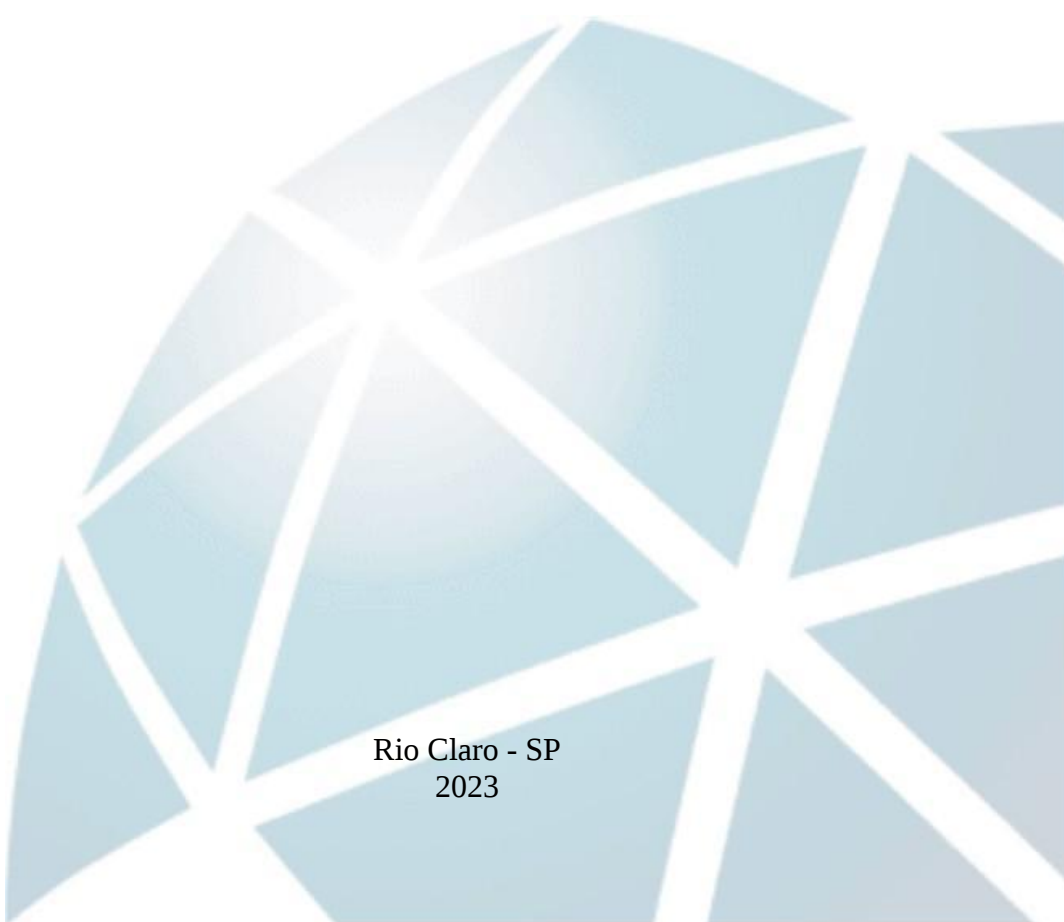

CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

SAMARA PEREIRA MIRANDA

**AVALIAÇÃO DA METODOLOGIA DE REAÇÃO
DO P-NITROFENILBUTIRATO NA DETECÇÃO
DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA CUTINASE**



Rio Claro - SP
2023

SAMARA PEREIRA MIRANDA

**AVALIAÇÃO DA METODOLOGIA DE REAÇÃO DO
P-NITROFENILBUTIRATO NA DETECÇÃO DA ATIVIDADE
ENZIMÁTICA DA CUTINASE**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências – Campus de Rio Claro, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do grau de Licenciada e Bacharela em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof.^a Dra. Derlene Attili de Angelis

Coorientadora: Prof.^a M^a Elaine Cristina Bucioli

Rio Claro - SP
2023

M672a

Miranda, Samara Pereira

Avaliação da metodologia de reação do p-nitrofenilbutirato na detecção da atividade enzimática da cutinase / Samara Pereira Miranda. -- Rio Claro, 2023
40 f. : il., tabs., fotos

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado e licenciatura - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro

Orientadora: Derlene Attili de Angelis

Coorientadora: Elaine Cristina Bucioli

1. Espectrofotometria. 2. Hidrólise. 3. Enzimas Microbianas. I. Título.

SAMARA PEREIRA MIRANDA

**AVALIAÇÃO DA METODOLOGIA DE REAÇÃO DO
P-NITROFENILBUTIRATO NA DETECÇÃO DA ATIVIDADE
ENZIMÁTICA DA CUTINASE**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências – Campus de Rio Claro, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do grau de Licenciada e Bacharela em Ciências Biológicas.

BANCA EXAMINADORA:

Prof.^a Dra. Derlene Attili de Angelis

Prof.^a M^a Elaine Cristina Bucioli

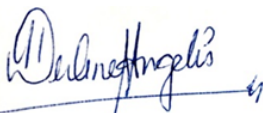
Prof.^a Dra. Daiane Cristina Sass

Prof. Dr. Michel Brienzo

Aprovado em: 08 de Novembro de 2023



Assinatura do discente



Assinatura da orientadora



Assinatura da coorientadora

Dedico este trabalho,

À minha mãe, Marcia, que preza por uma educação de qualidade e sempre me apoiou nas minhas decisões.

À minha avó, Maria Verônica (*in memoriam*), que estaria muito orgulhosa neste momento.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e Nossa Senhora Aparecida, sempre presentes em minha vida, gratidão.

À minha mãe, Marcia Pereira, por todo apoio, por sempre acreditar em mim e não medir esforços para a realização dos meus sonhos. Amo você.

Às minhas tias, Efigênia, Rosangela, Rose e Vera, pelas ajudas, orações, carinho e pelos incentivos.

À Prof.^a Dra Derlene Attili de Angelis, por toda paciência, ensinamentos e orientação que tornaram possível a conclusão deste trabalho.

À Prof.^a M^a Elaine Cristina Bucioli, pelos ensinamentos, conselhos e sugestões que tornaram possível a realização desta pesquisa.

Ao Professor José Silvio Govone que me auxiliou nas análises estatísticas dos resultados.

Ao Laboratório de Microbiologia Ambiental (LMA) e Instituto de Pesquisa em Bioenergia (IPBEN) pelo espaço e infraestrutura para realizar a pesquisa.

Às amigas que fiz durante o curso, pelas risadas, parceria e por cada momento vivido, o curso não teria sido o mesmo sem vocês.

Às amigas da vida, Gabriela, Marianne e Mayara pelos momentos descontraídos que passamos e pelo apoio mesmo sem entender nada da minha pesquisa.

E por fim, a todos que direta ou indiretamente, contribuíram para a conclusão deste trabalho.

RESUMO

Há uma preocupante exploração dos recursos naturais não renováveis, que ameaça a demanda de uma população global em crescimento. Polímeros sintéticos possuem versatilidade, baixo custo, maleabilidade, durabilidade e resistência, por isso são considerados muito importantes economicamente. Por outro lado, representam um grande problema ambiental em função de sua lenta degradação, a qual pode levar séculos. A biodegradação de um substrato é favorecida pela ação de enzimas microbianas, as quais têm se revelado como uma das alternativas mais interessantes para a recuperação de diversos tipos de plásticos. Pode ocorrer em condições aeróbicas, anaeróbicas ou em uma combinação sinérgica de ambas, levando a diferentes graus de fragilização, fragmentação e solubilização do material. Assim, tecnologias de biorremediação que empregam esses catalisadores surgiram como uma solução viável para o reuso ou recuperação de diferentes materiais, a fim de minimizar o problema. Dentre tantas enzimas já identificadas para este fim, a cutinase é investigada por sua capacidade de degradar a cutina, um poliéster alifático que atua como barreira de proteção natural de muitas plantas. Sua ação biocatalisadora, contudo, se estende a vários poliésteres artificiais, alguns tóxicos, inclusive. Uma das metodologias indicadas para detecção da atividade dessa enzima é a reação do *p*-nitrofenilbutirato (*p*NPB), que apesar de utilizada em vários estudos, ainda apresenta alguns desafios em sua aplicação. Assim, apoiando um projeto de pesquisa que investiga a produção de cutinases microbianas para uso na despolimerização do Polietilenotereftalato – PET, foi avaliado o método espectrofotométrico de hidrólise do *p*-nitrofenilbutirato cuja mistura reacional costuma ser instável para determinação da atividade enzimática da cutinase. A atividade da cutinase foi determinada pelo método espectrofotométrico a 405 nm. A reação foi monitorada por 15 minutos e comparada com a solução controle. A interrupção da reação foi avaliada pela adição de fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF) ao meio reacional de determinação da atividade enzimática e após isso foi feita uma análise estatística dos dados consistiu no teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Esse ensaio de inibição da atividade cutinolítica foi otimizado e validado com sucesso. Apresentou alta reprodutibilidade e confiabilidade, de acordo com os resultados obtidos com a presença do inibidor e com a temperatura a 40°C em 15 minutos de incubação, podendo ser utilizado preliminarmente para a aplicação da mesma em outros projetos, que visem a detecção da produção de cutinase microbiana.

Palavras-chave: Espectrofotometria; Hidrólise; Enzimas Microbianas; Indústria, inovação e infraestrutura.

