



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS – RIO CLARO



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA
CELULAR, MOLECULAR E MICROBIOLOGIA)

PRODUÇÃO DE ENZIMA CUTINASE FÚNGICA E AVALIAÇÃO NA HIDRÓLISE
DO POLIETILENO TEREFTALATO

ELAINE CRISTINA BUCIOLI

Rio Claro – SP
2024



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA
CELULAR, MOLECULAR E MICROBIOLOGIA)**

**PRODUÇÃO DE ENZIMA CUTINASE FÚNGICA E AVALIAÇÃO NA HIDRÓLISE
DO POLIETILENO TEREFALATO**

ELAINE CRISTINA BUCIOLI

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciências Biológicas (Biologia Celular, Molecular e Microbiologia).

Orientadora: Dra. Derlene Attili de Angelis

Coorientador: Dr. Michel Brienzo

B921p	Bucioli, Elaine Cristina Produção de enzima cutinase fúngica e avaliação na hidrólise do polietileno tereftalato / Elaine Cristina Bucioli. -- Rio Claro, 2024 71 p. : tabs., fotos Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Rio Claro Orientadora: Derlene Attili de Angelis Coorientador: Michel Brienzo 1. Biodegradação de polímeros. 2. Cutinase. 3. Hidrólise de polietileno tereftalato. 4. Enzimas fúngicas. I. Título.
-------	--

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Rio Claro. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: PRODUÇÃO DE ENZIMA CUTINASE FÚNGICA E AVALIAÇÃO NA HIDRÓLISE DO POLIETILENO TEREFALATO

AUTORA: ELAINE CRISTINA BUCIOLI

ORIENTADORA: DERLENE ATTILI DE ANGELIS

COORIENTADOR: MICHEL BRIENZO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em Ciências Biológicas (Biologia Celular, Molecular e Microbiologia), área: Diversidade Biológica e Biologia Ambiental pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. DERLENE ATTILI DE ANGELIS (Participação Virtual)
Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas Biológicas e Agrícolas / Universidade Estadual de Campinas

Prof. Dr. RENATO NALLIN MONTAGNOLLI (Participação Virtual)
Departamento de Ciências da Natureza, Matemática e Educação / UFSCar

Profa. Dra. LUCIANA FERRACINI DOS SANTOS (Participação Virtual)
FHO / Fundação Hermínio Ometto

Profa. Dra. BÁRBARA RANI BORGES (Participação Virtual)
Instituto de Química / Universidade de São Paulo

Rio Claro, 16 de julho de 2024

AGRADECIMENTOS

A Profa. Dra. Derlene Attili de Angelis, pela oportunidade, orientação, ensinamentos, parceria, amizade e confiança.

Ao prof. Dr. Michel Brienzo, pelas orientações, contribuições e parceria.

A profa. Dra. Lusiane Malafatti Picca, pela parceria inicial neste projeto, orientações e amizade.

A profa. Dra. Maria Isabel Rodrigues pelo tempo dedicado em nos auxiliar na elaboração do Delineamento Plackett & Burman.

A profa. Dra. Valéria Maia de Oliveira por ser a ponte com a Petrobrás e também por todo incentivo e contribuições com esse trabalho.

A profa. Dra. Dejanira de Francheschi de Angelis por toda motivação e sugestões.

Ao MSc. Tulio Capelini pela prontidão de sempre em nos auxiliar com insumos, informações, sempre fornecendo apoio para que o projeto sempre caminhasse.

Ao MSc. Mateus Manabu Abe e a Dra. Caroline de Freitas por todo auxílio, discussões e orientações técnicas.

A MSc. Natalia Speltri pelo auxílio e avaliação da viabilidade microbiana, parceria e sugestões.

A graduanda Sara Moreira de Souza pelo auxílio nas análises laboratoriais, comprometimento e amizade.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Celular, Molecular e Microbiologia) e todos os docentes do Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista – Rio Claro, pela oportunidade, contribuições e todo conhecimento fornecido.

Ao IPBEN - Universidade Estadual Paulista – Rio Claro, pela disponibilidade dos laboratórios para que fossem realizadas as análises de FTIR, Cromatografia gasosa, dosagens de proteínas e atividade enzimática.

Ao CBMAI – UNICAMP Paulínia, pela disponibilidade dos laboratórios para realização de análises cromatográficas, processo de liofilização e fornecimento e avaliação genética de microrganismos.

Ao DEMA – UFSCAR, São Carlos, pelas imagens de MEV.

A Faculdade de Engenharia, Departamento de Materiais e Tecnologia - Campus de Guaratinguetá, pelos ensaios de cristalinidade.

A minha filha Daniela Caminatti, meu amor maior, pelas palavras de apoio, pelo tempo e atenção cedidos, pela responsabilidade com suas atividades, me auxiliando de diversas formas para que esse projeto fosse concluído.

A minha família, meu pai, minha querida irmã e em especial minha mãe, por todo auxílio, apoio e amor e pelo exemplo de força e superação sempre.

Ao Aroldo José Isaias de Moraes, com quem compartilho a vida, por todo incentivo, apoio e compreensão pelos momentos de ausência.

Aos amigos muito mais que especiais, pelo apoio, incentivo, pela compreensão da minha ausência e principalmente por sempre me ouvirem e estarem de alguma forma ao meu lado.

A Petrobrás pela oportunidade em participar do projeto e pelo fomento financeiro.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Resumo

O polietileno tereftalato (PET) é um plástico com características que favorecem seu uso em embalagens de produtos alimentícios, como garrafas de refrigerantes e água, tornando rápido seu uso e descarte no meio ambiente. Diante dessa problemática, esse estudo buscou avaliar a produção da enzima cutinase por 13 linhagens de fungos, em ensaios de biodegradação em meio líquido utilizando o PET presente comercialmente em garrafas de água como principal fonte de carbono, e em meios contendo indutores. Dentre as hidrolases capazes de romper ligações ésteres, as lipases e cutinases são eficazes na despolimerização de polímeros. As cutinases, em particular, têm sido estudadas por suas características semelhantes à PETase. Bioensaios com fragmentos do polímero ocorreram em caldo de batata-dextrose (BDC) contendo três cubos (*plugs* de $\pm 0,5 \text{ cm}^2$) de micélios fúngicos com 7 dias de crescimento em BDA a 28 °C. Os frascos foram incubados com agitação a 100 rpm durante 14 dias a 28 °C. A atividade da cutinase foi determinada utilizando uma adaptação do método espectrofotométrico da hidrólise do *p*-nitrofenilbutirato (*p*-NPB) a 405 nm. O isolado *Fusarium* sp CBMAI 2266 foi o que apresentou a maior atividade enzimática (0,20 U/mL) em meio utilizando fragmento de PET. A avaliação do melhor tempo de fermentação também foi realizada evidenciando 18 dias como o período de melhor produção de cutinase. Foram realizados ensaios buscando avaliar a eficiência de indutores e alguns fatores que poderiam influenciar na obtenção da enzima, sendo identificado como agentes favoráveis sendo, o farelo de trigo e palmitato de cetila, além da agitação. Os resultados encontrados nesse trabalho pelas análises de MEV, DSC, FTIR e CG-MS, após a exposição do polímero por 14 dias ao extrato enzimático bruto, sugerem que a cutinase tem ação de hidrólise química sobre sua superfície, indicando a possibilidade do uso dessa enzima na reciclagem do PET.

Palavras-chaves: Cutinase; Hidrólise Enzimática; MEV; FTIR; DSC.

Abstract

PET is a plastic with characteristics that favor its use in food product packaging, such as soft drink and water bottles, making it quick to use and dispose of in the environment. Faced with this problem, this study sought to evaluate the production of the cutinase enzyme by 13 strains of fungi, in biodegradation tests in liquid media using PET commercially present in water bottles as the main source of carbon, and in media containing inducers. Among the hydrolases capable of breaking ester bonds, lipases and cutinases are effective in depolymerizing polymers. Cutinases, in particular, have been studied for their PETase-like characteristics. Bioassays with polymer fragments took place in potato dextrose broth (BDC) containing three fragments (+ 0.5 cm² plugs) of fungal colonies with 7 days of growth in PDA at 28 °C. The flasks were incubated with shaking at 100 rpm for 14 days at 28 °C. Cutinase activity was determined using an adaptation of the spectrophotometric method of *p*-nitrophenylbutyrate (*p*-NPB) hydrolysis at 405 nm. The isolate *Fusarium* sp CBMAI 2266 showed the highest enzymatic activity in a medium using PET fragment (0.20 U/mL). The evaluation of the best fermentation time was also carried out, showing 18 days as the period of best cutinase production. Tests were carried out seeking to evaluate the efficiency of inducers and some factors that could influence the production of the enzyme, with wheat bran and cetyl palmitate being identified as favorable agents, in addition to agitation. The results found in this work by SEM, DSC, FTIR and GC-MS analyses, after exposing the polymer for 14 days to the crude enzymatic extract, suggest that cutinase has chemical hydrolysis action on its surface, indicating the possibility of using this enzyme in PET recycling.

Keywords: Cutinase; Enzymatic Hydrolysis; SEM; FTIR; DSC.

SUMÁRIO

1	Introdução	9
1.1	Objetivos geral	11
1.1.1	Objetivos específicos.....	11
2	Revisão da literatura.....	12
2.1	Polietileno Tereftalato - PET.....	12
2.2	Reciclagem do PET.....	14
2.2.1	Despolimerização Microbiana do PET	16
2.3	Fungos estudados	18
2.4	Cutinase.....	20
2.5	Estudo da influência de variáveis para obtenção de enzima	22
3	Materiais e métodos.....	24
3.1	Microrganismos.....	24
3.2	Bioensaios para obtenção da enzima cutinase.....	25
3.2.1	Extratos enzimáticos utilizando PET no meio de cultivo	25
3.2.2	Extratos enzimáticos obtidos com indutores como fonte de carbono na obtenção da cutinase	26
3.3	Hidrólise enzimática do PET utilizando o extrato bruto	27
3.4	Determinação da atividade enzimática da cutinase	27
3.5	Dosagem de proteínas.....	28
3.6	Estudo da influência das variáveis na produção de cutinase.....	29
3.7	Avaliação do pet e extrato enzimático após a hidrólise	30
3.7.1	Espectroscopia de absorção no infravermelho com transformada de Fourier-FTIR	30
3.7.2	Microscopia eletrônica de varredura - MEV	31
3.7.3	Cromatografia gasosa GC-MS (Gas Chromatography Coupled with Mass Spectroscopy).....	31
3.7.4	Cristalinidade	31
4	Resultados e discussões	33
4.1	Avaliação da produção de cutinase	33
4.2	Avaliação da influência do tempo no bioensaio	34
4.3	Avaliação da produção de cutinase por diferentes linhagens de <i>Fusarium</i> ..	37
4.4	Avaliação da produção de cutinase pelo uso de indutores	40
4.5	Avaliação da influência de variáveis da produção de cutinase	43
4.6	Avaliação do extrato enzimático após a hidrólise do PET	46
4.7	Avaliação da hidrólise enzimática nos filmes de PET	49
4.7.1	FTIR.....	50
4.7.2	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	54
4.7.3	Cristalinidade	58
5	CONCLUSÃO	64
	BIBLIOGRAFIA	65

1 Introdução

Plásticos como o polietileno de tereftalato (PET), são imprescindíveis nos dias atuais por possuírem propriedades ótimas de manuseio, fácil processabilidade, resistência, leveza, baixo custo e flexibilidade de uso (Yoshida *et al*, 2016; Joo *et al*, 2018). Constitui um polímero sintético muito utilizado na sociedade moderna, que apresenta alta massa molecular, hidrofobicidade e alto grau de empacotamento molecular e cristalinidade, o que dificulta sua biodegradação natural (Philip *et al*, 2007; Ammala *et al*, 2011). A característica de resistência, que favorece a lenta degradabilidade dos plásticos, é considerada como uma das principais causas de problemas ambientais, principalmente devido ao destino incorreto gerando acúmulo de resíduos plásticos em aterros, comprometendo a qualidade de recursos hídricos e criando problemas de ordem social (Rochman *et al*, 2013; Joo *et al*, 2018). Muitos estudos investigam a biodegradabilidade dos plásticos com o intuito de entender esse processo e buscar microrganismos, enzimas e meios para otimizar a biodegradação e minimizar o impacto ambiental (Ghalazi *et al*, 2004; Austin *et al*, 2018; Kawai *et al*, 2019; Malafatti-Picca *et al*, 2019).

Boa parte do PET produzido no mundo é utilizado na produção de fibras têxteis, ou embalagens de bebidas e alimentos. Os filmes resultantes deste polímero são ainda utilizados nas indústrias de eletrônicos e outras embalagens (Zimmermann; Billig, 2010). Segundo a ABIPET (Associação Brasileira da Indústria do PET) 359 mil toneladas de PET foram recicladas em 2021, representando 56,4% das embalagens descartadas pelos consumidores. Em 2022 cerca de 25,6% dos resíduos plásticos pós-consumo no Brasil foram reciclados, segundo um estudo encomendado pelo Plano de Incentivo à Cadeia do Plástico (PICPlast). A reciclagem desse material para a utilização de embalagens em alimentos é realizada por meio da associação da reciclagem física e química (Macedo *et al*, 2020). Porém, a reciclagem química causa impactos ambientais poluindo principalmente os recursos hídricos e a atmosfera. Como alternativa, enzimas produzidas por microrganismos representam um processo sustentável para a reciclagem de plásticos e outros materiais (Malafatti-Picca, 2018). Apesar da característica recalcitrante do PET, várias enzimas hidrolíticas microbianas foram identificadas no seu processo de biodegradação, como hidrolases e enzimas relacionadas às lipases e carboxiesterases (Danso *et al*, 2018).

Dentre as hidrolases com capacidade para hidrolisar ésteres, as lipases e cutinases apresentam boa efetividade frente à despolimerização de PET (Anbalagan *et al.*, 2021). As cutinases (E.C. 3.1.1.74) são as que apresentam a menor molécula da família α/β hidrolases (Adigüzel; Tunçer, 2017). Possuem grande interesse industrial, pois não sofrem interferência do cálcio, ao contrário das lipases. Atuam, por exemplo, como enzimas lipolíticas em detergentes, e no processo de tratamento da superfície de fibras têxteis, melhorando a hidrofiliabilidade de poliésteres pela hidrólise de ligações éster. Também são utilizadas nas indústrias alimentícias, na produção de frutas secas e na hidrólise do excesso de gordura em produtos lácteos. Na indústria química atuam na síntese de ésteres e produção de biodiesel (Gomes *et al.*, 2013; Adigüzel; Tunçer, 2017). As principais fontes de cutinases são microrganismos e pólen (Degani, 2015).

Dutta *et al.*, (2009) e Donelli *et al.* (2010) utilizaram cutinase proveniente de *Fusarium solani* f.sp. *pisi*, e também comprovaram a biodeterioração de filmes PET pela análise das estruturas cristalinas e amorfas do polímero. Uma hidrolase produzida por *Thermobifida fusca* e uma lipase proveniente de *Pseudomonas* sp foram estudadas na biodeterioração de amostras de PET (Muller *et al.*, 2005). A bactéria *Ideonella sakaiensis* 201-F6 foi reportada como grande produtora de enzimas capazes de biodegradar PET, favorecendo a recuperação de ácido tereftálico (Yoshida *et al.*, 2016). Contudo, fungos também possuem metabolismo capaz de produzir diversas substâncias, como enzimas e ácidos orgânicos, que favorecem a obtenção de produtos de interesses diversos (El-Enshasy, 2007).

Os fungos são biodegradadores naturais de grande variedade de substratos, sendo assim são promissores para aplicação em processos biotecnológicos ambientais e biorremediação de áreas contaminadas, substituindo processos impactantes ao meio ambiente como os físico-químicos utilizados nos tratamentos de remediação (Soares *et al.*, 2011).

Diversos estudos abordam a produção de cutinase por bioprocessos utilizando diferentes gêneros e espécies de fungos, e tipos de substratos. Macedo e Pio (2005) identificaram a linhagem de *F. oxysporum* como potencial produtor de cutinase, e para isso foi utilizado um meio contendo glicose ou cutina como fonte de carbono. Fraga (2008) também obteve produção de cutinase pelo fungo *F. oxysporum*, utilizando como fontes de carbono resíduos agrícolas como casca de soja, torta e farelo; torta de gergelim; torta de girassol; farelo de arroz; farelo de trigo; bagaço da cana-de-

açúcar e polpa cítrica. Caprara (2015) estudou a obtenção de cutinase por *Penicillium restrictum* utilizando como fonte de carbono o farelo de trigo. Kumari *et al* (2016) utilizaram cutina para a produção de cutinase por *Aspergillus* sp.e Sooksai *et al* (2019) obtiveram cutinase por meio do uso de cutina de mamão como fonte de carbono pelo *Fusarium falciforme*. Os bioensaios duraram de 3 a 7 dias à temperatura de 30°C sob rotação de 100 a 150 rpm.

O conhecimento das cutinases no processo de biodegradação do PET ainda é insuficiente. Estudos que buscam identificar linhagens para a produção desta enzima, bem como avaliar o seu potencial enzimático sobre a biodegradação desse polímero são muito importantes. Sabe-se que vários métodos podem ser combinados para realizar tal avaliação, por isso esse estudo pretendeu ainda utilizar diferentes metodologias para entender como cada uma pode contribuir para estudos desta área.

1.1 Objetivo Geral

Avaliar a produção de cutinase por linhagens fúngicas, estimar a interferência de fatores como pH, agitação e meio de cultivo, e avaliar o potencial da enzima para degradação do PET.

1.1.1 Objetivos específicos

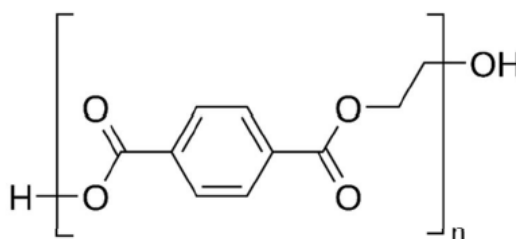
- ✓ Avaliar o potencial de produção da enzima cutinase por treze linhagens de fungos filamentosos;
- ✓ Selecionar a linhagem mais promissora e avaliar o efeito de diferentes variáveis na produção de cutinase;
- ✓ Avaliar a ação da cutinase sobre fragmentos de PET obtidos de garrafas de água (sem gás).

2 Revisão da literatura

2.1 Polietileno Tereftalato - PET

O PET é um poliéster termoplástico que foi gradativamente desenvolvido a partir do início do século XIX, tendo como pioneiro o pesquisador da Universidade de Harvard, Wallace H. Carothers (Silva, 2009). As macromoléculas de PET (Figura 1) constituem-se de repetições do monômero de tereftalato de etileno, os polímeros comerciais são formados por 130 a 155 repetições deste monômero (Canevarolo, 2002).

Figura 1: Estrutura do PET

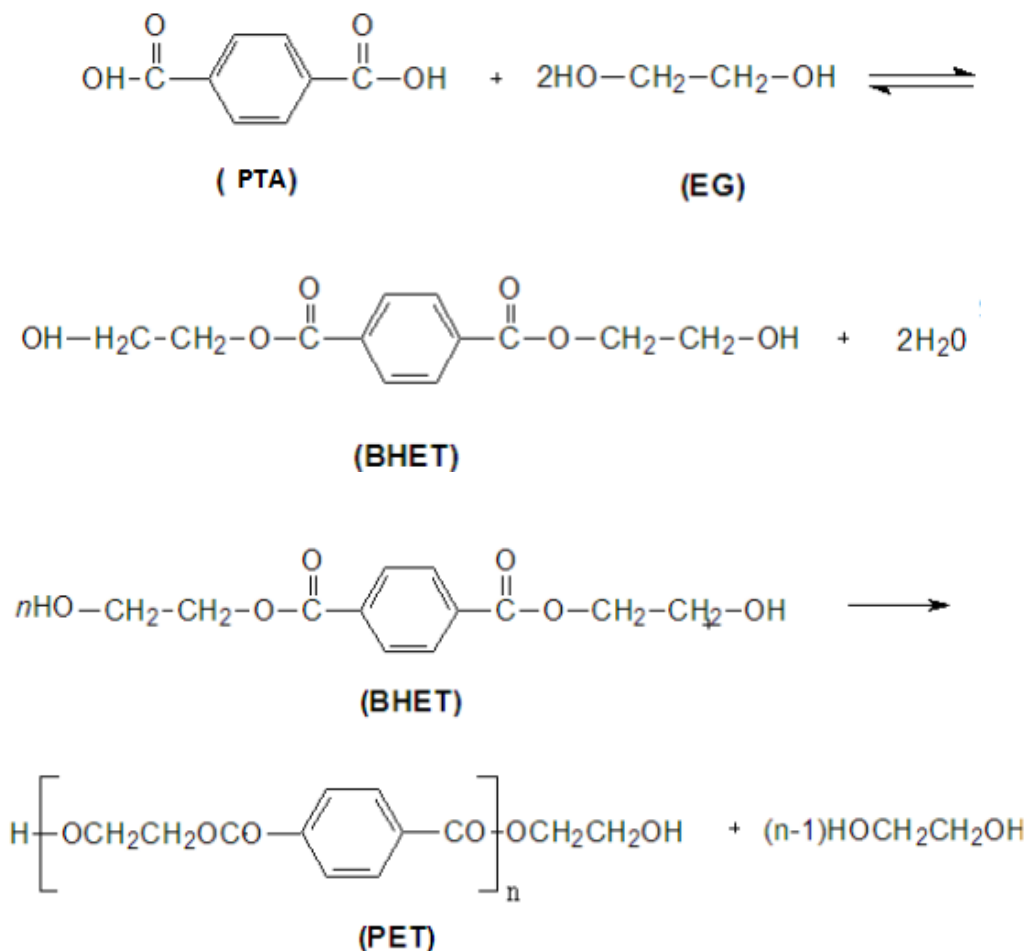


Fonte: Ahmaditabatabaei, 2021

O tereftalato de polietileno é sintetizado por reações de policondensação de ácido tereftálico (TPA) e etilenoglicol (EG) ou transesterificação de dimetil tereftalato e EG formando um polímero de poliésteres semiaromáticos (Hiraga *et al.*, 2019).

As reações de polimerização ocorrem em duas etapas, na primeira há a esterificação direta, obtida pela reação do ácido tereftálico (PTA) com etilenoglicol (EG) ou pela transesterificação quando o PTA é substituído pelo éster tereftalato de dimetileno (DMT), que origina o bis-2-hidroxietil tereftalato (BHET), um oligômero que é polimerizado em aproximadamente 30 unidades de repetição (Awaja; Pavel, 2005). Na segunda etapa, para atingir um grau de polimerização acima de 100 unidades de repetição (n), a policondensação é realizada em temperaturas e pressão acima de 270°C e 50 Pa (Pascal), respectivamente (Ravindranath; Mashelkar, 1986; Koshit *et al.*, 2018). A Figura 2 representa a rota da síntese química do PET pelo etileno glicol (EG) e o ácido tereftálico.

Figura 2: Reação de esterificação direta do PTA com o EG e de policondensação para obtenção do PET



Fonte: Adaptado de Romao, Spinace, De Paoli, (2009); Koshit *et al*, (2018).

A estrutura molecular do PET apresenta empacotamento em parte das cadeias, formando regiões cristalinas lineares, porém, os grupamentos aromáticos reduzem consideravelmente a velocidade de cristalização. Dessa forma, esse polímero pode existir tanto como um material amorfo (transparente) quanto como um material semicristalino (opaco), dependendo das condições de processamento e temperaturas utilizadas (Rabello; Wellen, 2008). A principal diferença dos tipos de PET consiste na massa molar ou grau de polimerização que proporciona diferentes características dos materiais resultantes. Quanto maior a massa molar, maior a resistência mecânica, química e térmica do PET (Soares, 2010).

