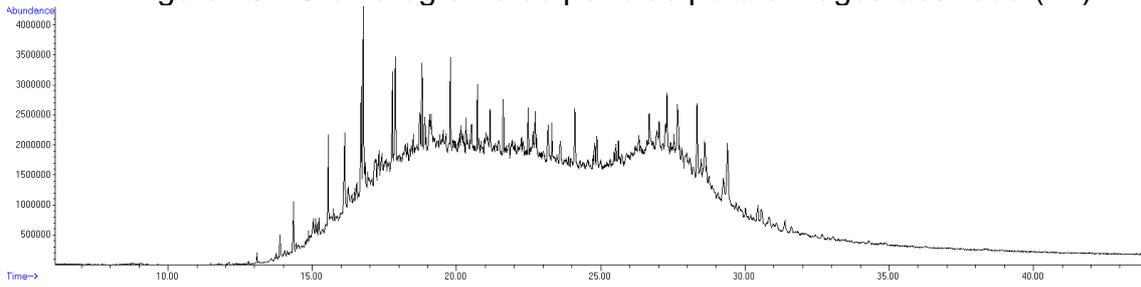


Figura 46 - Cromatograma do petróleo puro em água do mar (F1).

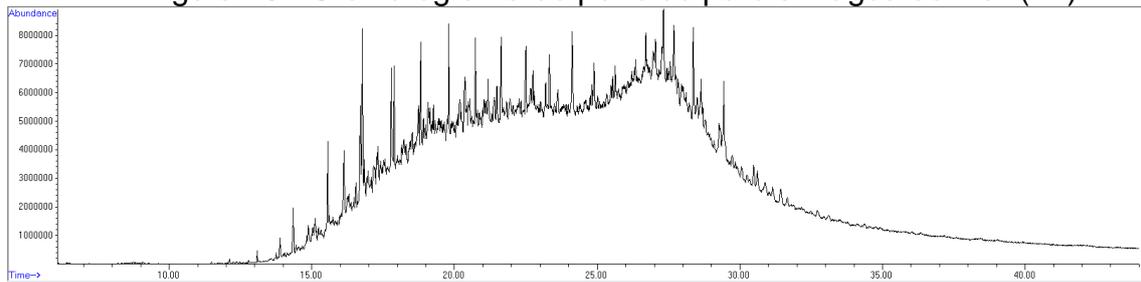


Figura 47 - Cromatograma da fibra pura + petróleo (F1).

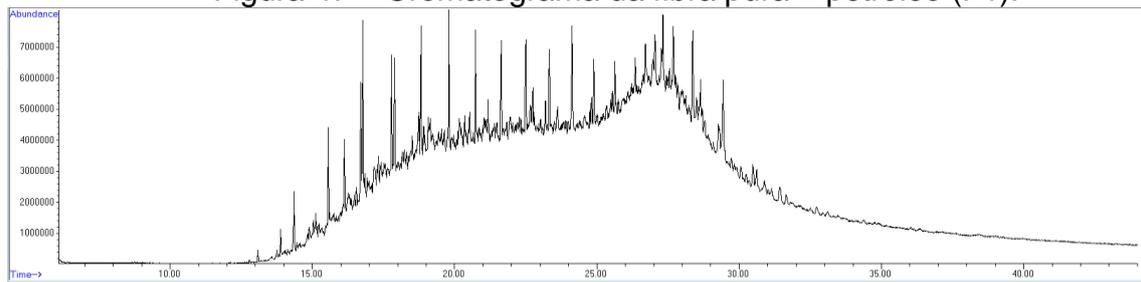


Figura 48 - Cromatograma do ensaio com enzima livre (F1).

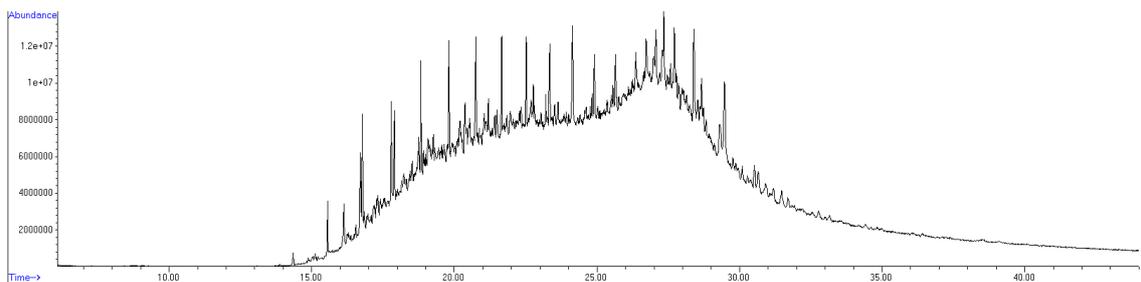


Figura 49 - Cromatograma do ensaio com a enzima imobilizada - água destilada (F1)

