



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO  
CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE  
TECNOLOGIA  
**Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia**



**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE FUNGOS ENDOFÍTICOS  
E FITOPATOGÊNICOS EM RELAÇÃO À PRODUÇÃO DA  
ENZIMA CUTINASE**

**Monique Maria Cardoso Maroldi Caetano**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE EM BIOTECNOLOGIA do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos.

***Orientador:***

Prof<sup>a</sup>. Dra. Cristiane Sanchez Farinas

***Coorientador***

Prof. Dr. Paulo Teixeira Lacava

**Bolsista CAPES – 88882.426519/2019-01**

**São Carlos - SP  
2020**

MONIQUE MARIA CARDOSO MAROLDI CAETANO

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE FUNGOS ENDOFÍTICOS  
E FITOPATOGÊNICOS EM RELAÇÃO À PRODUÇÃO DA  
ENZIMA CUTINASE**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE EM BIOTECNOLOGIA do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos.

***Orientador:***

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Cristiane Sanchez Farinas

***Coorientador***

Prof. Dr. Paulo Teixeira Lacava

**BANCA EXAMINADORA**

*Prof. Dra. Cristiane Sanchez Farinas.*

Embrapa Instrumentação – São Carlos

*Prof. Dra. Fernanda Perpétua Casciotori*

Departamento de Engenharia Química - UFSCar

*Prof. Dr. Marcel Otávio Cerri*

Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia - UNESP

**São Carlos - SP  
2020**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia  
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

---

Folha de Aprovação

---

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Monique Maria Cardoso Maroldi Caetano, realizada em 19/03/2020:

---

Profa. Dra. Cristiane Sanchez Farinas  
EMBRAPA

---

Prof. Dr. Marcel Otávio Cerri  
UNESP

---

Profa. Dra. Fernanda Perpétua Casciatori  
UFSCar

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente a Deus, que me permitiu a realização de cada passo desse trabalho.

Aos meus pais, a minha irmã e cunhado, a minha avó, a minha tia e a toda minha família que, com muito carinho e apoio, contribuíram para que eu chegasse até esta etapa de minha vida.

Ao meu marido que esteve ao meu lado durante a execução desde projeto e nunca mediu esforços para me apoiar.

Ao Prof. Dr. Paulo Teixeira Lacava e a Prof. Dra. Cristiane Sanchez Farinas pela paciência na orientação e incentivo que tornaram possível a conclusão desta dissertação.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (PPGBiotec-UFSCar) pela oportunidade em desenvolver este projeto.

Aos amigos e colegas, tanto da UFSCar quanto da Embrapa-Instrumentação, pelo incentivo e pelo apoio constante.

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

## RESUMO

O uso do plástico teve início no século passado e carrega impactos relacionados à contaminação ambiental extremamente relevantes, isso porque esse tipo de material vem sendo cada vez mais utilizado ao passar dos anos. Atualmente, a abordagem mais utilizada para retirada desse material de circulação é o depósito em aterros sanitários ou lixões. O uso de enzimas capazes degradar esse material destaca-se como uma estratégia sustentável para auxiliar na redução deste problema mundial de acúmulo de resíduos plásticos, sendo que as cutinases se destacam com um grande potencial na hidrólise do plástico. Dentro desse contexto, o objetivo desse estudo foi avaliar a viabilidade da utilização de fungos endofíticos e fitopatogênicos do gênero *Fusarium* em relação à produção de cutinase. Para isso, foram utilizados dois métodos de cultivos distintos, o sólido e o submerso, contendo diferentes fontes de carbono e micronutrientes, visando à seleção de uma linhagem microbiana de destaque para posterior aplicação do extrato enzimático na hidrólise de politereftalato de etileno (PET). Para ambas as técnicas de cultivo, os resultados obtidos pelas linhagens fitopatogênicas foram superiores aos obtidos pelas linhagens endofíticas. No cultivo submerso, uma linhagem de *Fusarium oxysporum* destacou-se com uma atividade máxima de 17,2 UI/mL após 48 h de cultivo, porém não houve reprodutibilidade para os experimentos realizados com esta linhagem nessa condição experimental. A fermentação em estado sólido revelou-se promissora para a produção de cutinase na ausência de solução nutriente, influenciando positivamente 4 das 5 linhagens testadas. A linhagem destaque para o cultivo em estado sólido utilizando-se farelo de trigo e água destilada foi uma de *Fusarium proliferatum* com uma atividade de 228 UI/g após 120 h de cultivo. Quando adicionado plástico a este meio de cultivo sólido, nas mesmas condições de umidade, tempo e temperatura, houve destaque para a linhagem de *Fusarium solani* com atividade de cutinase de 318 UI/g. Os resultados indicam que as linhagens utilizadas no presente trabalho são promissoras para a produção de cutinase, sendo o PET um potencial indutor na produção desta enzima quando utilizado no cultivo sólido.

**Palavras-chave:** Fitopatógenos; Endófitos; Cutinase; PET.

## ABSTRACT

The use of plastic started in the last century and has been increasingly used over the years causing extremely relevant impacts related to environmental contamination. Nowadays, the most widely used approach for removing this material from circulation is the waste disposal in landfills or dumps. The use of enzymes capable of degrading this material stands out as a sustainable strategy to help reduce this worldwide problem of plastic waste accumulation. The aim of this study was to identify the capacity of endophytic fungi and phytopathogenic fungi (genus *Fusarium*) in relation to cutinase production, in order to select a prominent strain for application in the polyethylene terephthalate (PET) hydrolysis. For this the fungi were cultivated in solid and submerged state, containing different carbon sources and nutrients. For both bioprocesses, the results obtained by phytopathogenic strains were superior to those obtained by endophytic strains. For the submerged cultivation, the strain *Fusarium oxysporum* stood out reaching an enzyme activity of 17.2 IU / mL after 48 h of cultivation, but there was no experimental reproducibility for this condition. Solid state cultivation was promising for the production of cutinase in the absence of nutrient solution, positive result was obtained for 4 of the 5 strains tested. The best cutinase activity obtained using wheat bran and distilled water was for the strain *Fusarium poliferatum* with an activity of 228 IU/g after 120 h of cultivation. When plastic (PET) was added to the medium, the strain *Fusarium solani* stood out with the best cutinase activity reaching 318 IU / g. The results indicate that the strains used in the present work are promising for the production of cutinase, with PET being a potential inducer in the production of this enzyme when used in solid cultivation.

**Keywords:** Phytopathogen; Endophyt; Cutinase; PET.

## LISTA DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 1.</b> Estrutura do sítio catalítico da cutinase isolada de <i>Thermobifida fusca</i> . (Extraído e adaptado de AUSTIN et al., 2018) .....   | 11 |
| <b>Figura 2.</b> Estrutura geral da cutina. ....   | 11 |
| <b>Figura 3.</b> Bactérias, fungos e planta apresentados pela literatura como produtores de cutinase .....   | 12 |
| <b>Figura 4.</b> Bactéria endofítica no xilema de <i>Catharanthus roseus</i> .....   | 13 |
| <b>Figura 5.</b> Plantação de tomate infectada pela murcha de <i>Fusarium</i> .....  | 14 |
| <b>Figura 6.</b> Comparação das composições dos ácidos graxos poli-insaturados de cinco óleos (de girassol, papoula, linhaça, cânhamo e gergelim).....   | 16 |
| <b>Figura 7.</b> Estrutura de um grão de trigo (A); Constituição aproximada do farelo de trigo por base de matéria seca (B) .....  | 18 |
| <b>Figura 8.</b> Produção anual global (milhões de toneladas/ano) de polímeros sintéticos em 2016 .....  | 19 |
| <b>Figura 9.</b> Principais estratégias para manejo de resíduos PET. Em vermelho destaque para os principais destinos desses resíduos. ....  | 20 |
| <b>Figura 10.</b> Discos de PET (aproximadamente 5mm) adicionados ao cultivo sólido. ....  | 30 |
| <b>Figura 11.</b> Garrafa utilizada para obtenção dos discos e material moído de PET.....  | 31 |
| <b>Figura 12.</b> Moinho pulverizador criogênico utilizado para obtenção de partículas menores de PET .....  | 32 |
| <b>Figura 13.</b> PET moído após dois ciclos no moinho criogênico. (A) Material bruto da moagem (B) Material peneirado e separado em 3 grupos (>1mm, entre 300µm e 1mm e <300µm) .....   | 32 |
| <b>Figura 14.</b> Morfologia das linhagens reativadas em BDA durante 7 dias a 30 °C.....   | 35 |
| <b>Figura 15.</b> Atividade enzimática (A), quantificação de proteínas (B) e atividade específica (C) dos cultivos das linhagens fitopatogênicas e endofíticas após cultivo de 48 e 120 h em meio líquido com óleo de linhaça a 30°C e 100 rpm. .... | 37 |
| <b>Figura 16.</b> Comparação dos cultivos líquidos da linhagem F.6 ( <i>F. oxysporum</i> ) após 48 h de cultivo, 30 °C, 100 rpm. ....  | 38 |
| <b>Figura 17.</b> Perfil temporal da atividade enzimática da linhagem de <i>Fusarium oxysporum</i> (F.6) com realização de pré-cultivo e adição de extrato de levedura (0,06%) no cultivo. ....  | 40 |
| <b>Figura 18.</b> Atividade enzimática das linhagens fitopatogênicas após cultivo de 120 h em meio sólido com diferentes composições de meio de cultivo e farelo de trigo como substrato.....  | 41 |
| <b>Figura 19.</b> Concentração de proteínas totais das linhagens fitopatogênicas após cultivo de 120h em meio sólido com diferentes composições de meio de cultivo e farelo de trigo como substrato.....   | 42 |
| <b>Figura 20.</b> Ilustração do cultivo das linhagens em placa com meio enriquecido com PET para induzir a expressão de enzimas que degradem PET, como por exemplo cutinases .....   | 44 |
| <b>Figura 21.</b> Atividades específicas de três cultivos sólidos realizados: (Ag) Farelo de trigo + água destilada; (P0,5) Farelo e trigo + 0,5g de PET em discos; (P0,1) Farelo de trigo + 1,0g de PET em discos. ....                             | 46 |
| <b>Figura 22.</b> Tubos após a hidrólise enzimática de PET .....   | 48 |

## LISTA DE TABELAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabela 1.</b> Descrição das linhagens utilizadas no presente trabalho .....   | 26 |
| <b>Tabela 2.</b> Composição do meio de cultivo líquido .....   | 27 |
| <b>Tabela 3.</b> Componentes do Meio de Mandels .....  | 28 |
| <b>Tabela 4.</b> Resultado da reativação dos fungos endofíticos e fitopatogêncios após 7 dias de cultivo em placa com meio BDA a 30 °C .....     | 34 |
| <b>Tabela 5.</b> Condições de cultivo e resultados obtidos para a linhagem F.6 ( <i>F. oxysporum</i> ) após 48h de cultivo, 100 rpm, 30 °C. .... | 39 |
| <b>Tabela 6.</b> Resultados obtidos na hidrólise de PET através da obtenção do peso seco pré e pós hidrólise.....                                | 47 |

# SUMÁRIO

|  |    |
|--|----|
| Introdução .....   | 9  |
| <b>1. Revisão bibliográfica</b> .....  | 11 |
| 1.1 Cutinase.....  | 11 |
| 1.1.1 Estrutura e função.....  | 11 |
| 1.1.2 Microrganismos produtores.....   | 12 |
| 1.2.2.1 Endofíticos.....   | 12 |
| 1.2.2.2 Fitopatógenos.....   | 13 |
| 1.2.3 Produção de cutinase pelo gênero <i>fusarium</i> .....                 | 14 |
| 1.2 Cultivos microbiológicos para obtenção de cutinase.....                  | 15 |
| 1.2.1 Cultivo submerso.....  | 15 |
| 1.2.2 Cultivo sólido .....   | 16 |
| 1.2.3 Influência de sais no cultivo sólido para produção de cutinase.....    | 18 |
| 1.3 Aplicações da enzima cutinase .....                                      | 18 |
| 1.3.1 Biorremediação: degradação de PET .....                                | 18 |
| 1.3.2 Indústria têxtil.....  | 22 |
| 1.3.3 Indústria de detergentes.....  | 23 |
| 1.3.4 Outras aplicações.....   | 23 |
| 1.4 Objetivos.....   | 25 |
| 1.4.1 Geral.....   | 25 |
| 1.4.2 Específicos.....   | 25 |
| <b>2. Materiais e Métodos</b> .....  | 26 |
| 2.1 Origem das linhagens e reativação.....                                   | 26 |
| 2.2 Cultivo em estado líquido .....  | 27 |
| 2.2.1 Meio de cultivo.....   | 27 |
| 2.2.2 Obtenção do extrato bruto .....  | 27 |
| 2.3 Cultivo em estado sólido .....   | 27 |
| 2.3.1 Farelo de trigo + meio de mandels .....                                | 28 |
| 2.3.2 Extração e obtenção do extrato bruto no cultivo em estado sólido ..... | 28 |
| 2.3.3 Farelo de trigo + água destilada .....                                 | 29 |
| 2.3.4 Extração e obtenção do extrato bruto .....                             | 29 |
| 2.3.5 Farelo de trigo + água destilada + plástico.....                       | 29 |
| 2.3.6 Extração e obtenção do extrato bruto .....                             | 30 |
| 2.4 Análise da atividade de cutinase.....                                    | 30 |
| 2.5 Quantificação de proteínas totais .....                                  | 31 |
| 2.6 Obtenção de pet .....  | 31 |
| 2.7 Hidrólises enzimáticas .....   | 32 |
| <b>3. Resultados e discussão</b> .....                                       | 34 |
| 3.1 Reativação das linhagens.....  | 34 |
| 3.2 Cultivo submerso das linhagens reativadas .....                          | 36 |
| 3.3 Análise de reprodutibilidade.....  | 38 |
| 3.4 Cinética do cultivo líquido .....  | 40 |
| 3.5 Cultivos em estado sólido .....  | 41 |
| 3.6 Hidrólise de PET .....   | 46 |
| <b>4. Conclusões</b> .....   | 50 |
| <b>5. Perspectivas futuras</b> .....   | 51 |
| <b>6. Referências bibliográficas</b> .....                                   | 52 |

## INTRODUÇÃO

O politereftalato de etileno (PET), polímero desenvolvido por Whinfield e Dickson em 1941, se caracteriza como um dos plásticos mais produzidos atualmente (DANSO, CHOW e STREIT, 2019). Alta resistência a temperatura e impacto, alta estabilidade hidrolítica e aparência incolor são algumas das características responsáveis pela versatilidade do PET (SOARES, 2010; GAO et al., 2017; KOSHTI et al., 2018).