ABSTRACT

There is a worrying exploitation of non-renewable natural resources, which threatens the demand of a growing global population. Synthetic polymers have versatility, low cost, malleability, durability and resistance, which is why they are considered very important economically. On the other hand, they represent a major environmental problem due to their slow degradation, which can take centuries. The biodegradation of a substrate is favored by the action of microbial enzymes, which have proven to be one of the most interesting alternatives for the recovery of different types of plastics. It can occur under aerobic, anaerobic or a synergistic combination of both conditions, leading to different degrees of embrittlement, fragmentation and solubilization of the material. Thus, bioremediation technologies that employ these catalysts have emerged as a viable solution for the reuse or recovery of different materials in order to minimize the problem. Among the many enzymes already identified for this purpose, cutinase is investigated for its ability to degrade cutin, an aliphatic polyester that acts as a natural protection barrier for many plants. Its biocatalyst action, however, extends to several artificial polyesters, some of which are even toxic. One of the methodologies recommended for detecting the activity of this enzyme is the p-nitrophenylbutyrate (pNPB) reaction, which, despite being used in several studies, still presents some challenges in its application. Thus, supporting a research project that investigates the production of microbial cutinases for use in the depolymerization of Polyethylene terephthalate – PET, the spectrophotometric method of hydrolysis of p-nitrophenylbutyrate, whose reaction mixture is usually unstable, was evaluated to determine the enzymatic activity of the cutinase. Cutinase activity was determined by the spectrophotometric method at 405 nm. The reaction was monitored for 15 minutes and compared with the control solution. The interruption of the reaction was evaluated by the addition of phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) to the reaction medium to determine the enzymatic activity and after that a statistical analysis of the data was carried out consisting of the non-parametric Kruskal-Wallis test. This cutinolytic activity inhibition assay was successfully optimized and validated. It showed high reproducibility and reliability, according to the results obtained with the presence of the inhibitor and the temperature at 40°C in 15 minutes of incubation. Besides, it can be used preliminarily for its application in other projects, aimed at detecting the production of microbial cutinase.

Keywords: Spectrophotometry; Hydrolysis; Microbial Enzymes; Industry, Innovation and infrastructure.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura geral da cutina.	16
Figura 2: <i>Trichoderma stromatum</i> : Fungo agente de controle da vassoura-de-bruxa do cacaueiro.	18
Figura 3: Plantação de tomate infectada pela murcha de <i>Fusarium</i>	19
Figura 4: Produção anual global (milhões de toneladas/ano) de polímeros sintéticos em 2016.	20
Figura 5: Reação de polimerização para a produção do PET.	21
Figura 6: Representação gráfica da curva de calibração da atividade contendo a equação da reta e coeficiente de correlação.	28
Figura 7: Atividade cutinolítica das três amostras sem a presença do inibidor.	29
Figura 8: Atividade cutinolítica das três amostras com a presença do inibidor.	29
Figura 9: Comparação das médias de valores da atividade enzimática (U/mL).	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Temperaturas variáveis dos ensaios para a obtenção da atividade enzimática da cutinase.	26
Tabela 2: Curva de calibração utilizando o p-nitrofenil como padrão	27
Tabela 3: Atividade da enzima cutinase em diferentes temperaturas sem adição do inibidor.	30
Tabela 4: Atividade da enzima cutinase em diferentes temperaturas com adição do inibidor.	30

LISTA DE ABREVIATURAS

ABS - Absorbância

BDA - Batata-Dextrose-Ágar

CBD - Caldo de Batata-Dextrose

IPBEN - Instituto de Pesquisa em Bioenergia

LMA - Laboratório de Microbiologia Aplicada

***p*-NPB** - *p*-nitrofenilbutirato

PBS - Succinato de Polihidroxibutil

PCL - Policaprolactona

PET - Politereftalato de Etileno

pH - Potencial Hidrogeniônico

PLA - Ácido Polilático

PMSF - Fluoreto de Fenilmetilsulfonila

RMN - Ressonância Magnética Nuclear

TPA - Ácido Tereftálico

UNESP - Universidade Estadual Paulista

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	OBJETIVOS	15
2.1	Objetivo Geral.....	15
2.2	Objetivos Específicos.....	15
3	REFERENCIAL TEÓRICO	16
3.1	Cutinases	16
3.1.1	Atividade catalítica da Cutinase.....	16
3.1.2	Papel da Cutinase	17
3.1.3	Produção da Cutinase.....	17
3.1.3.1	Micro-organismos endofíticos	18
3.1.3.2	Micro-organismos fitopatógenos	19
3.2	Biorremediação	19
3.2.1	Degradação de PET.....	19
3.3	Indústria Têxtil.....	21
3.4	Indústria de detergentes	22
3.5	Outras aplicações	22
3.6	Degradação.....	23
3.7	Importância das enzimas microbianas	23
4	MATERIAIS E MÉTODOS	25
4.1	Preparo do extrato enzimático.....	25
4.2	Determinação da atividade enzimática	25
4.3	Avaliação das alterações da metodologia	25
4.3.1	Interferência da temperatura	25
4.4	Análise Estatística	26

5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
6	CONCLUSÃO	33
7	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	34
	REFERÊNCIAS	35

1 INTRODUÇÃO

Pesquisas indicam que esperar por um futuro sustentável será quase impossível se ações imediatas não forem tomadas. Faz-se necessário reavaliar o ritmo de consumismo atual de forma crítica e detalhada, seus efeitos colaterais e o descarte de produtos (ZANIRATO; ROTONDARO, 2016). Dentre alguns desafios, temos os resíduos do plástico sintético, considerado muito importante economicamente devido às suas características, que permitem sua utilização para substituir materiais primários cruciais, como vidro e madeira, dentre outras aplicações. Ao serem descartados em lugares inadequados como lixões, rios ou encostas, impactam negativamente o processo de compostagem e estabilidade biológica (OLIVEIRA, 2012).

Diante disto, a reciclagem surge como uma alternativa viável, interessante e rentável para o manejo de polímeros, permitindo recuperar seus monômeros e participar da economia circular (NEW PLASTICS ECONOMY, 2016), além de transformar materiais previamente separados para posterior utilização. Desta forma, os resíduos são recuperados por meio de uma série de operações que permitem que materiais já processados sejam aproveitados como matéria-prima no processo gerador (MWANZA; MBOHWA; TELUKDARIE, 2018).

Enzimas microbianas participam ativamente da degradação natural e possuem, portanto, grande potencial de aplicação na biorremediação dos plásticos. O uso industrial das enzimas torna o processo ambientalmente amigável devido à alta degradabilidade destes biocatalisadores (RAO *et al.*, 2010). Existem desafios, entretanto, como as taxas de despolimerização alcançadas por tais enzimas, que em muitos casos são relativamente baixas para resíduos com propriedades mais complexas (KAWAI; KAWABATA; ODA, 2019).

Enzimas produzidas por fungos e bactérias apresentam uma impressionante capacidade de adaptação a condições adversas, tornando-se agentes ideais para aplicação na remediação biológica. A partir dos anos 2000, a catálise enzimática passou a ser implementada como uma estratégia para a síntese de polímeros por possuir características de menores danos ambientais e de maneira geral, bastante seletiva, permitindo assim a obtenção de macromoléculas com propriedades diferenciadas e com maior valor agregado (MILETIC *et al.*, 2011). As enzimas utilizadas no processo de síntese e modificações de polímeros estão nas classes das hidrolases (como lipases, proteases e esterases) e das oxidorreduções (GROSS; GANESH, 2010).

As cutinases são enzimas multifuncionais capazes de degradar a cutina, um componente estrutural das plantas (CHEN *et al.*, 2013). Essa enzima é atrativa por conta de suas características como estabilidade, atividade em solventes orgânicos, capacidade para catalisar reações de hidrólise e reações sintéticas (KUMARI *et al.*, 2016). Sendo biocatalisadora natural para hidrolisar poliésteres artificiais e xenobióticos tóxicos como o polietileno tereftalato (PET), policaprolactona (PCL), ácido polilático (PLA) e succinato de polihidroxibutil (PBS) (LIANG e ZOU, 2022).

Em 2016 Yoshida e colaboradores publicaram um estudo relatando a descoberta da PETase, uma enzima obtida por meio da bactéria *Ideonella sakaiensis* 201-F6, que possui afinidade pelo PET auxiliando no processo de biodegradação desse polímero. Diante dessa publicação observou-se que a cutinase, outra enzima bastante estudada em diversas áreas industriais (detergente, fibras têxteis, alimentícia, etc.) e produzida por algumas linhagens de fungos possui uma semelhança com a PETase fomentando estudos dessa enzima em ensaios de biodegradação de polímeros para recuperação dos monômeros visando um processo de reciclagem química sustentável.

Diante disso, a biocatálise pode ser utilizada para a síntese de polímeros naturais, como de polímeros sintéticos e estes fatores devem-se ao fato da sua elevada seletividade (enantio-, quimio-, éstereo- e régio-seletividade) que resulta na obtenção de polímeros bastante estruturados, em grande parte dos casos. Além disso, a catálise enzimática, de maneira geral, atua de forma bastante eficiente sob condições mais amenas de temperatura e pressão (MOURA *et al.*, 2012). As vantagens tornam-se mais visíveis quando se empregam biocatalisadores na forma imobilizada, a qual é uma técnica amplamente reportada pela literatura (SOARES *et al.*, 2003; GIRELLI *et al.*, 2012). A biocatálise, portanto, foi reconhecida na década de 1990 como uma área nova na síntese de polímeros de precisão (KOBAYASHI *et al.*, 2004).