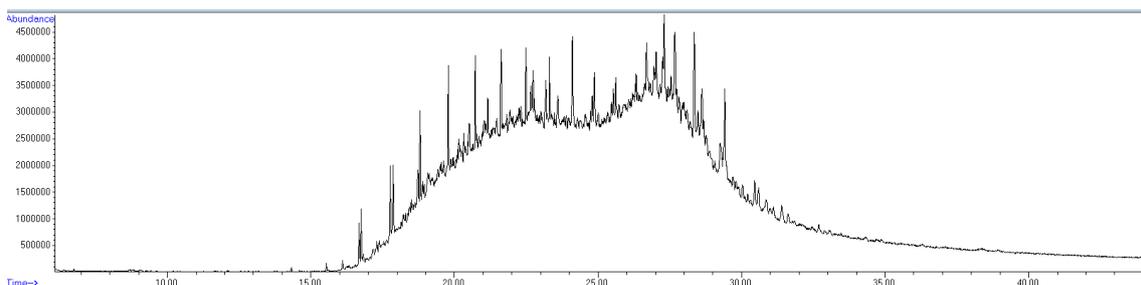


Figura 50 - Cromatograma do ensaio com a enzima imobilizada - água do mar (F1).

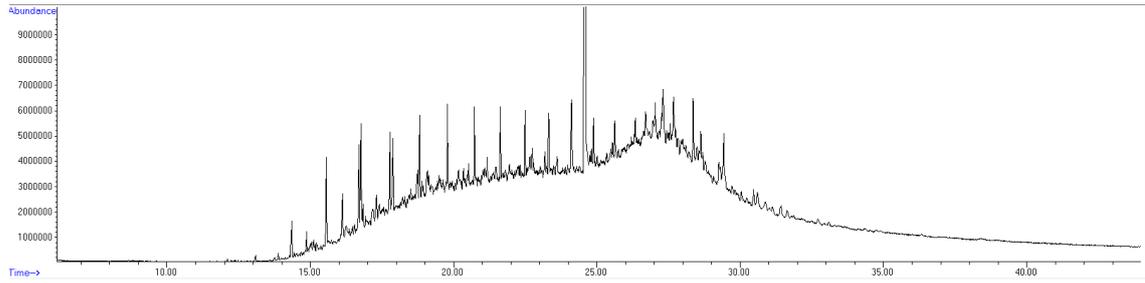


Figura 51 - Cromatograma do petróleo puro - água destilada (F2).

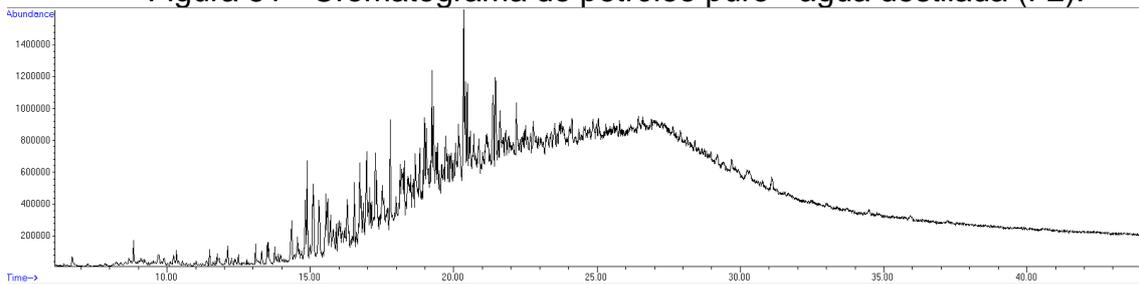


Figura 52 - Cromatograma do petróleo puro - água do mar (F2).