Em 2009, a empresa Coca-Cola apresentou a campanha da garrafa PlantBottle™, com o objetivo de reforçar o compromisso da empresa em relação à sustentabilidade das garrafas PET, usando uma nova formulação. Na ocasião, 30%

do monoetilenoglicol utilizado seria provido principalmente da cana-de-açúcar e o processo de obtenção, reduziria em até 25% as emissões de dióxido de carbono. O início da distribuição de garrafas produzidas com essa tecnologia foi em 2009, e desde então, a Coca-Cola declara que já distribuiu mais de 35 bilhões de garrafas em quase 40 países (Byun; Kim, 2013; CocaCola, 2019).

Sua resistência química, inércia a temperatura ambiente, boa resistência a impactos, ampla faixa de temperaturas de trabalho (de -60°C a 130°C), elevada rigidez, transparência, eficiente barreira contra gases, baixo custo e reciclabilidade são as principais propriedades do PET. Além disso, apresenta grande vantagem logística, pois sua densidade é menor quando comparada a de vidros e metais (Coelho, 2013; Koshti *et al.*, 2018). Todas essas propriedades fazem com que esse polímero seja amplamente utilizado nas indústrias de embalagens, principalmente em garrafas plásticas de refrigerantes, potes de alimentos e filmes plásticos (Mauria *et al.*, 2020).

As primeiras embalagens de refrigerante foram fabricadas nos EUA no ano de 1977. No Brasil, a resina PET só começou a ser comercializada no final da década de 1980, quando inicialmente foi utilizada na forma de fibras. A partir de 1993, o PET passou a ser aplicado em embalagens e desde então, o seu uso tem aumentado significativamente ano após ano (Romão *et al.*, 2009; Coelho, 2013).

2.2 Reciclagem do PET

As garrafas PET possuem uso rápido e descarte quase que imediato no meio ambiente. Contudo, o tempo de degradação deste polímero pode variar entre décadas a centenas de anos, dependendo do ambiente em que se encontram, causando ao longo desse processo a transferência trófica de microplásticos comprometendo os animais presentes no ecossistema (Ioakeimidis *et al.*, 2016; Chamas *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2021). Se não houver ações de mitigação, estima-se que em 2040 os resíduos plásticos nos oceanos poderão chegar ao montante de 37 milhões de toneladas/ano. O custo global total dos governos para a gestão dos resíduos plásticos considerando este cenário no período entre 2021 e 2040 é estimado em US\$ 670 bilhões (Pewtrusts, 2020). Neste contexto, além de reduzir os efeitos nocivos ao ambiente, a reciclagem objetiva aumentar o ciclo de vida destes materiais, disponibilizando resinas com boas propriedades físico químicas e a um menor custo, quando comparado a resinas virgens (Singh *et al.*, 2021).

A reciclagem é considerada uma das melhores alternativas para gerenciar os resíduos de plástico/PET, pois reduz o uso de energia e de recursos, também leva à redução da pegada de carbono com a redução da produção de produtos de PET virgens, utilizando matérias primas de base petroquímica (Quartinello *et al*, 2017).

Segundo Taniguchi e colaboradores (2019), em 2015 a produção mundial geral de plástico foi de 269 milhões de toneladas, desse valor, 18,8 milhões de toneladas correspondiam ao PET, isso devido à sua grande demanda. Da produção total de PET, apenas 28,4% foi reciclado em fibras, chapas, filmes e garrafas, e o restante foi descartado no meio ambiente ameaçando às várias formas de vida. Segundo a ABIPET (2021) em 2020 o Brasil apresentou um consumo de 596 mil t/ano de resina virgem, nesse mesmo período a reciclagem foi de 311 mil t/ano, o que corresponde a 52,2%.

Rozendo (2011) complementa os benefícios que a reciclagem do PET fornece: “redução do volume de resíduo coletado destinado aos aterros controlados e sanitários; economia de energia elétrica e do petróleo; geração de empregos aos colaboradores envolvidos em todo o processo e menor preço dos artefatos produzidos com plástico reciclado, para o consumidor final”.

A reciclagem do PET pode ser dividida em dois grandes grupos classificados como reciclagem mecânica e química (Awaja e Pavel, 2005; Park e Kim, 2014). No Brasil, a reciclagem mais utilizada é a mecânica, e 40% do PET reciclado é destinado às indústrias têxteis (Gonçalves-Dias; Teodósio, 2006; ABIPET, 2015).

Na reciclagem mecânica, se utiliza um tratamento físico onde o PET em flocos constitui o produto principal. Porém, este processo não consegue obter nem um polímero de alta qualidade e nem os monômeros ali presentes (Stefanelli, 2013; Costa *et al.*, 2015).

A reciclagem química também pode ser chamada de despolimerização que consiste na reversão de um polímero para o seu monômero, ou para um polímero de menor massa molar (Stefanelli, 2013; Park e Kim, 2014), as moléculas sofrem modificações estruturais que podem ser obtidas mediante diversos tratamentos como o de hidrólise (utilizando água), metanólise (metanol) e glicólise (etileno glicol). Dependendo do método, os produtos obtidos podem ser: etileno glicol (EG), ácido tereftálico (AT), dimetiltereftalato (DMT) e bis-hidroxietil tereftalato (BHET) (Soares, 2010; Silva, 2012). Esse tipo de reciclagem apresenta elevado custo energético e gera muitos subprodutos, além de apresentar baixo rendimento. No caso da hidrólise

alcalina pode levar à uma perda de até 15% do material original. A hidrólise enzimática, por outro lado, apresenta potenciais vantagens sobre os demais processos químicos (Park e Kim, 2014; Costa *et al.*, 2015).

A reciclagem química também pode ser executada por microrganismos, devido à ação de enzimas como as lipases, esterases e cutinases. Neste processo ocorre a despolimerização com produção de ácido tereftálico e etilenoglicol, possibilitando assim a reutilização dos mesmos para produção de novas garrafas sem perda de qualidade. Outra vantagem do processo de reciclagem por enzimas microbianas é ser menos agressivo e depender de condições amenas de temperatura (aproximadamente 70°C) para obter a despolimerização (Silva, 2012; Malafatti-Picca, 2018; Mauria *et al.*, 2020; Anbalagan, 2021; Sonnendecker *et al.*, 2022).

Há relatos na literatura de microrganismos com resultados positivos na degradação do PET, tais como: *Aspergillus oryzae* (Maeda *et al.*, 2005), *Fusarium* spp. (Nimchua *et al.*, 2007), *F. f.sp. pisi* (Dutta *et al.*, 2009; Donelli *et al.*, 2010), *F. oxysporum* (Macedo e Pio, 2007; Speranza *et al.*, 2011; Caetano, 2020) *Glomerella cingulata* (Seman *et al.*, 2014), *Ideonella sakaiensis* (Yoshida *et al.*, 2016), *Nocardia* (Sharon; Sharon, 2012), espécies de *Penicillium* (Liebminger *et al.*, 2007; Nowak *et al.*, 2011; Sepperumal *et al.*, 2013; Caprara, 2015) e *Pleurotus* spp. (Silva, 2009).

2.2.1 Despolimerização Microbiana do PET

Polímeros de cadeias lineares, como o PET, são geralmente menos biodegradáveis do que os de cadeias ramificadas, devido ao alto grau de empacotamento molecular que estas apresentam. Os polímeros ramificados não possuem essa acomodação molecular tão elevada, tornando as interações mais fáceis de serem rompidas (Philip *et al.*, 2007; Ammala *et al.* 2011). A preferência para iniciar a degradação se dá pela fase amorfa devido à desorganização do polímero nessa região (Faria; Martins-Franchetti, 2010).

Uma proposta da sequência do processo biodegradativo de polímeros por Ratajska e Boryniec (1998) incluiu três importantes características, a) as moléculas biodegradáveis presentes na superfície do polímero são as primeiras a sofrerem ataque microbiano; b) os fragmentos são removidos e a coesão do material é reduzida, tornando o material mais susceptível; c) os microrganismos conseguem atingir camadas mais profundas do material alterando as tensões mecânicas e d) as substâncias responsáveis pela degradação do material são as enzimas

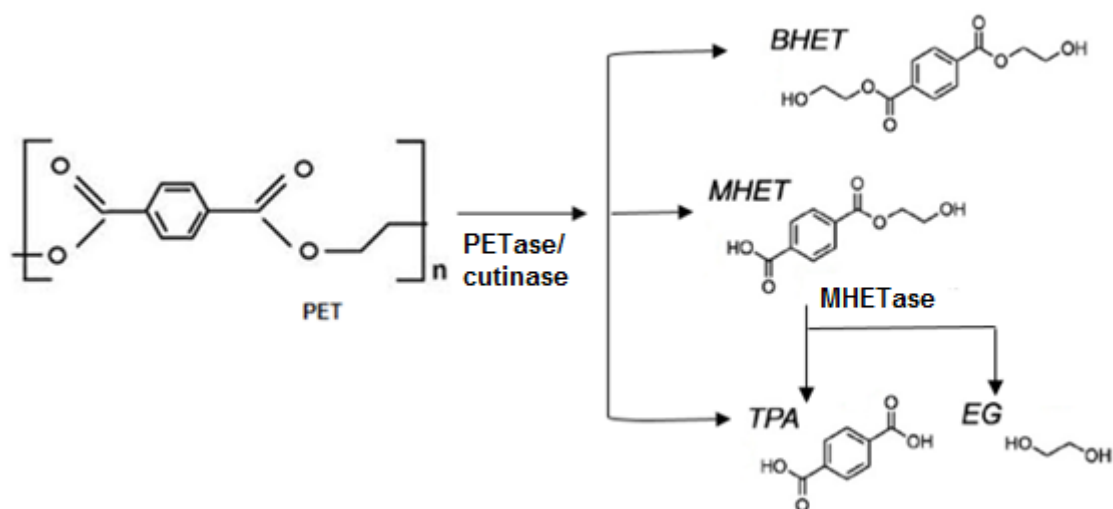
despolimerases, como as lipases, esterases e cutinases, produzidas durante o processo.

Os principais produtos da degradação biológica completa de polímeros, apontados por Costa e colaboradores (2015) são, na maioria das vezes, biomassa microbiana, água e dióxido de carbono. Para Müller (2005), devido à hidrofobicidade e ao tamanho da molécula polimérica, os microrganismos secretam enzimas que despolimerizam a superfície do material, para conseguir realizar a absorção desse composto. Dessa forma, além das moléculas citadas por Costa e colaboradores (2015), obtém-se moléculas intermediárias menos hidrofóbicas, que podem ser levadas para o interior das células microbianas e participar das rotas metabólicas.

Devido à sua estrutura, o PET é quimicamente inerte e de caráter hidrofóbico, o que dificulta a biodegradação deste polímero, principalmente os de alta cristalinidade (Castro *et al.*, 2017; Geyer *et al.*, 2017). PET de baixa cristalinidade é mais facilmente biodegradável em comparação com aqueles com alta cristalinidade já que este possui grande resistência à tração e maior compactação, dificultando o acesso da enzima à ligação éster, e prejudicando assim o processo de degradação (Mauria *et al.*, 2020).

A bactéria *Ideonella sakaiensis* 201-F6 foi identificada por Yoshida e colaboradores (2016) como capaz de utilizar o PET de baixa cristalinidade (1,9%) como principal fonte de carbono e energia. A enzima produzida, denominada PETase, possui características altamente específicas para despolimerização do PET à temperatura de 30°C e apresenta atividade enzimática melhor que as cutinases e lipases (Joo *et al.*, 2018). A Figura 3 ilustra o processo de despolimerização do PET por *I. sakaiensis*. A PETase converte o polímero em mono(2-hidroxietil) ácido tereftálico (MHET) e traços de ácido tereftálico (TPA) e bis(2-hidroxietil)-TPA (BHET), como produtos secundários. Posteriormente, a enzima MHETase, produzida pelo mesmo microrganismo, converte o MHET em dois monômeros: o TPA e o etilenoglicol (EG) (Yoshida *et al.*, 2016; Austin *et al.*, 2018). As enzimas identificadas no estudo apresentam similaridades com as enzimas α/β hidrolases, que inclui as cutinases (E.C. 3.1.1.74) e as lipases, responsáveis respectivamente pelas hidrólises das cutinas e dos ácidos graxos.

Figura 3: Despolimerização do PET pelas enzimas PETase e MHETase



Fonte: Adaptada de Austin *et al.*, 2018; Mauria *et al.*, 2020; Ahmadiatabatabaei *et al.*, 2021.

Diversas técnicas são utilizadas para avaliar a biodegradação de materiais poliméricos como: quantificação de monômeros (Malafatti-Picca, 2018; Anbalagan, 2021), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) (Pereira *et al.*, 2017; Anbalagan, 2021), Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) (Pereira *et al.*, 2017), Difração de Raios-X (DRX) (Sharon; Sharon, 2012; Miranda, 2017; Pereira *et al.*, 2017), Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) (Käpler *et al.*, 2016; Mohamed *et al.*, 2017; Anbalagan, 2021) e com Refletância Atenuada (FTIR-ATR) (Käpler *et al.*, 2016), Microscopia de Força Atômica (AFM) (Miranda, 2017), perda de massa e alteração de massa molecular (Lucas *et al.*, 2008; Shah *et al.*, 2008; Adigüzel; Tunçer, 2017). A combinação de técnicas auxilia na avaliação da biodegradação do polímero.

2.3 Fungos estudados

Os fungos são importantes fontes naturais de metabólitos com potencial de uso em áreas como farmacológica, agrícola e industrial (Acosta *et al.*, 2017). No ecossistema atuam como decompositores auxiliam na reciclagem de nutrientes e na fertilização dos solos. Neste trabalho, linhagens dos gêneros *Curvularia*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Paraconiothyrium*, *Paecilomyces* e *Trichoderma* foram avaliados em função do potencial relatado em literatura.

O gênero *Curvularia* constitui um grupo de ampla ocorrência, cujos representantes podem ser isolados a partir de organismos marinhos, do solo e do ar (Cruz, 2013). Estudos comprovaram várias fitotoxinas isoladas deste grupo, com potencial tanto na indústria farmacêutica (antimicrobiano) quanto na agrícola (herbicidas) (Santos *et al.*, 2008). Jadulco e colaboradores (2002) isolaram a substância lunatina do fungo *Curvularia lunata* proveniente da esponja *Niphates olemda* que apresentou atividade antibiótica contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Bacillus subtilis*.

Fungos do gênero *Trichoderma* spp., estão geralmente presentes no solo, e apresentam importante função ecológica, participando da decomposição e mineralização de materiais orgânicos contribuindo dessa forma com a disponibilização de nutrientes para as plantas (Machado *et al.*, 2012). Algumas linhagens desse fungo são utilizadas no controle de fitopatógenos e na promoção de crescimento vegetal além de atuarem como indutores de resistência das plantas contra doenças (Aguiar *et al.*, 2013; Guevara *et al.*, 2016; Rodrigues *et al.*, 2018).

As espécies de *Cladosporium* são encontradas em muitos tipos de ambientes de clínicos a ambientais e industriais e utilizam diferentes fontes de substratos para seu desenvolvimento tais como madeira, matéria orgânica em decomposição, frutas maduras e tecidos têxteis (Bensch *et al.*, 2015). Pesquisas realizadas com *C. cladosporioides* demonstraram a síntese de compostos bioativos como ácido *p*-metilbenzoico, peróxido de ergosterol e calfoestina C, assim como enzimas incluindo pectinametilesterase, poligalacturonase, clorpirifohidrolase, DNases, lípases e proteases (Gao *et al.*, 2012; Acosta *et al.*, 2017). Algumas espécies são capazes de produzir metabólitos secundários como antibióticos que inibem *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*, e outras atuam como excelentes inseticidas biológicos (Acosta *et al.*, 2017).

O gênero *Fusarium* apresenta alta diversidade morfológica, fisiológica, ecológica e genética, estando presente nas mais diversas regiões geográficas e nichos ecológicos. Se desenvolvem bem em regiões de climas tropicais e subtropicais e podem sobreviver por muito tempo no solo devido à formação de estruturas de resistência como clamidósporos (Milanesi, 2009).

Na área agrícola, *Fusarium* possui várias espécies associadas a doenças como *F. oxysporum*, responsáveis por atacar diversos hospedeiros causando doenças associadas às raízes e partes aéreas das plantas (Michereff *et al.*, 2003). Também é

considerado um fungo de grande importância, não apenas por causar patologias em plantas, mas por produzir toxinas importantes como tricotecenos e fumonisinas em milho e cereais (Tinoco, 2010).

Os fungos filamentosos estão entre os microrganismos que produzem a maior diversidade de cutinases (Rueda-Rueda *et al*, 2020). Constituem um grupo que possui um vasto campo de estudos por serem produtores de biomoléculas com grande potencial a serem empregadas em diversas áreas. Ao mesmo tempo, pesquisas demonstram que esses metabólitos são mais efetivos, menos tóxicos e fornecem menor impacto ambiental (Luo *et al.*, 2013; Moura *et al.*, 2016; Botero, 2018).

2.4 Cutinase

As enzimas microbianas possuem inúmeras aplicações dentro dos processos industriais por serem altamente específicas em suas ações catalisadoras, reduzindo o tempo dos processos e consequentemente aumentando a produção, com um consumo energético menor. São ainda consideradas um produto ambientalmente correto quando comparadas a outros catalisadores (Singh *et al*, 2016).

Desde tempos antigos as enzimas são utilizadas no tratamento de couros e tecidos, obtenção de corantes, e principalmente na indústria alimentícia na produção de cerveja, vinho e vinagre. Atualmente elas também despertam interesse na tecnologia ambiental, buscando o desenvolvimento sustentável (Patel *et al.*, 2018).

A aplicação de enzimas na degradação de polímeros vem recebendo destaque nos últimos anos. Esses biocatalisadores podem atuar de forma isolada ou associada a consórcios microbianos, para catalisar a hidrólise das ligações éster nesses polímeros (Costa *et al*, 2015). Estudos relatam que microrganismos produtores de hidrolases dos tipos esterase (Alisch *et al.*, 2004), lipase (Nowak *et al.*, 2011; Patel *et al.*, 2018), cutinases (Liebminger *et al.*, 2007) ou homólogos destas enzimas (Yoshida *et al.*, 2016) têm potencial para biodegradar/despolimerizar PET (Malafatti-Picca, 2018). As hidrolases são enzimas versáteis, capazes de catalisar reações de polimerização a partir de uma ampla gama de monômeros (Albuquerque *et al*, 2014).

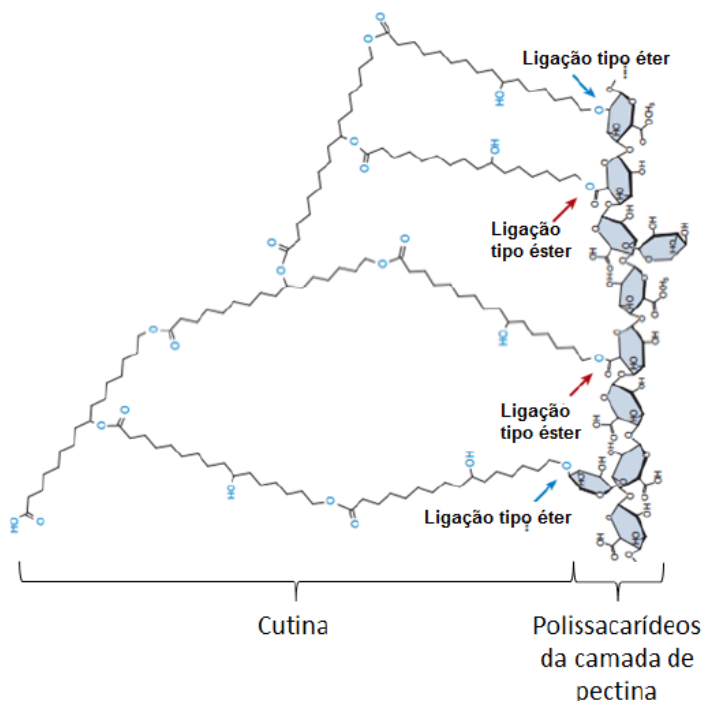
Lipases e esterases apresentam funções no metabolismo de muitos seres vivos, porém os microrganismos constituem os principais produtores dessas enzimas, que são utilizadas em vários setores industriais, como combustível, produtos têxteis, papel, química, ração animal, produção de laticínios, processamento de óleos, biotransformações, produtos farmacêuticos, produção de agroquímicos, pesticidas e

inseticidas dentre outros. Neste contexto a literatura destaca: *Aspergillus niger*, *Bacillus subtilis*, *Burkholderia territorii*, *Candida rugosa*, *C. antarctica*, *C. cylindracea*, *Penicillium roquefortii*, *Pseudomonas* sp., *Rhizomucor miehei*, *Rhizopus japonicus*, gêneros *Streptomyces*, e *Yarrowia lipolytica* (Griebeler et al., 2011; Albuquerque et al, 2014; Lisboa, 2020; Lopes et al, 2023).

Cutinase é a esterase que apresenta a menor molécula da família α/β hidrolases (Adigüzel; Tunçer, 2017). Foi inicialmente identificada por ser secretada por fungos para hidrolisar ligações éster da cutina da planta (um poliéster que reveste as folhas para evitar a evaporação), desde então demonstram características para catalisar hidrólises de uma variedade de polímeros, triacilgliceróis insolúveis e ésteres solúveis de baixo peso molecular (Chen et al, 2013; Anbalagan et al, 2021).

O sítio ativo da cutinase é grande o suficiente para acomodar substratos de alta massa molecular, como cutina (Figura 4) e alguns poliésteres sintéticos, bem como ésteres solúveis de baixa massa molecular e triacilgliceróis de cadeia curta e longa (Chen et al, 2013).

Figura 4: Modelo proposto para estrutura da cutina



Fonte: Adaptado de Fich et al (2016).

A cutinase foi identificada pela primeira vez na década de 1960 e caracterizada no início da década de 1970, sendo obtida pelo fungo filamentoso *F. solani* f. sp. *pisi*

que rapidamente se tornou um modelo para o estudo da estrutura das cutinases, além da sua função e reatividade (Chen *et al.*, 2013).

Mauria e colaboradores (2020) afirmam que a cutinase é produzida principalmente por microrganismos sapróbios, que utilizam a cutina como fonte de carbono ou por microrganismos fitopatogênicos com o objetivo de quebrar a barreira de cutina para colonizar plantas hospedeiras. As principais fontes de cutinases são fungos, bactérias e pólen (Degani, 2015).

Devido à versatilidade de hidrolisar uma ampla gama de ligações éster e catalisar reações de esterificação e transesterificação, a cutinase é vista como uma enzima promissora para várias aplicações industriais (Dutta *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2013). Também são utilizadas nas indústrias alimentícias, na produção de frutas secas e na hidrólise do excesso de gordura em produtos lácteos. Na indústria química atuam na síntese de ésteres e produção de biodiesel (Gomes *et al.*, 2013; Adigüzel; Tunçer, 2017).

A cutinase possui propriedades necessárias para a degradação do PET, chamando a atenção de vários pesquisadores nos últimos anos para essa área. É uma substância bem estudada com o objetivo de substituir produtos químicos, agressivos ao meio ambiente e que também oferecem riscos às pessoas que manuseiam, geralmente utilizados durante os processos de hidrólise/reciclagem de plásticos (Tournier *et al.*, 2020).