Dessa forma, essa pesquisa pode ser justificada com base em nossas próprias experiências durante ensaios enzimáticos que foram realizados para um projeto de doutorado, que os resultados não foram tão positivos pois a atividade enzimática da cutinase não estabilizava e continuava aumentando conforme o tempo de reação, sendo assim, analisando todos os aspectos este trabalho buscou melhorar essa metodologia, avaliando a atividade enzimática. De modo a contribuir para as tecnologias de avaliação para produção da enzima cutinase por microrganismos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Este trabalho teve como objetivo principal otimizar a atual metodologia espectrofotométrica de hidrólise do *p*-nitrofenilbutirato (*p*-NPB) relatada na literatura para determinação da atividade enzimática da cutinase.

2.2 Objetivos Específicos

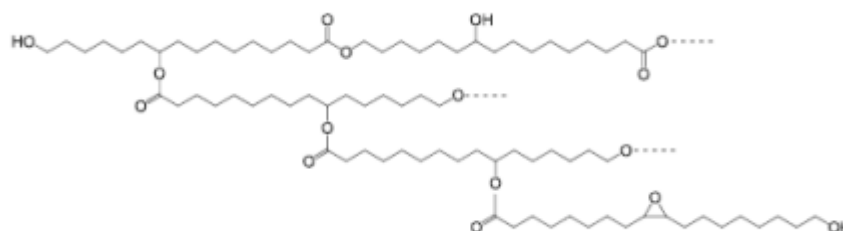
- a) Verificar a atividade enzimática da cutinase;
- b) Avaliar a substância de PMSF com potencial inibidor da reação;
- c) Avaliar a temperatura e o tempo de reação;
- d) Avaliar a reprodutibilidade do ensaio.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Cutinases

As cutinases são membros da família serina hidrolase, que apresenta a tríade catalítica composta por serina, histidina e um grupo carboxil (Figura 1). A subfamília das cutinases possuem em média 20 membros, baseada em sequências de aminoácidos similares. A dinâmica molecular, bem como suas estruturas foram identificadas a partir de estudos de cristalografia por raios X e ressonância magnética nuclear (RMN) (EGMOND; VLIEG, 2000).

Figura 1: Estrutura geral da cutina



Fonte: Retirado de NYSSÖLÄ (2015)

Segundo Borreguero *et al.*, (2001) a cutinase possui seu sítio catalítico não protegido por alça (tampa) helicoidal anfipática, a qual está presente nas lipases. Desta maneira, o sítio oxianion, que nas lipases é formado sobre a ligação com o substrato, é pré-formado nas cutinases, sendo estes fatores possivelmente responsáveis pela ausência da ativação interfacial detectada no comportamento catalítico da cutinase. Entretanto, segundo de Oliveira, (2018) algumas cutinases teriam a presença de um sítio de conformação que abre e fecha, o que aproxima a cutinase mais de uma lipase do que uma esterase. Este movimento de "mini-tampa" da cutinase protegendo seu sítio ativo poderia ser responsável por sua adaptação a diferentes solventes.

3.1.1 Atividade catalítica da Cutinase

Para que seja possível a ocorrência da atividade catalítica da cutinase alguns parâmetros, como o pH, são necessários. De acordo com Pio *et al.*, (2008) a estrutura tridimensional da cutinase permanece estável em uma faixa de pH entre 4,0 e 9,0. Todavia, constatou-se que a atividade ótima da cutinase consiste nos valores de pH ente 4,0; 5,0 e 8,5. Este comportamento atribui-se ao estado de ionização do His-188, já que este resíduo precisa ser desprotonado para estabilizar o sítio catalítico. As cutinases fúngicas apresentam estabilidade em pH ácido e

básico, diferentemente da cutinase de pólen, cuja estabilidade ocorre apenas em pH neutro, com valor ótimo em 6,8 (KOLATTUKUDY, 1984).

Diante do objetivo de aumentar a estabilidade térmica, bem como a operacionalidade das cutinases, diversas estratégias têm sido empregadas em diferentes meios de reação (Pio *et al.*, 2008). O uso de micelas reversas, são as estratégias mais empregadas de acordo com a literatura, esse fator deve-se ao maior ganho de atividades obtidas (MELO *et al.*, 2003). Por terem característica reversa, as micelas são sistemas compostos por moléculas anfifílicas que se auto organizam de forma que os grupamentos polares se orientam para a face interna e a parte apolar encontra-se na face externa. Desta maneira, essas enzimas apresentam características semelhantes às membranas biológicas, tornando-as um conveniente meio para o estudo das interações biológicas de peptídeos bioativos (MELO *et al.*, 2003).

3.1.2 Papel da Cutinase

As cutinases são responsáveis pela hidrólise da cutina, na natureza, que consiste em um biopoliéster insolúvel presente na cutícula das plantas. Este componente possui uma estrutura variável, entretanto apresenta-se comumente de conformação de ácidos de 16 e 18 carbonos. Esses componentes além de reações de hidrólise, são capazes também de catalisar reações reversas, tais como a esterificação, a transesterificação e a aminólise (NYYSSÖLÄ, 2015).

Desta maneira, são reconhecidas como enzimas intermediárias entre as lipases e as esterases, em decorrência da capacidade de hidrolisar ambos, ou seja, ésteres e lipídios. Essa configuração de diversas funcionalidades permite que realizem várias reações, entre elas, hidrólises, esterificações e transesterificações. Diante desses fatores, são passíveis de aplicação em áreas tais como: indústria de detergentes, têxtil e biorremediação (CARVALHO, *et al.*, 2000; PIO e MACEDO, 2007; NYYSSÖLÄ, 2015).

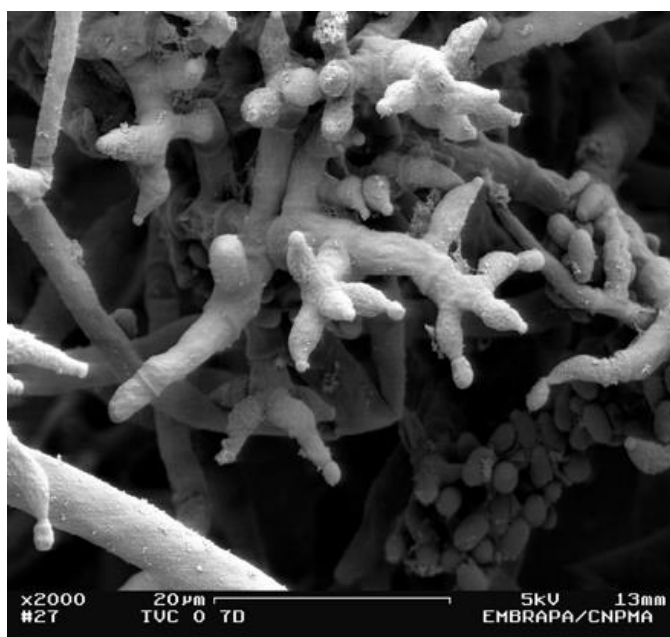
3.1.3 Produção da Cutinase

As cutinases podem ser produzidas por bactérias, fungos e plantas. Dentro desse contexto, portanto, dois grupos de microrganismos destacam-se em relação a produção de cutinase, sendo eles os micro-organismos fitopatogênicos e endofíticos (NYYSSÖLÄ, 2015).

3.1.3.1 Micro-organismos endofíticos

Os endofíticos representam micro-organismos que habitam os tecidos internos de plantas (Figura 2), por pelo menos um período do seu ciclo de vida, de maneira não prejudicial ao hospedeiro (CHANDRA, 2012). Segundo os pesquisadores Yan *et al.*, (2019) este tipo de associação entre planta e micro-organismo é relevante em vários aspectos para a planta como, por exemplo, a atenuação de doenças, o apoio ao sistema imunológico e a tolerância a estresses abióticos. Já para o micro-organismo, a planta oferece proteção e nutrientes para sua sobrevivência. Ressalta-se, todavia, que o mecanismo de interação entre o ser endófito e o hospedeiro estabelece-se de forma específica entre ambos, envolvendo a produção de compostos e moléculas sinalizadoras (YAN *et al.*, 2019).

Figura 2: *Trichoderma stromatum*: Fungo agente de controle da vassoura-de-bruxa do cacaueiro



Fonte: Embrapa, (2021)

Sendo assim, os estudos realizados por Yan *et al.*, (2018) apontaram que a viabilidade da relação entre o microrganismo e a planta hospedeira ocorre em decorrência da produção de metabólitos bioativos. Desta maneira, os endofíticos destacam-se no contexto biotecnológico pela produção desses compostos bioativos que possuem utilidade na área médica, têxtil, alimentícia, agrícola e ambiental. Outro produto relevante no que diz respeito a esse grupo de microrganismos são as enzimas por eles secretadas, por exemplo, as celulases, amilases e pectinases (YAN *et al.* 2018).

3.1.3.2 Micro-organismos fitopatógenos

Os fitopatógenos são aqueles microrganismos que ao colonizarem uma planta causam danos à mesma (Figura 3), ou seja, causam doenças à planta hospedeira por meio de diversos mecanismos como produção de toxinas e enzimas que interferem no metabolismo do hospedeiro. Diante da sua capacidade e agressividade ao colonizar o vegetal, os fitopatógenos se tornaram alvo de exploração biotecnológica (CAETANO, 2020).

Figura 3: Plantação de tomate infectada pela murcha de *Fusarium*.