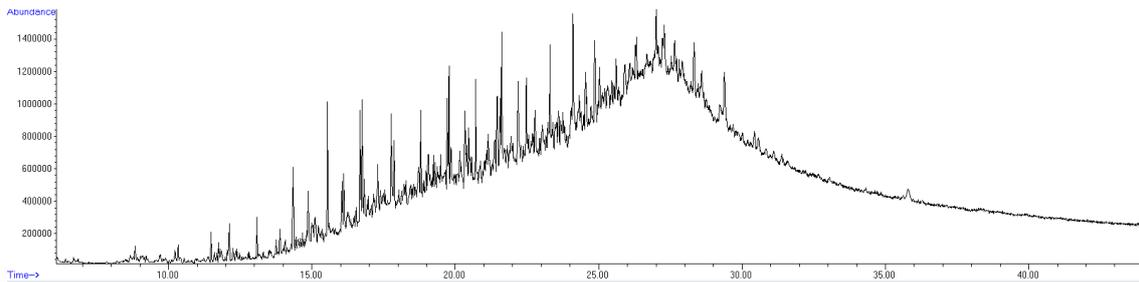


Figura 53 - Cromatograma do ensaio com a fibra pura + petróleo (F2).

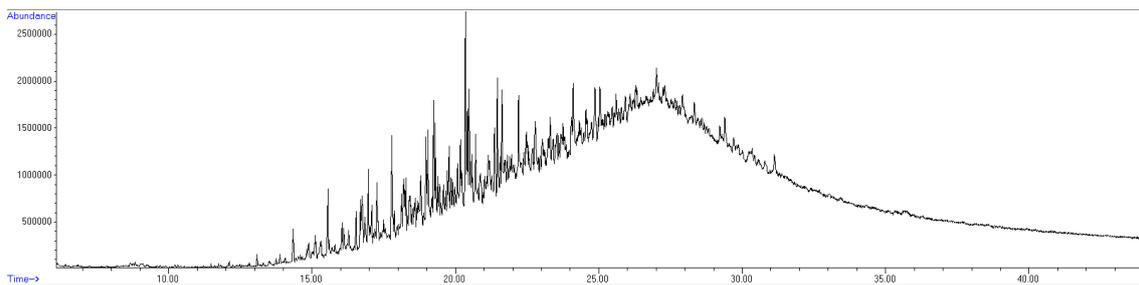


Figura 54 - Cromatograma do ensaio com enzima livre (F2).

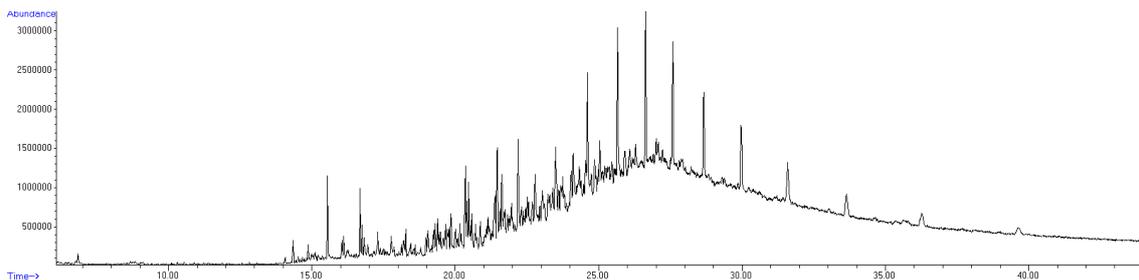


Figura 55 - Cromatograma do ensaio com a enzima imobilizada - água destilada (F2).

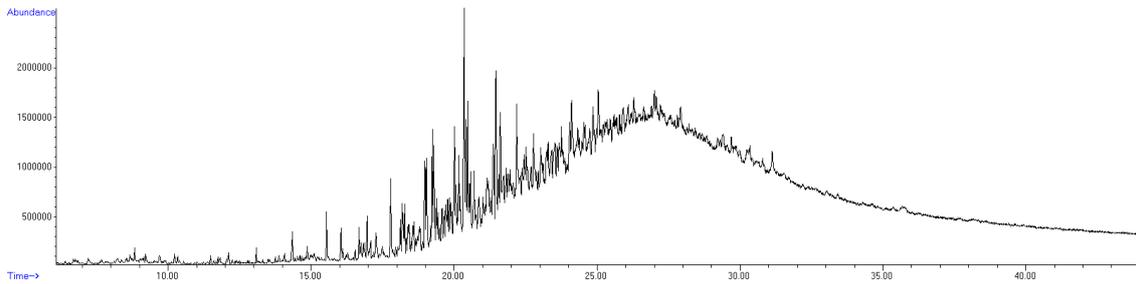


Figura 56 - Cromatograma do ensaio com a enzima imobilizada - água do mar (F2).