As garrafas, principal uso do PET no setor de embalagens, possuem características que as configuram como fator de grande preocupação ambiental. Estas possuem uma durabilidade alta e uma vida útil curta, o que confere a geração de enormes quantidades de resíduos (GOMES et al. 2019). Sendo assim, há uma preocupação global em se destinar corretamente esse material e, se possível, reintroduzi-lo ao mercado (KOSHTI et al. 2018).

Os três principais destinos dos resíduos PET são: aterros/lixões, incineração e reciclagem. Dentre os três, a reciclagem é a que se apresenta como o destino ambientalmente correto do material, sendo que esta pode ocorrer por meio de três processos principais: o mecânico, o químico e o biológico (KOSHTI et al., 2018).

No processo mecânico, o plástico (PET) passa por diversas etapas, sendo que a principal é a moagem, gerando diversos graus de degradação do polímero. Esta característica faz com que dificilmente haja homogeneidade no material obtido, o que limita sua posterior aplicação (HATTI-KAUL et al., 2020; GRIGORE, 2017). No caso do processo químico, busca-se obter novamente os monômeros ou oligômeros do PET através de reações como acidólise, alcoólise e glicólise. Para isso é necessária uma infraestrutura custosa e o processo em si requer muita energia, desta forma torna-se de difícil viabilidade (DI SOUZA et al., 2008; GRIGORE, 2017; HATTI-KAUL et al., 2020).

No processo biológico, são utilizadas enzimas com capacidade de despolimerizar PET a fim de se obter, similar ao processo químico, os monômeros ou oligômeros de PET. As vantagens deste processo são várias, entre elas: é um processo ambientalmente correto pois não libera poluentes ambientais e ocorre em condições mais brandas de temperatura, o que diminui o custo geral do processo (NIKOLAIVITS et al., 2017; CASTRO et al., 2018; GARCÍA 2018).

Enzimas como lipases, carboxilesterases e cutinases são as principais enzimas relatadas na literatura com capacidade de despolimerizar PET. Há relevância para as

cutinases, visto que são consideradas enzimas intermediárias entre as lipases e as esterases, sendo capazes de realizar reações de hidrólise, de esterificação e transesterificação (MUELLER, 2006; CASTRO et al., 2018). Tanto os fungos, como as bactérias são reportados na literatura como produtores de cutinase, sendo que o gênero *Fusarium* se destaca neste contexto (CARVALHO et al., 2000; CHEN et al., 2008; PIO e MACEDO, 2009; DUTTA e DUTTA, 2010; NYSSÖLÄ, 2015).

As vantagens de se despolimerizar o PET com uso de enzimas microbiológicas são extremamente relevantes na constituição de métodos mais ecológicos de despolimerização do material. (NIKOLAIIVITS et al., 2017; JOO et al., 2018). Isso evidencia a importância da bioprospecção de enzimas, como por exemplo, cutinases, em microrganismos.

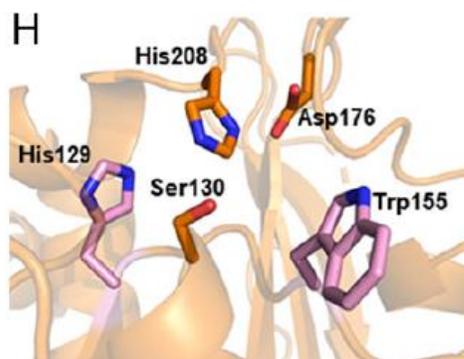
Dentro dessa temática, o presente trabalho teve como objetivo investigar a produção da enzima cutinase por diferentes linhagens do gênero *Fusarium* a fim de selecionar cepas com atividade para esta enzima e avaliar a influência de diferentes condições de cultivo para a produção de cutinase.

# 1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

## 1.1 CUTINASE

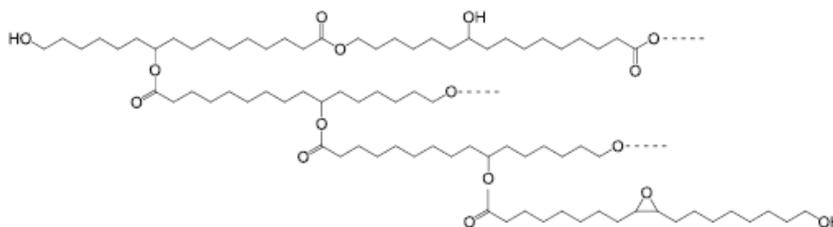
### 1.1.1 Estrutura e função

Cutinases (EC 3.1.1.74) são enzimas extracelulares pertencentes a família das serino-esterases e a superfamília  $\alpha/\beta$ -hidrolases, especificamente, aquelas que agem em ligações ester-carboxilícas. Essas proteínas apresentam em sua estrutura proteica a seguinte tríade catalítica: serina, histidina e ácido aspártico, como mostrado na Figura 1 (CHEN et al., 2013).



**Figura 1.** Estrutura do sítio catalítico da cutinase isolada de *Thermobifida fusca*. (Extraído e adaptado de AUSTIN et al., 2018)

Na natureza, as cutinases são responsáveis pela hidrólise da cutina (Figura 2), um biopoliéster insolúvel presente na cutícula das plantas. Esse biopoliéster possui estrutura variável, sendo mais comum a composição de ácidos de 16 e 18 carbonos. Além de reações de hidrólise, essas enzimas são capazes de catalisar reações reversas, tais como esterificação, trans-esterificação e aminólise (NYSSÖLÄ, 2015).



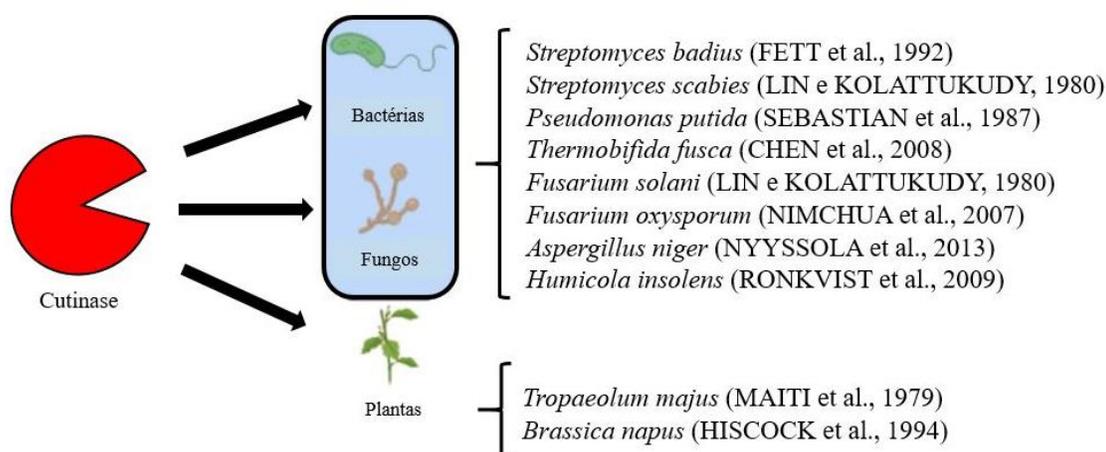
**Figura 2.** Estrutura geral da cutina. (Retirado de NYSSÖLÄ, 2015)

As cutinases são reconhecidas como enzimas intermediárias entre as lipases e as esterases. Isso se dá pois são capazes de hidrolisar ambos, ésteres e lipídios. Essa

multifuncionalidade permite que realizem várias reações, entre elas, hidrólises, esterificações e transesterificações. Visto isso, são passíveis de aplicação em áreas tais como: indústria de detergentes, têxtil e biorremediação (CARVALHO, et al., 2000; CHEN et al., 2008; PIO e MACEDO, 2009; DUTTA e DUTTA, 2010; NYSSÖLÄ, 2015).

### 1.1.2 Microrganismos produtores

As cutinases podem ser produzidas por bactérias, fungos e plantas. A Figura 3 mostra algumas das diversas espécies de bactérias, fungos e planta que foram caracterizadas na literatura por produzirem a enzima.



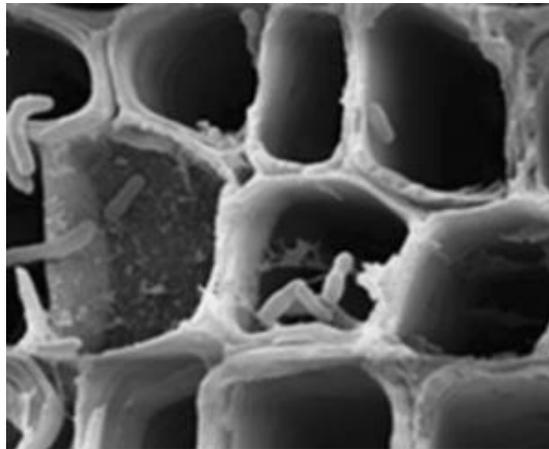
**Figura 3.** Bactérias, fungos e planta apresentados pela literatura como produtores de cutinase (MAITI et al., 1979; LIN e KOLATTUKUDY, 1980; CHANDRA e KOLATTUKUDY, 1987; FETT et al., 1992; HISCOCK et al., 1994; PUNNAPAYAK e ZIMMERMANN, 2007; CHEN et al., 2008; RONKVIST et al., 2009; NYSSÖLÄ et al., 2013)

Dentro desse contexto, dois grupos de microrganismos são especialmente estudados em relação a produção de cutinase, sendo eles os fitopatogênicos e os endofíticos.

#### 1.2.2.1 Endofíticos

Microrganismos endofíticos são aqueles que habitam os tecidos internos de plantas (Figura 4), por pelo menos um período do seu ciclo de vida, sem causar nenhum dano perceptível ao hospedeiro (CHANDRA, 2012). Evidências indicam que este tipo de associação planta-microrganismo é importante em diversos aspectos para a planta, como por

exemplo, na atenuação de doenças, no apoio ao sistema imunológico e tolerância a estresses abióticos (YAN et al., 2019). Já para o microrganismo, a planta oferece proteção e nutrientes para sua sobrevivência. É válido ressaltar que o mecanismo de interação entre o endófito e o hospedeiro é estabelecido de forma específica entre ambos, envolvendo a produção de compostos e moléculas sinalizadoras (YAN et al., 2019).



**Figura 4.** Bactéria endofítica no xilema de *Catharanthus roseus*. (Extraído e adaptado de FERREIRA et al., 2011)

Estudos apontam que o sucesso da relação entre o microrganismo e a planta hospedeira se dá por meio da produção de metabólitos bioativos. Neste sentido, os endofíticos se destacam no contexto biotecnológico pela produção desses compostos com utilidade na área médica, têxtil, alimentícia, agrícola e ambiental. Outro produto relevante no que diz respeito aos microrganismos endofíticos são as enzimas por eles secretadas, por exemplo, as celulases, amilases e pectinases (YAN et al. 2018).

### **1.2.2.2 Fitopatógenos**

Os fitopatógenos são aqueles microrganismos que ao colonizarem uma planta causam danos à mesma (Figura 5). Esses microrganismos causam doenças à planta hospedeira por meio de diversos mecanismos. Um desses mecanismos é a produção de compostos, como 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 (PASCHOLATI et al., 1998; MAGNANI, 2007).



**Figura 5.** Plantação de tomate infectada pela murcha de *Fusarium* (Extraído e adaptado de LIM et al., 2006).

Dentre os fitopatógenos de interesse econômico, responsáveis pelo ataque de culturas agrícolas, destacam-se os fungos filamentosos pertencentes ao gênero *Fusarium*. Estima-se que mais de 100 culturas são afetadas por esse gênero, dentre elas *Arabidopsis thaliana* (Erva estrelada), *Brassica rapa* (Nabo), *Glycine max* (Soja), *Jatropha curcas* (Pinhão-manso) e *Ricinus communis* (Mamona) (Chatarina and Carels 2018, van Dam et al. 2018)

O estudo dos fitopatógenos possui duas vertentes. Há o interesse em estudar estratégias de combate a esse tipo de microrganismo causadores de doenças em plantas, e ao mesmo tempo, uma segunda abordagem revela o interesse em se estudá-los devido a sua capacidade de produzir biomoléculas de valor agregado, como a produção de enzimas para diversas aplicações. Entre elas destacam-se as celulases (SHIRSATH et al., 2018), pectinases (KIKOT et al., 2010) e cutinases (SPERANZA et al., 2011).

### **1.2.3 Produção de cutinase pelo Gênero *Fusarium***

PURDY e KOLATTUKUDY (1973), em um de seus estudos pioneiros, investigaram a hidrólise de cutina por uma enzima extracelular denominada cutinase. Neste estudo, foi utilizada uma linhagem de *Fusarium solani pisi*, conhecido por causar a podridão vermelha da raiz em plantas (soja e batata). As principais características descritas para essa enzima nesse estudo envolveram: a determinação do melhor substrato para degradação (no caso do estudo citado, p-nitrofenilpalmitato), compostos que demonstraram

auxiliar na atividade enzimática (Triton X-100) e pH ótimo da enzima (8,5). Outros estudos envolvendo o mesmo grupo trouxeram contribuições importantes para esta área, entre eles pode-se citar: PURDY e KOLATTUKUDY (1975), onde foram estudadas cutinases específicas pertencentes a uma linhagem de *Fusarium solani* tendo algumas de suas características exploradas; KOLATTUKUDY (1985) que elucidou a fundo o papel das cutinases no processo de infecção do fitopatógeno a planta.

Outra espécie de *Fusarium* de bastante relevância citado na literatura é o *Fusarium oxysporum*, retratado por PIO e MACEDO (2007). Neste estudo foram testadas algumas fontes de carbono e nitrogênio para o cultivo líquido a fim de revelar qual iria se sobressair e aumentar a produção de cutinase. Os resultados revelaram que as melhores condições para obtenção de níveis maiores de atividade cutinólítica (17,72 UI/mL) foram: 30°C, 100rpm, utilizando o indutor óleo de linhaça por um período de 48h de cultivo.