Várias linhagens de fungos são significativas fontes de cutinases. Por exemplo, cutinases de *Aspergillus oryzae*, *A. nidulans*, *Penicillium citrinum*, *Humicola insolens*, *F. solani*, *F. solani* f.sp. *pisi* e *F. oxysporum* mostraram atividade hidrolisante em relação ao PET de baixa cristalinidade (Ic) (Ahmaditabatabaei *et al.*, 2021).

Algumas técnicas utilizadas para caracterização e quantificação de enzimas são a dosagem de proteínas, Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE/ HPLC), determinação da massa molecular e a determinação da atividade enzimática remanescente (Speranza, 2010; Caprara, 2015; Degani, 2015; Malafatti-Picca, 2018).

2.5 Estudo da influência de variáveis para obtenção de enzima

A aplicação de técnicas estatísticas de delineamento ou desenho experimental no desenvolvimento e melhorias de bioprocessos tem sido amplamente citado na literatura científica (Colla *et al.*, 2010; Severo *et al.*, 2010; Thakkar; Saraf, 2014; Bonogli-Santos *et al.*, 2016). Esta metodologia pode ser usada como uma ferramenta

para compreender de forma complexa um bioprocesso e descrever os efeitos individuais, cumulativos e interativos do teste de variáveis sobre o rendimento do processo, dessa forma identificando as melhores condições para obtenção de um produto de interesse (Sen; Swaminathan, 2004).

Rodrigues e lemma (2009) orientam que alguns fatores devem ser considerados para se aplicar o delineamento experimental Plackett & Burman (PB) PB16, sendo: a importância de considerar o número de variáveis no desenvolvimento de um produto e/ou processo; realizar um planejamento consciente de um experimento; otimizar processos e/ou produtos e por fim quantificar o efeito das variáveis, de forma a obter dados confiáveis.

Colla e colaboradores (2008) identificaram a melhor condição de substrato, temperatura e pH para obtenção da trealose, por meio de delineamento experimental. Krüger (2017), também identificaram os efeitos das variações de umidade e granulometria para produção de lipase de *Penicillium sumatrense* por bioensaio sólido, obtendo as melhores especificações para ser efetivo na obtenção da enzima de interesse. Santos *et al* (2010), utilizaram o delineamento experimental para prever a atividade ligninolítica e produtividade da enzima em função das variáveis de salinidade e concentração de farelo de trigo.

Uma opção para redução do número de ensaios é utilizar *screening designs* por meio de delineamentos prévios baseados em frações fatoriais como os fatoriais fracionados e planejamento Plackett-Burman, considerando os fatores e/ou níveis que podem levar a respostas ótimas (Rodrigues; lemma, 2009). Ainda segundo os autores, é necessário escolher um delineamento PB contendo no mínimo quatro ensaios a mais que o número de fatores ($n-4$). Sendo assim, os três graus restantes podem ser utilizados para estimar os valores calculados para os efeitos principais. Os autores também recomendam a realização de pelo menos três repetições na condição do ponto central.

As ciências ômicas também vêm sendo utilizadas em estudos com o objetivo de conhecer os genomas e até mesmo otimizar produções de metabólitos de interesse (Danson *et al*, 2018). Kumari *et al* (2021) identificaram os genes de uma espécie de bactéria marinha, *Bacillus AIIW2*, capaz de degradar a estrutura do PET e também concluíram que poderiam melhorar a degradação através do melhoramento genético.

3 Materiais e Métodos

3.1 Microrganismos

As linhagens de fungos utilizadas nos ensaios (Tabela 1) estão depositadas na Coleção Brasileira de Microrganismos de Ambiente e Indústria, CBMAI/CPQBA/UNICAMP, Paulínia, SP, Brasil e preservadas no Laboratório de Microbiologia Ambiental (LMA- Táxon), localizada no Centro de Estudos Ambientais, CEA, na Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (Unesp), Rio Claro, SP, Brasil. As linhagens foram pré-selecionadas pelos resultados obtidos nos ensaios de Malafatti-Picca *et al.* (2019).

A viabilidade e pureza das culturas foram confirmadas pelo cultivo em placas de Petri (90 x 15 mm) contendo aproximadamente 20 mL de Agar Batata-Dextrose (BDA, 20 g.L⁻¹ de dextrose, 4 g.L⁻¹ de extrato de batata).

Tabela 1: Linhagens pré-selecionados para avaliação da produção de cutinase

Linhagem	Código CBMAI	Fontes de Isolamento	Código LMA
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	CBMAI 2075 APPE	Contaminante do ar, no LMA. Isolada por Malafatti-Picca	1831
<i>Curvularia trifolii</i>	CBMAI 2111 APPE	Amostra de água do Rio Atibaia	12
<i>Fusarium</i> sp. complexo <i>oxysporum</i>	CBMAI 2266 APPE	Amostra de água da lagoa de estabilização da Replan-Paulínia	1269
<i>Paraconiothyrium cyclothyrioides</i>	CBMAI 2109 APPE	Amostra de água do Rio Atibaia	43
<i>Paecilomyces</i> cf. <i>lilacium</i>	CBMAI 2083 APPE	Cutícula de formiga cortadeira	433
<i>Trichoderma estonicum</i>	CBMAI 2071 APPE	Amostra de água da lagoa de estabilização da Replan-Paulínia	106
<i>Trichoderma atroviride</i>	CBMAI 2073 APPE	Amostra de água do Rio Atibaia	1239
<i>Trichoderma</i> cf. <i>atroviride</i>	CBMAI 2258 APPE	Amostra de água do Rio Atibaia	1251
<i>Fusarium</i> sp. complexo <i>oxysporum</i>	CBMAI 2260 APPE	Cutícula de formiga cortadeira	1145
<i>Fusarium</i> sp. complexo <i>oxysporum</i>	CBMAI 2259 APPE	Cutícula de formiga cortadeira	1172
<i>Fusarium</i> sp. complexo <i>fujikuroi</i>	CBMAI 2181 APPE	Amostra de água do Rio Atibaia	47

<i>Fusarium cf. petroliphilum</i>	CBMAI 2166 APPE	Amostra de água do Rio Atibaia	17
<i>Fusarium sp. complexo fujikuroi</i>	CBMAI 2154 APPE	Amostra de água do Rio Atibaia	42

Fonte: Elaborado pela autora

3.2 Bioensaios para obtenção da enzima cutinase

Os ensaios para obtenção da enzima cutinase foram realizados de duas formas. O primeiro utilizou o PET como uma das fontes de carbono, buscando obter a enzima a partir do próprio polímero. No segundo, indutores foram empregados, sem a presença de PET para obtenção do extrato enzimático. Os indutores, além da fonte de carbono, possuem lipídios, proteínas e minerais que são atuantes importantes nas rotas metabólicas de biomoléculas (Macedo e Pio, 2007; Bakker, 2017; Sales, 2018).

3.2.1 Extratos enzimáticos utilizando PET no meio de cultivo

Foram utilizados fragmentos de 4.5 cm x 2.5 cm de garrafas PET de água sem gás (500 mL). A garrafa de água selecionada utiliza 30% do monoetilenoglicol proveniente da cana-de-açúcar e os 70% restantes provenientes do petróleo, com espessura e massa menores do que os de uma garrafa PET convencional.

As amostras de embalagens foram adquiridas no comércio local e tratadas previamente ao bioensaio, retirando rótulos e tampas, os quais correspondem a outros tipos de polímeros, seguidas pela limpeza com água e detergente neutro. Os fragmentos foram imersos em solução 2% de hipoclorito de sódio por 1 h, em seguida lavados com água destilada e submetidos por 30 min em luz ultravioleta em fluxo laminar. Após o processo de esterilização, foram secos em estufa a 50 °C até toda água ser evaporada (Bentes, 2008; Malafatti-Picca *et al*, 2019). Esse processo foi realizado antes e após o bioensaio.

Dois fragmentos de PET, com a massa previamente determinada em balança analítica, foram submetidos ao meio de cultivo contendo os fungos a serem avaliados em relação a atividade enzimática. O bioensaio ocorreu em Erlenmeyer contendo 40 mL de caldo de batata-dextrose (BDC) e três cubos (*plugs*) de BDA de aproximadamente 0,5 cm² (de colônias fúngicas, Tabela 1, com 7 dias de crescimento, incubadas a 28 °C). Os frascos foram incubados com agitação a 100 rpm durante 14 dias a 28 °C. Após o bioensaio os caldos foram centrifugados a 5.000g em tubos Falcon de 50mL por 10 min e filtrados através de uma membrana de 0,45µm para

separar os fragmentos de micélio e PET do extrato enzimático. As reações de controle (sem o inóculo) foram realizadas com base nas mesmas condições utilizadas em cada experimento (Malafatti-Picca *et al*, 2019).

Os fragmentos de PET foram recuperados, higienizados e a massa foi determinada conforme descrito previamente.

3.2.2 Extratos enzimáticos obtidos com indutores como fonte de carbono na obtenção da cutinase

O bioensaio ocorreu em Erlenmeyers contendo 20 mL de cada meio (Tabela 2), foram adicionados cinco cubos (*plugs*) de BDA de aproximadamente 0,5 cm² (de micélio da linhagem CBMAI 2266 do *Fusarium* sp. complexo *oxysporum* com 7 dias de crescimento, incubadas a 28 °C). Esse microrganismo foi selecionado devido aos resultados obtidos pelo ensaio 3.2.1. Os frascos foram incubados sob agitação a 100rpm e as retiradas das amostras foram feitas com 14 dias de bioensaio a 28 °C.

Tabela 2: Meios de cultivo

Substâncias	Quantidade
NaNO ₃ (g/L)	0,15g (0,06%)
KH ₂ PO ₄ (g/L)	0,15g (0,06%)
MgSO ₄ (g/L)	0,05g (0,02%)
FeSO ₄ .7H ₂ O (g/L)	0,025g (0,01%)
KCl (g/L)	0,05g (0,02%)
Indutor*	2,5g (1,0%)
pH	7,2
Agitação (rpm)	100

*Indutores utilizados nos ensaios: Óleo de Linhaça, Farelo de Trigo, Casca de Maçã *in natura*, Cutina extraída da Maçã, Cutina comercial (palmitato de cetila), Cutina Comercial + Tween, Farelo de trigo+ Cutina Comercial (1% e 0,5%). Fonte: Elaborado pela autora

A cutina proveniente da maçã foi obtida conforme a metodologia descrita por Manrich *et al* (2017), onde as cascas das maçãs passaram por hidrólise alcalina sob aquecimento e posterior ajuste de pH para 5,0, centrifugação e liofilização.

Após os bioensaios os caldos foram centrifugados a 5.000g em tubos Falcon de 50 mL por 10 min e filtrados através de uma membrana de 0,45 µm para separar materiais sólidos oriundos do caldo fermentado. Os ensaios de controle (sem o inóculo) foram realizados com base nas mesmas condições utilizadas em cada experimento (Adaptado de Macedo e Pio (2007); Fraga (2008); Caetano (2020)). Os ensaios ocorreram em triplicata.

3.3 Hidrólise enzimática do PET utilizando o extrato bruto

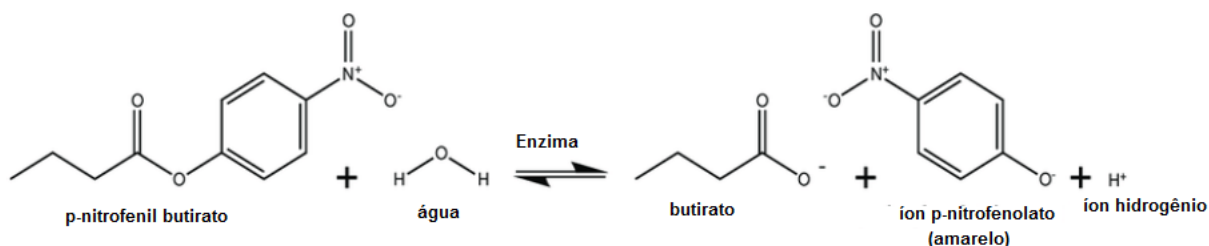
Em tubos de ensaio com tampa, adicionou-se 25 mL do extrato enzimático bruto e um fragmento de PET (0,8 cm x 2,0 cm, 0,045 g e 0,15 mm de espessura), 0,68 g de fosfato (0,2 M), 0,003 g de azida sódica e o pH sendo ajustado para 7,0. A mistura foi conduzida a uma incubadora com agitação orbital (*shaker*), modelo TE-420, marca Tecnal, com rotação 360° durante 15 dias a temperatura ambiente e 30 rpm. Após o tempo decorrido de hidrólise, o fragmento de PET foi retirado e os tubos foram centrifugados a 8.000 rpm à 10 °C por 20 minutos. Um controle foi realizado apenas com a solução tampão fosfato 0,2M, azida sódica e o polímero (sem extrato enzimático). O sobrenadante foi coletado e o PET foi devidamente higienizado (3.2.1) para análises posteriores (adaptado de Castro *et al*, 2017 e Caetano, 2020).

Os ensaios de hidrólise foram realizados em duas concentrações enzimáticas: para os extratos provenientes da cutina da maçã, farelo de trigo e cutina comercial a concentração utilizada foi de 2,1 U/mg para cada um deles. A concentração de 8,44 U/mg foi utilizada para o extrato obtido contendo os indutores de farelo de trigo e cutina comercial (juntos).

3.4 Determinação da atividade enzimática da Cutinase

A atividade da cutinase foi determinada utilizando-se uma adaptação do método espectrofotométrico da hidrólise do *p*-nitrofenilbutirato (*p*-NPB) à 405 nm. Uma alíquota (0,070 mL) do sobrenadante da cultura foi adicionada a 3,43 mL da mistura reacional com a seguinte composição: 1,12 mM *p*-NPB dissolvido em 50 mM tampão fosfato de pH 7,2, contendo 0,2% (N / P) Triton X-100 (0,2%) e tetra-hidrofurano 0,43M. A reação foi monitorada por 15 minutos em banho termostatizado a 25 °C. A solução branco foi a mistura reacional sem a amostra de enzima. Após os 15 min a mesma foi analisada com leitura de absorbância em espectrofotômetro a 405 nm. Uma unidade de atividade cutinolítica foi definida como a quantidade de cutinase necessária para liberar um micromol de *p*-nitrofenil (Figura 5) em 1 min sob as condições especificadas (Speranza, 2010; Gomes, 2013). Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

Figura 5: Hidrólise do *p*-nitrofenil butirato



Fonte: Adaptado Pliego *et al*, (2015).

O *p*-nitrofenol foi utilizado para a obtenção da curva padrão, solubilizado em água destilada, nas concentrações de 0,01; 0,02; 0,04; 0,06; 0,08 e 0,1 micromol *P*-NP/mL (Gráfico 1 em anexo) (Speranza, 2010; Gomes, 2013).

3.5 Dosagem de proteínas

A dosagem de proteínas foi relevante para esse estudo para realização do cálculo de atividade específica da enzima cutinase. O método utilizado para determinação da dosagem de proteína foi o de Lowry (Lowry *et al*, 1951). Nesse método foi utilizada a solução A além do reagente de Folin. A solução A é composta de 2% de carbonato de cálcio, 1% de sulfato de cobre e 1% de tartarato de sódio e potássio, diluídos em uma solução de hidróxido de sódio 0,1M, o reagente de Folin foi diluído na proporção de 1:1 em água destilada. Cada amostra foi analisada em triplicata sendo dosadas em tubos de ensaio com volumes de 0,05, 0,1 e 0,2 mL, tendo o volume final completado para 0,5 mL com água destilada. A cada tubo foi adicionado 2,5 mL do reagente A recém preparado, os tubos foram agitados e 15 min foram aguardado. Após esse tempo foi adicionado a cada tubo 0,25 mL do reagente de Folin diluído, os quais foram agitados e então aguardou-se mais 30 min. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 660 nm. Para o branco foi utilizada água destilada no volume das amostras. A albumina do soro bovino (BSA), foi utilizada como padrão proteico, sendo solubilizada em água destilada até a concentração de 1 mg/mL. Esta solução foi utilizada para a preparação de uma curva de calibração (Gráfico 2 em anexo).

Os valores obtidos de proteínas foram utilizados para obter a atividade específica da enzima (U/mg) por meio da seguinte fórmula:

$$\text{Atividade específica (U/mg)} = \frac{\text{atividade enzimática (U/mL)}}{[\text{Proteína (mg/mL)}]} \quad (1)$$

3.6 Estudo da influência das variáveis na produção de cutinase

Os dados para os ensaios de avaliação da influência de variáveis foram obtidos por meio do planejamento experimental fracionado Plackett-Burman (PB) obtendo a seleção das melhores condições das variáveis (Rodrigues e lemma, 2009).

A partir de uma revisão bibliográfica (Macedo e Pio, 2005; Maeda *et al.*, 2005; Fraga, 2008; Caprara, 2015; Kumari *et al.*, 2016; Malafatti-Picca, 2018; Sooksai *et al.*, 2019), foram selecionadas 7 variáveis a serem avaliadas (12 fatores), adotando um PB16, ou seja, 16 ensaios, acrescidos de 3 pontos centrais, totalizando 19 ensaios. Os fatores a serem testados e os níveis estão presentes na Tabela 3.

Tabela 3: Valores utilizados no Delineamento Plackett & Burman (PB) PB16

	Código	Fatores	Unidade	-1	0	1
Nitrogênio	x1	NaNO ₃	g/L	0,3	1,65	3
	x2	KNO ₃	g/L	0	0,5	1
	x3	Extrato de levedura	g/L	0,2	1,6	3
	x4	Peptona	g/L	0	1	2
Carbono	x5	Glicose	g/L	0,2	0,4	0,6
	x6	Sacarose	g/L	0,2	0,4	0,6
Enxofre	x7	MgSO ₄	g/L	0,2	0,6	1
	x8	FeSO ₄	g/L	0,02	0,06	0,1
Fosfato	x9	KH ₂ PO ₄	g/L	0,2	0,6	1
Potássio	x10	KCl	g/L	0,2	0,6	1
pH	x11	pH		6	6,5	7
Agitação	x12	Agitação	rpm	0	50	100

Fonte: Elaborado pela autora

Foram considerados como fatores fixos: temperatura (ambiente), massa de farelo de trigo e cutina comercial (0,5% de cada – 1 g de cada) e período de bioensaio (14 dias). Pelos resultados prévios do bioensaio para produção de cutinase, a linhagem selecionada para otimização foi a CBMAI 2266 *Fusarium* sp. complexo *oxysporum*.

A Tabela 4 apresenta a matriz de dados codificados para as variáveis estudadas.

Os valores de produção de cutinase obtidos após o ensaio de PB foram avaliados estatisticamente pela ANOVA. Os resultados experimentais foram ajustados para um modelo polinomial de segunda ordem a um nível de 95% de significância ($p < 0,05$).

Tabela 4: Matriz de dados codificados para as variáveis estudadas

Ensaios	x1	x2	x3	x4	x5	x6	x7	x8	x9	x10	x11	x12
1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	1	-1
2	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	1
3	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	1	-1
4	1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	1
5	-1	1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	1
6	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1
7	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1
8	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	-1	1
9	1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	-1
10	-1	1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1
11	-1	-1	1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1
12	1	-1	-1	1	1	-1	1	-1	1	1	1	1
13	-1	1	-1	-1	1	1	-1	1	-1	1	1	1
14	-1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	1	-1	1	1
15	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	1	-1	1
16	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Fonte: Elaborado pela autora

3.7 Avaliação do PET e extrato enzimático após a hidrólise

3.7.1 Espectroscopia de absorção no infravermelho com transformada de Fourier - FTIR

As análises de espectroscopia de absorção no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) das amostras, foram realizadas nos filmes (antes e após o ensaio de hidrólise enzimática), utilizando espectrofotômetro de infravermelho, marca Shimadzu, modelo IRAffinity-1S, com resolução de 4 cm^{-1} e 32 varreduras para identificação das bandas características das amostras. Os ensaios foram realizados

no laboratório do IPBen, Instituto de pesquisa em bioenergia - campus Rio Claro - SP – Unesp.

3.7.2 Microscopia eletrônica de varredura – MEV

Os filmes poliméricos originais e biotratados foram analisados em microscópio eletrônico de varredura Tescan-Mira, após serem metalizados com ouro em metalizador Sputter Coater Baltec SCD 004. Os ensaios de MEV foram realizados pelo Departamento de Engenharia de Materiais (DEMa) na Universidade Federal de São Carlos – UFSCar, campus de São Carlos-SP.

3.7.3 Cromatografia Gasosa GC-MS (Gas Chromatography Coupled with Mass Spectroscopy)

Os produtos obtidos após ensaio de hidrólise enzimática foram identificados pela análise GC-MS das amostras de extratos. À temperatura 65 °C por um período de 48 h, 2 mL dos extratos foram evaporados e posteriormente 2 ml de diclorometano foram adicionados antes de filtrar em filtro de seringa PTFE de 0,22 µm. Esta amostra filtrada foi analisada em GC acoplado com MS utilizando hélio como gás de arraste. O GC foi equipado com coluna HP 5MS ou DB 5MS (30 m x 0,25 mm ID, espessura do filme 0,25 µ). A temperatura do forno foi programada para 40°C por 3 min até alcançar 280 °C a 10 °C/min, e então mantido por 4 min a 280 °C (adaptado de Kyaw, 2012 e Shahnawaz *et al.*, 2016). As substâncias referentes aos principais picos foram identificadas utilizando biblioteca NIST utilizado com pontuação de corte de 70%.

3.7.4 Cristalinidade

A cristalinidade das amostras de PET foi determinada em um calorímetro de varredura diferencial (DSC) modelo DSC Q20 V24.9 Build 121, conforme a norma ASTM D 3418-2012, empregando aquecimento (para 290 °C) e taxas de resfriamento (até 0 °C) de 10 °C/min. O calor de fusão (DH_m) de cada amostra foi correlacionado com o de um polímero 100% cristalino (estimado em 140 J/g), para determinação do seu grau de cristalinidade (Castro *et al.*, 2017; Malafatti-Picca *et al.*, 2023). O percentual de cristalinidade das amostras foi definido pela equação utilizada por Faria *et al.* (2015):

$$\alpha_c = \Delta H_m / \Delta H_m^0 * 100 \quad (2)$$

Onde ΔH_m é a entalpia de fusão e ΔH_m^0 é a entalpia de fusão supondo uma amostra 100% cristalina, sendo considerado o valor de 140 J/g para o PET.

Os ensaios foram realizados pelo Departamento de Materiais e Tecnologia da Faculdade de Engenharia - Campus de Guaratinguetá - SP – Unesp.

4 Resultados e discussão

4.1 Avaliação da produção de cutinase

Os fungos neste estudo foram submetidos ao bioensaio contendo fragmentos de PET por 14 dias à 28 °C sob agitação. Dentre as linhagens avaliadas, *Fusarium* sp. complexo *oxysporum* CBMAI 2266 apresentou maior atividade enzimática (0,20 U/mg), seguido das linhagens *Paraconiothyrium cyclothyrioides* CBMAI 2109 (0,11 U/mg) e *Cladosporium cladosporioides* CBMAI 2075 (0,11 U/mg) (Tabela 5).

Tabela 5: Avaliação da produção de cutinase utilizando fragmentos de PET no meio de cultivo.