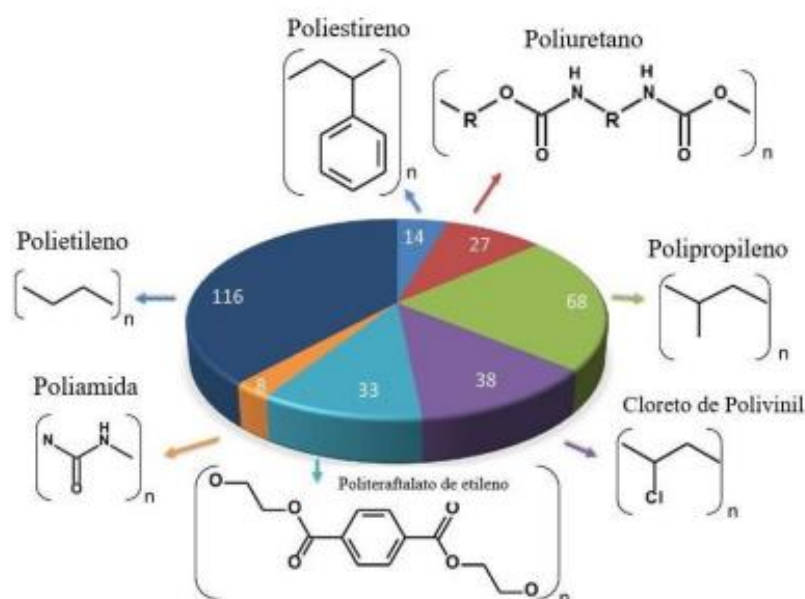
Fonte: Retirado de Pereira *et. al.*, (2014)

3.2 Biorremediação

3.2.1 Degradação de PET

O politereftalato de etileno (PET) representa um polímero termoplástico que representa uma alta produção (Figura 4), superior a 30 milhões de toneladas anuais, e possui como principal aplicação as garrafas descartáveis para bebidas carbonatadas (GOMES *et al.*, 2019). Plásticos, de maneira geral, representam cerca de 80% dos resíduos encontrados em oceanos, aterros sanitários e lixos municipais (KOSHTI *et al.*, 2018).

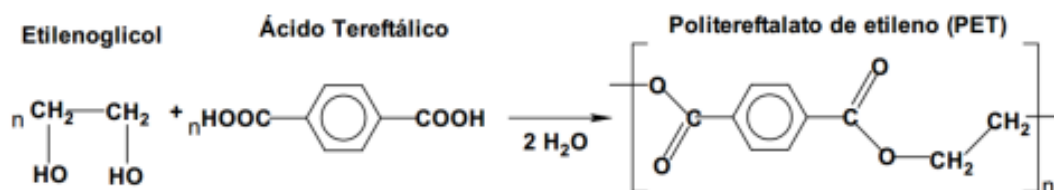
Figura 4: Produção anual global (milhões de toneladas/ano) de polímeros sintéticos em 2016.



Fonte: Retirado de CAETANO, (2020).

O PET é um poliéster, polímero termoplástico, obtido a partir de monômeros do etilenoglicol e o ácido tereftálico a partir de reações de condensação, gerando além do polímero, substâncias secundárias (Figura 5). Algumas características como alto peso molecular, cadeias longas inertes e hidrofobicidade consistem em alguns dos motivos pelos quais os plásticos são de difícil degradação sob condições ambientais naturais (LEE e LIEW, 2019). O principal problema especialmente relacionado ao PET, entretanto, refere-se ao seu uso primordial, ou seja, as garrafas, embora, duráveis, com boa resistência e transparência, possuem uma vida útil muito curta e são produzidas em grande escala, gerando resíduos em grandes quantidades (GOMES *et al.*, 2019). Diante desta situação, há uma preocupação global em se destinar corretamente esses resíduos para que assim possam gerar menos impactos ambientais (KOSHTI *et al.*, 2018). A principal e mais preocupante é sua permanência destes no ambiente. Isso se deve à dificuldade de degradação sob condições muitas vezes instáveis e anaeróbias oferecidas nos locais de descarte (KOSHTI *et al.*, 2018).

Figura 5: Reação de polimerização para a produção do PET.



Fonte: Retirado de KOSCHEVIC; BITTENCOURT, (2016).

Desta maneira, um dos métodos para a reciclagem desses materiais consiste no processo biológico, ou seja, utilizam-se enzimas capazes de despolimerizar o PET e que, diferentemente dos processos que envolvem catalisadores químicos, ocorre em condições mais brandas e sem necessidade de equipamentos nobres (CASTRO *et al.*, 2018; GARCÍA 2018). Além da economia financeira no processo de despolimerização, o uso de enzimas biológicas torna o processo mais ecológico, evitando o uso de substâncias tóxicas e não gerando poluentes ambientais (JOO *et al.*, 2018; NIKOLAIVITS *et al.*, 2017).

Sendo assim, enzimas como cutinases, lipases e carboxilesterases destacam-se pela capacidade de despolimerizar PET (DANSO *et al.*, 2019). Dentre as três, as cutinases são as enzimas de maior destaque para esta finalidade (MUELLER, 2006; CASTRO *et al.*, 2018). Os pesquisadores Castro *et al.*, (2018) avaliaram diversas lipases e cutinases para hidrólise de PET, sendo que a que apresentou melhor desempenho foi a cutinase isolada de *Humicola insolens* em combinação com a lipase isolada de *Candida antarctica*. O uso em conjunto dessas enzimas revelou uma liberação máxima de ácido tereftálico (TPA), monômero do PET. Esses resultados foram relevantes em decorrência da possibilidade de uma nova rota de conversão de embalagens PET já utilizadas a seus monômeros mínimos, que por sua vez podem ser utilizados nas próprias instalações industriais de PET.

3.3 Indústria Têxtil

As fibras de algodão, componentes de diversos tecidos, são processadas de diversas formas para adquirir as características desejáveis para comercialização. Entre essas etapas, a limpeza corresponde à retirada da cutícula hidrofóbica da fibra com a finalidade de facilitar o tingimento do tecido (DEGANI *et al.*, 2002). Usualmente a retirada da cutícula das fibras de algodão é realizada através de uma hidrólise alcalina sob altas temperaturas, despendendo de altas quantidades de água, energia, gerando poluentes alcalinos e danos às fibras (CHEN *et al.*, 2013). Visto isso, despertou-se o interesse na busca por rotas mais ecológicas para tornar o

processo menos agressivo ao ambiente e ao material, sendo que uma das alternativas foi a utilização de enzimas microbiológicas com capacidade de retirar a cutícula presente na fibra (CHEN *et al.*, 2013; DEGANI *et al.*, 2002).

Neste contexto, proteases, pectinases, lipases e cutinases foram estudadas e relatadas como substâncias potenciais para a substituição da hidrólise alcalina. Resultados promissores foram obtidos ao utilizar-se cutinases combinadas com pectinases, de acordo com AGRAWAL *et al.*, 2008 e DEGANI *et al.*, 2002. Essa combinação de enzimas, atua da seguinte maneira: as cutinases são requeridas promovendo aberturas na camada cuticular o que permite as pectinases internalização da fibra, promovendo a ruptura da camada pectinosa.

Além da vantagem funcional dessa combinação de enzimas, outro ponto que as tornam uma alternativa viável ao processo é que as 23 pectinases atuam em pH alcalino, correspondendo a uma faixa ideal para ação das cutinases (NYSSOLA, 2015). Fibras sintéticas, tais como aquelas compostas por PET também são passíveis de tratamento enzimático para comercialização. O uso de cutinases nessas fibras promovem um aumento da hidrofiliabilidade o que torna o tecido mais maleável e confortável para ser utilizado (CHEN *et al.*, 2013; NYSSOLA, 2015).

3.4 Indústria de detergentes

A aplicação de cutinases na indústria de detergentes torna-se uma oportunidade comparada a outras lipases que desempenham a mesma função em decorrência da estabilidade das cutinases a diversos fatores tais como: presença de peróxido de hidrogênio, faixa de temperatura entre 20° e 50°C, pH (estáveis em pH alcalino) e a presença de outras enzimas. Outro fator que as tornam interessantes para este uso, consiste na capacidade das cutinases para remover triacilgliceróis e hidrolisar gorduras sem que o cálcio esteja presente, diferentemente de outras lipases comerciais que usualmente são empregadas em indústrias com essa finalidade (OLIVEIRA, 2018).

3.5 Outras aplicações

As cutinases também podem ser utilizadas na indústria alimentícia, sendo empregadas na secagem de frutas e vegetais, fornecimento de edulcorantes, conservantes e estabilizadores (NYSSOLA, 2015). Além destas funções, emprega-se a cutinase na retirada de compostos indesejáveis como hemicelulose do xarope de amido de trigo (PIO *et al.*, 2008). No setor agrícola as cutinases também podem desempenhar atividades na formulação de inseticidas e

pesticidas, já que sua utilização anterior ou combinada ao agente químico do produto promove a degradação de polímeros de superfície, facilitando a penetração do agente e tornando-o mais eficiente, permitindo, assim, o uso de menores quantidades de pesticidas ou inseticidas (OLIVEIRA, 2018; PIO *et al.*, 2008).

3.6 Degradação

São cientificamente reportados tanto com a finalidade de degradação biológica quanto como fonte de enzimas para a degradação enzimática de polímeros os fungos filamentosos, leveduras e bactérias. De acordo com os pesquisadores Baker *et al.*, (2012) o uso de cutinases de *Aspergillus oryzae*, *Alternaria brassicicola*, *Aspergillus oryzae*, *Humicola insolens* e *Fusarium solani* são bastante direcionados na degradação de poliésteres, a 40 °C. Segundo Kemme *et al.*, (2011), entretanto, utilizaram-se de uma esterase de *Mucor miehei* para os mesmos processos realizados por Baker *et al.*, (2012).