O cultivo sólido para a produção de cutinase por *Fusarium* também foi explorado por (FRAGA et al., 2012) que avaliou a influência de três substratos, sendo eles: farelo de trigo, de arroz e de soja para uma linhagem de *F. oxysporum*. Os resultados revelaram que a maior atividade de cutinase (173,6 UI/g) foi obtida utilizando-se farelo de trigo, após 120h de cultivo a 28,3°C.

Outro estudo envolvendo o cultivo sólido para produção de cutinase por *Fusarium* foi realizado por OLIVEIRA (2018) que avaliou a atividade cutinólítica de 4 espécies, sendo elas: *F. acuminatum*, *F. verticillioides*, *F. equiseti* e *F. oxysporum* em dois substratos diferentes, arroz e farelo de arroz. Os melhores resultados envolveram o uso da espécie *Fusarium verticillioides* com o substrato de farelo de arroz, obtendo uma atividade de 16 UI/g a 28°C e 10 dias de cultivo.

## **1.2 CULTIVOS MICROBIOLÓGICOS PARA OBTENÇÃO DE CUTINASE**

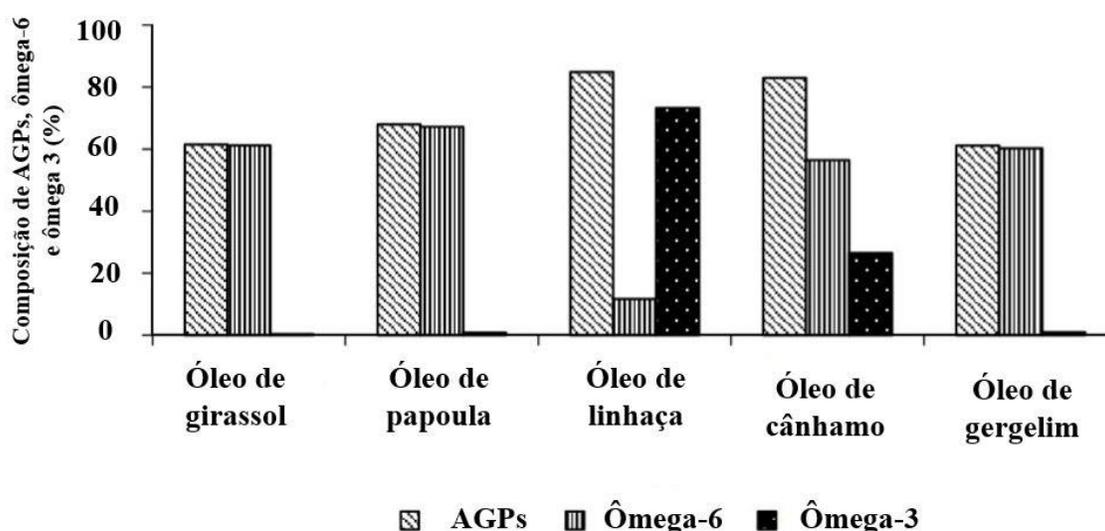
### **1.2.1 Cultivo submerso**

O cultivo submerso pode ser definido como o cultivo de microrganismos em um meio líquido enriquecido com nutrientes (MARTINS et al., 2011)

Alguns estudos revelam que a produção de cutinase por cultivo submerso é viável. Entre eles, pode-se destacar o trabalho desenvolvido por PIO e MACEDO (2007), que

como já citado (Item 1.2.3), envolveu o desenvolvimento de um meio mineral acrescido de um indutor para se melhorar a produção de cutinase por *Fusarium oxysporum*; já CHAUDHARI e SINGHAL (2015) utilizaram cutina provida de casca de melancia como fonte de carbono no cultivo submerso, revelando máxima atividade de 6.77 UI/mL também para uma linhagem de *F. oxysporum*.

O estudo realizado por PIO e MACEDO (2007) relatou que o óleo de linhaça no cultivo submerso age como um indutor na produção de cutinase. A linhaça (*Linum usitatissimum* L) é uma oleaginosa rica em ácidos graxos poli-insaturados (AGP's), tais como o ômega-3, conforme constatado por SENILA et al., 2020 (Figura 6).



**Figura 6.** Comparação das composições dos ácidos graxos poli-insaturados de cinco óleos (de girassol, papoula, linhaça, cânhamo e gergelim) (Extraído e adaptado de SENILA et al., 2020).

### 1.2.2 Cultivo sólido

O cultivo em estado sólido pode ser definido como o crescimento microbiano que ocorre em meio sólido, seja um suporte inerte ou um material insolúvel, servindo como fonte de carbono. A essas partículas sólidas é acrescida uma pequena quantidade de água, o suficiente para o metabolismo do microrganismo (PANDEY et al., 2000; HOLKER et al., 2004, MARTINS et al., 2011). Os fungos filamentosos possuem uma capacidade maior de se desenvolverem neste tipo de ambiente (ausência de água líquida) quando comparados a bactérias, fazendo destes microrganismos uma classe preferencial para utilização na fermentação em estado sólido (RAGHAVARAO et al., 2003).

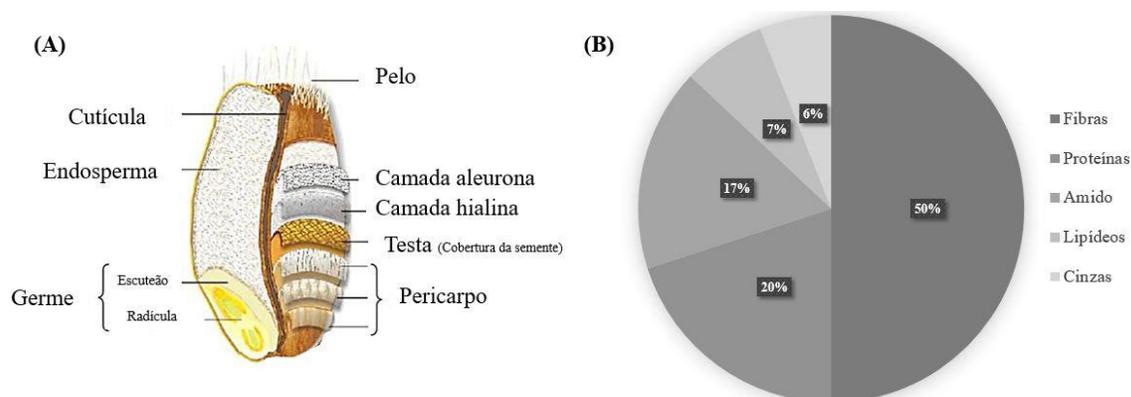
A produção de cutinases por cultivo sólido vem sendo relatada na literatura como potencial meio eficiente para este fim, especialmente para fungos do gênero *Fusarium* (FRAGA et al., 2012, OLIVEIRA, 2018).

Um tópico relevante no cultivo sólido é a seleção do substrato, visto que esse servirá de suporte físico e fonte nutriente para o microrganismo. Este deverá apresentar algumas características específicas para ser considerado adequado ao cultivo, como por exemplo uma capacidade mínima de absorção de água para assegurar o crescimento microbiano e suas respectivas atividades biológicas. Em determinados casos se torna necessária a adição de uma solução nutritiva, como é o caso do meio de Mandels (MANDELS e WEBER, 1969), visto que muitas vezes somente a fonte de carbono não é adequada para garantir o crescimento.

Neste contexto surge uma alternativa interessante como substrato para cultivos sólidos: os resíduos agroindustriais. Estes possuem características necessárias para manutenção do microrganismo: oferecimento de nutrientes e suporte físico. Além disso, possuem um baixo valor agregado, o que pode vir a tornar o processo mais viável economicamente. (de CASTRO et al., 2015; OLIVEIRA, 2018).

Alguns substratos descritos como subprodutos agroindustriais, tais como o farelo de trigo, farelo de arroz, farelo de soja foram explorados em relação a sua capacidade de servirem como substrato no cultivo sólido para produção de cutinase (FRAGA et al., 2012; OLIVEIRA, 2018). Sendo que dentre eles, o substrato que quando utilizado influenciou numa maior atividade cutinólítica foi o farelo de trigo (173,6 UI/mL).

O farelo de trigo é uma mistura de diversos fragmentos advindos da camada hialina-aleurona do grão (Figura 7a) e constitui o principal subproduto advindo da moagem do trigo (DI LENA et al., 1997; SILVA et al., 2003). A constituição do farelo de trigo (Figura 7b) é majoritariamente fibrosa e proteica, sendo que o amido, as cinzas e os lipídeos também estão presentes. (DEROOVER et al., 2019; SHENOY e PRAKASH 2002; HEMERY et al., 2009; ZHANG e MOORE 1997).



**Figura 7.** Estrutura de um grão de trigo (A); Constituição aproximada do farelo de trigo por base de matéria seca (B) (Extraído e adaptado de DERROOVER et al., 2019; HEMERY et al., 2007).

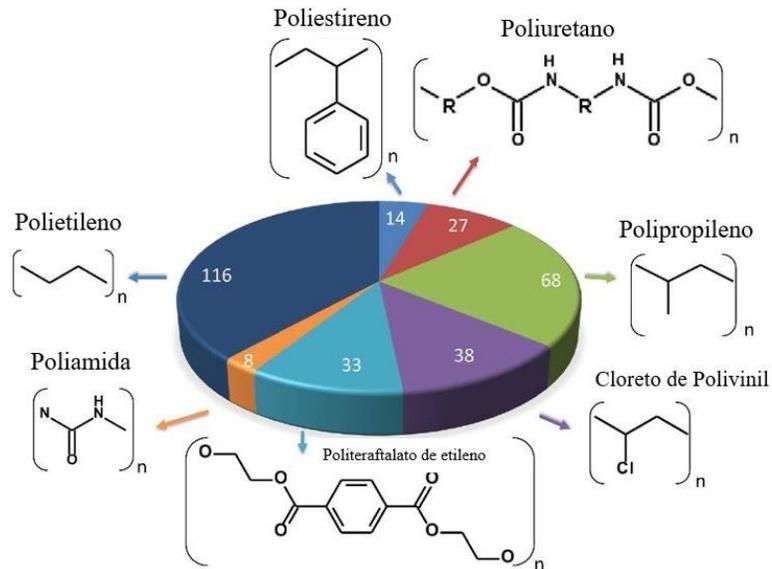
### 1.2.3 Influência de sais no cultivo sólido para produção de cutinase

Diversos estudos reportam a influência de soluções nutrientes adicionadas ao cultivo sólido para produção de cutinase. (PIO e MACEDO, 2007; SPERANZA, 2010; FRAGA et al., 2012; OLIVEIRA, 2018; de OLIVEIRA et al., 2019). Para todos os estudos realizados, a inserção de um meio nutriente ao cultivo resultou em níveis menores de produção enzimática.

## 1.3 APLICAÇÕES DA ENZIMA CUTINASE

### 1.3.1 Biorremediação: Degradação de PET

Dentre os polímeros sintéticos mais produzidos anualmente encontra-se o politereftalato de etileno (Figura 8). O PET é um polímero termoplástico e sua alta produção (superior a 30 milhões de toneladas anuais) se deve a sua principal aplicação: garrafas descartáveis para bebidas carbonatadas (GOMES et al., 2019).

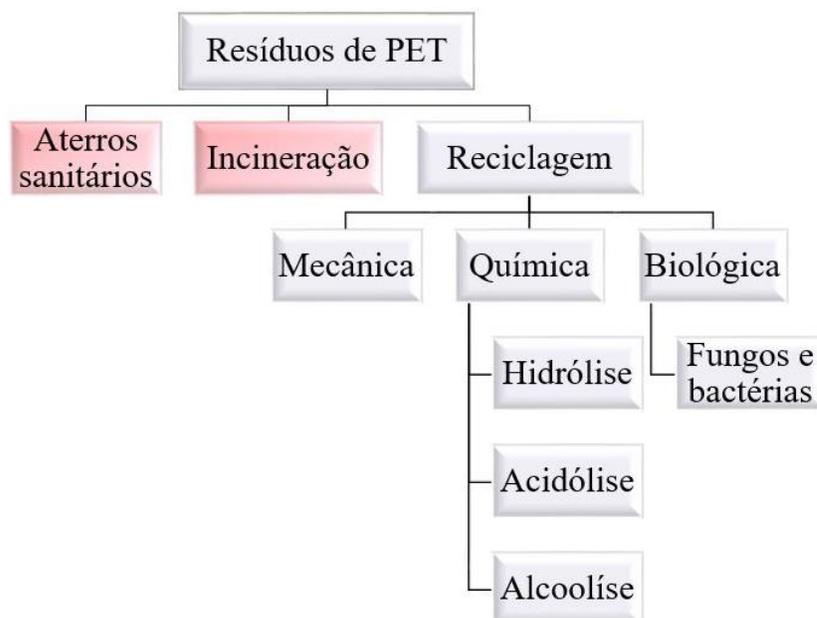


**Figura 8.** Produção anual global (milhões de toneladas/ano) de polímeros sintéticos em 2016. (Extraído e adaptado de: DANSO et al., 2019)

Os plásticos, no geral, representam cerca de 80% dos resíduos encontrados em oceanos, aterros sanitários e lixo municipal (KOSHTI et al., 2018). A geração deste tipo de resíduo aumenta diariamente e atualmente é de aproximadamente 150 milhões de toneladas por ano (RAHIMI e GARCÍA, 2017). Características como alto peso molecular, cadeias longas inertes e hidrofobicidade são alguns dos motivos pelos quais os plásticos são de difícil degradação sob condições ambientais naturais (LEE e LIEW, 2019). Vale ressaltar que o PET representa uma das parcelas mais expressivas do total desses resíduos (GOMES et al., 2019).

O principal problema especialmente relacionado ao PET refere-se ao seu principal uso: garrafas. Essas são duráveis, possuem boa resistência e transparência, porém possuem uma vida útil muito curta e são produzidas em enormes quantidades, gerando, uma quantidade enorme de resíduos (GOMES et al., 2019). Visto esta situação, há uma preocupação global em se destinar corretamente esses resíduos para que assim possam gerar menos impactos ambientais, e se possível, serem reintroduzidos no mercado (KOSHTI et al., 2018).