Linhagem	U (total)	Atividade enzimática (U/mL)	Proteínas totais (mg)	Atividade Específica (U/mg)
<i>Paecilomyces</i> cf <i>lilacinum</i> CBMAI 2083	11,70	0,12	187,54	0,06 ± 0,05
<i>Paraconiothyrium cyclothyrioides</i> – CBMAI 2109	36,91	0,42	330,19	0,11 ± 0,07
<i>Curvularia trifolii</i> - CBMAI 2111	19,70	0,29	264,81	0,07 ± 0,07
<i>Fusarium</i> sp. complexo <i>oxysporum</i> CBMAI 2266	63,77	0,65	316,42	0,20 ± 0,10
<i>Trichoderma estonicum</i> - CBMAI 2071	25,02	0,26	318,25	0,08 ± 0,01
<i>Trichoderma</i> cf. <i>atroviride</i> – CBMAI 2258	10,06	0,13	307,82	0,03 ± 0,02
<i>Cladosporium cladosporioides</i> - CBMAI 2075	30,24	0,36	285,64	0,11 ± 0,06
<i>Trichoderma atroviride</i> - CBMAI 2073	28,48	0,34	317,98	0,09 ± 0,04

Fonte: Elaborada pela autora

A cutinase foi relatada pela primeira vez no início da década de 1960, obtida pelo fungo filamentoso *Fusarium solani* sp. e desde então este gênero vem sendo reportado em diversos outros estudos como promissor (Egmond e Vlieg, 2000; Macedo e Pio, 2005; 2007; Heinen, 1963 apud Chen *et al.*, 2013; Caetano, 2020; Santos-Beneit *et al.*, 2023).

Observou-se que os valores das atividades enzimáticas encontrados neste ensaio foram inferiores a outros relatos da literatura, apesar de não ser o esperado, este desafio abriu uma oportunidade para que a metodologia da presente investigação fosse ampliada, incluindo a busca por adequações das condições de cultivo. Speranza *et al.* (2011), destacou a espécie *F. oxysporum* como outra importante produtora de cutinase, dentre 400 isolados de solos e plantas. O meio de cultivo utilizado para crescimento da linhagem, continha cutina extraída da maçã como principal fonte de carbono. Utilizando o mesmo microrganismo em ensaios contendo resíduos agrícolas, foi obtido o valor de atividade enzimática de 6,2 U/mL em meio contendo farelo de arroz, 13,64 U/mL em meio contendo farelo de trigo e 18,88 U/mL quando utilizado casca de soja. Macedo e Pio (2007) também identificaram uma linhagem de *F. oxysporum* como melhor produtora de cutinase em meio líquido contendo 1% de óleo de linhaça como indutor, 0,06% NaNO₃, 0,06% K₂HPO₄, 0,02% MgSO₄, 0,02% KCl e 0,01% FeSO₄·7H₂O. A cultura apresentou uma atividade cutinolítica de 18,84 U/mL após 48 horas de bioensaio.

Em outro estudo, a produção de cutinase por *F. proliferatum* foi avaliada em meio sólido com farelo de trigo e água destilada, alcançando uma atividade de 228 U/g após 120 h de cultivo (Caetano, 2020). Em cultivo líquido, após 48 h com óleo de linhaça a 30 °C e a 100 rpm, a linhagem de *F. oxysporum* apresentou a maior atividade, 17,2 U/mL, porém sem reprodutibilidade (Caetano, 2020).

No presente estudo optou-se por fragmentos de PET maiores (4,5 cm x 2,5 cm) seguindo a metodologia utilizada por Malafatti-Picca *et al* (2019), embora há conhecimento que a superfície de contato menor favorece a disponibilidade do polímero para o microrganismo, como comprovado por Caetano (2020), que utilizando PET moído (1,0 g) compondo o meio sólido com o *F. solani* obteve uma atividade de 318 U/g.

Dessa forma verificou-se que o meio de cultivo, principalmente a fonte de carbono, pode interferir na produção da enzima. Outros componentes considerados indutores (farelo de trigo, óleo de linhaça e cutina) e repressores (alguns íons

metálicos) também interferiram na quantidade obtida da enzima (Dutta *et al*, 2009; Sales, 2018; Sooksai *et al.*, 2019; Rueda-Rueda *et al*, 2020). Melhorias no meio foram realizadas nos próximos experimentos com o propósito de se produzir uma concentração maior de cutinase.

Diante dos resultados de produção de cutinase obtidos com o PET no bioensaio, o microrganismo selecionado para prosseguir com os estudos foi *Fusarium* sp. complexo *oxysporum* - CBMAI 2266. A escolha foi definida por esta linhagem apresentar melhor produção de cutinase, dentre os microrganismos testados, tendo o polímero como uma das fontes de carbono no meio de cultivo e também pelos registros obtidos na literatura.

4.2 Avaliação da influência do tempo no bioensaio

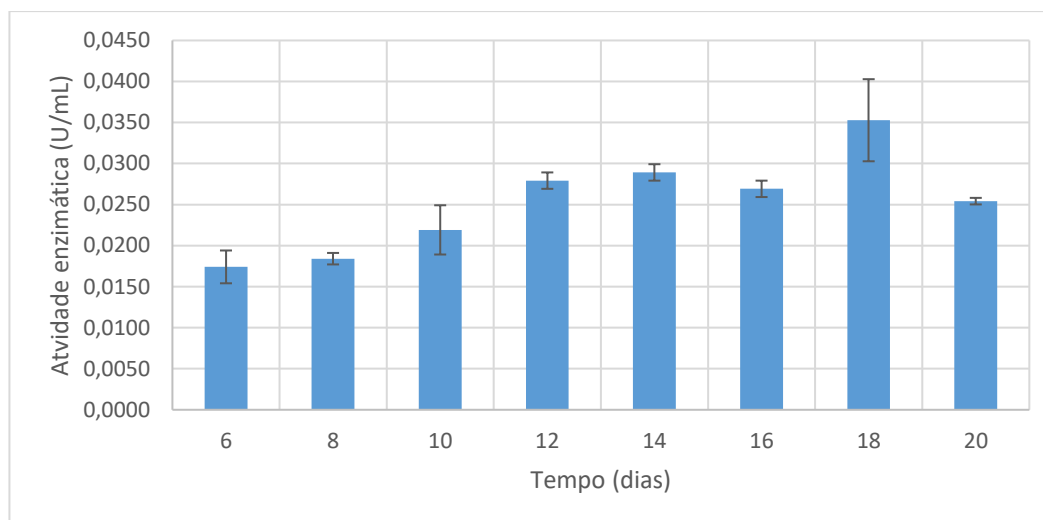
O tempo de bioensaio, tendo fragmentos de PET como a fonte de carbono, foi avaliado para o meio de cultivo utilizado nesse estudo considerando a linhagem de CBMAI 2266 escolhida no item 4.1. A comparação entre o tempo de bioensaio e a atividade enzimática e específica da cutinase estão presentes na Tabela e na Figura 6.

Tabela 6: Ensaio do tempo de bioensaio utilizando fragmentos de PET como fonte de carbono

Tempo do bioensaio (dias)	U (total)	Atividade Enzimática (U/mL)	Proteína Total (mg)	Atividade Específica (U/mg)
6	0,70	0,01741	70,36	0,0989 ± 0,002
8	0,77	0,01841	76,36	0,0101 ± 0,001
10	1,21	0,02192	93,82	0,0128 ± 0,002
12	1,40	0,02792	99,58	0,0140 ± 0,001
14	1,58	0,02892	103,10	0,0152 ± 0,001
16	1,48	0,02692	96,27	0,0153 ± 0,001
18	1,82	0,03528	98,79	0,0154 ± 0,005
20	1,30	0,02542	100,44	0,0184 ± 0,000

Fonte: Elaborada pela autora

Figura 6: Atividade enzimática x tempo de bioensaio



Fonte: Elaborado pela autora.

O tempo de bioensaio aplicado foi de 14 dias, conforme o proposto por Malafatti-Picca *et al* (2019). Devido a busca por concentrações maiores de cutinase, foi realizado o ensaio para avaliação do tempo de bioensaio que poderia fornecer uma melhor produção.

Com o tempo de 14 e 16 dias a atividade enzimática obtida foi de 0,029 U/mL e 0,027 U/mL, respectivamente. No período total de 18 dias o valor encontrado foi de 0,035 U/mL, apresentando um aumento de 20,70% quando comparado ao período de 14 dias que foi considerado nos ensaios anteriores.

Macedo e Pio (2005), testaram *F. oxysporum* e o meio de cultivo contendo nitrato de sódio a 0,06%, fosfato de potássio a 0,06%, sulfato de magnésio a 0,02%, cloreto de potássio a 0,02%, sulfato ferroso de heptahidrato a 0,01%, para otimizar a produção de cutinase, 0,4% de cutina (m/v) foi adicionada como fonte de carbono. A atividade enzimática foi determinada após 4, 6, 8, 10, 12 e 14 dias de bioensaio. As autoras constataram que do dia 8 ao dia 12 houve um aumento na atividade enzimática, com pico no dia 12.

Utilizando *F. oxysporum*, em meio de cultivo contendo resíduos agrícolas diversos como farelo de trigo e arroz, casca de soja entre outros, à temperatura de 30°C e 100 rpm de agitação, avaliou-se o tempo de bioensaio para cada substrato, entre 1 a 5 dias. A atividade de cutinase variou de 0,8 a 27,5 U/mL e os melhores resultados foram encontrados utilizando casca de soja (11,9 U/mL), farelo de arroz (18,8 U/mL) e farelo de trigo (27,5 U/mL) após 5 dias de bioensaio (Fraga, 2008).

Os resultados de outros estudos (Macedo e Pio, 2005; Fraga, 2008; Speranza, 2011) sugerem que o meio de cultivo utilizado para a produção de cutinase pode influenciar no tempo de bioensaio, quando fontes de carbono e nitrogênio mais facilmente assimiláveis foram disponibilizadas para o microrganismo. Após avaliar 23 fungos potenciais produtores de cutinase, Sooksai e colaboradores (2019) observaram que a linhagem de *F. falciforme* PBURU-T5 apresentou uma atividade de cutinase indutiva da ordem de $3,36 \pm 0,12$ U/mL, e destacaram a linhagem como promissora. Isso indica que nenhuma atividade ocorreu em meio sem cutina.

Outra questão observada pelos estudos de outros ensaios (Macedo e Pio, 2005; Fraga, 2008; Speranza, 2011; Sooksai *et al.*, 2019; Caetano, 2020) e também avaliada nesse trabalho foi em relação a outros representantes do gênero *Fusarium*.

Como na avaliação do tempo de bioensaio, para obtenção da cutinase, no presente trabalho não houve aumento expressivo; para os demais estudos, prevaleceu a utilização dos 14 dias.

4.3 Avaliação da produção de cutinase por diferentes linhagens de *Fusarium*

Como o gênero *Fusarium* foi identificado no item 4.1 e também é considerado em vários outros estudos, com grande potencial para obtenção de cutinase, outros isolados desse gênero foram avaliados nesse trabalho, além da linhagem proposta inicialmente.

Várias espécies de *Fusarium* também foram avaliadas por Rueda-Rueda *et al* (2020), utilizando 10 mL de meio de cultivo composto por 0,06% NaNO₃, 0,06% K₂HPO₄, 0,02% MgSO₄, 0,02% KCl, 0,01% FeSO₄.7H₂O, a pH 7,2 e 1% (p/v) de óleo de linhaça como fonte de carbono. As culturas foram incubadas a 30°C e agitadas a 100 rpm por 4 dias. As linhagens avaliadas no presente estudo e no estudo de Rueda-Rueda *et al* (2020) e os respectivos resultados de atividade enzimática de cutinase, estão presentes na Tabela 7.

Tabela 7: Avaliação de produção de cutinase por diferentes linhagens de *Fusarium*

Linhagem	Atividade total (U)	Atividade enzimática U/mL	Proteínas totais (mg)	Atividade Específica (U/mg)	Temperatura (°C)	Tempo (dias)	Agitação (rpm)	Fonte de Carbono	Referência
<i>Fusarium</i> sp. complexo <i>oxysporum</i> CBMAI 2260	0,16	0,00	70,20	0,00 $\pm$ 0,00	28	14	100	Fragmentos de PET	Presente Trabalho
<i>Fusarium</i> sp. complexo <i>oxysporum</i> CBMAI 2259	2,13	0,05	53,14	0,04 $\pm$ 0,006	28	14	100	Fragmentos de PET	Presente Trabalho
<i>Fusarium</i> sp. complexo <i>fujikuroi</i> CBMAI 2181	0,53	0,0	113,32	0,00 $\pm$ 0,00	28	14	100	Fragmentos de PET	Presente Trabalho
<i>Fusarium</i> cf. <i>petroliphilum</i> CBMAI 2166	1,60	0,03	44,92	0,04 $\pm$ 0,05	28	14	100	Fragmentos de PET	Presente Trabalho
<i>Fusarium</i> sp. complexo <i>fujikuroi</i> CBMAI 2154	1,83	0,03	118,00	0,02 $\pm$ 0,002	28	14	100	Fragmentos de PET	Presente Trabalho
<i>Fusarium</i> sp (H1)	-	0	-	-	30	4	100	Óleo de Linhaça	Rueda-Rueda <i>et al</i> (2020)
<i>Fusarium fujikuroi</i> (H2)	-	33,5 $\pm$ 2,0	-	-	30	4	100	Óleo de Linhaça	Rueda-Rueda <i>et al</i> (2020)
<i>Fusarium</i> sp (H4)	-	3,5 $\pm$ 0,2	-	-	30	4	100	Óleo de Linhaça	Rueda-Rueda <i>et al</i> (2020)
<i>Fusarium fujikuroi</i> (H9)	-	2,4 $\pm$ 0,4	-	-	30	4	100	Óleo de Linhaça	Rueda-Rueda <i>et al</i> (2020)
<i>Fusarium</i> sp (H11)	-	0,2 $\pm$ 0,0	-	-	30	4	100	Óleo de Linhaça	Rueda-Rueda <i>et al</i> (2020)
<i>Fusarium fujikuroi</i> (H14)	-	1,0 $\pm$ 0,0	-	-	30	4	100	Óleo de Linhaça	Rueda-Rueda <i>et al</i> (2020)

<i>Fusarium oxysporum</i> (H17)	-	0,4 ± 0,1	-	-	30	4	100	Óleo de Linhaça	Rueda-Rueda <i>et al</i> (2020)
<i>Fusarium fujikuroi</i> (H19)	-	9,35 ± 2,50	-	-	30	4	100	Óleo de Linhaça	Rueda-Rueda <i>et al</i> (2020)
<i>Fusarium fujikuroi</i> (H24)	-	3,3 ± 0,6	-	-	30	4	100	Óleo de Linhaça	Rueda-Rueda <i>et al</i> (2020)
<i>Fusarium</i> sp (H27)	-	0,3 ± 0,1	-	-	30	4	100	Óleo de Linhaça	Rueda-Rueda <i>et al</i> (2020)
<i>Fusarium equiseti</i> (H29)	-	2,2 ± 0,5	-	-	30	4	100	Óleo de Linhaça	Rueda-Rueda <i>et al</i> (2020)

Fonte: Elaborado pela autora

Neste trabalho, observou-se que as linhagens com maior atividade cutinolítica foram CBMAI 2259 e o CBMAI 2166, apresentando respectivamente os valores de atividade enzimática de 0,05 U/mL e 0,04 U/mL.

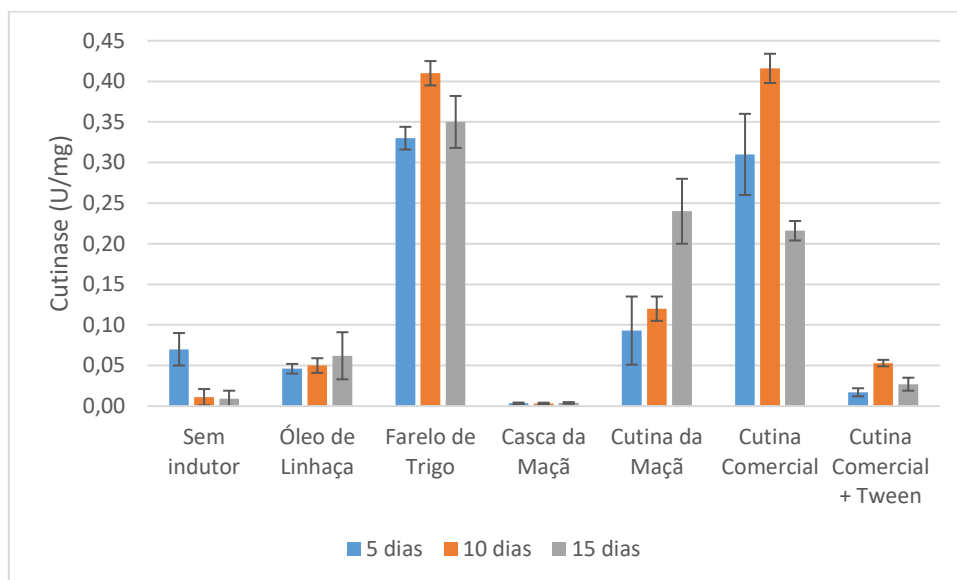
As culturas de *Fusarium* estudadas no trabalho de Rueda-Rueda *et al* (2020) foram isoladas de Raquis de bananeira, apresentando diferenças significativas de atividade cutinolítica, mesmo que pertencendo à mesma espécie. O isolado *Fusarium* sp (H1), por exemplo, não apresentou nenhuma atividade enzimática. As linhagens denominadas como *Fusarium* sp (H₁₁ e H₂₇) apresentaram atividade de 0,2 e 0,3 U/mL respectivamente, o *Fusarium oxysporum* (H₇), 0,4 U/mL. As espécies de *F. fujikuroi* (classificadas como H₂, H₉, H₁₄, H₁₉ e H₂₄) apresentaram valores diversos que vão desde 1,0 a 33,5 U/mL. Os autores também observaram que a atividade cutinolítica foi maior quando a atividade da lipase foi menor. Por fim, outra constatação destes autores foi que o óleo de linhaça pode ser usado como bom indutor da produção de cutinase nesse tipo de ensaio, além da utilização da cutina extraída de frutas.

Em dois dos ensaios apresentados (Macedo e Pio, 2005; Speranza *et al.*, 2011) foi utilizado a cutina extraída da maçã como agente indutor para produção de cutinase, dessa forma, além da utilização da cutina extraída de frutas o óleo de linhaça também foi considerado como potencial indutor a ser avaliado nesse estudo.

4.4 Avaliação da produção de cutinase pelo uso de indutores.

Diante dos resultados de baixa produção de cutinase obtidos nos ensaios de atividade enzimática apresentados em 4.1, 4.2 e 4.3, foram realizados bioensaios na presença de indutores para a produção de cutinase. Como relatado anteriormente o meio foi modificado, em relação aos ensaios utilizando o PET como fonte de carbono, havendo a necessidade de reavaliar o tempo necessário da análise, sendo retiradas alíquotas em 5, 10 e 15 dias. Os ensaios ocorreram em triplicata e os resultados de atividade enzimática estão demonstrados no Figura 7.

Figura 7: Atividade enzimática (U/mg) considerando diferentes indutores e tempos de bioensaio



*Avaliado a linhagem de *Fusarium* sp. complexo *oxysporum* CBMAI 2266

Fonte: Elaborado pela autora

Os indutores que apresentaram melhor performance para a obtenção da cutinase foram o farelo de trigo, a cutina comercial e a cutina da maçã. O tempo de dez dias foi considerado o melhor tempo de bioensaio para produção de cutinase, no caso do farelo de trigo ($0,42 \pm 0,02$ U/mg) e da cutina comercial ($0,42 \pm 0,02$ U/mg); 15 dias foi o tempo de maior produção da enzima proveniente da cutina extraída da maçã ($0,24 \pm 0,04$ U/mg). A utilização de indutores favoreceu a atividade do microrganismo na obtenção da cutinase, o que pode ser atribuído à qualidade da fonte de carbono, disponibilidade e assimilação desse, pela linhagem avaliada e presença de outras substâncias como minerais e lipídios.

O interesse no uso do farelo de trigo se sobressai aos demais por ser um resíduo de origem agrícola e de baixo custo. Segundo Kumar *et al.* (2018), o aproveitamento de resíduos agrícolas em bioensaios pode reduzir o custo total de produção de enzimas em 40-60%. Outro fator que encoraja o uso do farelo de trigo é o fato da extração de cutina de frutas ser considerado um processo caro e de difícil obtenção em larga escala (Pio e Macedo, 2007), ao contrário do uso direto do resíduo, de custo-benefício muito mais interessante.

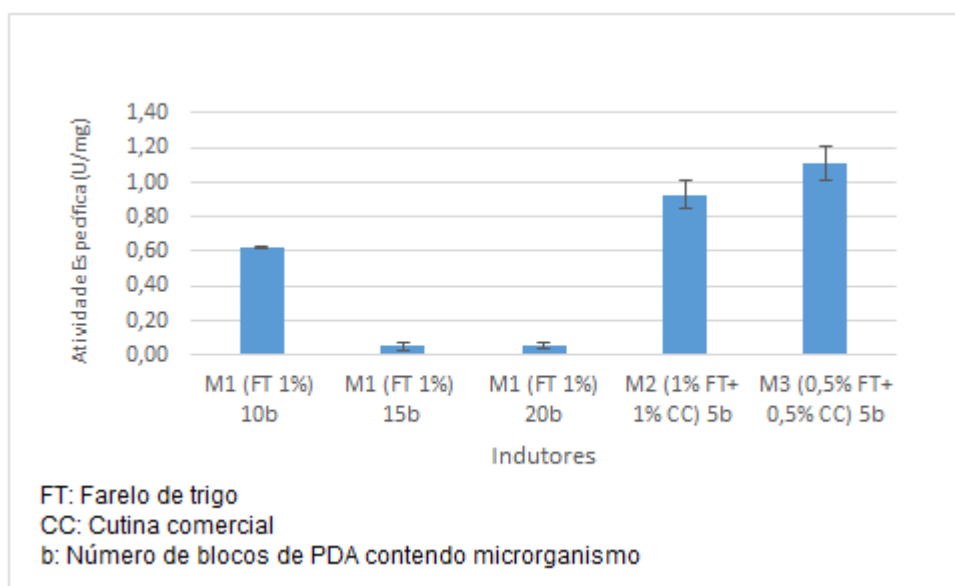
O farelo de trigo é ainda rico em fibras solúveis e insolúveis, carboidratos, proteínas e metabólitos secundários e também possui em menor quantidade ácidos

graxos, minerais e vitaminas (Javed *et al*, 2012; Amorim *et al*, 2016). Além do alto valor nutricional, o farelo de trigo apresenta alta capacidade de retenção de água, favorecendo a produção de enzimas microbianas, quando utilizado como meio nutricional em cultivos (Amorim *et al*, 2016; Sales, 2018).

O farelo de trigo foi considerado boa fonte de carbono para produção de cutinase, não havendo necessidade de suplementação com outros nutrientes como, adição de sais e óleos como fontes de carbono e minerais, demonstrando ser economicamente viável para produção da enzima (Fraga, 2008).

Visando uma maior produção da enzima, foi avaliado também a combinação do farelo de trigo como a cutina comercial e a influência da quantidade de microrganismo no bioensaio (Figura 8).

Figura 8: Avaliação da combinação entre indutores e influência da quantidade de microrganismos



Fonte: Elaborado pela autora

Como o farelo de trigo e a cutina comercial apresentaram os maiores valores de atividade específica, a combinação desses dois indutores foi avaliada. Observou-se que a concentração de 0,5% de cada um, favoreceu a produção de cutinase que apresentou um valor de atividade específica de $1,10 \text{ U/mg} \pm 0,1$, maior que os valores encontrados quando testados separadamente (próximo a $0,41 \text{ U/mg} \pm 0,01$ para ambos).