Picca *et al.*, 2023 demonstraram que cutinases de *Fusarium solani*, esterases de *Cladosporium cladosporioides* e *Penicillium citrinum* e lipases de *Aspergillus oryzae* têm sido destacadas como tendo potencial para aumentar a hidrofiliabilidade de polímeros de PET. Muller *et al.*, 2005 reportaram que o uso de uma cutinase de *Thermobifida fusca* expressa em *Escherichia coli* que resultou em uma redução de até 54,2% na massa de filmes de PET utilizados em ensaios, enquanto enzimas comerciais, como a *Novozym* não resultaram em perdas significativas.

3.7 Importância das enzimas microbianas

Devido à importância da sustentabilidade nas atividades produtivas, a utilização de métodos enzimáticos como alternativa aos processos químicos tem ganhado atenção ao longo dos anos. Nestes processos, as reações baseadas na utilização de insumos não renováveis precisam ser substituídas por processos que utilizem insumos renováveis. Além disso, alguns processos empregados na engenharia química utilizam compostos considerados tóxicos ao meio ambiente. Neste contexto, a tecnologia enzimática vem recebendo cada vez mais atenção por ser muito promissora para a síntese de compostos de alto valor agregado (MUNHOZ, 2020).

Os microrganismos possuem uma alta produção de enzimas de aplicabilidade industrial alimentícia que tem a finalidade de melhoria de produção, e outros componentes relacionados

como, por exemplo, sabor, aroma, cor, textura, aparência, vida de prateleira e valor nutritivo (SRIVASTAVA, 2019). Segundo Papadaki *et al.* (2020), existe atualmente um mercado de enzimas, sendo este avaliado em US \$ 7,1 bilhões em 2017 e deverá chegar a US\$ 10,5 bilhões em 2024, com uma taxa de crescimento anual de 5,7% de 2018 a 2024.

Alguns micro-organismos possuem relevância industrial, como *Bacillus licheniformis*, *Candida cylindracea*, *Aspergillus oryzae* e *Trichoderma reesei* tem a finalidade de produzir proteases, lipases e celulasas, respectivamente, muito empregadas na indústria (WEISS, 2020). Em relação às proteases microbianas, entretanto, sua utilização ocorre no processo de preparo de hidrolisados de proteína de alto valor, podendo ser usada em formulações de alimentos infantis, produtos alimentares terapêuticos específicos, fortificantes de sucos e refrigerantes e como aditivos alimentares funcionais (AGUILAR; SATO, 2017).

Todavia, as pectinases podem ser aplicadas nas indústrias de alimentos e bebidas em vários processos, como clarificação de bebidas, produção de vinho e extração de óleo vegetal (MURUGAN *et al.*, 2020). As amilases, atuam na hidrólise do amido produzindo xaropes de frutose e glicose, e, também na produção de itens de panificação (SURIYA *et al.*, 2016). As lipases são capazes de atuar nas modificações das propriedades de lipídios, produzir sabor e aroma modificando a estrutura por inter ou transesterificação obtendo produtos de maior valor nutricional, facilitam a remoção de gordura de produtos de carne e peixe, entre outros (MEHTA *et al.*, 2021).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Os ensaios descritos neste capítulo foram realizados no Laboratório de Microbiologia Aplicada (LMA) e no Instituto de Pesquisa em Bioenergia (IPBEN), UNESP – Rio Claro/SP.

4.1 Preparo do extrato enzimático

Em Erlenmeyers adicionou-se 40 mL de caldo de batata-dextrose (CBD) e fragmento de PDA de aproximadamente 0,5 cm², com crescimento de colônias fúngicas com 7 dias, incubadas a 28 °C e fragmentos de PET com aproximadamente 5mm de diâmetro. Os frascos foram incubados com agitação a 100 rpm durante 14 dias a 28 °C. As culturas foram centrifugadas a 4.472 g em tubos Falcon de 50 mL esterilizados e filtradas através de uma membrana de 0,45 µm para separar os fragmentos de micélio do caldo fermentado (PICCA, 2018).

4.2 Determinação da atividade enzimática

A atividade da cutinase foi determinada pelo método espectrofotométrico de hidrólise do *p*-nitrofenilbutirato (*p*-NPB) a 405 nm. Uma alíquota de cultura sobrenadante (70 µL) foi adicionada a 3,43 mL de mistura reacional com a seguinte composição: 1,12 mM de *p*-NPB disperso em 50 mM de tampão fosfato a pH 7,2 com 0,2% (N/P) Triton X-100 (0,2%) e 0,43M tetra-hidrofurano. A reação foi monitorada por 15 minutos e comparada com a solução controle (branco) (SPERANZA, 2010; GOMES, 2013). Todos os ensaios foram feitos em triplicatas.

4.3 Avaliação das alterações da metodologia

4.3.1 Interferência da temperatura

Uma alíquota de 70 µL do sobrenadante com a mistura reacional foi submetida a diferentes temperaturas (23°C, 25°C e 40°C) antes da leitura da absorbância no espectrofotômetro para sua estabilidade, como na tabela a seguir:

Tabela 1: Temperaturas variáveis dos ensaios para a obtenção da atividade enzimática da cutinase

Temperatura	Minutos
25°C (em banho)	15 min
23°C (Ambiente)	15 min
40°C	15 min

Fonte: Elaborado pela autora

Após o tempo de reação em cada temperatura a atividade enzimática foi avaliada conforme no item 5.2.

4.3.2 Interferência de agente inibidor

A interrupção da reação foi avaliada pela adição de fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF) ao meio reacional de determinação da atividade enzimática. A mistura de reação contendo 1 mM de PMSF e 20 µL de enzima foram incubados em temperatura ambiente, 40°C e 55°C durante 20 min. A atividade da cutinase foi monitorada em intervalos de 5 min (VERMA; KANWAR, 2010), e ao final foi comparado com uma reação controle (branco).

4.4 Análise Estatística

A análise estatística dos dados consistiu no teste não paramétrico de Kruskal-Wallis (AYRES, 2010; ZAR, 2009).

Foram testadas as seguintes igualdades:

- 3 níveis de temperatura, sem a presença do inibidor;
- 3 níveis de temperatura, com a presença do agente inibidor;
- Presença/ausência do agente inibidor, dentro de cada valor de temperatura.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Determinação da atividade enzimática

Todas as determinações das atividades enzimáticas foram realizadas em triplicata. As leituras da absorbância foram realizadas em espectrofotômetro à 405 nm e as atividades enzimáticas foram expressas em U/mL, após verificar que havia uma correlação linear entre esta unidade de atividade cutinólítica e concentração da enzima em mg/mL, sendo (U) que reflete quantidade de enzima que catalisa a transformação de 1 μ mol de substrato ou geração de 1 μ mol de produto por minuto e, a partir desta pode ser calculada a atividade específica, que é a atividade enzimática (U) por mg de proteína.

Para a determinação da atividade enzimática fez-se necessário a construção de uma curva de calibração, utilizando p-nitrofenil como padrão e tampão fosfato. A curva de calibração foi construída com 6 pontos experimentais. Foram realizadas as leituras de absorbância (ABS) de cada tubo de reação em espectrofotômetro em comprimento de onda de 405 nm. A Tabela 2 apresenta os valores de ABS obtidos.

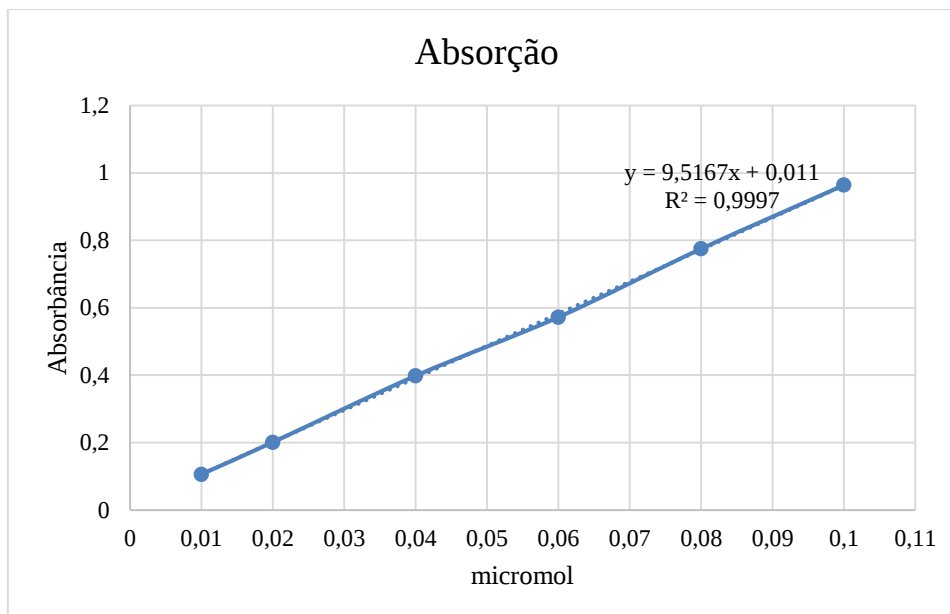
Tabela 2: Curva de calibração utilizando o p-nitrofenil como padrão

Curva de calibração		
Pontos da Curva	micromol P-NP/mL	Absorção
0	0,00	0,000
1	0,01	0,106
2	0,02	0,201
3	0,04	0,398
4	0,06	0,572
5	0,08	0,775
6	0,1	0,964

Fonte: Elaborado pela autora

A partir dos dados obtidos acima construiu-se a curva de calibração (Figura 6), descrita pela equação matemática representada por $y = 9,5167x - 0,011$, que obteve um valor para o coeficiente de determinação (R^2) de 0,999. Um dos parâmetros para verificar um bom ajuste dos pontos experimentais é justamente o R^2 . Quanto mais próximo de 1, significa que há uma boa reprodutibilidade da técnica, bem como, no preparo das soluções, das pesagens, das medidas volumétricas inerentes a técnica, e além disso, que os equipamentos utilizados estão respondendo bem a essa técnica.