Atualmente, existem 3 vias principais de destino de resíduos PET, que refletem também os três principais destinos de plásticos no geral, como mostrado na Figura 9.



**Figura 9.** Principais estratégias para manejo de resíduos PET. Em vermelho destaque para os principais destinos desses resíduos (Extraído e adaptado de KOSHTI et al., 2018).

Segundo estimativas apresentadas pela UNEP (2018) na cartilha sobre plásticos de uso único, cerca de 79% dos resíduos plásticos produzidos até o ano de 2018 estão em aterros, lixões ou no meio ambiente, 12% foram incinerados e apenas 9% foram reciclados.

Destinar esse material a aterros sanitários, apesar de ser considerada a maneira mais fácil de se depositar resíduos PET, possui diversas desvantagens. A principal e mais preocupante é permanência destes no ambiente. Isso se deve a dificuldade de degradação sob condições muitas vezes instáveis e anaeróbias oferecidas nesses locais (KOSHTI et al., 2018).

A incineração, responsável por uma parcela intermediária de destino desses resíduos, apesar de apresentar uma proposta de se obter energia a partir desse material, também possui desvantagens de preocupação global considerável. Isso é devido a liberação de dióxidos e furanos no ambiente durante o processo; esses compostos podem vir a contaminar solos e águas, afetando a saúde da população. (HATTI-KAUL et al., 2020).

As desvantagens apresentadas para os dois métodos mais utilizados de descarte dos resíduos PET gerou uma preocupação ambiental em se desenvolver métodos ecologicamente corretos para este fim. Neste contexto destaca-se a reciclagem, que pode

ocorrer de três maneiras: mecanicamente, quimicamente ou biologicamente (KOSHTI et al., 2018).

No processo mecânico, considerado o mais comum entre os três, o resíduo PET passa inicialmente por uma sessão de triagem, em seguida é moído, lavado, fusionado, extrudado e granulado. Esse processo gera diversos graus de degradação do polímero, o que limita diretamente o número de reprocessamentos (HATTI-KAUL et al., 2020). Além disso, o material reciclado por esse método assume características heterogêneas o que limita suas novas aplicações e o torna menos atrativo (GRIGORE, 2017).

Já no processo de reciclagem química, os plásticos são reprocessados a fim de que sua estrutura química seja retomada a matéria prima, para que assim sirva de insumo básico para a produção de novos produtos plásticos. Ou seja, a intenção é fazer a reação contrária a síntese do PET, no sentido de se obter novamente monômeros ou oligômeros do material (GRIGORE, 2017). Para isso alguns processos foram desenvolvidos, entre eles a hidrólise, acidólise, alcoólise, glicólise e aminólise (DI SOUZA et al., 2008). Porém, trata-se de um processo que requer muita energia e de alto custo, sendo de difícil viabilidade atualmente (HATTI-KAUL et al., 2020).

Por fim, o terceiro método de reciclagem é o biológico. Neste processo são utilizadas 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). Enzimas como cutinases, lipases e carboxilesterases se destacam por serem capazes 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).

FURUKAWA et al. (2019) avaliaram a atividade de hidrólise de uma cutinase isolada e modificada geneticamente de *Thermobifida fusca* (TfCut2) sob diferentes surfactantes. A adição de surfactantes catiônicos ao meio de hidrólise apresentou os melhores resultados, sendo que a taxa de degradação de PET após uma reação de 24h utilizando a enzima mutante, na presença do surfactante catiônico foi de 90%. Esse

resultado é indicado pelos autores como a taxa mais alta relatada até o momento para PET hidrolases.

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, de 59,989  $\mu\text{mol/L}$  (9,36 g / L). Esses resultados foram revelantes pois indicam 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.

### 1.3.2 Indústria têxtil

As fibras de algodão, componentes do tecido mais popular no mundo, são processadas de diversas formas para adquirir as características desejáveis para comercialização. Entre essas etapas, a de limpeza da fibra é aquela responsável por retirar a 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 altas quantidades de água, energia, gerando poluentes alcalinos e danos as 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 potenciais candidatas para substituir a hidrólise alcalina. Resultados promissores foram obtidos ao se utilizar cutinases combinadas a pectinases, como indicado por AGRAWAL et al., 2008 e DEGANI et al., 2002. Essa combinação de enzimas, resumidamente, atua da seguinte maneira: as cutinases são requeridas para promoverem aberturas na camada cuticular permitindo que as pectinases internalizem a fibra e promovam 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

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). NIMCHUA et al. (2007), avaliaram o tratamento de fios de PET por duas cutinases isoladas de dois fungos do gênero *Fusarium* (*F. solani* e *F. oxysporum*). A cutinase de *F. oxysporum*, mostrou-se mais eficiente em comparação àquela obtida de *F. Solani*, ou seja, a cutinase advinda de *F. Oxysporum* promoveu um aumento maior da hidrofiliabilidade dos fios de PET.

### 1.3.3 Indústria de detergentes

Sua aplicação na indústria de detergentes torna-se preferencial quando comparada a outras lipases que desempenham a mesma função devido a estabilidade das cutinases a diversos fatores tais como: presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, faixa de temperatura (20-50°C), pH (estáveis em pH alcalino), presença de outras enzimas. Outro fator que a torna interessante para este uso é a capacidade das cutinases em remover triacilgliceróis e hidrolisar gorduras sem que o cálcio esteja presente, diferentemente de outras lipases comerciais que usualmente são empregadas nesta indústria (DUTTA et al., 2009).

GARCIA et al., 2017 em seu estudo buscou avaliar o potencial de uma cutinase (ANCUT2) isolada de *Aspergillus nidullans* para aplicação na formulação de detergentes. Além da caracterização bioquímica desta enzima, indicando que esta enzima é termoalcalina, tendo maior atividade a pH 9 e 60°C, os resultados obtidos indicam o potencial da ANCUT2 na formulação de detergentes, visto sua capacidade de se manter estável e compatibilidade a compostos de detergentes comerciais.

### 1.3.4 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, a cutinase pode ser aplicada na retirada de compostos indesejáveis, como por exemplo a hemicelulose do xarope de amido

de trigo, visto que este composto prejudica o processo de obtenção do produto final (PIO et al., 2008).

No setor agrícola as cutinases também podem vir a desempenhar funções interessantes na formulação de inseticidas e pesticidas. Isso se deve ao fato de 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 (KOLATTUKUDY e POULOSE, 1996; OLIVEIRA, 2018; PIO et al., 2008).

## **1.4 OBJETIVOS**

### **1.4.1 Geral**

Este trabalho teve como objetivo avaliar a capacidade de fungos endofíticos e fitopatogênicos em relação à produção da enzima cutinase quando cultivados em meio líquido e sólido, sob diferentes condições e ação de indutores.

### **1.4.2 Específicos**

- Cultivar as 12 linhagens pertencentes ao gênero *Fusarium* em meio líquido na presença de óleo de linhaça;
- Cultivar as 12 linhagens pertencentes ao gênero *Fusarium* em meio sólido;
- Avaliar a influência do meio nutriente utilizado no cultivo em estado sólido;
- Avaliar a influência da adição de PET no cultivo em estado sólido;
- Utilizar o extrato enzimático bruto para hidrólise de PET.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 ORIGEM DAS LINHAGENS E REATIVAÇÃO

Os fungos utilizados no presente trabalho foram obtidos de três coleções de culturas microbianas do Laboratório de Microbiologia e Biomoléculas - LaMiB, Departamento de Morfologia e Patologia, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, UFSCar, São Carlos, SP. As linhagens endofíticas selecionadas são oriundas de um trabalho de isolamento e caracterização de fungos endofíticos isolados de espécies vegetais encontradas em manguezais no estado de São Paulo (SEBASTIANES et al., 2013). Já os fungos fitopatogênicos utilizados possuem diversas origens, como mostrado na Tabela 1.

**Tabela 1.** Descrição das linhagens utilizadas no presente trabalho

| Classificação | Código de identificação | Gênero/Espécie                  |
|---------------|-------------------------|---------------------------------|
| Endofíticos   | E.1                     | <i>Fusarium sambucinum</i>      |
|               | E.2                     | <i>Fusarium clamydosporum</i>   |
|               | E.3                     | <i>Fusarium</i> sp.             |
|               | E.4                     | <i>Fusarium</i> sp.             |
|               | E.5                     | <i>Fusarium</i> sp.             |
|               | E. 6                    | <i>Fusarium</i> sp.             |
|               | E. 7                    | <i>Fusarium</i> sp.             |
|               | E. 8                    | <i>Fusarium camptoceras</i>     |
| Fitopatógenos | F. 1                    | <i>Fusarium solani</i>          |
|               | F. 2                    | <i>Fusarium oxysporum</i>       |
|               | F. 3                    | <i>Fusarium proliferatum</i>    |
|               | F. 4                    | <i>Fusarium verticillioides</i> |
|               | F. 5                    | <i>Fusarium oxysporum</i>       |
|               | F. 6                    | <i>Fusarium oxysporum</i>       |

As linhagens foram reativadas em meio de batata e dextrose (BDA) 39 g.L<sup>-1</sup> durante 7 dias a 30 °C em estufa de crescimento, em seguida foram estocadas em glicerol 50% em ultrafreezer (-80 °C) para posterior utilização.

## 2.2 CULTIVO EM ESTADO LÍQUIDO

### 2.2.1 Meio de cultivo

Para avaliar o potencial enzimático das linhagens o meio de cultivo foi estabelecido baseado no estudo realizado por PIO e MACEDO (2007), que otimizaram o meio de cultivo submerso para produção de cutinase por *Fusarium oxysporum*, sendo a composição do meio líquido descrita na Tabela 2.

**Tabela 2.** Composição do meio de cultivo líquido

| <b>Composto</b>                         | <b>Concentração (%)</b> |
|---|-------------------------|
| <b>NaNO<sub>3</sub></b>                 | 0,06                    |
| <b>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>     | 0,06                    |
| <b>MgSO<sub>4</sub></b>                 | 0,02                    |
| <b>KCl</b>                              | 0,02                    |
| <b>FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O</b> | 0,01                    |
| <b>Óleo de linhaça</b>                  | 1                       |

Os cultivos líquidos foram realizados em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 20 mL do meio líquido (Tabela 2). Foram inoculados a cada frasco 5 círculos de aproximadamente 8 mm da placa de cultivo de meio BDA. Este tipo de inoculação se fez necessária pois sob as condições de cultivo em placa as linhagens não esporularam. Os frascos Erlenmeyer foram mantidos a 30 °C, 100 rpm em estufa rotativa (*shaker*) durante 48 h e 120 h.

### 2.2.2 Obtenção do extrato bruto

Após o tempo indicado de cultivo (48h e 120h) os caldos de cultivo foram filtrados a vácuo e centrifugados durante 20 minutos a 10 °C e 8.000 rpm. O sobrenadante coletado foi utilizado para a determinação da atividade enzimática.

## 2.3 CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO

### 2.3.1 Farelo de trigo + Meio de Mandels

O primeiro cultivo em estado sólido das linhagens foi realizado utilizando-se frascos do tipo Erlenmeyer de 250 mL, contendo 10 g do substrato (farelo de trigo), e 15 mL do meio nutriente como descrito por MANDELS e WEBER (1969). Novamente a cada frasco foram inoculados 5 círculos de aproximadamente 8 mm da placa de cultivo e os frascos foram mantidos em estufa sob temperatura constante de 32°C durante 48h e 120h. A composição do meio nutriente encontra-se na Tabela 3.

**Tabela 3.** Componentes do Meio de Mandels

| Unidade | Composto  | Concentração |
|---------|---|--------------|
| mg/L    | FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O            | 10           |
|         | MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O            | 3,2          |
|         | ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O            | 2,8          |
|         | CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O            | 40           |
| g/L     | Uréia   | 4,2          |
|         | (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 5,6          |
|         | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                 | 4,0          |
|         | CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O            | 0,8          |
|         | MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O            | 0,6          |
|         | Peptona   | 1,8          |
|         | Extrato de Levedura                             | 0,5          |

### 2.3.2 Extração e obtenção do extrato bruto no cultivo em estado sólido

Após o tempo indicado de cultivo (48h e 120h) foram adicionados à cada frasco 50 mL de tampão acetato 50 mM, pH 4,5 sendo homogeneizado e posteriormente agitado em incubadora tipo *shaker* por 40 minutos, a 220 rpm e 32 °C. Posteriormente a mistura foi filtrada a vácuo e centrifugada durante 20 minutos a 10 °C e 8.000 rpm. O sobrenadante foi coletado e denominado extrato bruto de cutinase.

### **2.3.3 Farelo de trigo + Água destilada**

O segundo cultivo em estado sólido das linhagens se realizou de duas formas (1 e 2), sendo que ambas foram baseadas ao descrito por SPERANZA et al. (2011), com devidas adaptações.

No primeiro caso (1), se utilizou frascos do tipo Erlenmeyer de 250 mL, contendo 10 g de farelo de trigo, e 10 mL de água destilada. A cada frasco foram inoculados 5 círculos de aproximadamente 8 mm da placa de cultivo e os frascos foram mantidos em estufa sob temperatura constante de 30 °C durante 48 h e/ou 120 h.

Já num segundo momento (2), utilizou-se frascos do tipo Erlenmeyer de 125 mL, contendo 5g de farelo de trigo, e 5 mL de água destilada. A cada frasco foram inoculados 3 círculos de aproximadamente 8 mm da placa de cultivo e os frascos foram mantidos em estufa sob temperatura constante de 30 °C durante 48 h e/ou 120 h.

### **2.3.4 Extração e obtenção do extrato bruto**

Após o tempo indicado de cultivo (48 h e 120 h) foram adicionados, aos frascos obtidos por 1, 50 mL de água destilada e aos frascos obtidos por 2, 25 mL de água destilada. A seguir os frascos foram homogeneizados e posteriormente agitados em incubadora tipo *shaker* por 40 minutos, a 220 rpm e 30°C. Posteriormente a mistura foi filtrada a vácuo e centrifugada durante 20 minutos a 10°C e 8.000 rpm. Logo após, o sobrenadante foi coletado e denominado extrato bruto de cutinase.