Em relação ao aumento do inóculo, foi observado nesse ensaio que a utilização de 10 blocos pode aumentar a produção de cutinase em aproximadamente 33%.

4.5 Avaliação da influência de variáveis da produção de cutinase

A utilização do delineamento de Plackett-Burman demonstrou a influência de cada variável na produção da cutinase obtida pela linhagem CBMAI 2266. Os 16 ensaios propostos avaliaram 12 características consideradas importantes para o desenvolvimento do microrganismo e a produção da enzima. A Tabela 8 demonstra os valores de atividade enzimática obtidos em cada ensaio. O ensaio número 17 representa o ponto central realizado em triplicata.

Tabela 8: Atividade enzimática da cutinase produzida pela linhagem CBMAI 2266 com o delineamento de Plackett-Burman

Ensaio	Média (U/mL)	U (total)	Proteína Total (mg)	Atividade Específica (U/mg)
1	0,09	4,69	39,04	0,12 ± 0,07
2	0,50	25,79	30,12	0,86 ± 0,16
3	0,08	3,95	46,02	0,09 ± 0,04
4	0,19	9,85	73,14	0,13 ± 0,01
5	2,51	117,77	93,41	1,26 ± 0,07
6	0,19	7,52	71,71	0,10 ± 0,06
7	0,03	1,23	59,54	0,02 ± 0,01
8	0,04	1,88	48,39	0,04 ± 0,02
9	0,00	0,23	58,33	0,00 ± 0,00
10	0,07	3,23	57,87	0,06 ± 0,03
11	0,21	26,64	77,39	0,34 ± 0,16
12	0,49	26,64	64,40	0,41 ± 0,10
13	1,39	73,73	37,69	1,96 ± 0,30
14	0,90	43,90	55,67	0,79 ± 0,30
15	0,11	6,33	52,73	0,12 ± 0,10
16	0,04	1,82	36,10	0,05 ± 0,05
17*	0,00	0,00	73,07	0,00 ± 0,00

*Ponto central em triplicata

Fonte: Elaborada pela autora

Maiores atividades específicas foram encontradas nos ensaios 13, 5, 2 e 14. Como fonte de nitrogênio, os meios de cultivo desses ensaios continham em comum o nitrato de sódio e o extrato de levedura. Como fonte de carbono em comum eles tinham a glicose e a sacarose.

A Tabela 9 traz os meios utilizados em cada ensaio do delineamento aplicado, em evidência estão os meios que obtiveram valores maiores de atividade específica. Nos quatro meios em destaque, pode se observar o valor da agitação em comum. Os micronutrientes também estavam presentes em todos os meios e o pH variou entre 6-7. A agitação foi de 100 rpm para os 4 bioensaios.

Tabela 9: Meios utilizados em cada ensaio para avaliação das variáveis

	x1	x2	x3	x4	x5	x6	x7	x8	x9	x10	x11	x12
	NaNO ₃	KNO ₃	Extrato de levedura	Peptona	Glicose	Sacarose	MgSO ₄	FeSO ₄	KH ₂ PO ₄	KCl	pH	Agitação
1	3	0	0,2	0	0,6	0,2	0,2	0,1	1	0,2	7	0
2	3	1	0,2	0	0,2	0,6	0,2	0,02	1	1	6	100
3	3	1	3	0	0,2	0,2	1	0,02	0,2	1	7	0
4	3	1	3	2	0,2	0,2	0,2	0,1	0,2	0,2	7	100
5	0,3	1	3	2	0,6	0,2	0,2	0,02	1	0,2	6	100
6	3	0	3	2	0,6	0,6	0,2	0,02	0,2	1	6	0
7	0,3	1	0,2	2	0,6	0,6	1	0,02	0,2	0,2	7	0
8	3	0	3	0	0,6	0,6	1	0,1	0,2	0,2	6	100
9	3	1	0,2	2	0,2	0,6	1	0,1	1	0,2	6	0
10	0,3	1	3	0	0,6	0,2	1	0,1	1	1	6	0
11	0,3	0	3	2	0,2	0,6	0,2	0,1	1	1	7	0
12	3	0	0,2	2	0,6	0,2	1	0,02	1	1	7	100
13	0,3	1	0,2	0	0,6	0,6	0,2	0,1	0,2	1	7	100
14	0,3	0	3	0	0,2	0,6	1	0,02	1	0,2	7	100
15	0,3	0	0,2	2	0,2	0,2	1	0,1	0,2	1	6	100
16	0,3	0	0,2	0	0,2	0,2	0,2	0,02	0,2	0,2	6	0
17	1,65	0,5	1,6	1	0,4	0,4	0,6	0,06	0,6	0,6	6,5	50
18	1,65	0,5	1,6	1	0,4	0,4	0,6	0,06	0,6	0,6	6,5	50
19	1,65	0,5	1,6	1	0,4	0,4	0,6	0,06	0,6	0,6	6,5	50

Fonte: Elaborado pela autora

O nitrogênio é um requisito essencial para o crescimento, e a capacidade de metabolizar uma ampla variedade de fontes de nitrogênio permite que os fungos colonizem diferentes nichos ambientais e sobrevivam às limitações de nutrientes (Tudzynski, 2014). Fontes de nitrogênio orgânico, como extrato de levedura, auxiliam na obtenção de cutinase, fornecendo nutrientes essenciais para o metabolismo do fungo (Macedo e Pio, 2007). Para obtenção da cutinase o meio contendo extrato de levedura foi o que forneceu o melhor resultado, porém, quando a glicose esteve presente no mesmo meio como fonte de carbono, houve um decréscimo na atividade

enzimática (Macedo e Pio, 2007; Kumari *et al.*, 2016). Em 5 meios de cultivos avaliados, contendo pequenas diferenças entre os constituintes (KH_2PO_4 0,5 g, K_2HPO_4 2,5 g, NaCl 0,1 g, MgSO_4 0,2 g, CaCl_2 0,06 g, FeSO_4 0,03 g, cutina (de várias fontes) 1g/l) , o fungo *Aspergillus* sp. RL2Ct não apresentou produção de cutinase em 3 deles (Kumari *et al.*, 2016).

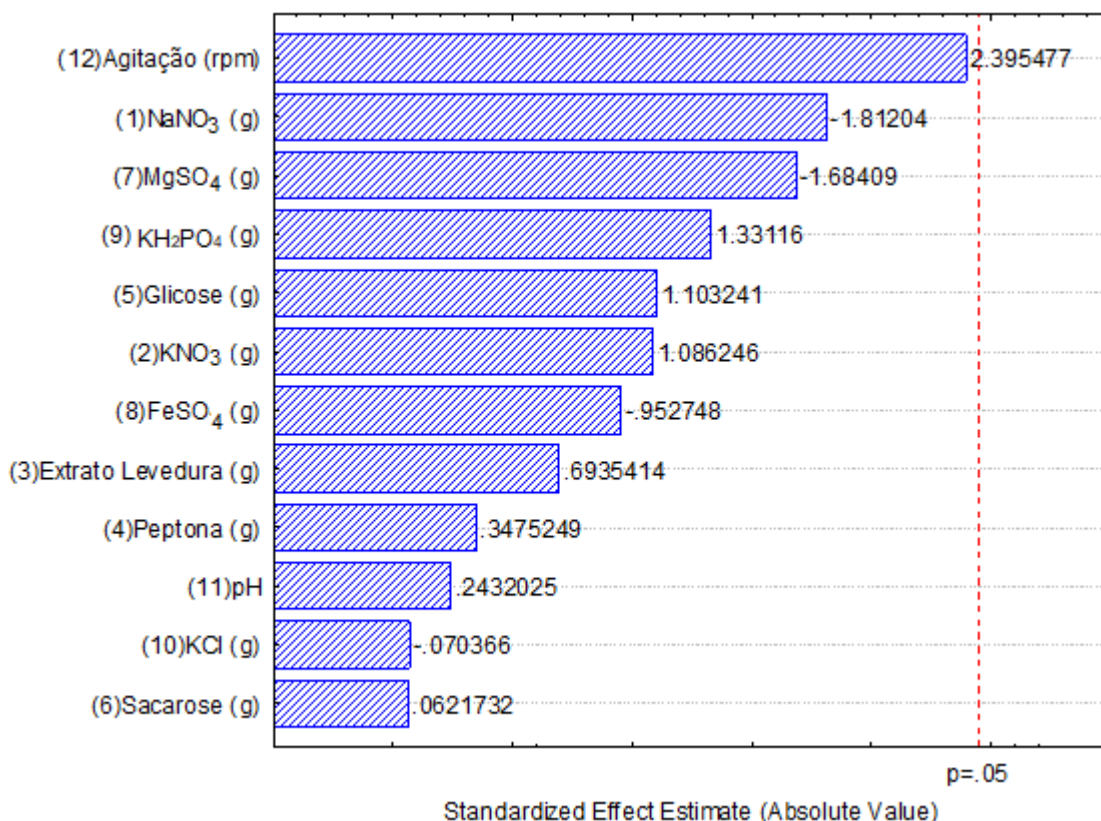
O pH do meio de cultivo influencia diretamente a atividade enzimática e o crescimento microbiano. Para a produção ótima de cutinase, é necessário um pH adequado, geralmente neutro a ligeiramente alcalino (Macedo e Pio, 2007; Speranza *et al.*, 2011; Kumari *et al.*, 2016).

Micronutrientes adicionados no meio de cultivo apresentaram influência negativa na produção de cutinase pelo *F. verticillioides*, tanto que foram excluídos do estudo subsequente sobre a influência de variáveis para obtenção da enzima (Oliveira, 2018). Foi sugerido maiores estudos nos trabalhos de Pio e Macedo (2007) e Speranza *et al.* (2011) sobre a influência dos micronutrientes na obtenção da cutinase, pois eles podem ter efeito negativo dependendo da composição do meio. Na avaliação entre diferentes íons metálicos, o sulfato de zinco com concentração de 0,01% foi considerado melhor para produção de cutinase, os demais apresentaram influência negativa no aumento da produção da enzima (Rueda-Rueda *et al.*, 2020).

A agitação do meio de cultivo é crucial para a homogeneização dos nutrientes e aeração do fungo, influenciando significativamente a produção de enzimas (Pio e Macedo, 2008; Degani, 2015; Parmar e Rahi, 2023). A agitação foi avaliada em ensaios com o *F. verticillioides*, considerando uma faixa de 0-200 rpm, sendo identificado 120 rpm como ótima para obtenção da cutinase (Parmar e Rahi, 2023).

A Figura 9 traz o diagrama de Pareto obtido com os resultados das análises das influências dos fatores, objetivo do uso do gráfico de Pareto foi avaliar, por ordem de maior à menor interferência os efeitos estatisticamente significativos. Os resultados obtidos no gráfico de Pareto foram analisados pelo teste de análise de variância (ANOVA) para sua significância. Os resultados confirmaram que o modelo era significativo com $p < 0,05$.

Figura 9: Gráfico de Pareto Plackett-Burman



Fonte: Elaborado pela autora

Dos 12 fatores avaliados no presente trabalho, foi identificado uma influência da agitação na produção da cutinase, na faixa estudada, a agitação teve um grande efeito positivo correspondente a 2,39, já que a maior atividade específica na tabela 8 foi de 1,96 $\pm$ 0,30, e ainda foi significativo para $p=0,05$. Algumas substâncias sofrem interferência de outras quando estão juntas em um mesmo meio. Isso justifica a influência negativa das fontes de nitrogênio, diante da presença das fontes de carbono (glicose e sacarose).

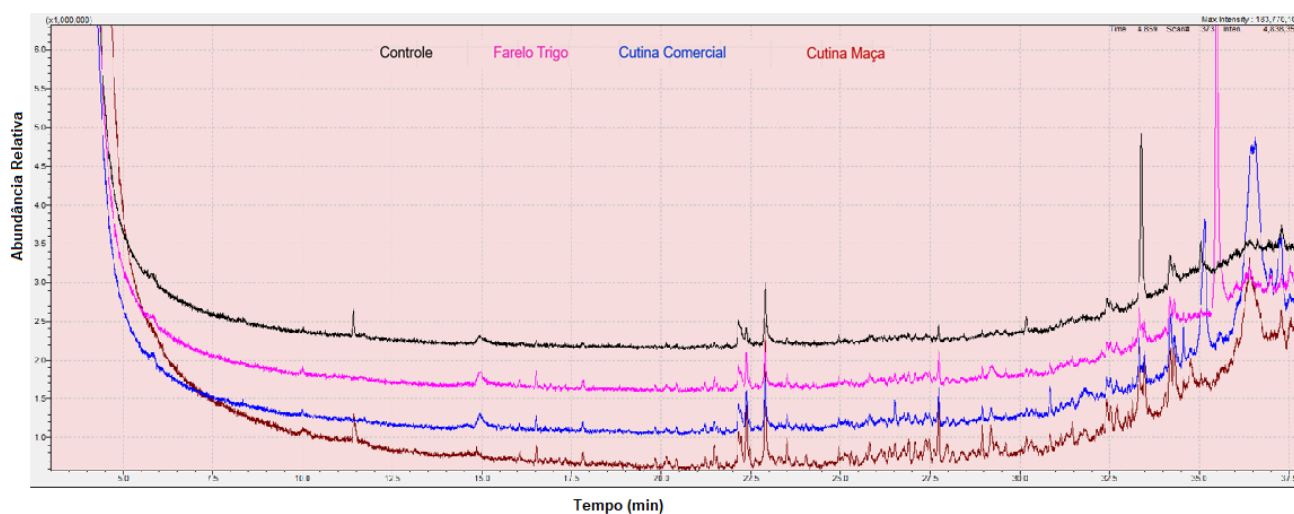
4.6 Avaliação do extrato enzimático após a hidrólise do PET

Após os ensaios para obtenção da cutinase, selecionou-se os extratos enzimáticos brutos com maior atividade enzimática (farelo de trigo, cutina comercial e cutina da maçã) para serem utilizados nos ensaios de hidrólise do PET. Posteriormente, os extratos foram analisados por cromatografia gasosa (GC-MS) para identificar possíveis substâncias resultantes da degradação do PET pela enzima.

Os hidrolisados obtidos do PET foram avaliados pelo ensaio de cromatografia gasosa. Os espectros demonstram alterações após os ensaios de hidrólise enzimática em relação ao controle.

Os espectros dos ensaios de hidrólise do PET com os extratos provenientes do farelo de trigo, cutina comercial e cutina da maçã estão na Figura 10. Esses extratos foram utilizados na concentração de 2,10 U/mg.

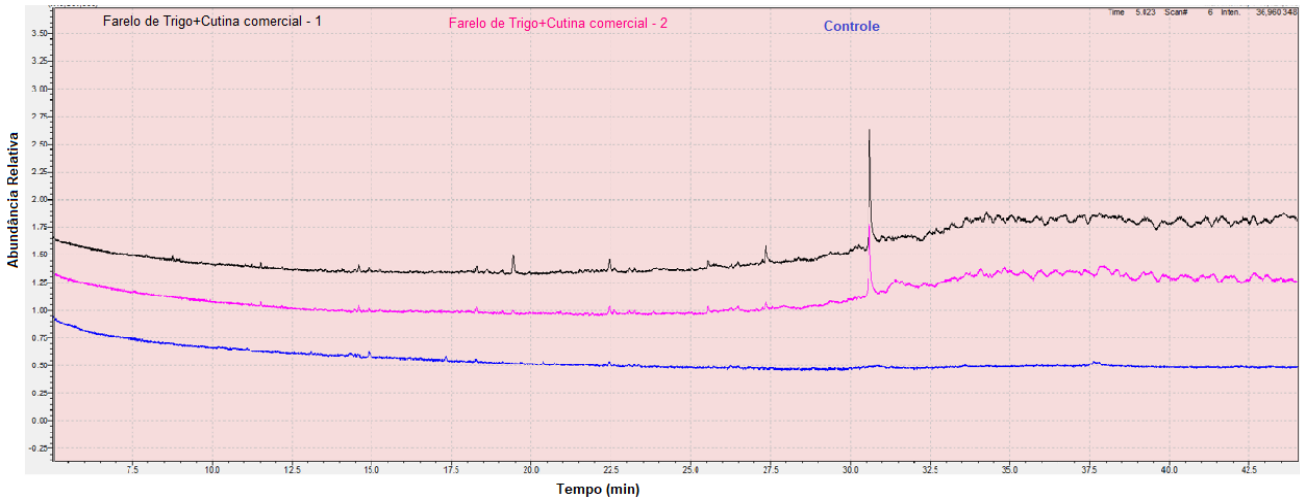
Figura 10: Espectro de GC dos extratos após o ensaio de hidrólise do PET



Fonte: Elaborado pela autora

Os espectros do ensaio de hidrólise contendo o extrato obtido com a presença dos indutores de farelo de trigo (FT) + cutina comercial (CC), utilizado na concentração de 8,44 U/mg, estão presentes na Figura 11.

Figura 11: Espectro de GC dos extratos de FT+CC pós o ensaio de degradação do PET



Fonte: Elaborado pela autora

As substâncias presentes nos extratos após a hidrólise foram identificadas no cromatograma pelo NIST e estão elencadas na Tabela 10.

Tabela 10: Substâncias identificadas no cromatograma após a hidrólise enzimática

Extrato	Tempo (min)	Componente	Fórmula Química	Aplicação
Farelo de Trigo (FT)	37'54	Triacontano, 1, 30-dibromo	C ₃₀ H ₆₀ Br ₂	-
	37'54	1-Decanol, 2-octil-2Octildecano-1-ol	C ₁₈ H ₃₈ O	Lubrificante
Cutina comercial (CC)	36'50	1-Docosene	C ₂₂ H ₄₄	Lubrificante
Cutina da Maçã	36'41	1-Decanol, 2-octil-2Octildecano-1-ol	C ₁₈ H ₃₈ O	Lubrificante
		1-Heptacosanol	C ₂₇ H ₅₆ O	-
		1-Decanol, 2-hexil	C ₁₆ H ₃₄ O	Lubrificante
Farelo de trigo e cutina comercial (FT+CC)		Hidrazida de ácido esteárico	C ₁₈ H ₃₈ N ₂ O	-

Fonte: NIST (2023) e National Center for Biotechnology Information (2024).

No Brasil, a resolução RDC nº 326 de 2019, estabelece a lista com aditivos permitidos destinados à elaboração de materiais plásticos e revestimentos poliméricos em contato com alimentos. A referida resolução define aditivos como a “substância intencionalmente adicionada à formulação do material para atingir um efeito físico ou químico durante a fabricação do plástico ou no material ou no objeto final; destina-se a estar presente no material ou objeto final”.

Lubrificantes são um grupo de aditivos utilizados para reduzir o atrito entre os equipamentos superfícies e o polímero, promovendo o fluxo de plástico sobre e através do equipamento e evitando que o plástico grude nas superfícies. Os principais lubrificantes utilizados em plástico de materiais de embalagem são ácidos carboxílicos, seus ésteres e amidas, ceras de polietileno, parafina, estearatos e silicones. Geralmente, os lubrificantes podem ser adicionados à resina plástica ou aplicado externamente (Marín-Morocho *et al*, 2021).

Rani *et al* (2015), afirmam que geralmente os lubrificantes são baseados em um tipo de óleo básico ou misturas destes dependendo dos requisitos de desempenho. O ácido n-hexadecanóico ou ácido oleico (o mais abundante dos ácidos graxos insaturados na natureza) foi detectado com maior frequência também em aditivos plásticos e lubrificantes. Outros como tricaprilato de glicerol, miristato de isopropilo, 1-eicosanol, 2-hexil-1-decanol, octadecanamida, 4-metil-benzenossulfonamida, 1-hexacosanol e ácido decanodióico, éster bis(2-etil-hexil) foram detectados com menos frequência. Os álcoois (com um comprimento de cadeia alquílica variando de C-9 a C-16) são frequentemente usados como intermediário químico ou como lubrificante interno.

Fabris (2007), avaliou por CG-MS amostras de PET pós consumo identificando compostos de aldeídos (heptanal, octanal, etc), álcoois (2-hexanol), cetonas (3-hexanona, isopentilacetato, etc), ácidos carboxílicos (ácido hexanóico e ácido octanóico) e hidrocarbonetos (n,heptano, tolueno e outros).

4.7 Avaliação da hidrólise enzimática nos filmes de PET

Foram avaliados os fragmentos de PET antes e após serem submetidos ao ensaio de hidrólise enzimática. Foram considerados os extratos que apresentaram maior concentração de cutinase no meio, dessa forma, os fragmentos do polímero

foram expostos aos extratos provenientes do farelo de trigo, da cutina comercial, da cutina da maçã e da combinação entre farelo de trigo e cutina comercial.

Para avaliação do polímero foi realizado o ensaio de FTIR, MEV e DSC com objetivo de avaliar o efeito da hidrólise enzimática sobre a superfície do polímero.

4.7.1 FTIR

A espectroscopia FTIR é um método recomendado para o estudo estrutural e caracterização conformacional de polímeros por causa da sensibilidade das vibrações moleculares às forças de ligação e configurações. Esta técnica tem sido amplamente aplicada para avaliar mudanças conformacionais de polímeros PET envolvendo as porções de etilenoglicol, anéis aromáticos ou os grupos carbonila (Donelli *et al*, 2009).

Foram realizadas análises de FTIR nos fragmentos de polímero antes de ser submetido ao extrato, chamado de controle antes da hidrólise enzimática (AD) e do fragmento de polímero utilizado como controle durante o ensaio, sendo exposto apenas a solução tampão, chamado de controle depois (PD). Os fragmentos de polímeros que foram expostos aos extratos obtidos pela cutina comercial (CC), pelo farelo de trigo (FT) e cutina da maçã (CM) também foram avaliados pelo ensaio de FTIR e foram denominados pelo nome do indutor utilizado para obtenção da cutinase. Esses três extratos foram selecionados pois apresentaram os melhores valores de atividade enzimática, em ensaios prévios.

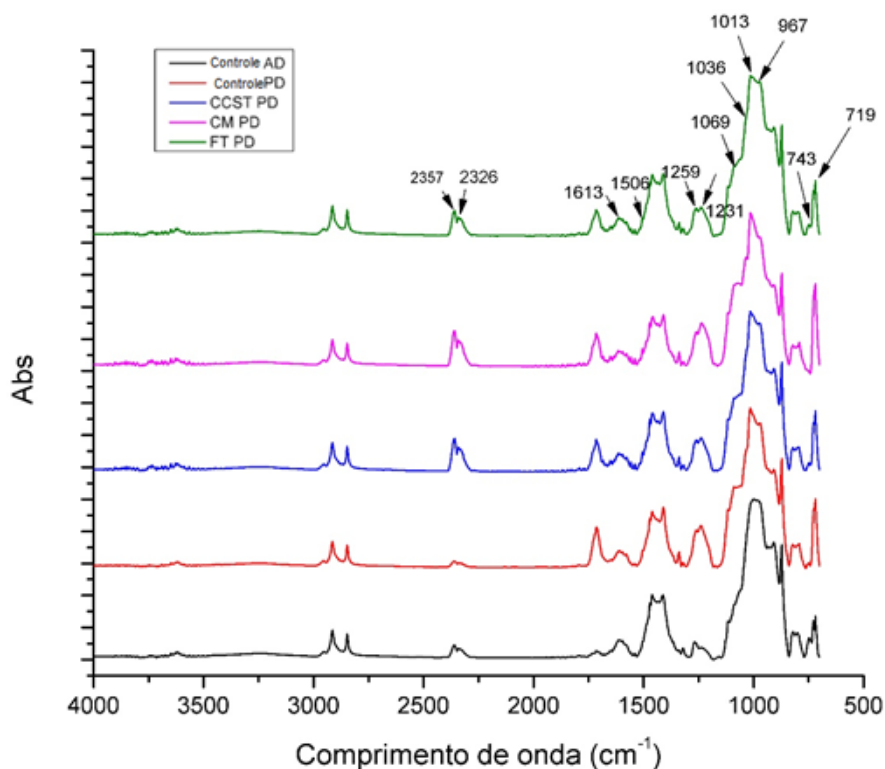
Alterações foram observadas em algumas bandas (em evidência na Figura 12) quando comparadas as dos polímeros que foram expostos aos extratos enzimáticos e os que não foram. A Tabela 11 apresenta as principais bandas e os respectivos comprimentos de onda identificados por outros autores durante a degradação do PET.