Figura 6: Representação gráfica da curva de calibração da atividade contendo a equação da reta e coeficiente de correlação

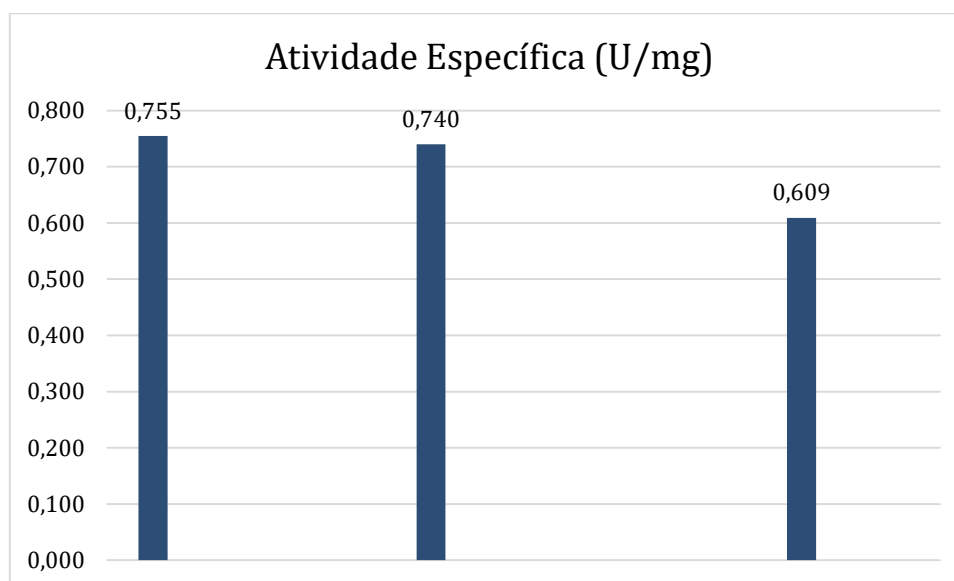


Fonte: Elaborado pela autora

Com base nisso, a curva de calibração é um referencial essencial para a determinação da atividade enzimática de cutinase. Utilizando-se da equação matemática obtida ($y = 9,5167x - 0,011$), foram encontrados os valores correspondentes. Em seguida, estes foram manipulados matematicamente para a determinação do valor que representa a atividade cutinólítica (Tabela 3), que por convenção é expressa por minuto de reação por mL (U/mL). Em virtude disso, os valores foram divididos por 15 (em função dos 15 min de reação) e multiplicados por 3,5 (em função do 3,43 mL de extrato enzimático usado na reação).

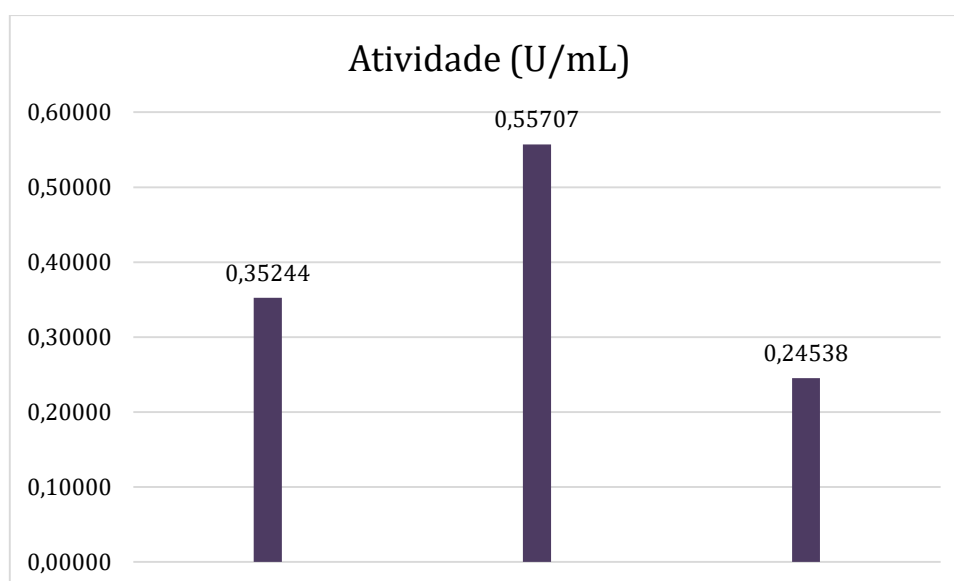
Nas figuras 7 e 8, observa-se o resultado da atividade específica da cutinase sem a presença do inibidor e a atividade cutinólítica com a presença do inibidor, respectivamente. Os resultados da figura 7 demonstram que a maior atividade de cutinase (0,755) ocorreu em condições de temperatura ambiente (23°C) e sem a presença do inibidor. Já os resultados da figura 8 mostra que a maior atividade enzimática (0,557) ocorreu em condições de temperatura a 40°C de incubação e com a presença do inibidor. A partir destes resultados obtidos é possível fazer a comparação de valores e observar que mesmo com os diferentes valores de atividade específica, os melhores resultados foram obtidos com a temperatura mais alta e com a presença do inibidor, sendo um resultado positivo para a pesquisa.

Figura 7: Atividade cutinólítica das três amostras sem a presença do inibidor



Fonte: Elaborado pela autora

Figura 8: Atividade cutinólítica das três amostras com a presença do inibidor



Fonte: Elaborado pela autora

Avaliação das alterações da metodologia

A tabela abaixo exibe as respectivas respostas em termos de atividade enzimática sem a presença do inibidor. Observou-se que a atividade cutinólítica aumentou em todos os ensaios. Os dados indicam que não houve uma estabilidade da atividade.

Tabela 3: Atividade da enzima cutinase em diferentes temperaturas sem adição do inibidor

Amostras	Condições do Bioensaio	Atividade Cutinólítica (U/mL)	U (total)*	Atividade Específica (U/mg)*
1.23 ^a	Temperatura ambiente (23°C) (1)	0,74851	27,8880	0,7546014947
1.23b	Temperatura ambiente (23°C) (2)	0,68826		
1.23c	Temperatura ambiente (23°C) (3)	0,81226		
2.25 ^a	Temperatura (25°C - 15min) (1)	0,71734	27,34071	0,7397938653
2.25b	Temperatura (25°C - 15min) (2)	0,73555		
2.25c	Temperatura (25°C - 15min) (3)	0,75201		
3.40 ^a	Temperatura (40°C - 15min) (1)	0,62171	22,51537	0,6092281808
3.40b	Temperatura (40°C - 15min) (2)	0,61261		
3.40c	Temperatura (40°C - 15min) (3)	0,58143		

* Os valores de U e atividade específica são a média de três repetições.

Fonte: Elaborado pela autora

Observando cada tratamento individual na Tabela 3, verifica-se que a atividade enzimática aumenta à medida que a temperatura de incubação aumentou, mostrando um efeito temperatura-dependente. A resposta obtida comprovou que a temperatura da reação influenciou na atividade da enzima cutinase.

O efeito inibidor na atividade da cutinase foi estudado incubando a enzima e os substratos na presença de substâncias nas concentrações de 1 mM a 23, 40 e 55 °C. A Tabela 4 mostra o efeito do inibidor sobre a atividade da cutinase.

Tabela 4: Atividade da enzima cutinase em diferentes temperaturas com adição do inibidor

Amostras	Condições do Bioensaio	Média* (U/mL) 5 min	Média* (U/mL) 10 min	Média* (U/mL) 15min
1.23 ^a	Inibidor 1 mM 15' (23°C) + 5'+5' (1)	0,29445	0,35622	0,40665
1.23b	Inibidor 1 mM 15' (23°C) + 5'+5' (2)			
1.23c	Inibidor 1 mM 15' (23°C) + 5'+5' (3)			
2.40 ^a	Inibidor 1 mM 15' + 10' (40°C) + 5'+5' (1)	0,50449	0,55353	0,61319
2.40b	Inibidor 1 mM 15' + 10' (40°C) + 5'+5' (2)			
2.40c	Inibidor 1 mM 15' + 10' (40°C) + 5'+5' (3)			
3.55 ^a	Inibidor 1 mM 15' + 10' (55°C) + 5'+5' (1)	0,25464	0,24296	0,23853
3.55b	Inibidor 1 mM 15' + 10' (55°C) + 5'+5' (2)			
3.55c	Inibidor 1 mM 15' + 10' (55°C) + 5'+5' (3)			

* Os valores são a média de três repetições

Fonte: Elaborado pela autora

A partir da adição do inibidor foi possível observar melhores resultados em termos de paralisação da atividade para a cutinase, como mostra a Tabela 4. Pode-se observar que a

atividade enzimática apresentou melhores resultados em termos de estabilidade. No momento em que há contato com o inibidor, há uma maior estabilidade da reação da enzima, nas condições de 55°C foi obtido o melhor resultado.