### **2.3.5 Farelo de trigo + Água destilada + Plástico**

A terceira maneira de cultivo sólido utilizada nesse trabalho seguiu as mesmas condições ao descrito em 2.3.3 para a forma 2 de cultivo (Frascos do tipo Erlenmeyer de 125 mL contendo 5g de farelo de trigo, 5 mL de água destilada para o cultivo, 30°C) (SPERANZA et al., 2011). Porém a esses cultivos se adicionou plástico (PET) em discos de aproximadamente 5 mm como mostrado na Figura 10 (A forma de obtenção dos discos está descrita no item 2.6 deste trabalho). Variou-se a quantidade de plástico adicionada podendo ser de 0,5 ou 1,0g. Vale se ressaltar que para adição nos cultivos, os discos foram esterilizados com álcool 70% e secos na presença de UV.



**Figura 10.** Discos de PET (aproximadamente 5mm) adicionados ao cultivo sólido (Acervo pessoal da autora).

### **2.3.6 Extração e obtenção do extrato bruto**

Após o tempo indicado de cultivo (48h e 120h) foram adicionados aos frascos 25 mL de água destilada na proporção de 1:5. A seguir os frascos foram homogeneizados e posteriormente agitados em incubadora tipo *shaker* por 40 minutos, a 220 rpm e 30 °C. Posteriormente a mistura foi filtrada a vácuo e centrifugada durante 20 minutos a 10 °C e 8.000 rpm. Logo após, o sobrenadante foi coletado e denominado extrato bruto de cutinase.

## **2.4 ANÁLISE DA ATIVIDADE DE CUTINASE**

A atividade enzimática de todos os extratos enzimáticos obtidos foi realizada utilizando-se um método espectrofotométrico segundo a hidrólise de p-nitrofenilbutirato (p-NPB) (PIO E MACEDO, 2009). O substrato para essa reação foi preparado da seguinte maneira: 1,74 mL de tetrahidrofurano, 0,1 mL de triton X-100; 9,8 µL de p-NPB e tampão fosfato 50 mM pH 7,2 até completar o volume de 50 mL. Uma alíquota de 3,43 mL do substrato foi adicionado a 0,07 mL da solução enzimática reagindo durante 15 minutos à temperatura ambiente contra o branco (água destilada + substrato). Decorrido os 15 minutos a absorbância foi determinada por espectrofotômetro a 405 nm (KOLATTUKUDY 1985). Uma unidade de atividade cutinolítica (UI) foi definida como a quantidade enzimática necessária para converter um µmol de p-NPB em p-NP em um minuto sob as condições especificadas. Todas as análises de atividade enzimática foram realizadas em triplicata.

## 2.5 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS

As quantidades de proteínas totais de todos os cultivos foram mensuradas segundo o método descrito por BRADFORD, 1976.

## 2.6 OBTENÇÃO DE PET

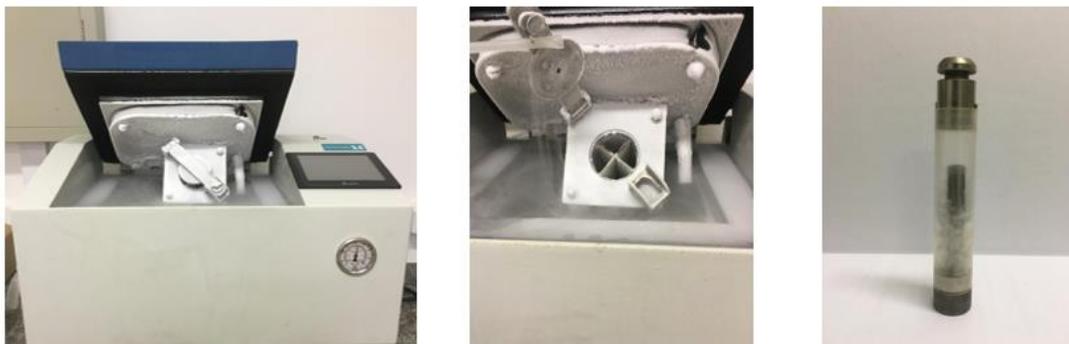
O PET utilizado neste trabalho tem sua origem em garrafas PET (500mL) engarrafadas com água destilada e pertencentes a marca Nestlé semelhante ao ilustrado na Figura 11.



**Figura 11.** Garrafa utilizada para obtenção dos discos e material moído de PET (Acervo pessoal da autora).

Inicialmente as garrafas foram submetidas ao recorte de discos de aproximadamente 5 mm de diâmetro, como mostrado na Figura 11. Esse tipo de material foi utilizado no cultivo sólido como descrito anteriormente.

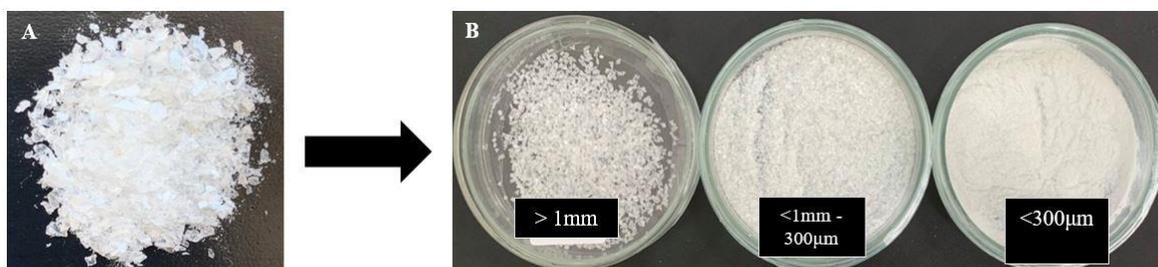
A sobra do material submetido ao recorte, ou seja, as rebarbas da garrafa, foram reaproveitadas com a finalidade de se obter partículas menores do material. Para isso utilizou-se um moinho pulverizador criogênico da marca Marconi, modelo MA775 como apresentado na Figura 12.



**Figura 12.** Moinho pulverizador criogênico utilizado para obtenção de partículas menores de PET (Acervo pessoal da autora).

As rebarbas do material foram submetidas a dois ciclos no equipamento. Cada ciclo totalizava sete minutos, sendo que os dois primeiros minutos eram de criogenia pelo uso de nitrogênio líquido e os outros cinco minutos de moagem. O material final desta etapa é apresentado na Figura 13 (A).

O material moído foi peneirado e separado em três frações, como mostrado na Figura 13 (B).



**Figura 13.** PET moído após dois ciclos no moinho criogênico. (A) Material bruto da moagem (B) Material peneirado e separado em 3 grupos (>1mm, entre 300µm e 1mm e <300µm) (Acervo pessoal da autora).

## 2.7 HIDRÓLISES ENZIMÁTICAS

As hidrólises enzimáticas foram realizadas segundo ao descrito por CASTRO et al., 2018 com adaptações. Inicialmente tubos de 15 mL foram pesados com suas respectivas tampas e sua massa foi anotada. Em seguida esses tubos foram conduzidos a uma estufa com fluxo de ar a 60 °C para devida secagem juntamente com as amostras de plástico obtidas após a moagem. Após 72 h, a cada tubo foi adicionado 2 mg de plástico moído (partículas de <1 mm a 300 µm ou partículas <300 µm) e novamente a massa foi anotada.

Logo após, se adicionou 5 mL do extrato enzimático bruto e a mistura foi conduzida a estufa com rotação 360° durante 14 dias a 37 °C e 30 rpm.

Após o tempo decorrido de hidrólise os tubos foram centrifugados a 8.000 rpm e 25°C por 20 minutos. O sobrenadante foi coletado e os tubos foram conduzidos a estufa com fluxo de ar a 60 °C para secagem por um período de 7 dias. Após este tempo os tubos foram novamente pesados e a massa anotada.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 REATIVAÇÃO DAS LINHAGENS

Das 14 linhagens selecionadas para avaliação em relação ao potencial de produção de cutinase, 12 tiveram sucesso no processo de reativação como indicado na Tabela 4. A morfologia das 12 linhagens se encontra na Figura 15.

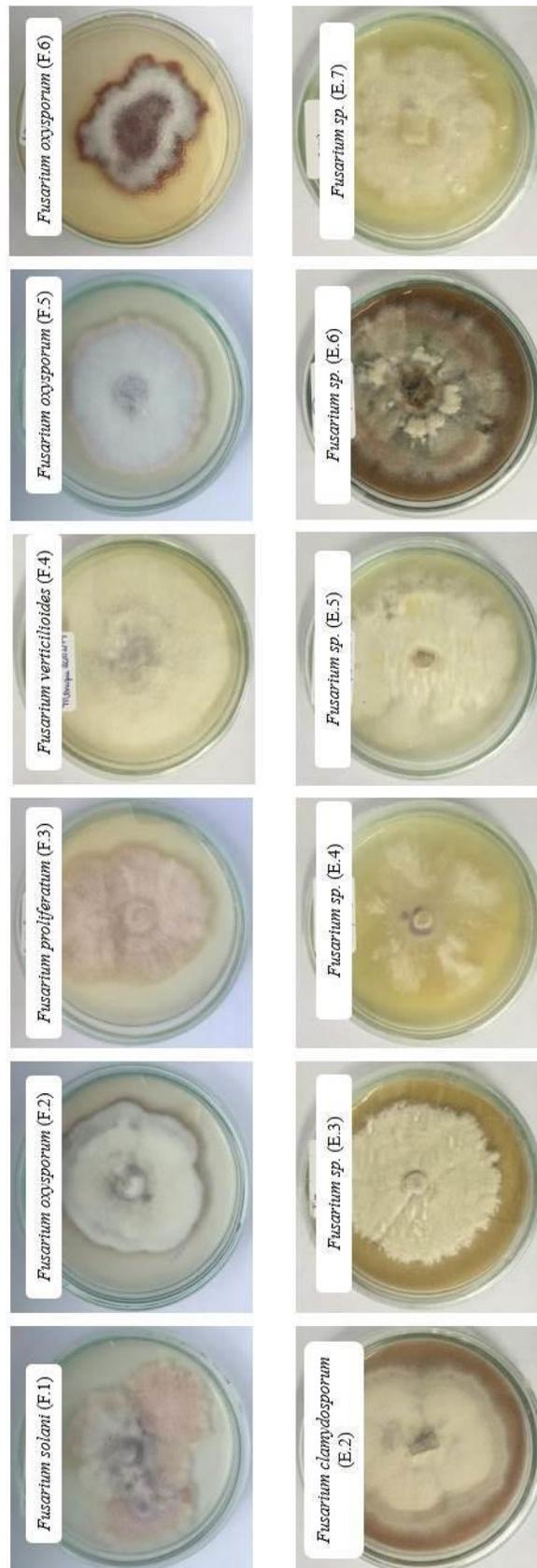
**Tabela 4.** Resultado da reativação dos fungos endofíticos e fitopatogênicos após 7 dias de cultivo em placa com meio BDA a 30 °C

| Classificação   | Código de identificação | Gênero/Espécie                  | Reativação* |
|-----------------|-------------------------|---------------------------------|-------------|
| Endofíticos     | E. 1                    | <i>Fusarium sambucinum</i>      | -           |
|                 | E. 2                    | <i>Fusarium clamydosporum</i>   | +           |
|                 | E. 3                    | <i>Fusarium</i> sp.             | +           |
|                 | E. 4                    | <i>Fusarium</i> sp.             | +           |
|                 | E. 5                    | <i>Fusarium</i> sp.             | +           |
|                 | E. 6                    | <i>Fusarium</i> sp.             | +           |
|                 | E. 7                    | <i>Fusarium</i> sp.             | +           |
|                 | E. 8                    | <i>Fusarium camptoceras</i>     | -           |
| Fitopatogênicos | F. 1                    | <i>Fusarium solani</i>          | +           |
|                 | F. 2                    | <i>Fusarium oxysporum</i>       | +           |
|                 | F. 3                    | <i>Fusarium proliferatum</i>    | +           |
|                 | F. 4                    | <i>Fusarium verticillioides</i> | +           |
|                 | F. 5                    | <i>Fusarium oxysporum</i>       | +           |
|                 | F. 6                    | <i>Fusarium oxysporum</i>       | +           |

\*Os sinais de + ou - indicam se houve ou não crescimento em placa, sendo que quando indicado + houve reativação e - quando não houve reativação.

MAROLDI et al., 2018 avaliou a reativação de 45 linhagens pertencentes ao Laboratório de Microbiologia e Biomoléculas, com a finalidade de obtenção de enzimas (hemi)celulolíticas, sendo que seus resultados indicaram um sucesso de reativação de 88% das linhagens. Este valor é próximo ao obtido no presente estudo, que foi de 85,7%.