Tabela 11: Bandas com modos vibracionais atribuídos do espectro FTIR das amostras de PET

Absorção das bandas (cm ⁻¹)	Bandas
3660 e 3426	Grupo álcool -OH
2970 e 2901	Grupos alifáticos de estiramento assimétrico de metil C-H
2350	Deformação Axial simetrica de CO ₂
1717 e 1698	<i>Stretching</i> de C=O
1579 e 1504	Compostos hetero-oxi de compostos nitro alifáticos e aromáticos
1473	<i>Bending</i> CH ₂
1463, 1416	<i>Stretching</i> de C-O e deformação de O-H
1337 e 1320	<i>Trans wagging</i> CH ₂
1260	<i>Stretching</i> assimétrico de grupos C-C-O
1240 e 1124	Grupo tereftalato (OOCCH ₆ H ₄ -COO)
1091	Grupos metileno
1096 e 1050	Grupo metileno e vibrações da banda de éster C-O
976, 904 e 799	Anel aromático

Fonte: Adaptado de Donelli *et al.*, 2009; Pereira *et al.*, 2017; Mecozzi e Nisini, 2019; Anbalagan *et al.*, 2021.

Figura 12: Espectro de FTIR dos filmes submetidos aos respectivos extratos



*AD: antes da despolimerização e PD: Pós despolimerização

Fonte: Elaborado pela autora

Pelo espectro de FTIR obtido, alterações em algumas bandas importantes foram observadas, correspondentes da região amorfa do PET. Como alterações espectrais, foram consideradas variações de intensidade, deslocamento, surgimento e desaparecimento de bandas.

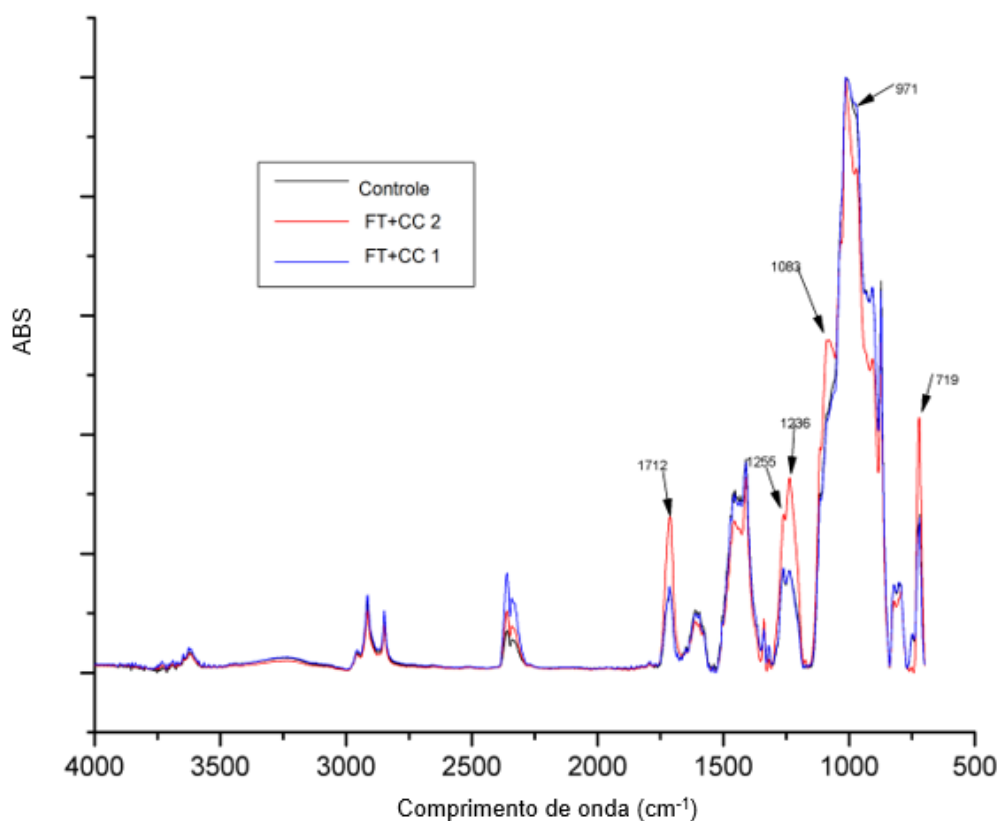
As bandas de estiramento da carbonila são fortes e geralmente ocorrem entre 1.800 e 1.600 cm^{-1} . Uma das ligações C-O no grupo éster está ligada ao carbono carbonílico e a outra não, dessa forma pode-se esperar que sejam quimicamente distintas e tenham constantes de força diferentes e, portanto, originam dois picos separados entre 1300 e 1000 cm^{-1} (Smith, 2022). Nos espectros do presente estudo houve uma redução da banda correspondente a carbonila em 1613 cm^{-1} e alterações de intensidade das bandas próximas a 1000 cm^{-1} , sendo a 1036 cm^{-1} , 1013 cm^{-1} e 967 cm^{-1} . Foi identificada alteração na banda por volta de 970 cm^{-1} , sendo atribuída a vibrações de ligações O-CH₂ e C(=O)-O, encontradas em estrutura cristalina de PET (Donelli *et al.*, 2009)

Outras bandas também apresentam alterações importantes, desaparecimento ou redução, após o ensaio de hidrólise (1231, 743 e 719 cm^{-1}). Modificações também foram identificadas no PET em 1235 cm^{-1} , se referindo ao estiramento do grupo éster que pode ser atribuído ao tereftalato (Pereira *et al.*, 2017) e em 1090 cm^{-1} sendo identificadas como vibração do grupo metileno e em 1016 e 725 cm^{-1} para bandas aromáticas (Chen *et al.*, 2013). O espectro para PET é confirmado pela absorção em 730 cm^{-1} , devido à interação do grupo éster polar e o anel aromático (Edge *et al.*, 1996; Pereira *et al.*, 2017).

As bandas presentes em 2357 e 2326 cm^{-1} apresentaram um aumento de intensidade isso se deve a deformação simétrica axial de CO_2 (Pereira *et al.*, 2017).

Algumas alterações de bandas, também foram evidenciadas, nos fragmentos de PET expostos ao extrato enzimático obtido pelos indutores de farelo de trigo e cutina comercial. As principais evidências foram identificadas nas bandas de 1712 (*Stretching* de $\text{C}=\text{O}$), 1255 (*Stretching* assimétrico de grupos $\text{C}-\text{C}-\text{O}$), 1236 (se referindo ao estiramento do grupo éster que pode ser atribuído ao tereftalato), 1083 (Grupos metileno), 971 e 719 cm^{-1} (anel aromático) (Figura 13).

Figura 13: Espectro de FTIR dos filmes submetidos ao extrato de FT+CC



Fonte: Elaborado pela autora

4.7.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

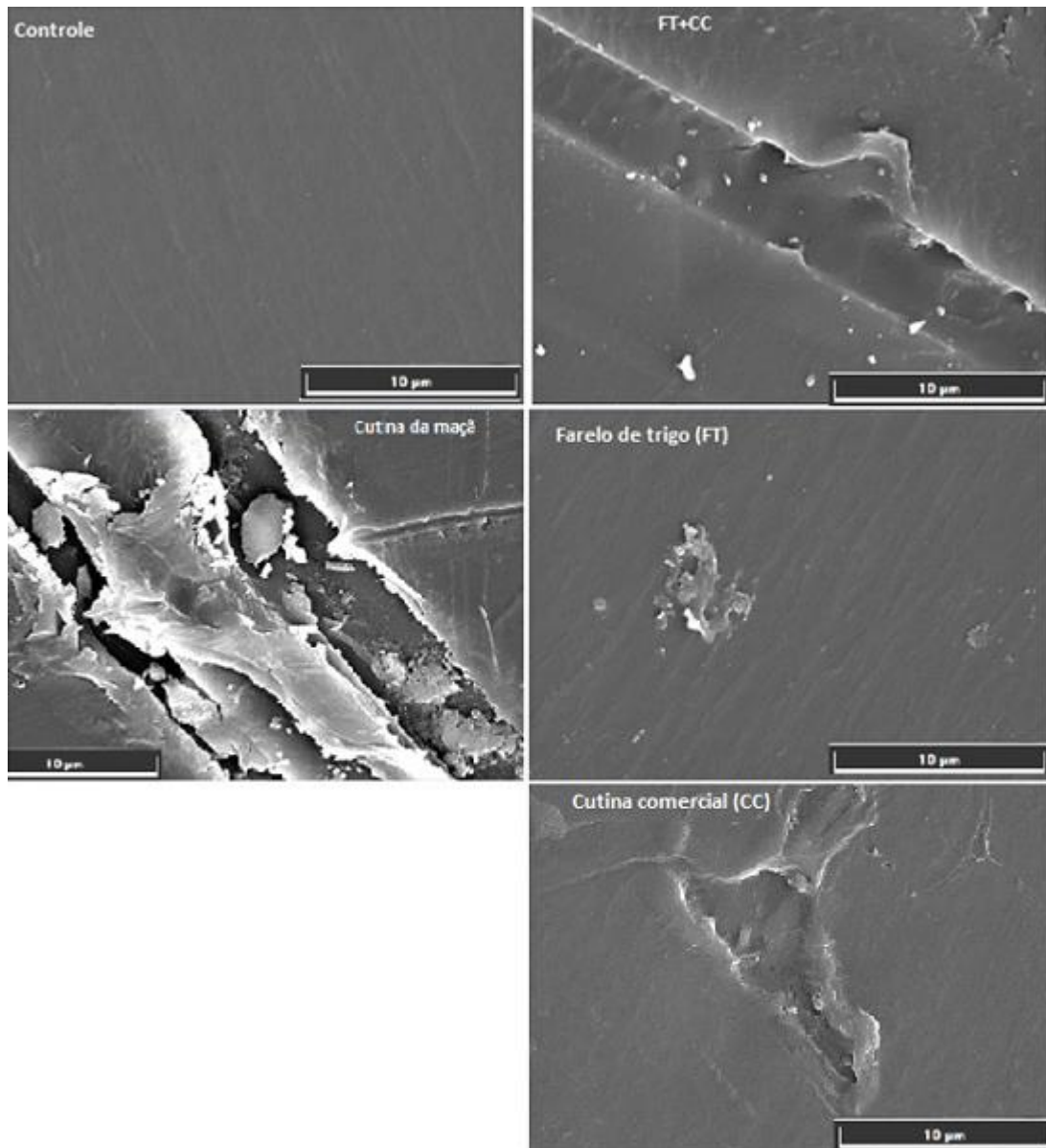
Os aspectos micro morfológicos da superfície dos filmes submetidos à hidrólise enzimática foram analisados mediante medidas de MEV e comparados com os filmes originais.

O filme original apresentou uma superfície relativamente regular com algumas imperfeições e riscos provenientes do processo industrial de conformação da garrafa PET e processos logísticos. Os ensaios de microscopia eletrônica de varredura (Figura 14), demonstraram algumas alterações nas superfícies dos fragmentos de polímeros expostos aos extratos enzimáticos, sendo mais visível nos polímeros que tiveram contato com os extratos provenientes da cutina da maçã, da cutina comercial e da sinergia do farelo de trigo e cutina comercial.

Pode se observar que, em todos fragmentos de PET submetidos aos extratos enzimáticos, houve uma mudança na morfologia mas que pode estar associada aos possíveis defeitos superficiais do material. Portanto, pode se inferir que a atividade

enzimática tendeu a ser iniciada e acentuada nas partes que previamente apresentavam defeitos superficiais, provavelmente devido à flexibilidade favorecida da cadeia de poliéster induzida por estresse mecânico (Sevilla *et al*, 2023).

Figura 14: Imagens dos ensaios de MEV obtidos dos polímeros submetidos aos extratos enzimáticos brutos



Fonte: Elaborado pela autora

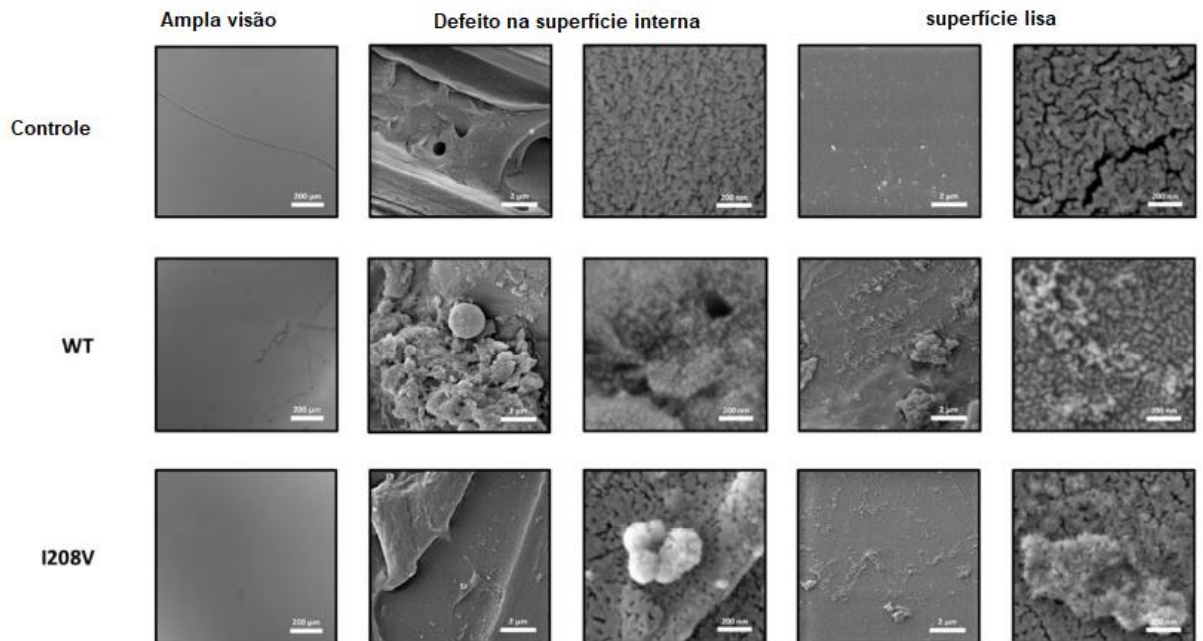
Os resultados de MEV podem ser utilizados para interpretar a hidrólise enzimática, uma vez que a morfologia do PET é semi cristalina e seus monômeros

apresentam uma morfologia disforme (Donelli *et al.*, 2009; Weng *et al.*, 2013; Bucioli *et al.*, 2021; Malafatti-Picca *et al.*, 2023).

Weng *et al.* (2013), na avaliação de biodegradação de polihidroxialcanoatos, descrevem que à medida que transcorre o tempo do processo da hidrólise enzimática, as modificações se acentuam, surgindo, furos e descamações na superfície do filme; evidenciando que a degradação do material ocorre primeiramente pela erosão da superfície, provocada pela ação enzimática no filme e depois se aprofunda, adentrando nas demais camadas do material. Nas microscopias realizadas nos fragmentos do PET do presente trabalho, pode-se notar que a amostra controle apresenta uma superfície mais lisa em comparação com as amostras tratadas com os extratos enzimáticos. Há presença de ranhuras (FT+CC e CM) e descamações (CM) e algumas perfurações (FT+CC, CM e CC); o fragmento exposto ao extrato proveniente de farelo de trigo apresentou algumas deposições.

Sevilla *et al.* (2023) identificaram diferenças, de forma heterogênea, nas superfícies dos fragmentos de PET ((6 mm diâmetro e espessura de 0.213 mm) quando expostos a diferentes variações da enzima PETase, inferindo que a atividade enzimática é iniciada e acentuada nas partes que previamente apresentavam defeitos superficiais, provavelmente devido à flexibilidade favorecida da cadeia de poliéster induzida por estresse mecânico. No fragmento considerado controle as imagens obtidas pelo MEV mostraram a existência de defeitos superficiais na forma de canais em todas as amostras, possivelmente originados da manipulação dos filmes. Mesmo assim pode-se notar que a amostra controle apresenta uma superfície mais lisa (primeira linha da Figura 15) em comparação com as amostras tratadas com enzima (segunda e terceira linha da Figura 15).

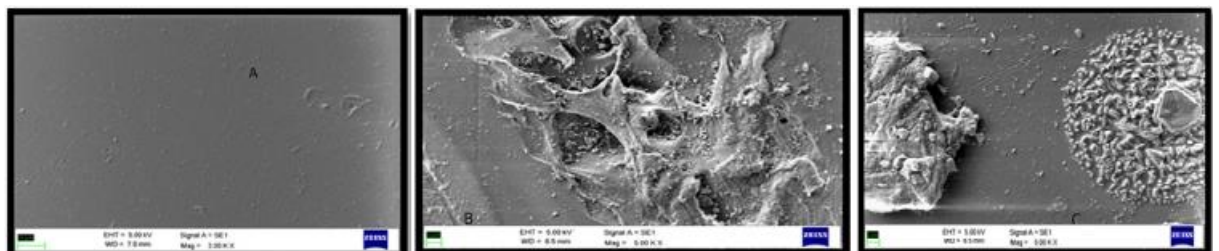
Figura 15: Comparação das imagens de MEV de PET antes e após exposição a enzimas



Fonte: Sevilla *et al.* (2023)

Sarkhel *et al.* (2019) avaliaram a superfície de PETs obtidos de ambientes marinhos, antes e após bioensaios envolvendo uma linhagem de bactéria e outra de fungo (*Vibrio* sp (GenBank accession nº: KY941137.1, linhagem PD6) e *Aspergillus* sp (GenBank accession nº: MH119104.1)), em meio mínimo por 6 semanas. As imagens de MEV obtidas por eles, demonstraram que o filme antes da degradação apresenta uma superfície mais lisa (Figura 16 a) em comparação aos filmes após degradação que apresenta evidentes rugosidade e rachaduras (Figura 16 b e c).

Figura 16: Imagens de MEV de PET antes e após bioensaio



Fonte: Sarkhel *et al.* (2019)

Embora a estrutura do PET seja composta por ligações éster, que podem ser facilmente quebradas, o PET apresenta resistência à degradação enzimática devido

à presença de alta proporção de unidades de tereftalato aromático. Alguns principais fatores que contribuem para a resistência do PET à degradação incluem a cristalinidade (a maioria dos PETs comercializados em garrafa são altamente cristalinos), sua alta massa molecular, a baixa flexibilidade da cadeia polimérica, alta hidrofobicidade superficial e a temperatura favorável a hidrólise que se encontra próxima à temperatura de T_g (65 – 80°C) (Ahmaditabatabaei *et al*, 2021).

O efeito de diferentes cristalinidades presentes no polímero no processo da degradação enzimática pode ser explicado pelas mudanças nas estruturas agregadas macromoleculares do mesmo. Onde as moléculas geralmente se agrupam de maneira não uniforme com uma mistura de moléculas ordenadas, que são chamadas de regiões cristalinas e regiões desordenados, chamadas de amorfas. A região amorfa das cadeias poliméricas é menos compactada do que aquelas nos domínios cristalinos, o que favorece a ação enzimática nesses sítios (Ahmaditabatabaei *et al*, 2021; Sevilla *et al*, 2023).

No trabalho de Donelli *et al*. (2009) a superfície do polímero após o contato com a enzima apresentou pequenas deposições, não diferenciando muito do polímero considerado controle, porém os autores identificaram alterações relacionadas a hidrofiliabilidade da superfície.

4.7.3 Cristalinidade

A temperatura de fusão (T_m), a entalpia de fusão (ΔH_m) e o grau de cristalinidade (α_c) são características dos polímeros que são alteradas pelo processo de biodegradação sendo detectadas pelo método de calorimetria exploratória diferencial (DSC). Essas análises térmicas foram realizadas para determinar a temperatura de fusão e a porcentagem de cristalinidade das amostras de PET que foram submetidas ao contato com o extrato enzimático FT+CC (Tabela 12). As curvas de DSC para as amostras de PET estão apresentadas na figura 17.