Análise estatística

Para análise estatística dos dados coletados foi usado o software Bioestat 5.0 considerando o intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$) que foram aplicados na obtenção de um modelo matemático capaz de explicar a estabilidade da atividade enzimática da cutinase. Embora as amostras sejam muito pequenas (triplicatas) aplicou-se o teste de Kruskal Wallis (AYRES, 2010; ZAR, 2009), para comparar as diferentes temperaturas, ao nível $\alpha = 0,05$ de probabilidade de erro tipo 1.

Para o cálculo dos três grupos o valor de (p) encontrado foi igual $p = 0,066 > \alpha = 0,05$. Portanto, aceitamos a hipótese de igualdade das temperaturas quanto à variável, sendo assim não foi detectado diferenças significativas entre os 3 valores de temperatura.

Comparando os resultados com o inibidor temos os valores por grupo, o p-valor $< 0,0001 < \alpha$. Aplicando o teste a Posteriori de Student Newman Keuls, os p-valores são:

Grupos 1 e 2	$P = 0,0162 < \alpha$
Grupos 1 e 3	$P = 0,0162 < \alpha$
Grupos 2 e 3	$P < 0,0001 < \alpha$

A amostras foram separadas em grupos para melhor comparação:

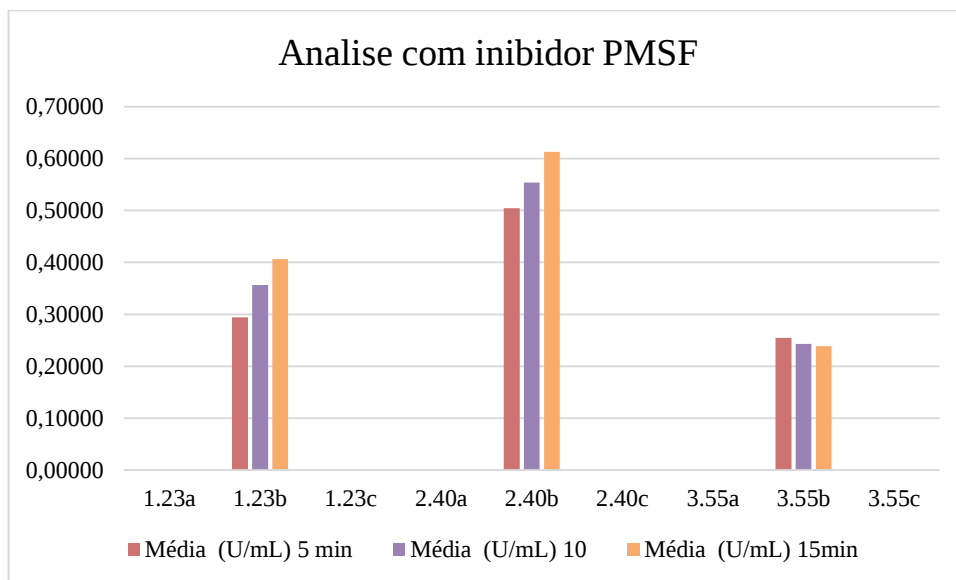
Grupo 1: inibidor de 1 mM com 15 minutos de incubação em temperatura ambiente (23°C).

Grupo 2: inibidor de 1 mM com 15 minutos de incubação a 40°C.

Grupo 3: inibidor de 1 mM com 15 minutos de incubação a 55°C.

Portanto, concluímos que os 3 grupos se diferem significativamente entre si, como podemos observar na imagem abaixo.

Figura 9: Comparação das médias de valores da atividade enzimática (U/mL).



Fonte: Elaborado pela autora

Fazendo uma comparação com a presença/ausência do agente inibidor, dentro dos valores de temperatura 23°C e 40°C, o valor de p foi igual para ambos $p = 0,0495 < \alpha$, a enzima mostrou-se aparentemente estável, sendo assim conseguimos observar que há efeito do inibidor para ambas as temperaturas, porém com resultado mais satisfatório na temperatura de 40°C.

6 CONCLUSÃO

O método de determinação enzimática para cutinase desenvolvido neste trabalho, através dos resultados dos ensaios, mesmo com pequena quantidade de réplicas, mostrou-se eficiente e aplicável, baseado nos resultados da determinação enzimática com o efeito do inibidor e também da análise estatística. Foram avaliadas condições de temperaturas e também se avaliou a estabilidade da enzima com a presença do inibidor PMSF que indicou uma maior estabilidade à temperatura mais altas. Na análise estatística os resultados mostraram-se satisfatórios em relação à repetibilidade, além de comprovar a diminuição da afinidade da enzima pelo substrato, diminuindo a velocidade da reação enzimática. Os valores dos resultados encontrados atestam a repetibilidade do método.

Esse ensaio de inibição da atividade cutinolítica foi otimizado e validado com sucesso. Apresentou alta reprodutibilidade e confiabilidade, de acordo com os resultados obtidos com a presença do inibidor e com a temperatura a 40°C em 15 minutos de incubação, podendo ser utilizado preliminarmente para a aplicação da mesma em outros projetos, que visem a detecção da produção de cutinase microbiana, de potencial aplicação em biorremediação de polímeros.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- a) Avaliar a eficiência de outros inibidores na reação da atividade enzimática da cutinase;
- b) Estudar a especificidade da cutinase quanto aos inibidores avaliados.

REFERÊNCIAS

- AGRAWAL, P. B.; NIERSTRASZ, V.A.; BOUWHUIS, G.H.; WARMOESKERKEN, M. M. C. G. **Cutinase and pectinase in cotton bioscouring: an innovative and fast bioscouring process**. *Biocatalysis and Biotransformation*, 26, 412–21, 2008.
- AGUILAR, J. G. dos S.; SATO, H. H. **Microbial proteases: Production and application in obtaining protein hydrolysates**. *Food Research International*, 2017.
- AYRES, M., **Elementos de Bioestatística – a seiva do açaizeiro**, MCT – Belém, PA, 2010.
- BAKER, P. J.; POULTNEY, C.; LIU, Z.; GROSS, R.; MONTCLARE, J. K.; **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 93, 229, 2012.
- BORREGUERO, I.; CARVALHO, C. M. L.; CABRAL, J. M. S.; Sinisterra, J. V.; ALCÁNTARA, A. R.; *J. Mol. Catal. B: Enzym*, 11, 613, 2001.
- CAETANO, M. M. C. M. **Avaliação do potencial de fungos endofíticos e fitopatogenicos em relação à produção da enzima cutinase**. Mestrado – Universidade Estadual de São Carlos, São Carlos, 2020.
- CARVALHO, C. M. L.; AIRES-BARROS, M. R.; CABRAL, J. M. S.; *J. Biotechnol*, 81, 1, 2000.
- CASTRO, A. M.; CARNIEL, A.; JUNIOR, J. N.; GOMES, A. C.; VALONI, A. **Screening of commercial enzymes for poly(ethylene terephthalate) (PET) hydrolysis and synergy studies on different substrate sources**. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 10, 835-844, 2018.
- CHANDRA, S. **Endophytic fungi: Novel sources of antiancer lead molecules**. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 95, 47-59, 2012.
- CHEN, S.; SU, L.; CHEN, J.; WU, J. **Cutinase: Characteristics, preparation, and application**. *Biotechnology Advances*, 14, 1754-1767, 2013.
- DANSO, D.; CHOW, J.; STREIT, W. R. **Plastics: Environmental and biotechnological perspectives on microbial degradation**. *Applied and Environmental Microbiology*, 85, 14, 2019.
- DEGANI, O.; GEPSTEIN, S.; DOSORETZ, C. G. **Potential use of cutinase in enzymatic scouring of cotton fiber cuticle**. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 103, 277-289, 2002.
- EGMOND, M. R.; DE VLIEG, J.; *Biochimie*, 82, 1015, 2000.
- GARCÍA, J. M. **Catalyst: Design challenges for the future of plastics recycling**. *Chemistry*, 7, 813-815, 2018.
- GIRELLI, A. M.; SALVAGNI, L.; TAROLA, A. M.; J. BRAZ. **Use of Lipase Immobilized on Cellulose Support for Cleaning Aged Oil Layers**. *Chem. Soc.* 23, 585-592, 2012.
- GROSS, R. A.; GANESH, M.; LU, W. **Trends Biotechnol**, 28, 435, 2010.

GOMES, D. S.; MATAMÁ T.; PAULO A. C.; TAKAKI, G. M. C.; Salgueiro, A. A. **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.

GOMES, T. S.; VISCONTE, L. L. Y.; PACHECO, E. **Life cycle assessment of polyethylene terephthalate packaging: An overview**. Journal of Polymers and the Environment, 27, 533-548, 2019.

JOO, S.; CHO, I. J.; SEO, H.; SON, H. F.; SAGONG, H. Y.; SHIN, T. J.; CHOI, S. Y.; LEE, S. Y.; KIM, K. J. **Structural insight into molecular mechanism of poly(ethylene terephthalate) degradation**. Nature Communications, 9, 382, 2018.

KAWAI, F.; KAWABATA, T.; ODA, M. **Current knowledge on enzymatic PET degradation and its possible application to waste stream management and other fields**. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 103, n. 11, p. 4253–4268, 2019.

KEMME, M.; PROKESCH, I.; HEINZEL-WIELAND, R.; **Polym. Test**, 30, 743, 2011.

KOBAYASHI, S.; UYAMA, H.; EM: DOI, Y.; STEINBUCHER, A. **POLYESTERS I: Biological systems and Biotechnological Production**, 3^a ed., Wiley-VCH: Weinheim. 2004.