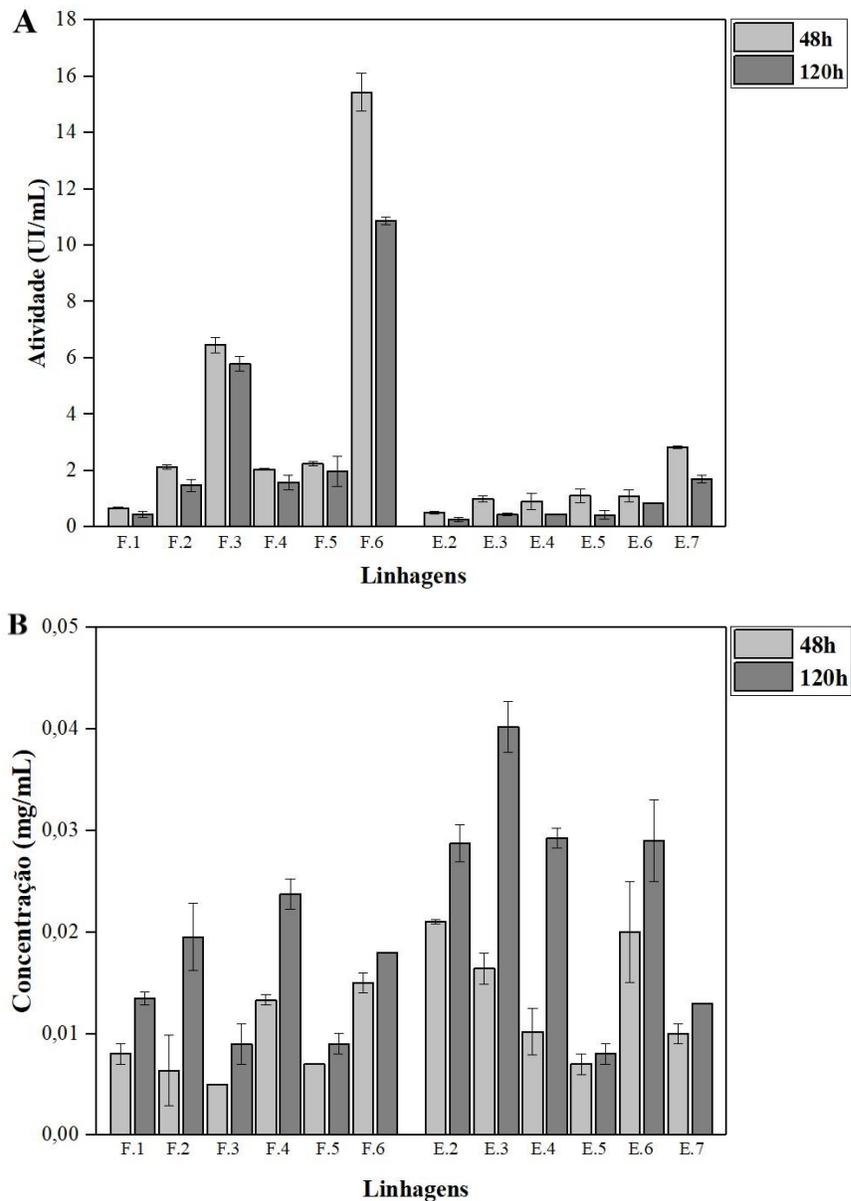
As linhagens reativadas, ilustradas na Figura 14, prosseguiram para as próximas etapas do trabalho.

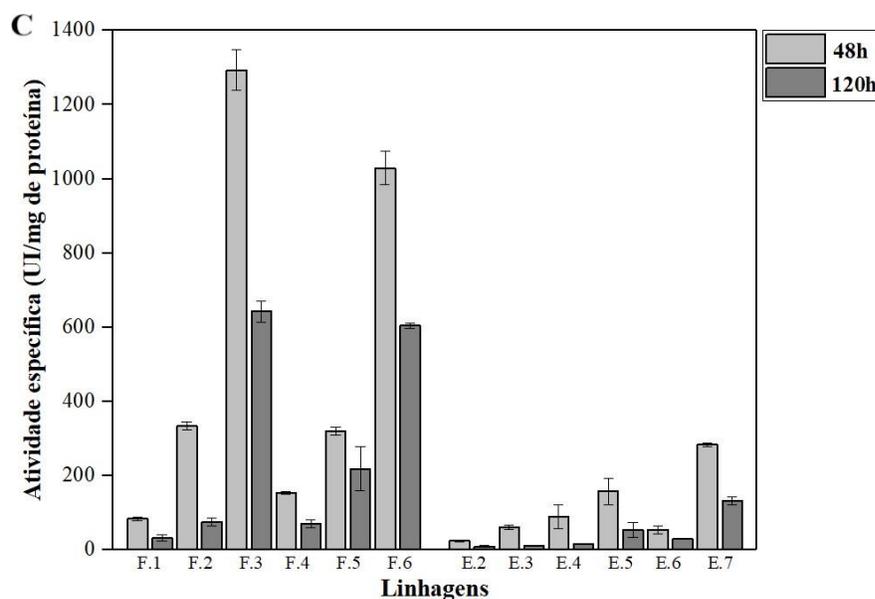


**Figura 14.** Morfologia das linhagens reativadas em BDA durante 7 dias a 30 °C (Acervo pessoal da autora).

### 3.2 CULTIVO SUBMERSO DAS LINHAGENS REATIVADAS

A Figura 15 mostra os resultados obtidos de atividade enzimática e quantificação de proteínas dos cultivos submersos realizados para as linhagens fitopatogênicas e endofíticas, respectivamente, sendo que as barras claras representam os valores obtidos após 48h de cultivo e as barras escuras após 120h.





**Figura 15.** Atividade enzimática (A), quantificação de proteínas (B) e atividade específica (C) dos cultivos das linhagens fitopatogênicas e endofíticas após cultivo de 48 e 120 h em meio líquido com óleo de linhaça a 30°C e 100 rpm.

Ao comparar as atividades obtidas entre os dois grupos de fungos, os fitopatógenos foram aqueles com resultados mais satisfatórios, sendo que a linhagem F.6 (*Fusarium oxysporum*) apresentou a maior atividade em 48 h de cultivo,  $15,4 \pm 0,66$  UI/mL. Essa atividade é próxima ao obtido por PIO e MACEDO (2007) (18,84 U/mL), também após 48 h de cultivo utilizando-se o mesmo meio de cultura.

Segundo AZEVEDO e ARAÚJO (2007) os microrganismos endofíticos costumam adentrar as plantas por meio de aberturas naturais ou feridas. Já os fungos fitopatógenos, necessitam ultrapassar as barreiras da planta hospedeira para se instalarem. Dentre essas barreiras encontra-se a cutícula, constituída de cutina. Assim, já é esperada a produção de cutinase pelos fitopatógenos (DEGANI, 2015). Dentre as espécies fúngicas mais bem estudadas em relação à produção dessa enzima, encontram-se o *F. solani* e *F. oxysporum* (TOPAKAS et al., 2014; ZUMSTEIN et al., 2017). Portanto, os resultados obtidos até o presente momento condizem com os descritos na literatura.

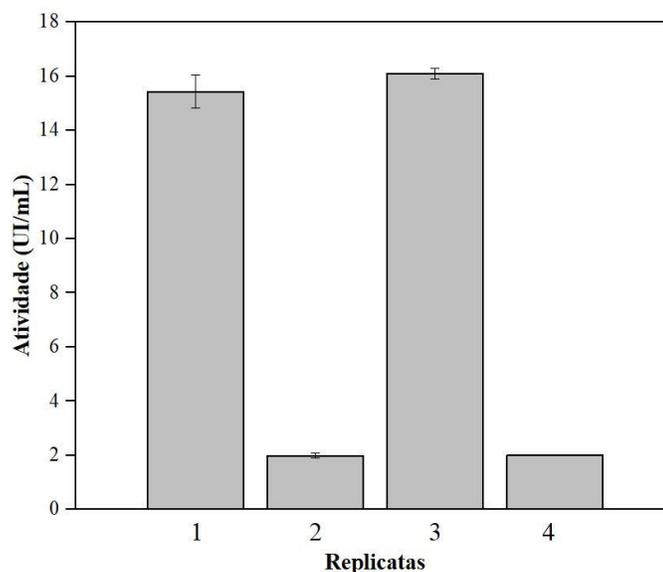
O trabalho de PIO e MACEDO (2007) avaliou a adição de diversos tipos de óleo e outros compostos, como por exemplo cutina, no meio de cultura para produção de cutinase por *Fusarium*. Como citado houve uma atividade maior de cutinase ao se adicionar óleo de

linhaça ao meio, tornando a comparação das estruturas do substrato natural da cutinase (cutina) e do óleo de linhaça relevantes no contexto.

Como já citado, o óleo de linhaça é composto majoritariamente de ácidos graxos poli-insaturados, tais como o ácido linoleico (18:6) e linolênico (18:3) (SENILA et al., 2020). Já a cutina é composta principalmente por ácidos graxos com 16 e 18 carbonos, como é o caso do ácido palmítico (16:0) e oleico (18:1) (CHEN et al., 2008; ROMA, 2018). Um estudo realizado in vitro por SULAIMAN et al. (2012) indica que uma cutinase parcialmente similar a isolada de *Thermobifida fusca*, apresenta uma eficiência maior na catálise de ácidos graxos com cadeias menores (de 2 a 8 carbonos), mas apresenta atividade, com menor eficiência, em cadeias maiores (16 e 18 carbonos).

### 3.3 ANÁLISE DE REPRODUTIBILIDADE

Após a seleção da linhagem F.6 (*F. oxysporum*), novos cultivos foram realizados sob as mesmas condições previamente estabelecidas (meio de cultivo com adição de óleo de linhaça (Tabela 4), 48 h de cultivo, 30 °C, 100 rpm), porém não houve reprodutibilidade nos experimentos. A Figura 16 apresenta o resultado de 4 cultivos conduzidos em triplicata e experimentalmente semelhantes, porém os resultados das atividades foram divergentes. Vale ressaltar que a concentração de proteínas totais em todos os cultivos se mantiveram por volta de 0,016 mg/mL.



**Figura 16.** Comparação dos cultivos líquidos da linhagem F.6 (*F. oxysporum*) após 48 h de cultivo, 30 °C, 100 rpm.

A fim de se obter resultados reprodutíveis, novas condições de cultivo foram testadas. Foi adicionada uma etapa de pré-cultivo para a realização dos experimentos, com a finalidade de padronização da etapa inicial do processo, dessa forma todas as outras etapas de produção permaneceram inalteradas. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 5.

**Tabela 5.** Condições de cultivo e resultados obtidos para a linhagem F.6 (*F. oxysporum*) após 48h de cultivo, 100 rpm, 30 °C.

| <b>Condição</b>  | <b>Composto adicionado</b> | <b>Atividade obtida (UI/mL)</b> | <b>Proteínas totais (mg/mL)</b> |
|------------------|----------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| Sem pré-cultivo  | 0,06% Extrato de Levedura  | 5,31±0,31                       | 0,017±0                         |
| Com pré-cultivo* | Nenhum                     | 4,76±0,26                       | 0,009±0                         |
|                  | 0,06% Extrato de levedura  | 17,20±0,15                      | 0,016±0                         |

\*O pré-cultivo foi realizado durante 24 h, 100 rpm e utilização do meio básico com óleo de linhaça.

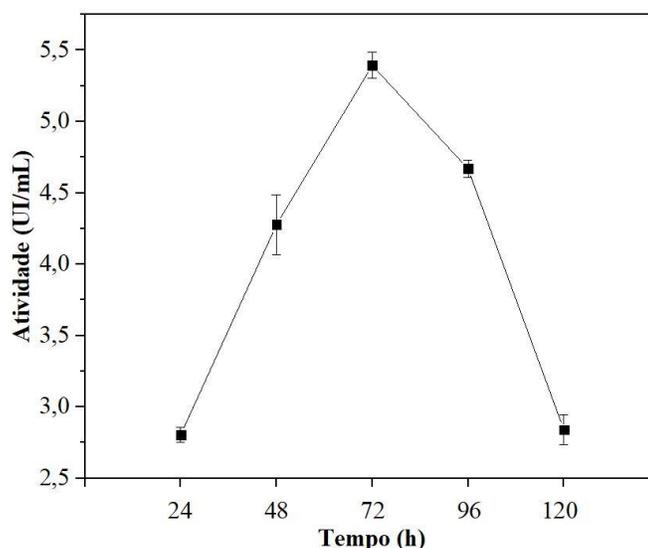
A atividade enzimática obtida somente com a adição do pré-cultivo foi baixa, porém mostrou-se reprodutível, visto que os experimentos foram conduzidos em triplicata e repetidos duas vezes. Sendo assim, sugere-se que a variação das atividades obtidas nos cultivos indicados na Figura 16 se atribuam a variação no inóculo.

Apesar da atividade obtida com a adição do pré-inóculo terem sido constantes, os valores se mostraram inferiores aos obtidos na literatura. Sendo assim, uma outra variável foi analisada, a fonte de nitrogênio. O estudo realizado por PIO e MACDEDO (2007) revelou que dentre várias fontes de nitrogênio testadas, a que revelou melhor influência na produção de cutinase foi quando o extrato de levedura foi adicionado ao meio. Na presente etapa do trabalho a adição de extrato de levedura ao meio básico aumentou a atividade obtida quando adicionado no cultivo com pré-inóculo, como observado na Tabela 5, condizendo com o que foi apresentado no trabalho de PIO e MACEDO (2007).

Com base nesses resultados, definiu-se uma nova condição de trabalho para as próximas etapas, na qual seria realizado o pré-cultivo e extrato de levedura numa concentração de 0,06% seria adicionado ao meio de cultivo.

### 3.4 CINÉTICA DO CULTIVO LÍQUIDO

Após a definição da condição de cultivo, a próxima etapa do trabalho foi a análise da cinética da atividade da cutinase para a linhagem selecionada (*F. oxysporum*), cujo resultado está apresentado na Figura 17. A quantificação de proteínas totais ao longo do cultivo não variou significativamente, mantendo-se entre 0,013 e 0,017 mg/mL.



**Figura 17.** Perfil temporal da atividade enzimática da linhagem de *Fusarium oxysporum* (F.6) com realização de pré-cultivo e adição de extrato de levedura (0,06%) no cultivo.

Apesar das atividades apresentarem valores abaixo do esperado (no item 3.3 foi obtido uma atividade de  $17,20 \pm 0,15$  UI/mL), é possível observar que há um pico de atividade em 72 h. SPERANZA et al. (2011) em seu estudo sobre produção de cutinase pelo gênero *Fusarium*, apresentou um valor máximo de atividade para esta enzima em 72 h.