Tabela 12: Características físicas obtidas por análise DSC para os fragmentos de PET

Amostra	T _m (°C)	ΔH _m (J.g ⁻¹)	X(%)
Controle	241,81	43,06	30,75
PET 1	241,3	46,65	32,89
PET 2	241,94	46,88	33,48

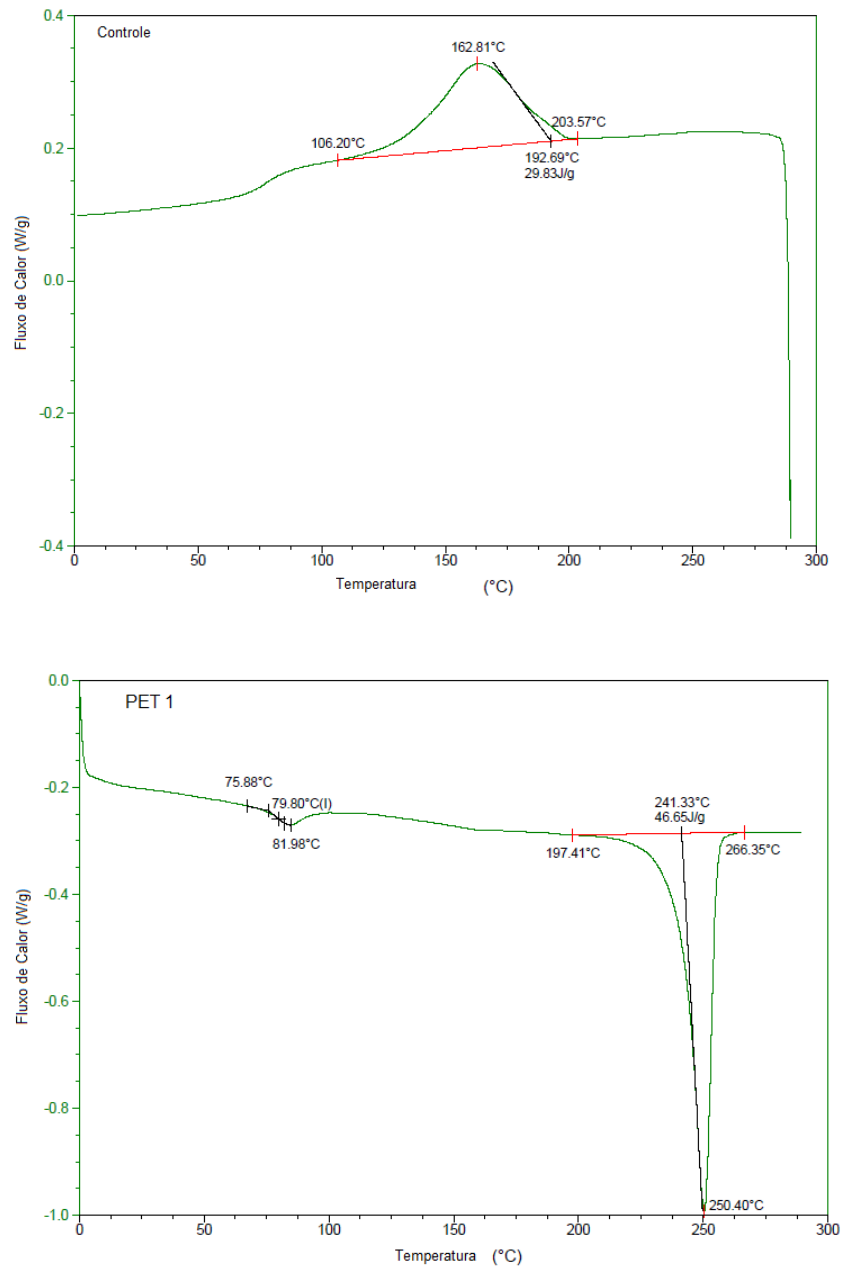
T_m (°C) = Temperatura de fusão; ΔH_m(J.g⁻¹) = entalpia de fusão; X (%) = percentagem de cristalinidade

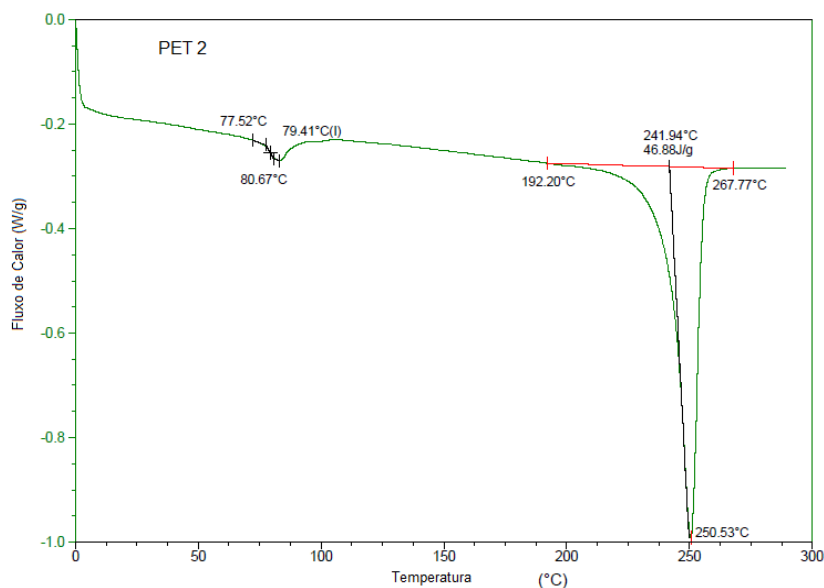
Fonte: Elaborada pela autora

Os resultados da percentagem de cristalinidade, demonstraram um aumento de 8% dos valores nos fragmentos de PET que foram submetidos ao contato com o extrato enzimático, sugerindo um consumo da fase amorfa do PET durante o processo de hidrólise enzimática. Ensaio de hidrólise enzimática pela cutinase no PET, sugerem que a cristalinidade do PET aumenta após a exposição a enzima em 27% (Ronkvist et al, 2009). Avaliações da cristalinidade dos polímeros lcPET e hcPET antes e depois do processo da hidrólise enzimática identificaram que para o PET de baixa cristalinidade (lcPET), pode-se observar que a cristalinidade aumenta com o aumento do nível de conversão, indicando que PETase teve preferência pelo PET amorfo (Chen *et al.*, 2022).

Pode se observar também, que os valores de entalpia de fusão aumentaram de 43,06 para 46,65 e 46, 88 J.g⁻¹. Segundo Faria et al. (2015), a entalpia de fusão aumenta devido à degradação da fase amorfa antes da fase cristalina, permanecendo assim uma maior porcentagem da fase cristalina.

Figura 17: Termogramas para fragmentos de PET





Fonte: Elaborada pela autora

Em todos os ensaios de hidrólise enzimática do presente trabalho, foi avaliado a perda de massa dos fragmentos de PET e a micragem da espessura, porém não foi identificado redução. Mesmo evidenciando alterações no polímero pela exposição à enzimas ou até mesmo à outras soluções como álcalis, não houve identificação de perda de massa, dessa forma pode-se concluir que a enzima é capaz de aumentar o caráter hidrofílico do PET, especialmente o amorfo, sem alterar a superfície, o volume e a massa desse substrato (Donelli *et al.*, 2009).

Após os ensaios realizados tanto nos extratos brutos quanto nos fragmentos de PET, antes e após a hidrólise enzimática, pode-se sugerir que houve pelo menos um início de degradação do polímero. Dessa forma algumas ações podem melhorar e intensificar esse processo de degradação do PET, como triagem de enzimas de alta temperatura de cepas hipertermofílicas, adaptação enzimática, modificação genética das cepas produtoras de enzimas e/ou implantação surfactantes e aditivos (Donelli *et al.*, 2009; Ahmadiatababaei *et al.*, 2021).

Ahmadiatababaei *et al.* (2021) afirmam que o PET que contém uma alta porcentagem de regiões amorfas é mais propenso a alterações enzimáticas. Os autores também afirmam que as reações de hidrólises enzimáticas do PET devem ocorrer sob as temperaturas próximas à temperatura de transição vítrea (T_g) do polímero (65 ~ 80°C), porém o PET de alta cristalinidade (30~40 %) representa os mais amplos tipos de plástico pós-consumo. Para o PET de alta cristalinidade os autores recomendam uma reação catalítica com suplementação de biossurfactantes

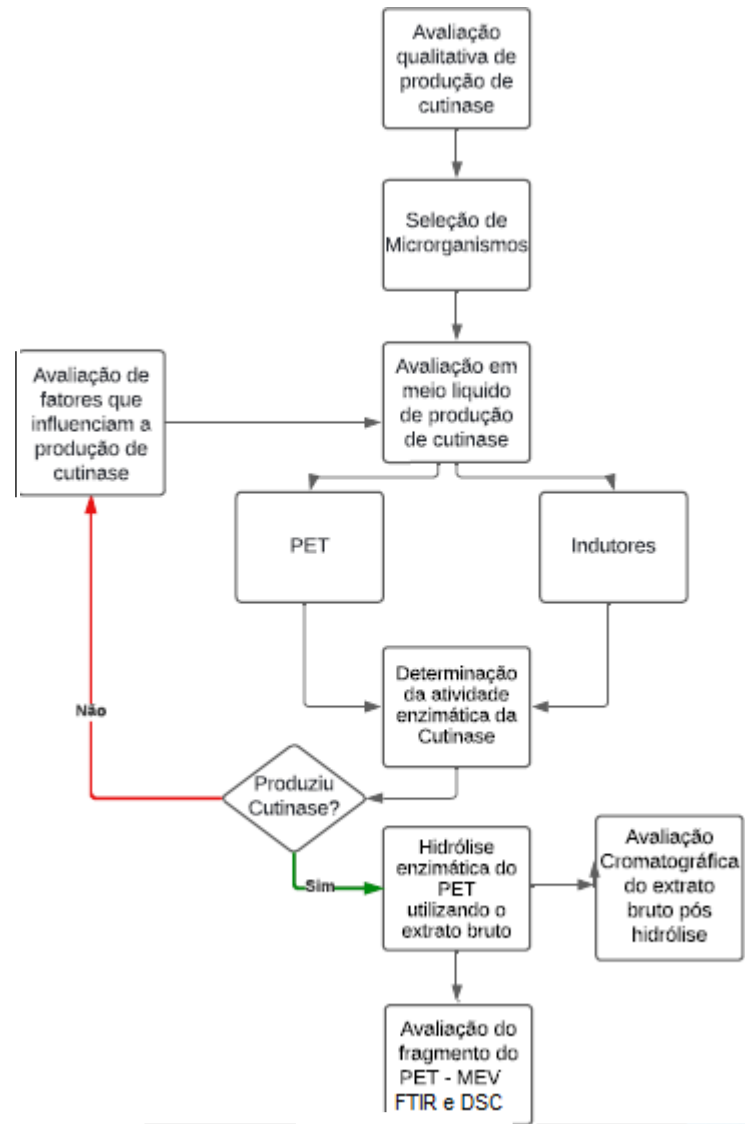
naturais (hidrofobinas) ou sintéticos (lauril sulfato de sódio), avaliação de diversas fontes de obtenção e concentração da enzima, temperatura de incubação e período de reação.

A atividade enzimática no PET também pode ser afetada pelas propriedades físicas do substrato, como porcentagem de cristalinidade, tamanho de partícula e superfície de contato (Donelli *et al.*, 2009; Hellesnes *et al.*, 2023).

Este estudo objetivou avaliar a produção de cutinase por linhagens fúngicas, estimar a interferência do pH, agitação e meio de cultivo, além de avaliar o potencial da enzima para degradação do PET. Foram buscadas todas as ferramentas disponíveis para que os objetivos fossem cumpridos (Figura 18), incluindo a troca de informações com expertises na área e a vasta leitura de artigos científicos. A intenção inicial de encontrarmos uma linhagem promissora para produzir cutinase não foi alcançada como desejado, mas vale a pena ressaltar que o desafio aqui enfrentado cumpriu com a tarefa de um aprendizado bem fundamentado em termos de técnicas, essencial para a proposta de futuros projetos nessa linha de pesquisa.

Microrganismos constituem poderosas fontes de moléculas ativas de grande aplicação em inúmeras demandas criadas pelo ser humano, contudo sabe-se que sistemas biológicos estão sujeitos a variações, o que pode ser o caso das linhagens aqui estudadas. Atualmente, pesquisadores encorajam a busca por linhagens isoladas de ambientes inóspitos, capazes de produzir enzimas em condições adversas, principalmente de fungos em função de apresentarem uma capacidade incomum de adaptação. À continuidade da busca por um microrganismo de alta produção de cutinase, novas linhagens serão investigadas.

Figura 18: Fluxograma do presente trabalho ao cumprir os objetivos propostos



Fonte: Elaborado pela autora

5 Conclusões

Esse estudo conclui que mesmo o gênero *Fusarium* sendo reconhecidamente um promissor para produção de cutinase, o cultivo da linhagem CBMAI 2266 ainda precisa de otimização para demonstrar uma atividade enzimática competitiva.

Conclui-se que o fragmento de PET utilizado como única fonte de carbono, no meio de cultivo empregado nesse estudo, não favorece a produção de cutinase. Acredita-se que tratado previamente de forma mecânica venha fornecer melhores resultados.

Dentre as fontes de carbono que agiram como indutores aumentando a produção de cutinase, a cutina e o farelo de trigo são os mais recomendados.

A avaliação da ação da cutinase sobre o PET, por meio da combinação de vários ensaios como o FTIR, DSC, MEV e CG-MS, sugerem que a enzima pode atuar no processo de hidrólise do PET, demonstrando a importância da realização desses ensaios quando se investiga a hidrólise de polímeros. Outros ensaios também podem ser utilizados em estudos futuros para avaliar a hidrólise enzimática, como a cromatografia líquida e avaliação de ângulo de contato.

Baseado nos resultados obtidos, conclui-se a importância de uma etapa de seleção de microrganismos produtores de cutinase utilizando métodos qualitativos, possibilitando avaliar um número maior de linhagens, pois o tempo de crescimento e avaliação seria menor.

6 Referências Bibliográficas

- ABIPET - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE EMBALAGEM. **Estudo sobre a indústria de reciclagem do plástico no Brasil**. 2022. Disponível em: <https://abipet.org.br/wp-content/uploads/2022/12/Infografico_12_Censo_da_Reciclagem_no_Brasil-Novembro_2022.pdf>. Acesso em: 15 abr 2024.
- ACOSTA, M. B. R. *et al.* Enzimas hidrolíticas (DNAses, lipases e proteases) secretadas por *Cladosporium cladosporioides* isolado de solo e seu potencial de aplicação em biotecnologia. **Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología**, Norteamérica, 37, p. 61-65, 2017.
- ADIGÜZEL, A.O.; TUNÇER, M. Purification and characterization of cutinase from *Bacillus* sp. KY0701 isolated from plastic wastes. **Prep. Biochem. Biotechnol.**, 47, p. 925–933, 2017.
- AGUIAR, A. R. *et al.* Seleção de isolados de *Trichoderma spp.* na promoção de crescimento de mudas do feijoeiro cv. carioca e controle de *Sclerotinia sclerotiorum*. **Ciência e Natura UFSM**, 34 (2), p. 47-58, 2013.
- AHMADITABATABAEI, S.; KYAZZE, G.; IQBAL, H. M. N.; KESHAVARZ, T. Fungal Enzymes as Catalytic Tools for Polyethylene Terephthalate (PET) Degradation. **J. Fungi**, 7, 931, 2021.
- ALBURQUERQUE M. C. C. *et al.* Aplicações de enzimas na síntese e na modificação de polímeros. **Quim. Nova**, v. 37, nº. 4, p. 699-708, 2014.
- ALISCH, M. *et al.* Biocatalytic modification of polyethylene terephthalate fibres by esterases from actinomycete isolates. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 22, n. 5– 6, p. 347–351, 2004.
- AMMALA, A.; BATEMAN, S.; DEAN, K.; PETINAKIS, E.; SANGWAN, P.; WONG, S.; YUAN, Q.; YU, L.; PATRICK, C.; LEONG, K. H. An overview of degradable and biodegradable polyolefins. **Progress in polymer science**, Londres, v. 36, p. 1015-1049, 2011.
- AMORIM, C. C.; MIRANDA, E. A.; FARINAS C. S. Liquefação de farelo de trigo para a produção de Xilanases por cultivo submerso com *Aspergillus niger*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA, n. XXI., 2016, Fortaleza - Ce.
- ANBALAGAN, S., *et al.* Hydrolytic Degradation of Polyethylene Terephthalate by Cutinase Enzyme Derived from Fungal Biomass–Molecular Characterization. **Biointerface Res. Appl. Chem.** V.12, p. 653–667, 2021.
- AUSTIN, H. P. *et al.* Characterization and engineering of a plastic-degrading aromatic polyesterase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 115, n 19, 2018.

AWAJA, F.; PAVEL, D. Recycling of PET. **Eur. Polym. J.**, v. 41, n. 7, p.1453 – 1477, 2005.

BAKKER, C. M. C. N. **Avaliação da produção e aplicação de enzimas utilizando resíduos de farelo de trigo como substrato por fermentação em estado sólido**. 2017. Tese (Engenharia Química). Universidade Federal do Rio Grande do Norte. 2017.

BRASIL. Resolução da diretoria colegiada - RDC Nº 326, de 3 de dezembro de 2019. Estabelece a lista positiva de aditivos destinados à elaboração de materiais plásticos e revestimentos poliméricos em contato com alimentos e dá outras providências. Brasília (DF): MS; 2019. Brasil.

BENSCH, K.; GROENEWALD, J.Z.; BRAUN, U.; DIJKSTERHUIS, J.; DE JESÚS YÁÑEZ-MORALES, M.; CROUS, P.W. Common but different: The expanding realm of Cladosporium. **STUDIES IN MYCOLOGY** 82: 23–74, 2015.
<https://doi.org/10.1016/j.simyco.2015.10.001>

BENTES, V.L.I. **Hidrólise básica de resíduos poliméricos pós consumo e degradação catalítica dos monômeros de partida**. 2008. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2008.

BONOGLI-SANTOS R. C. *et al.* Enhanced textile dye decolorization by marine-derived basidiomycete *Peniophora* sp. CBMAI 1063 using integrated statistical design. **Environ Sci Pollut Res**, 23:8659–8668 2016, 2016.

BOTERO W. B. **Bioprospecção e isolamento de metabólitos de *Microsphaeropsis arundinis*, um fungo endofítico de *Paepalanthus planifolius* (Eriocaulaceae)**. 2018. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2018.

BUCIOLI, E. C. *et al.* Benefits of Disposing Polyhydroxybutyrate-Co-Hydroxyvalerate (PHBV). **Int J Waste Resour**, Vol. 11 Iss. 8 No: 419, 2021.

Blends in Soil, as Alternative for Low Density Polyethylene

BYUN, Y.; KIM, Y. T. Utilization of Bioplastics for Food Packaging Industry. In: HAN, J. **Innovations in Food Packaging** [s.l.] Elsevier Ltd, 369-389, 2013.

CAETANO, M. M. C. M. **Avaliação do potencial de fungos endofíticos e fitopatogênicos em relação à produção da enzima cutinase**. 2020. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia) - Universidade Federal de São Carlos, 2020.

CANEVALORO JR, S. V. **Ciência dos Polímeros**: Um texto básico para tecnólogos e engenheiros. 1ª edição. São Paulo: Artliber editora, 2002. p. 183.

CAPRARA C. S. C. **Processo de obtenção e caracterização de proteases extracelulares expressas por *Penicillium restrictum***. 2015. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade de Brasília, Brasília, 2015.

CASTRO, A. M., *et al.* Screening of commercial enzymes for poly (ethylene terephthalate) (PET) hydrolysis and synergy studies on different substrate sources. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.** 44, 835–844, 2017.

CHAMAS, A; MOON, H; ZHENG, J; QIU, Y; TABASSUM, T; JANG, J.H; ABU-OMAR, M; SCOTT, S.L and SUH, S. Degradation Rates of Plastics in the Environment. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering.** 2020.

CHEN, S., SU, L., CHEN, J. e WU, J. Cutinase: characteristics, preparation, and application. **Biotechnol. Adv.** 31, 1754–1767, 2013.

CHEN, Z. *et al.* The thermal analysis of poly(ethylene terephthalate) by FTIR spectroscopy. **Thermochimica Acta** 552 (2013) 123– 130.

CHEN, Z. *et al.* Biodegradation of highly crystallized poly(ethylene terephthalate) through cell surface codisplay of bacterial PETase and hydrophobin. **Nature Communications**, 2022, 13:7138.

COCACOLA. **Coca-Cola partilha a sua tecnologia Plantbottle para melhorar a sustentabilidade das embalagens.** 2019. Disponível em:< <https://www.coca-cola.com/pt/pt/sustainability/plantbottle-melhorar-sustentabilidade-embalagens> >. Acesso em: abr. 2024.

COELHO, A. **Desenvolvimento morfológico sob deformação de nanocompósitos de PET e nanotubos de carbono.** 2013. Dissertação (mestrado em Engenharia de Polímeros). Universidade do Minho. Braga, Portugal, 2013.

COLLA, E. *et al.* Optimization of trehalose production by *Rhodotorula dairenensis* following a sequential strategy of experimental design. **Food and bioprocess technology**, v. 3, 265–275, 2010.

COSTA, C. Z. *et al.* Degradação microbiológica e enzimática de polímeros: uma revisão. **Quim. Nova**, v. 38, n. 2, p.259-267, 2015.

CRUZ, H. J. M. **Estudo químico e avaliação das atividades antimicrobianas, anticolinesterásica e larvicida do fungo *Curvularia lunata* e levantamento quimiotaxonômico do complexo *Curvularia-Bipolaris-Cochliobolu*.** 2013. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2013.

DANSO, D. *et al.* New insights into the function and global distribution of polyethylene terephthalate (PET) degrading bacteria and enzymes in marine and terrestrial metagenomes. **Appl. Environ. Microbiol.** V. 84 n 8, 2018.

DEGANI, O. Production and Purification of Cutinase from *Fusarium oxysporum* Using Modified Growth Media and a Specific Cutinase Substrate. **Advances in Bioscience and Biotechnology**, 6(4):245-258, 2015.

DIN, S. U. *et al.* The Purification and Characterization of a Cutinase-like Enzyme with Activity on Polyethylene Terephthalate (PET) from a Newly Isolated Bacterium *Stenotrophomonas maltophilia* PRS8 at a Mesophilic Temperature. **Appl. Sci.** 2023, 13, 3686.

DONELLI I. *et al.* Surface structure and properties of poly-(ethylene terephthalate) hydrolyzed by alkali and cutinase. **Polymer Degradation and Stability**, 95, p. 1542-1550, 2010.

DUTTA, K., SEN, S. e VEERANKI, V. D. (2009). Production, characterization and applications of microbial cutinases. **Process Biochem.** 44, 127–134, 2009.

EDGE, M. *et al.* Characterisation of the species responsible for yellowing in melt degraded aromatic polyesters-I: Yellowing of poly(ethylene terephthalate). **Polymer Degradation and Stability** 53 (1996) 141-151.

EGMOND, M.R.; VLIEG, J. *Fusarium solani pisi* Cutinase. **Biochimie**, v. 82, 1015-1021, 2000.

EL-ENSHASY, H.A. Filamentous fungal cultures: process, characteristics, products and applications. **Elsevier**. p. 241-265. 2007.

FABRIS, S. **Desenvolvimento e validação de método analítico para a determinação de contaminantes voláteis provenientes de embalagens de PET (polietileno tereftalato) e sua aplicação em PET pós-consumo.** 2007.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP: [s.n.], 2007.

FARIA, A. U.; MARTINS-FRANCHETTI, S. Biodegradação de Filmes de Polipropileno (PP), Poli(3-hidroxibutirato) (PHB) e Blenda de PP/PHB por Microrganismos das Águas do Rio Atibaia. **Polímeros**, vol. 20, nº 2, p. 141-147, 2010.

FARIA, P. C .; WISBECK, E.; DIAS, L. P. Biodegradação de polipropileno reciclado (ppr) e de poli (tereftalato de etileno) reciclado (petr) por *Pleurotus ostreatus*. **Revista Matéria**, v.20, n.2, pp. 452 – 459, 2015.

FICH, E. A., *et al.* The plant polyester cutin: Biosynthesis structure, and biological roles. **Annual Review of Plant Biology**, 67 (1), 2016.

FRAGA, L.P. **PRODUÇÃO DE CUTINASE POR *Fusarium oxysporum* UTILIZANDO SUB-PRODUTOS AGROINDUSTRIAIS.** 2008. Dissertação de mestrado em Ciência de Alimentos - Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP: [s.n.], 2008.

GAO Y. *et al.* **Purification and characterization of a novel chlorpyrifos hydrolase from *Cladosporium cladosporioides* Hu-01.** **PLoS ONE**. 2012. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0038137>>. Acesso em: fev. 2019.

GHAZALI, F. M. *et al.* Biodegradation of hydrocarbons in soil by microbial consortium. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 54, 61 – 67, 2004.

GEYER, R., JAMBECK, J. R. e LAW, K. L. Production, use, and fate of all plastics ever made. **Sci. Adv.** **3**: e1700782, 2017.

GOMES D. S. *et al.* Production of heterologous cutinases by *E. coli* and improved enzyme formulation for application on plastic degradation. **Electronic Journal of Biotechnology**, Vol. 16 No. 5, 2013.

GONÇALVES-DIAS S. L. F.; TEODÓSIO, A. S. S. Reciclagem do PET: desafios e possibilidades. **XXVI ENEGEP** - Fortaleza, CE, Brasil, 2006.

GRIEBELER, N. *et al.* Isolation and screening of lipase-producing fungi with hydrolytic activity, **Food Bioprocess Technol.**, v. 4, n.4, p. 578–586, 2011.

GUEVARA M. *et al.* Efecto antagónico de una cepa de *Trichoderma* sp sobre *Fusarium* sp. En planta de tomate Río Grande (*Solanum lycopersicum*). **Revista de Investigación y Cultura**, vol. 5, núm. 1, 2016.