KOLATTUKUDY P. E. EM LIPASES; BORGSTROM, B.; BROCKMAN, T., eds.; **Elsevier**: Amsterdam, p. 471, 1984.

KOSCHEVIC, M. T.; BITTENCOURT, P. R. S. **Meio ambiente e materiais poliméricos: Breves considerações com ênfase ao Politereftalato de Etileno (PET) e processos de degradação**. R. Eletr. Cient. Inov. Tecnol., Medianeira, v. 2, n. 14, p. 60-80, 2016.

KOSHTI, R.; MEHTA, L.; SAMARTH, N. **Biological recycling of polyethylene terephthalate: A mini-review**. Journal of Polymers and the Environment, 26, 3520-3529, 2018.

KUMARI, V.; KUMAR, V.; CHAUHAN, R.; ASIF, M.; BHALLA, T. C. **Optimization of medium parameters by response surface methodology (RSM) for enhanced production of cutinase from *Aspergillus***. 3 Biotech, v. 6, n. 2, p. 1-10, 2016.

LIANG, X.; ZOU, H. **Biotechnological Application of Cutinase: A Powerful Tool in Synthetic Biology**. Synbio, v.1, p. 54–64, 2022.

LEE, A.; LIEW, M. S. **Ecologically derived waste management of conventional plastics**. Journal of Material Cycles and Waste Management, 22, 1-10, 2019.

Mapeamento da biodiversidade. Embrapa, 2021. Disponível em: <https://www.embrapa.br/agencia-de-informacao-tecnologica/tematicas/agricultura-e-meio-ambiente/manejo/recursos-geneticos/mapeamento-da-biodiversidade>. Acesso em: 14 de Jun. de 2023.

MEHTA, A.; GULERIA, S.; SHARMA, R.; GUPTA, R. **The lipases and their applications with emphasis on food industry**. Microbial Biotechnology in Food and Health, 2021.

MELO, E. P.; BAPTISTA, R. P.; CABRAL, J. M. S.; J. Mol. Catal. B: **Enzym**, 22, 299, 2003.

MELO, E. P.; COSTA, S. M. B.; CABRAL, J. M. S.; FOJAN, P.; PETERSEN, S. B.; **Chem. Phys. Lipids**, 124, 37, 2003.

MILETIC, N.; LOOS, K.; GROSS, R.; Em **Biocatalysis in Polymer Chemistry**; Loos, K. (ed.); Wiley VCH-Verlag GmbH & Co.: Weinheim, cap. 4, 2011.

MOURA, C. V. R.; NUNES, A. S. L.; MOITA NETO, J. M.; NERES, H. L. S.; CARVALHO, L. M. G.; MOURA, E. M.; J. BRAZ. **Chem. Soc**, 23, 1226, 2012.

MUELLER, R. J. **Biological degradation of synthetic polyesters: Enzymes as potential catalysts for polyester recycling**. *Process Biochemistry*, 41, 2124-2128, 2006.

MULLER, R. J.; SCHRADER, H.; PROFE, J.; DRESLER, K.; DECKWER, W-D.; **Macromol. Rapid Commun**, 26, 1400, 2005.

MUNHOZ, M. D. **Enzimas: da obtenção à aplicação! Uma abordagem de valorização ao emprego dessas macromoléculas na indústria**. Faculdade de engenharia de alimentos, Unicamp, 2020.

MURUGAN, T.; DEEPIKA, P; KOWSALYA, A.; SIVASUBRAMANIAN, K.; REJISHA, R. P.; M. MURUGAN, M.; WINS, J. A. **Production and characterization of extracellular pectinase from a newly isolated *Bacillus* species from fruit waste soil**. *Materials*, 2020.

MWANZA, B. G.; MBOHWA, C.; TELUKDARIE, A. **Strategies for the Recovery and Recycling of Plastic Solid Waste (PSW): A Focus on Plastic Manufacturing Companies**. *Procedia Manufacturing*, v. 21, n. 2017, p. 686–693, 2018.

NEW PLASTICS ECONOMY. **Rethinking the Future of Plastics**. Disponível em: https://www3.weforum.org/docs/WEF_The_New_Plastics_Economy.pdf. Acesso em: Abril/2022.

NIKOLAIVITS, E.; MAKRIS, G. TOPAKAS. E. Immobilization of a cutinase from *Fusarium oxysporum* and application in pineapple flavor synthesis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 65, 3505-3511, 2017.

NYSSÖLÄ, A. **Which properties of cutinases are important for applications**. In *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99, 4931-4942, 2015.

OLIVEIRA, M. C. B. R. **Gestão de Resíduos Plásticos Pós-Consumo: Perspectivas para a Reciclagem no Brasil**. Dissertação (mestrado) – UFRJ/ COPPE/ Programa de Planejamento Energético, Rio de Janeiro, 2012.

OLIVEIRA, C. T. **Produção, concentração e caracterização de cutinase microbiana**. In *Engenharia Química*, 68. Mestrado - Universidade Federal de Santa Maria, 2018.

- PAPADAKI, E.; KONTOGIANNOPOULOS, N. K.; ASSIMOPOULOU, A. N.; MANTZOURIDOU, F. T. **Feasibility of multi-hydrolytic enzymes production from optimized grape pomace residues and wheat bran mixture using *Aspergillus niger* in an integrated citric acidenzymes production process.** *Bioresource Technology*, v. 309, 123317, 2020.
- PEREIRA, R. B., LUCAS, G. C., PINHEIRO, J. B. **Murcha de *Fusarium* em tomateiro.** *Nosso Alho*, Brasília, DF, n. 21, p. 22-25, 2014.
- PICCA, L. M. **Despolimerização de Polietilenotereftalato (PET) mediada por fungos filamentosos.** Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Rio Claro, 2018.
- PICCA, L. M.; BUCIOLI, E. C.; CHAVES, M. R. B.; de CASTRO, A. M.; VALONI, É.; de OLIVEIRA, V. M.; MARSAIOLI, A. J.; GOVONE, J. S.; de ANGELIS, D. F.; BRIENZO, M.; ATTILI-ANGELIS, D. **Fungal Screening for Potential PET Depolymerization.** *Polymers*, 15, 1581, 2023.
- 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.
- PIO, T. F.; FRAGA, L. P. e MACEDO, G. A. **Cutinases fúngicas: propriedades e aplicações industriais.** *Quim. Nova*, Vol. 31, No. 8, 2118-2123, 2008.
- RAO, M.; SCELZA, R.; SCOTTI, R.; GIANFREDI L. **Role of enzymes in the remediation of polluted environments.** *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, v. 10, n. 3, p. 333–353, jul. 2010.
- SOARES, C. M. F.; SANTANA, M. H. A.; ZANIN, G. M.; Castro, H. F.; **Quim. Nova**, 26, 832, 2003.
- SPERANZA P. **Caracterização bioquímica de cutinases produzidas em diferentes meios de cultivo por *Fusarium oxysporum* e avaliação do potencial enantiosseletivo destas enzimas.** Dissertação (mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, 2010.
- SRIVASTAVA, N. **Production of Food-Processing Enzymes from Recombinant Microorganisms.** *Enzymes in Food Biotechnology*. Department of Biotechnology, CETIILM, Greater Noida, India, 2019.
- SURIYA, J.; BHARATHIRAJA, S.; KRISHNAN, M.; MANIVASAGAN, P.; KIM, S.-K. **Marine Microbial Amylases: Properties and Applications.** *Advances in Food and Nutrition Research*, v. 79, 2016.
- VERMA, M. L.; KANWAR, S. S., **Purification and characterization of a low molecular mass alkaliphilic lipase of *Bacillus cereus* MTCC 8372.** *Acta microbiologica et immunologica hungarica*, vol. 57, no. 3, pp. 191-207, 2010.
- WEISS, R.; EISCHER, A.; TADIC, T.; GRITSCH, S. M.; ORTNER, M.; PRALL, K.; NEUNTEUFEL, E.; F. PUTZ, R. F.; GUEBITZ, G. M.; NYANHONGO, G. S. **Valorisation of slaughter house and deinking paper waste streams for the production of enzyme by *Trichoderma reesei*.** *Journal of Cleaner Production*, v. 275, 122882, 2020.

YAN, L.; ZHAO, H.; ZHAO, X.; XU, X.; DI, Y.; JIANG, C.; SHI, J.; SHAO, D.; HUANG, Q.; YANG, H.; JIN, M. **Production of bioproducts by endophytic fungi: Chemical ecology, biotechnological applications, bottlenecks, and solutions.** *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102, 6279-6298, 2018.

YAN, L.; ZHU, J.; ZHAO, X.; SHI, J.; JIANG, C.; SHAO, D. **Beneficial effects of endophytic fungi colonization on plants.** *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103, 3327-3340, 2019.

YOSHIDA, S.; HIRAGA, K.; TAKEHANA, T.; TANIGUCHI, I.; YAMAJI, H.; MAEDA, Y.; TOYOHARA, K.; MIYAMOTO, K.; KIMURA, Y.; ODA, K. **A bacterium that degrades and assimilates poly (ethylene terephthalate).** *Science*, 351, 1196-1199, 2016.

ZANIRATO, S. H.; ROTONDARO, T. G. **Consumo, um dos dilemas da sustentabilidade.** *Estudos Avançados*, v. 30, n. 88, p. 72-92, 2016.

ZAR, J.H., **Biostatistical Analysis**, Pearson, EUA, 2009.