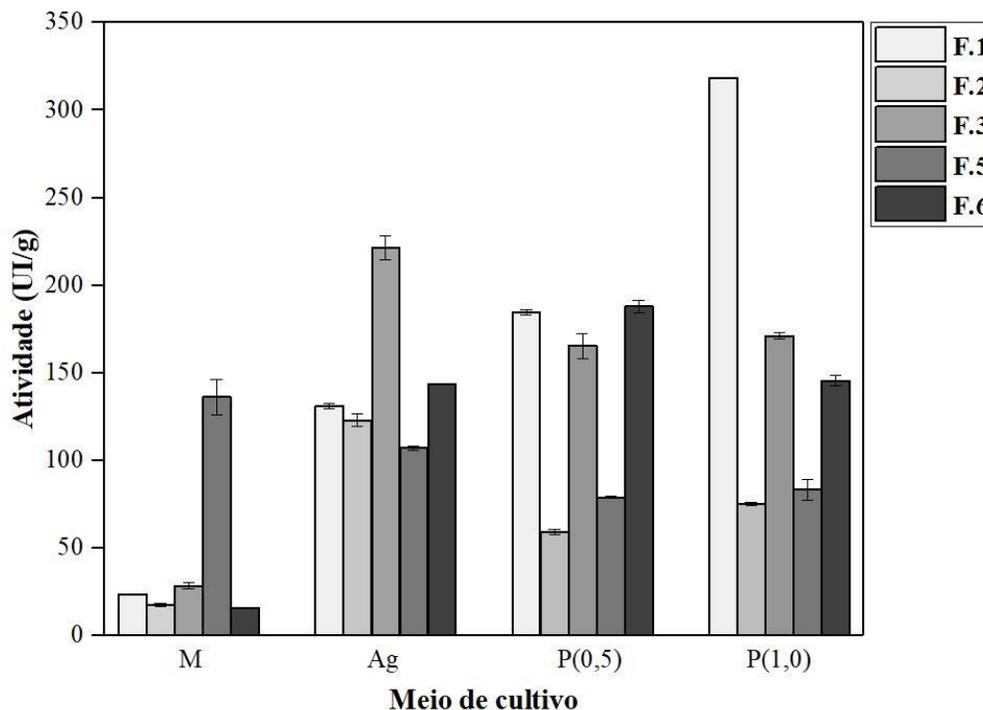
Diante da variação nos resultados de atividade enzimática utilizando o cultivo líquido, o cultivo em estado sólido foi também avaliado para produção de cutinase nos próximos experimentos.

### 3.5 CULTIVOS EM ESTADO SÓLIDO

Baseado em estudos reportados na literatura, selecionou-se o farelo de trigo como substrato para o cultivo em estado sólido. FRAGA (2008) apontou que o farelo de trigo foi um substrato interessante para produção de cutinase pelo fungo *Fusarium oxysporum*. YANG et al. (2013), também adotou o farelo de trigo como fonte de carbono para produção de cutinase, mesmo utilizando microrganismos de outro gênero, obteve resultados positivos semelhantes a FRAGA (2008).

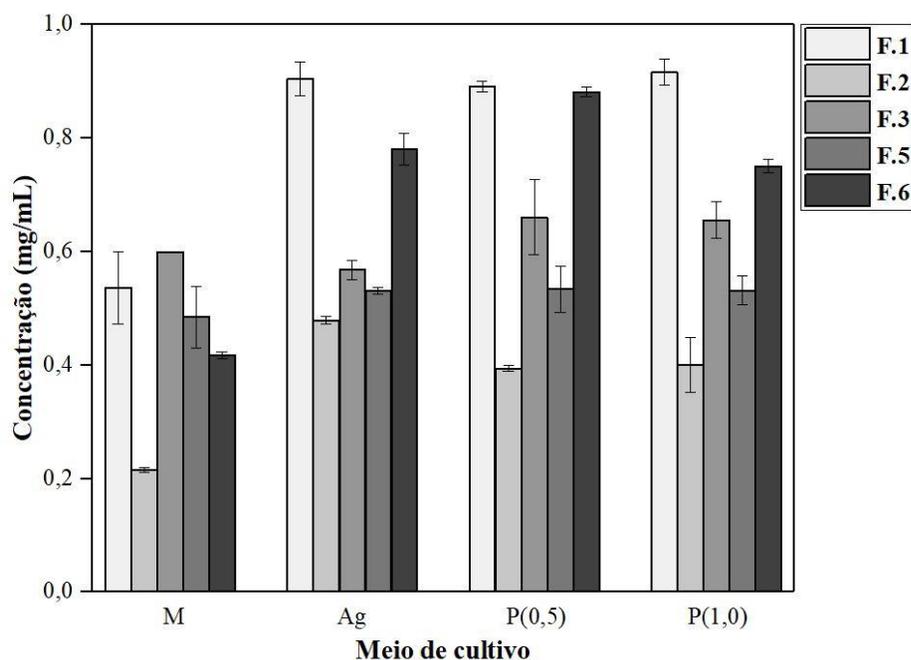
Para esta etapa, todos os fungos reativados foram submetidos ao cultivo sólido utilizando farelo de trigo como substrato e em 4 condições diferentes: Utilizando meio de Mandels como meio nutriente (M); apenas com a adição de água destilada (Ag) e por fim com adição de água destilada e uma quantidade de 0,5g de plástico (P0,5) ou 1,0g de plástico (P1,0), como indicado na Figura 18.

Todas as linhagens de fungos endofíticos e a linhagem 10 fitopatogênica não apresentaram atividade para cutinase sob estas condições, portanto os resultados apresentados na Figura 18 se resumem somente às 5 linhagens (F.1, F.2, F.3, F.5, F.6) de fungos fitopatogênicos produtoras de cutinase.



**Figura 18.** Atividade enzimática das linhagens fitopatogênicas após cultivo de 120 h em meio sólido com diferentes composições de meio de cultivo e farelo de trigo como substrato.

A concentração de proteínas totais para os cultivos também foi quantificada, como indicado na Figura 19.



**Figura 19.** Concentração de proteínas totais das linhagens fitopatogênicas após cultivo de 120h em meio sólido com diferentes composições de meio de cultivo e farelo de trigo como substrato.

As linhagens F.1, F.2, F.3, F.5, F.6 apresentaram atividade para a enzima em questão, sendo que houve destaque para a linhagem F.5 (*Fusarium oxysporum*), obtendo valor máximo de 136,34 UI/g após 120 h de cultivo com o uso do meio nutritivo de Mandels. Já para o cultivo utilizando-se somente farelo de trigo e água destilada, o destaque ocorreu para a linhagem F.3 (*F. proliferatum*), com atividade próxima a 222 UI/g. Quando adicionado plástico (PET) ao cultivo na quantidade de 0,5 g houve destaque para a linhagem F.6 (*F. oxysporum*) com uma atividade de 187 UI/g. Por fim, ao se adicionar água destilada e 1,0 g de plástico o destaque ocorreu para a linhagem F.1 (*F. solani*), com atividade superior a 315 UI/g.

O estudo realizado por SPERANZA et al. (2011) reportou uma atividade de cutinase de 192 UI/g ao utilizar farelo de trigo para o cultivo sólido para o microrganismo *Fusarium* sp. Já FRAGA et al. (2012) ao utilizar esta mesma fonte de carbono, obteve atividade de 183,3

UI/g para o microrganismo *Fusarium oxysporum*. Em ambos trabalhos se adicionou ao meio somente água destilada, como é caso do cultivo SAg indicado nas Figuras 18 e 19.

Como é possível perceber no presente trabalho, com exceção da linhagem F.5 (*F. oxysporum*) todos os resultados de atividade foram melhorados quando houve a troca da solução nutriente por água destilada. Esse resultado condiz com os dados encontrados na literatura para cultivo em estado sólido para produção da enzima cutinase para o gênero *Fusarium*, especificamente.

O trabalho de PIO e MACEDO (2007) avaliou a influência de determinados compostos no cultivo líquido de *F. oxysporum* para produção de cutinase. Os resultados indicaram que compostos tais como  $\text{NaNO}_3$  (0,46 UI/mL),  $\text{NaNO}_2$  (0,22 UI/mL),  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (0,40 UI/mL) e  $\text{KNO}_3$  (0,16 UI/mL) quando adicionados ao meio de cultivo diminuem a atividade cutinásica em relação a quando foi adicionado ao meio cutina (11.2 UI/mL).

SPERANZA et al. (2011) avaliaram a influência de  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{KCl}$ ,  $\text{HgCl}_2$ ,  $\text{MnCl}_2$ ,  $\text{CoCl}_2$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{FeSO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{ZnSO}_4$ ,  $\text{MnSO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  e  $\text{NaHSO}_3$  na atividade enzimática da linhagem de *Fusarium* sp. quando cultivado em meio sólido utilizando farelo de trigo como substrato. Os resultados indicam que somente  $\text{ZnSO}_4$ ,  $\text{MnSO}_4$ ,  $\text{KCl}$  e  $\text{CoCl}_2$  foram capazes de aumentar a atividade enzimática quando comparado ao controle (farelo + água).

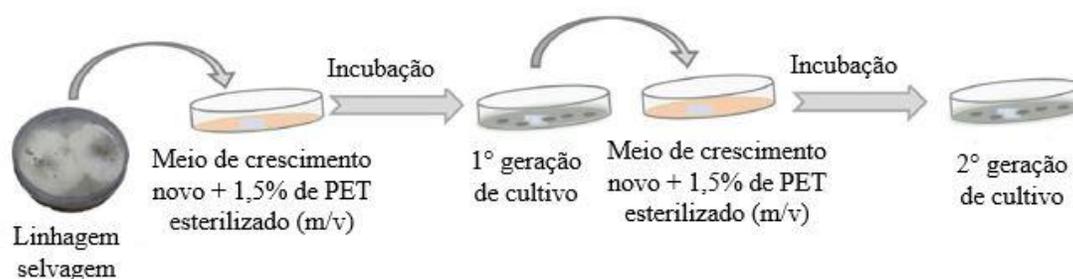
Já OLIVEIRA (2018) avaliou a influência de uma solução nutriente contendo  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{KCl}$ ,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{NaCl}$  no cultivo sólido, tendo farelo de arroz como substrato, de uma linhagem de *F. verticillioides*. Porém, novamente a adição de uma solução micronutriente resultou na diminuição da atividade de cutinases.

O não aumento da atividade cutinásica no caso da linhagem F.5 (*F. oxysporum*) ao se fazer a troca do meio nutriente por água destilada indica que esta linhagem provavelmente necessita de mais nutrientes para produzir esta enzima. SPERANZA et al. (2011) ao avaliar a influência de alguns compostos adicionados ao cultivo sólido na produção de cutinase para uma linhagem de *Fusarium*, observou que quatro dos 14 compostos testados poderiam aumentar a produção de cutinase quando comparado ao cultivo apenas com água destilada. No caso, os compostos que aumentaram a atividade foram:  $\text{ZnSO}_4$ ,  $\text{MnSO}_4$ ,  $\text{KCl}$  e  $\text{CoCl}_2$ , sendo que três destes estão presentes no meio de Mandels utilizado no presente trabalho. Isso indica que para a linhagem F.5 há a

possibilidade que haja a necessidade da presença destes compostos para também aumentar sua atividade de cutinase como mostrado no trabalho citado.

Em relação à adição de PET ao cultivo, percebe-se 4 perfis distintos das linhagens utilizadas quando comparadas ao cultivo somente com água destilada (2), sendo eles: aumento da atividade em ambas concentrações de PET (F.1 – *F. solani*); diminuição da atividade na menor concentração de PET e depois uma restauração da atividade na maior concentração (F.2 – *F. oxysporum*); diminuição da atividade nas duas concentrações (F.3 e F.5 – *F. proliferatum* e *F. oxysporum*) e, por fim, aumento da atividade na baixa concentração e diminuição na alta concentração de PET (F-6 – *F. oxysporum*).

CHAVES et al. (2018) propuseram um método de crescimento em placa de cepas, bacterianas e fúngicas, na presença de PET como mostrado na Figura 20.



**Figura 20.** Ilustração do cultivo das linhagens em placa com meio enriquecido com PET para induzir a expressão de enzimas que degradem PET, como por exemplo cutinases. (Extraído e adaptado de CHAVES et al., 2018)

A finalidade desta etapa do trabalho citado foi a obtenção de uma cepa adaptada a crescer em um meio contendo PET. Posteriormente essas mesmas linhagens foram transferidas para outra placa de diâmetro menor, contendo apenas PET e uma solução tampão. Em seguida, através de um novo método envolvendo fluorescência pode-se medir a degradação do polímero. Este estudo revelou que quatro linhagens fúngicas adaptadas apresentaram uma melhora na degradação do PET quando submetidas à indução em placa, mostrada na Figura 20, quando comparadas a sua respectiva cepa selvagem.

Apesar dos resultados obtidos por CHAVES et al. (2018) terem sido advindos da quantificação de monômeros liberados pela degradação do PET e não da quantificação da atividade enzimática envolvida no processo, os autores indicam que o cultivo na presença de PET provocou a indução de genes relacionados a complexos enzimáticos capazes de

apresentar uma performance superior na hidrólise do polímero, quando comparados as suas linhagens selvagens.

No primeiro caso, ou seja, da linhagem F.1 (*F. solani*), percebe-se que o PET funcionou como um indutor na produção de cutinase, sendo que quanto maior a massa de PET adicionada ao cultivo, maior a atividade da enzima. Esse resultado, de forma geral, concorda com o obtido por CHAVES et al. (2018), visto que a presença de PET no cultivo provocou um aumento da atividade de cutinase.

SALES (2018) avaliou a influência de diversos compostos, entre eles PET reciclado, adicionados ao meio de cultura sólido na produção de enzimas lipolíticas. Os resultados envolvendo a adição de PET reciclado no cultivo indicaram que, em uma concentração baixa do material, houve uma leve queda da atividade quando comparada ao controle. Já ao se aumentar a quantidade do polímero no cultivo, a atividade enzimática decaiu consideravelmente. Esse perfil pode ser comparado ao obtido no presente trabalho para as linhagens F.3 e F.5 (*F. proliferatum* e *F. oxysporum*), visto que para ambas quantidades de PET adicionadas ao cultivo, a atividade obtida foi menor quando comparada ao cultivo somente com a adição de água destilada.