Heinen, W. On the enzymatic degradation of cutin. IV. Separation of cutinase from associated oxidative enzymes. **Enzymologia** 1963, 25, 281–291.

HELLESNES, K. N. *et al.* Biochemical Characterization and NMR Study of a PET-Hydrolyzing Cutinase from *Fusarium solani* pisi. **Biochemistry** 2023, 62, 1369 – 1375

HIRAGA, K., TANIGUCHI, I., YOSHIDA, S., KIMURA, Y. e ODA, K. Biodegradation of waste PET: a sustainable solution for dealing with plastic pollution. **EMBO Rep.** 20:e49365, 2019.

IOAKEIMIDIS, C; FOTOPOULOU, K.N; KARAPANAGIOTI, H.K. The degradation potential of PET bottles in the marine environment: An ATR-FTIR based approach. **Sci Rep.** 2016.

JADULCO, R. *et al.* New metabolites from sponge-derived fungi *Curvularia luneta* and *Cladosporium herbarum*, **Journal of Natural Products**, v. 65, p. 730-733, 2002.

JAVED, M. M. *et al.* Wheat bran as a brown gold: Nutritious value and its biotechnological applications. **African Journal of Microbiology Research**, v. 6, p. 724-733, 2012.

JOO, S. *et al.* Structural insight into molecular mechanism of poly(ethylene terephthalate) degradation. **Nature Communications**, v. 9, 382, 2018.

KÄPLER A. *et al.* Analysis of environmental microplastics by vibrational microspectroscopy: FTIR, Raman or both? **Anal Bioanal Chem**, 408:8377–8391, 2016.

KAWAI, F. *et al.* Current knowledge on enzymatic PET degradation and its possible application to waste stream management and other fields. **Applied Microbiology and Biotechnology** v. 103:4253–4268, 2019.

KOSHTI, R., MEHTA, L., AND SAMARTH, N. Biological recycling of polyethylene terephthalate: a mini-review. **J. Polym. Environ.** 26, 3520–3529, 2018.

KUMAR B. A., *et al.* Wheat bran fermentation for the production of cellulase and xylanase by *Aspergillus niger* NFCCI 4113. **Research Journal of Biotechnology**, v. 13, 2018.

KUMARI, V. *et al.* Optimization of medium parameters by response surface methodology (RSM) for enhanced production of cutinase from *Aspergillus* sp. RL2Ct. **3 Biotech**, v. 6:149, 2016.

KUMARI, A. *et al.* Transcriptome-Guided Insights Into Plastic Degradation by the Marine Bacterium. **Front. Microbiol.** 12:751571. 2021. doi: 10.3389/fmicb.2021.751571

KRÜGER, C. **Síntese enzimática de éster do biodiesel a partir de lipases fúngicas de *Penicillium sumatrense* produzidas por fermentação no estado sólido.** 2017. 84 f. Dissertação (Mestrado em Bioenergia) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo, 2017.

KYAW, B. M. *et al.* Biodegradation of Low Density Polythene (LDPE) by *Pseudomonas* Species. **Indian J Microbiol** (July–Sept 2012) 52(3):411–419

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

LOPES, I.R.; CANELLAS, A.L.B.; DE OLIVEIRA, B.F.R.; LAPORT, M.S. Microrganismos marinhos: um reservatório de hidrolases biotecnologicamente interessantes. **Revista da Biologia**. 2023. vol,22p 32-46.

LOWRY, O. H., *et al.* Protein measurement with the Folin-Phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p; 265-276, 1951.

LISBOA, Paulo Henrique Gomes. **Caracterização de rizobactérias associadas à *Solanum lycocarpum* St. Hil.** quanto ao potencial biotecnológico para promoção de crescimento vegetal, enzimas e agentes antimicrobianos. 2020. Dissertação (Programa de Pós-graduação em Biotecnologia) – UFSCar, São Carlos, 2020.

LUCAS, N. *et al.* Polymer biodegradation: mechanisms and estimation techniques, **Chemosphere**, Oxford, v. 73, p. 429-442, 2008.

LUO J. *et al.* Arundinols A – C and Arundinones A and B from the Plant Endophytic Fungus *Microsphaeropsis arundinis*. **J. Nat. Prod.**, 76, p. 107 – 112, 2013.

MACEDO, G. A.; PIO, T. F. A Rapid Screening Method for cutinase producing microorganisms. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 36, p. 388-394, 2005.

MACEDO, G.; PIO, T. Optimizing cutinase production by *Fusarium oxysporum* in liquid medium using response surface methodology. **Journal of Biotechnology**, v. 131, n. 2, p. S211–S212, 2007.

MACEDO, I. M. E. *et al.* Reciclagem do Polietileno Tereftalato (PET) no Fomento da Economia Circular. **Braz. J. of Develop.**, Curitiba, v.6, n.8, p.57704-57723, aug.2020.

MACHADO D. F. M. *et al.* *Trichoderma* no Brasil: O Fungo e o bioagente. **Revista de Ciências Agrárias**, Vol. 35, 1, 26: p. 274-288, 2012.

MAEDA, H., YAMAGATA, Y., ABE, K. *et al.* Purification and characterization of a biodegradable plastic-degrading enzyme from *Aspergillus oryzae*. **Appl Microbiol Biotechnol** 67, 778–788, 2005.

MAEDA, H. *et al.* Purification and characterization of a biodegradable plastic-degrading enzyme from *Aspergillus oryzae*. **Appl Microbiol Biotechnol** (2005) 67: 778–788.

MALAFATTI-PICCA, L. **Despolimerização de Polietilenotereftalato (PET) mediada por fungos filamentosos**. 2018. Tese (doutorado em Ciências Biológicas) - Microbiologia Aplicada. - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro, 2018.

MALAFATTI-PICCA, L. *et al.* Hydrocarbon-associated substrates reveal promising fungi for poly(ethylene terephthalate) (PET) depolymerization. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 50, n. 3, p. 633-648, 2019.

MALAFATTI-PICCA, L. *et al.* Fungal Screening for Potential PET Depolymerization. **Polymers** 2023, 15, 1581.

MANRICH A. *et al.* **Extração e caracterização de cutina de casca de maçã**. IX Workshop de Nanotecnologia Aplicada ao Agronegócio. Embrapa Instrumentação, São Carlos/SP, 21 a 22 de Novembro de 2017.

MARÍN-MOROCHO, K. *et al.* Identification of Potential Migrants in Polyethylene Terephthalate Samples of Ecuadorian Market. **Polymers** 2021, 13, 3769.

MAURIA, A.; BHATTACHARYA, A.; KHARE, S. K. Enzymatic Remediation of Polyethylene Terephthalate (PET)–Based Polymers for Effective Management of Plastic Wastes: An Overview. **Front. Bioeng. Biotechnol.** 8:602325, 2020.

MECOZZI, M. e NISINI, L. The differentiation of biodegradable and non-biodegradable polyethylene terephthalate (PET) samples by FTIR spectroscopy: A potential support for the structural differentiation of PET in environmental analysis. **Infrared Physics and Technology** 101 (2019) 119–126.

MICHEREFF, S.J. *et al.* Variabilidade de isolados de *Alternaria brassicicola* no estado de Pernambuco. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n.6, p. 656-663, nov./ dez. 2003.

MILANESI, P.M. **Caracterização, toxicidade e patogenicidade de *Fusarium* spp. em genótipos de soja em sistema plantio direto**. 2009. 91 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2009.

MIRANDA G. M. **Avaliação do comportamento de degradação de blenda de PEBD com aditivo PEPZYME™**. 2017. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Tecnologia de Materiais) - Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2017.

MOHAMED M. A. *et al.* Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy, in: Nidal, H., Ahmad Fauzi, I., Takeshi, M., Darren, O.-R. (Eds.), *Membrane Characterization*. **Elsevier**, p. 3-29, 2017.

MOURA L. F. W. G. *et al.* Isolamento e identificação de fungos associados às plantas medicinais nativas da caatinga da região dos Inhamuns, Tauá, Ceará, Brasil. **Essentia**, Sobral, v. 17, n. 2, p. 43-63, 2016.

MÜLLER. R-J. *et al.* Enzymatic Degradation of Poly(ethylene terephthalate): Rapid Hydrolyse using a Hydrolase from *T. fusca*. **Macromol. Rapid Commun.** V.26, p.1400–1405, 2005.

National Center for Biotechnology Information (2024). **PubChem Compound Summary**. Retrieved February 20, 2024 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/>.

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

NOWAK, B. *et al.* Biodegradation of poly(ethylene terephthalate) modified with polyester “Bionolle®” by *Penicillium funiculosum*. **Polimery/Polymers**, v. 56, n. 1, p. 35–44, 2011.

OLIVEIRA, C. T. **Produção, concentração e caracterização de cutinase microbiana**. 2018. Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). 2018.

PATEL N. *et al.* Lipases: Sources, Production, Purification, and Applications. **Recent Patents on Biotechnology**, vol. 12, nº. 4, 2018.

PARK, S. H. e KIM, S. H. Poly (ethylene terephthalate) recycling for high value added textiles. **Fash. Text.** 1:1, 2014.

PARMAR, A. S.; RAHI, D. K. Cutinase production from *Fusarium verticillioides* using response surface methodology and its application as potential insecticide degrader. **Environmental Science and Pollution Research** (2023) 30:86484–86497.

PEREIRA A. P. S. *et al.* Processing and Characterization of PET Composites Reinforced With Geopolymer Concrete Waste. **Materials Research.**, 20(Suppl. 2): 411-420 , 2017.

PEWTRUSTS. The Pew Charitable Trusts. **BREAKING THE PLASTIC WAVE: A Comprehensive Assessment of Pathways Towards Stopping Ocean Plastic Pollution.** 2020. Disponível em: <https://www.pewtrusts.org/-/media/assets/2020/07/breakingtheplasticwave_report.pdf>. Acesso em abr. 2024.

PICPLAST- Plano de incentivo à cadeia do plástico. **Monitoramento dos índices de reciclagem mecânica de plásticos pós-consumo no Brasil.** Webinar, 2023. Disponível em: < https://www.abiplast.org.br/wp-content/uploads/2023/11/Indices-Reciclagem-2022_PICPlast_Webinar_20out23_Revisado_2.pdf>. Acesso em: abr, 2024.

PIO, T. F.; MACEDO, G. A. Optimizing the production of cutinase by *Fusarium oxysporum* using response surface methodology. **Enzyme and Microbial Technology**, 41, 613–619, 2007.

PLIEGO, J., *et al.* Monitoring Lipase/Esterase Activity by Stopped Flow in a Sequential Injection Analysis System Using p-Nitrophenyl Butyrate. **Sensors**, v. 15, p. 2798-2811, 2015.

PHILIP, S.; KESHAVARZ, T.; ROY, I. Polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymers with a range of applications. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 82, n. 3, p. 233-247, 2007.

QUARTINELLO, F., *et al.* Synergistic chemo-enzymatic hydrolysis of poly(ethylene terephthalate) from textile waste. **Microbial. Biotechnol.** 10, 1376–1383, 2017.

RABELLO, M.S.; WELLEN, R.M.R. “Estudo da Cristalização a Frio do Poli (tereftalato de etileno) (PET) para Produção de Embalagens”, **Revista Eletrônica de Materiais e Processos.** v.3, n. 2, p. 1-9, 2008.

RANI M., *et al.* Qualitative Analysis of Additives in Plastic Marine Debris and Its New Products. **Arch Environ Contam Toxicol** (2015) 69:352–366.

RATAJSKA, M.; BORYNIEC, S. Physical and chemical aspects of biodegradation of natural polymers. **Reactive and Functional Polymers**, v. 38, n. 1, p. 35-49, 1998.

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

ROCHMAN, C. M. *et al.* Classify plastic waste as hazardous. **Nature**, v. 494, p. 169-171, 2013.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos: uma estratégia seqüencial de planejamentos**, Campinas, SP, Casa do Pão Editora, 2005.

RODRIGUES G. S. *et al.* Antagonismo de *Trichoderma spp.* ao agente etiológico da Murcha de Ceratocystis em cacauero. **Summa Phytopathol.**, Botucatu, v. 44, n. 1, p. 72-78, 2018.

ROMÃO, W., SPINACÉ, M.A.S., DE PAOLI, M.A. "Poli(Tereftalato de Etileno), PET: Uma Revisão Sobre os Processos de Síntese, Mecanismos de Degradação e sua Reciclagem". **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 19, n. 2, p. 121-132, 2009.

RONKVIST, A. M. *et al.* Cutinase-Catalyzed Hydrolysis of Poly(ethylene terephthalate). **Macromolecules** 2009, 42, 5128–5138

ROZENDO, A. D. R. **Reciclagem química do Poli(tereftalato de etileno) (PET) pós-consumo por aminólise e aplicação na síntese de Poli(éster-amida)**. (2011). Dissertação (mestrado em Ciência e Tecnologia de Polímeros) - Instituto de Macromoléculas - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

RUEDA-RUEDA, H. *et al.* Cutinases obtained from filamentous fungi: a comparison of screening methods. **Revista DYNA**, 87(214), pp. 183-190, July - September, 2020.

SALES, J. C. S. **Produção de enzimas por *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 em fermentação no estado sólido visando o uso biodespolimerização**. 2018. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2018.

SAN-MARTÍN A., PAINEMAL K., DÍAZ Y., MARTÍNEZ C., ROVIROSA J. Metabolites from the marine fungus *Cladosporium cladosporioides*. **An Asoc Quím Argent**, 93:247-51, 2005.

SANTOS-BENEIT, F. *et al.* Screening Enzymes That Can Depolymerize Commercial Biodegradable Polymers: Heterologous Expression of *Fusarium solani* Cutinase in *Escherichia coli*. **Microorganisms**, 11, 328, 2023.

SANTOS, M. F. C. *et al.* Phytotoxins isolated of *Curvularia sp* fungi associated with *Spigelia anthelmia*. 31ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química - **Sociedade Brasileira de Química (SBQ)**, 2008.

SANTOS, R. C. B. **Fungos isolados de macro-organismos marinhos brasileiros: Diversidade genética e potencial biotecnológico**. 2010. Tese (doutorado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.

SEMAN, W. M. K. W. *et al.* High level expression of *Glomerella cingulate* cutinase in dense cultures of *Pichia pastoris* grown under fed-batch conditions. **Journal of Biotechnology**, v. 184, p. 219–228, 2014.

SEN, R.; SWAMINATHAN, T. Response surface modeling and optimization to elucidate and analyze the effects of inoculum age and size on surfactin production. **Biochemical Engineering Journal**, 21, p. 141–148, 2004.

SEPPERUMAL, U.; MARKANDAN, M.; PALRAJA, I. Micromorphological and chemical changes during biodegradation of Polyethylene terephthalate (PET) by *Penicillium* sp . **Journal of Microbiology and Biotechnology Research**, v. 3, n. 4, p. 47–53, 2013.

SEVERO M. G.; MORAES, K.; RUIZ, W. A. Modificação enzimática da farinha de arroz visando a produção de amido resistente. **Quim. Nova**, vol. 33, nº 2, p. 345-350, 2010.

SEVILLA et al. Degradation of PET Bottles by an Engineered *Ideonella sakaiensis* PETase. **Polymers**, 15, 1779, 2023.

SHAH, A.; HASAN, F.; HAMEED, A.; AHMED, S. Biological degradation of plastics: A comprehensive review. **Biotechnology Advances**, v. 26, n. 3, p. 246-265, 2008.

SHAHNAWAZ, M. et al. Bacteria-based polythene degradation products: GC-MS analysis and toxicity testing. **Environ Sci Pollut Res**, 2016.

SARKHEL, R. et al. Comparative biodegradation study of polymer from plastic bottle waste using novel isolated bacteria and fungi from marine source. **Journal of Polymer Research** (2020) 27:16.

SHARON C.; SHARON M. Studies on Biodegradation of Polyethylene terephthalate: A synthetic polymer. **J. Microbiol. Biotech. Res.**, 2 (2):248-257 , 2012.

SILVA, K.R.I.S. **Biodegradação de polietileno tereftalato (pet) por fungos ligninolíticos**. 2009. 193 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Departamento Ciência de Alimentos, Unicamp, Campinas, 2009.

SILVA, C. T. **Avaliação de metodologia de obtenção do ácido tereftálico via reciclagem química do pet**. 2012. 110 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Escola de Química, Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

SINGH, A et al. Techno-economic, life-cycle, and socioeconomic impact analysis of enzymatic recycling of poly(ethylene terephthalate). **Joule**. 2021.

SINGH, R. et al. Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. **3 Biotech**, v. 6, n. 174, p. 1-15, 2016.

SMITH, B. C. Infrared Spectroscopy of Polymers, VIII: Polyesters and the Rule of Three. **Spectroscopy**, v. 37, Issue, 10 p. 25–28, 2022.

SOARES JR., A. B. **Produção do poli(tereftalato de etileno) modificado com glicerol e derivados**. 2010. Dissertação de Mestrado em Engenharia Química - COPPE, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

SOARES, I. et al. Fungos na Biorremediação de Áreas Degradadas. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 78, n. 2, p. 341-350, abr./jun. 2011.

SONNENDECKER, C. *et al.* Low Carbon Footprint Recycling of Post-Consumer PET Plastic with a Metagenomic Polyester Hydrolase. **ChemSusChem**, v. 15, n. 9, p. e202101062, 2022.

SPERANZA P. **Caracterização bioquímica de cutinases produzidas em diferentes meios de cultivo por *Fusarium oxysporum* e avaliação do potencial enantiosseletivo destas enzimas**. 2010. Dissertação (mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, 2010.

SPERANZA, P.; CARVALHO, P. O.; MACEDO, G. A. Effects of different solid state fermentation substrate on biochemical properties of cutinase from *Fusarium* sp. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 72, 181-186, 2011.

SOOKSAI, T. *et al.* Production of cutinase from *Fusarium falciforme* and its application for hydrophilicity improvement of polyethylene terephthalate fabric. **3 Biotech**. V. 9:389, 2019.

STEFANELLI, T. K. T. D. **Remoção de corante de poli(tereftalato de etileno) (PET) através de recristalização e sua posterior despolimerização em meio ácido**. 2013. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química, Campinas, 2013.

TANIGUCHI, I., YOSHIDA, S., HIRAGA, K., MIYAMOTO, K., KIMURA, Y., and ODA, K. Biodegradation of PET: current status and application aspects. **ACS Catal.** 9, 4089–4105, 2019.

THAKKAR A.; SARAF M. Application of Statistically Based Experimental Designs to Optimize Cellulase Production and Identification of Gene. **Nat. Prod. Bioprospect**, 4: p. 341–351, 2014.

TINOCO, M. L. P. **Silenciamento Trans-Específico in vivo entre fumo e o fungo patogênico *Fusarium verticillioides***. 2010. Tese (doutorado em Biologia Molecular) – Universidade de Brasília, Departamento de Biologia Celular, Brasília, 2010.

TOURNIER, V., *et al.* An engineered PET depolymerase to break down and recycle plastic bottles. **Nature** 580, 216–219, 2020.

TUDZYNSKI, B. Nitrogen regulation of fungal secondary metabolism in fungi. **Front Microbiol.** 2014 Nov 28;5:656.

WANG, Feifei *et al.* Microplastic characteristics in organisms of different trophic levels from Liaohe Estuary, China. **Science of The Total Environment**, v. 789, p. 148027, 2021.

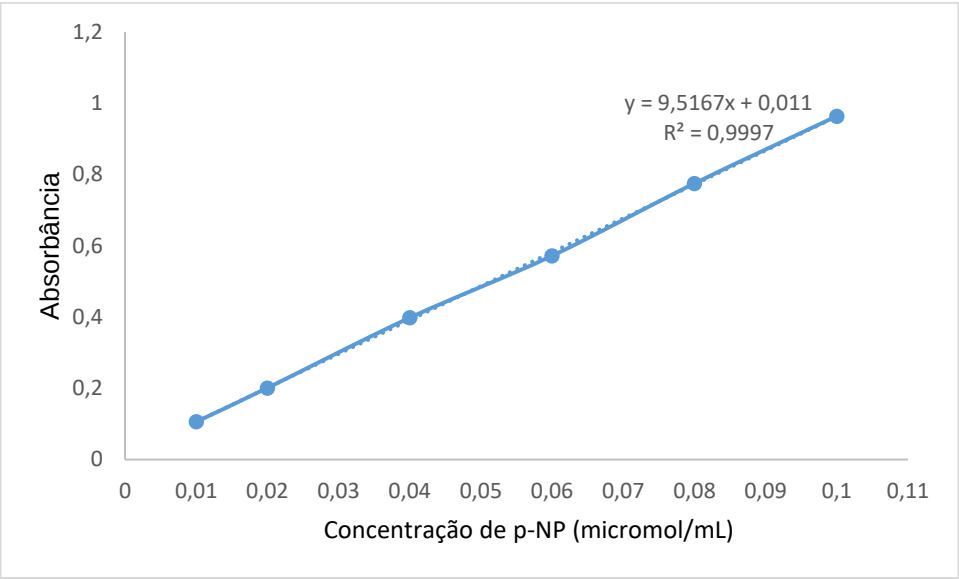
WENG, Y. X., WANG, L. ZHANG, M., WANG X. L., WANG, Y. Z. Biodegradation behavior of P (3HB, 4HB)/PLA blends in real soil environments. **Polymer testing**, v. 32, p. 60-70, 2013.

YOSHIDA, S. *et al.* Response to Comment on “A bacterium that degrades and assimilates poly(ethylene terephthalate)”. **Science**, v. 353, n. 6301, p. 759–759, 2016.

ZIMMERMANN, W.; BILLIG, S. Enzymes for the Biofunctionalization of Poly(Ethylene Terephthalate). **Adv Biochem Engin/Biotechnol**, v. 125: p. 97-120, 2010.

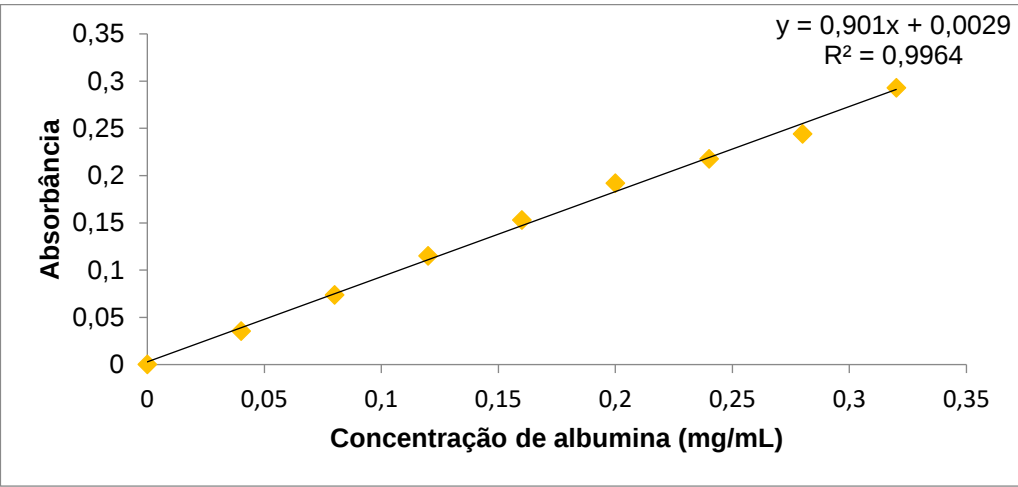
Anexos

Gráfico 1: Curva padrão de p-nitrofenol para ensaio de atividade enzimática.



Fonte: Elaborado pela autora

Gráfico 2: Curva padrão de albumina para ensaio de proteínas



Fonte: Elaborado pela autora