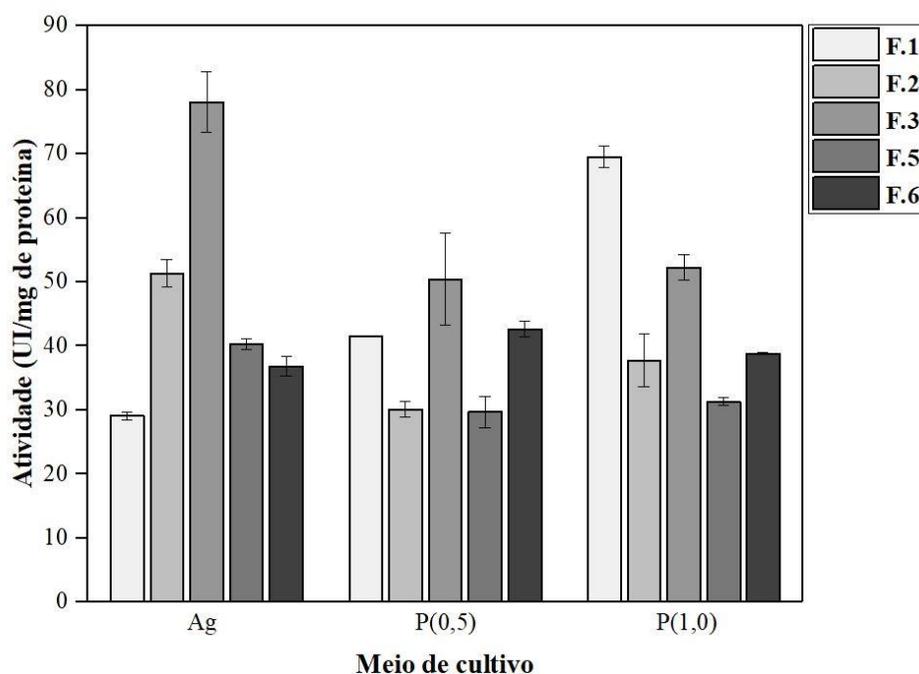
Outro composto também foi avaliado por SALES (2018), o BHET, que como já descrito, trata-se de um monômero obtido através da despolimerização de PET. Neste caso, os cultivos aos quais foram adicionados uma baixa concentração do material (5% m/m) houve um aumento da atividade lipolítica. Já a adição de 20% de BHET no cultivo, gerou uma queda de mais de 50% quando comparado ao valor máximo de atividade obtida (no cultivo com 5% do material). Esse resultado pode ser comparado ao obtido para a linhagem F.6 (*F. oxysporum*), sendo que houve uma queda de aproximadamente 20% de atividade de cutinase ao se adicionar 1,0 g de plástico no cultivo quando comparado a adição de apenas 0,5 g de plástico.

A linhagem F.2 (*F. oxysporum*) do presente estudo apresentou uma leve queda na atividade de cutinase quando adicionado ao cultivo 0,5 g de plástico e uma manutenção da atividade ao se adicionar 1,0 g de PET ao cultivo, quando comparado ao cultivo “controle” que continha apenas farelo e água destilada. Isso indica que a adição de PET não aumentou a atividade da enzima em nenhuma circunstância. Esse resultado pode ser comparado ao obtido por PIO e MACEDO (2007) ao avaliar a influência de diversos compostos no meio

de cultivo líquido para produção de cutinase. O cultivo controle deste experimento envolvia a adição de cutina a um meio nutritivo (11,20 UI/mL), observou-se que somente o óleo de linhaça (15,2 UI/mL) quando adicionado ao meio proporcionava um aumento na atividade da enzima. Todos os outros compostos, seja na concentração de 0,5% ou 1%, mostraram-se não efetivos ou até mesmo prejudiciais na atividade da enzima.

### 3.6 HIDRÓLISE DE PET

Nesta etapa foram analisadas a atividade enzimática de cutinase (Figura 19) e a atividade específica (Figura 21) para seleção de duas linhagens as quais tiveram seu extrato enzimático aplicado na hidrólise de PET.



**Figura 21.** Atividades específicas de três cultivos sólidos realizados: (Ag) Farelo de trigo + água destilada; (P0,5) Farelo e trigo + 0,5g de PET em discos; (P0,1) Farelo de trigo + 1,0g de PET em discos.

Analisando os resultados de atividade de cutinase e atividade específica os extratos selecionados para a etapa de hidrólise foram da linhagem F.1 (*F. solani*) e os da linhagem F.3 (*F. proliferatum*). Para cada extrato foram utilizados dois substratos PET, sendo que o primeiro continha partículas menores que 1mm até 300µm e o segundo, partículas menores que 300µm. Os controles foram realizados adicionando-se água ao invés do extrato. Os resultados obtidos se referem ao peso seco pré e pós hidrólise como mostrados na Tabela 6.

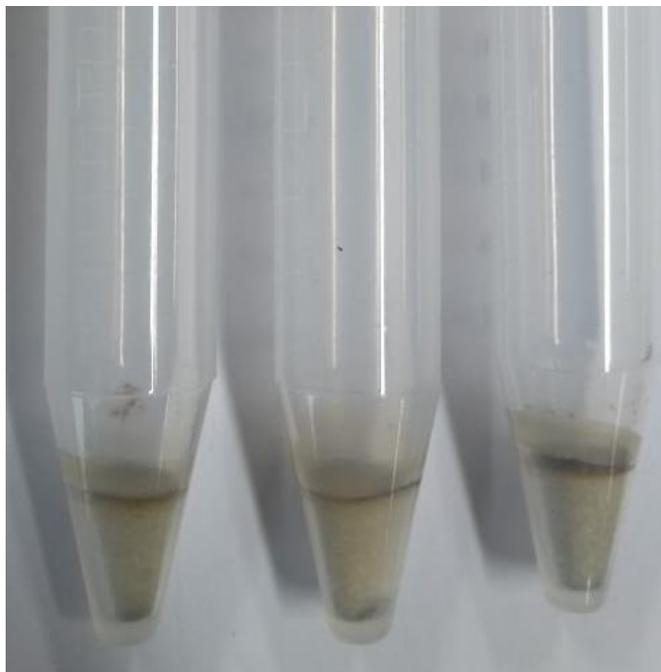
**Tabela 6.** Resultados obtidos na hidrólise de PET através da obtenção do peso seco pré e pós hidrólise.

| Hidrólises     |                        |         |                    |                  |            |                     |                   |               |                       |
|----------------|------------------------|---------|--------------------|------------------|------------|---------------------|-------------------|---------------|-----------------------|
| Número do tubo | Identificação do fungo | Amostra | Peso do tubo/tampa | Peso do plástico | Peso total | Peso após hidrólise | Diferença de peso | Desvio Padrão | % da variação de peso |
| 1              | Controle               | Água    | 6,383              | 0,2015           | 6,5845     | 6,5841              | 0,0004            | 0,0002        | 0,006075              |
| 2              | Controle               | Água    | 6,121              | 0,203            | 6,324      | 6,3235              | 0,0005            |               | 0,007906              |
| 3              | Controle               | Água    | 6,232              | 0,2014           | 6,4334     | 6,4322              | 0,0002            |               | 0,003109              |
| 4              | F.1                    | SAg     | 6,3803             | 0,2005           | 6,5808     | 6,5873              | -0,0065           | 0,0013        | -0,09877              |
| 5              | F.1                    | SAg     | 6,2687             | 0,2003           | 6,469      | 6,4773              | -0,0083           |               | -0,1283               |
| 6              | F.1                    | SP0,5   | 6,1154             | 0,2022           | 6,3176     | 6,3244              | -0,0068           | 0,0018        | -0,10764              |
| 7              | F.1                    | SP0,5   | 6,2377             | 0,2004           | 6,4381     | 6,4474              | -0,0093           |               | -0,14445              |
| 8              | F.1                    | SP1,0   | 6,283              | 0,2024           | 6,4854     | 6,495               | -0,0096           | 0,0014        | -0,14802              |
| 9              | F.1                    | SP1,0   | 6,2082             | 0,2011           | 6,4093     | 6,4169              | -0,0076           |               | -0,11858              |
| 10             | F.3                    | SAg     | 6,1363             | 0,2052           | 6,3415     | 6,3514              | -0,0099           | 0,0008        | -0,15611              |
| 11             | F.3                    | SAg     | 6,1366             | 0,2018           | 6,3384     | 6,3472              | -0,0088           |               | -0,13884              |
| 12             | F.3                    | SP0,5   | 6,4046             | 0,201            | 6,6056     | 6,6169              | -0,0113           | 0,0001        | -0,17107              |
| 13             | F.3                    | SP0,5   | 6,3884             | 0,2025           | 6,5909     | 6,6021              | -0,0112           |               | -0,16993              |
| 14             | F.3                    | SP1,0   | 6,4191             | 0,1999           | 6,619      | 6,6286              | -0,0096           | 0,0019        | -0,14504              |
| 15             | F.3                    | SP1,0   | 6,1509             | 0,2034           | 6,3543     | 6,3666              | -0,0123           |               | -0,19357              |
| 21             | Controle               | Água    | 6,3702             | 0,1999           | 6,5701     | 6,5701              | 0                 | 0,004         | 0                     |
| 22             | Controle               | Água    | 6,1318             | 0,208            | 6,3398     | 6,3329              | 0,0069            |               | 0,108836              |
| 23             | Controle               | Água    | 6,1933             | 0,2069           | 6,4002     | 6,4001              | 0                 |               | 0                     |
| 24             | F.1                    | SAg     | 6,4035             | 0,2011           | 6,6046     | 6,6162              | -0,0116           | 0,0025        | -0,17564              |
| 25             | F.1                    | SAg     | 6,2978             | 0,2054           | 6,5032     | 6,5183              | -0,0151           |               | -0,23219              |
| 26             | F.1                    | SP0,5   | 6,1643             | 0,2042           | 6,3685     | 6,3817              | -0,0132           | 0,0001        | -0,20727              |
| 27             | F.1                    | SP0,5   | 6,1527             | 0,2022           | 6,3549     | 6,368               | -0,0131           |               | -0,20614              |
| 28             | F.1                    | SP1,0   | 6,4186             | 0,2002           | 6,6188     | 6,6315              | -0,0127           | 0,0010        | -0,19188              |
| 29             | F.1                    | SP1,0   | 6,2717             | 0,2047           | 6,4764     | 6,4905              | -0,0141           |               | -0,21771              |
| 30             | F.3                    | SAg     | 6,4642             | 0,2002           | 6,6644     | 6,681               | -0,0166           | 0,0019        | -0,24908              |
| 31             | F.3                    | SAg     | 6,3851             | 0,2045           | 6,5896     | 6,6035              | -0,0139           |               | -0,21094              |
| 32             | F.3                    | SP0,5   | 6,2449             | 0,201            | 6,4459     | 6,4612              | -0,0153           | 0,0007        | -0,23736              |
| 33             | F.3                    | SP0,5   | 6,247              | 0,2012           | 6,4482     | 6,4625              | -0,0143           |               | -0,22177              |
| 34             | F.3                    | SP1,0   | 6,274              | 0,2041           | 6,4781     | 6,4919              | -0,0138           | 0,0015        | -0,21303              |
| 35             | F.3                    | SP1,0   | 6,1641             | 0,2022           | 6,3663     | 6,378               | -0,0117           |               | -0,18378              |

O sombreamento cinza indica experimentos realizados com tamanho de partícula inferior a 1mm até 300 $\mu$ m e o sombreamento verde indica experimentos realizados com tamanho de partícula inferior a 300 $\mu$ m

A partir dos resultados obtidos na hidrólise, verificou-se que houve um aumento no peso final dos tubos, com exceção dos controles. Esse aumento de peso pode ser justificado

pois, ao se centrifugar as amostras contendo extrato enzimático, partículas que estavam no extrato também formaram parte do pellet, como mostrado na Figura 22.



**Figura 22.** Tubos após a hidrólise enzimática de PET (Acervo pessoal da autora).

Para que o resultado da etapa de hidrólise seja avaliado será necessário o uso de cromatografia líquida de alta eficiência, após sucessivas lavagens do pellet com solvente, visto que em água destilada os monômeros de PET não se solubilizam, como descrito por outros trabalhos que realizaram hidrólise de PET, entre eles: FURUKAWA et al. (2019) que avaliou a atividade de hidrólise de uma cutinase isolada e modificada geneticamente da bactéria *Thermobifida fusca* (TfCut2), sendo que o estudo aponta que a atividade desta enzima em PET é aumentada pela adição de um surfactante catiônico. Esse aumento na taxa de hidrólise resultou em uma conversão de 90%, resultado indicado pelos autores como a maior obtida até o momento.

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, de 9,36 g / L.

NIMCHUA et al. (2007) avaliaram a hidrólise de fios de PET por duas cutinases isoladas de dois fungos do gênero *Fusarium* (*F. solani* e *F. oxysporum*). A cutinase de *F. oxysporum* mostrou-se mais eficiente na liberação de TPA em comparação aquela obtida de *F. solani*. Além disso, os tecidos utilizados, quando tratados pela cutinase de *F. oxysporum* mostraram uma maior hidrofiliçidade, resultado bastante desejável para aplicação têxtil.

Para todos os trabalhos citados quantificou-se os monômeros gerados pela degradação de PET, sendo eles: TPA (Ácido terfetálico), BHET (Tereftalato de bis-hidroxietila) e MHET (Monoetil-2-hidroxietiltereftalato). Assim, pretende-se também realizar a quantificação por HPLC das amostras submetidas à hidrólise, como indicado a seguir nas perspectivas futuras.

## 4. CONCLUSÕES

O presente trabalho investigou a produção da enzima cutinase por linhagens fitopatógenas e endofíticas do gênero *Fusarium*. As linhagens fitopatógenas apresentaram atividade superior aos endofíticos tanto quando cultivadas em meio líquido, quanto em meio sólido.

A linhagem F.6 (*F. oxysporum*) apresentou atividade da enzima equiparável ao reportado na literatura, com valor máximo de 17,2 UI/mL, quando cultivada em meio líquido, porém não houve reprodutibilidade experimental dessa condição de cultivo.

No cultivo sólido, utilizando farelo de trigo como substrato, foi possível constatar que a adição de água destilada e a retirada de solução nutriente aumentou a atividade enzimática de cutinase para a maioria dos fitopatógenos, sendo que a atividade máxima obtida foi de 221 UI/ g para a linhagem F.3 (*F. oxysporum*).

A adição de PET ao meio de cultivo sólido se mostrou eficiente para induzir a produção de cutinase, sendo que o maior valor de atividade obtido foi de 318 UI/g pela linhagem F.1 (*F. solani*) ao se adicionar 1,0g de PET.

Em virtude do que foi apresentado pode-se dizer que as linhagens fitopatogênicas abordadas no presente estudo são promissoras para a produção de cutinase, quando cultivadas em meio sólido e o PET apresentou potencial em induzir a atividade de cutinase.

## **5. PERSPECTIVAS FUTURAS**

- Quantificação dos monômeros TPA, BHET e MHET por HPLC das amostras obtidas após a hidrólise;
- Avaliação dos materiais antes e após a hidrólise por microscopia eletrônica de varredura;
- Avaliar novas condições de hidrólise.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRAWAL, P. B.; NIERSTRASZ, V.A.; BOUWHUIS, G.H.; WARMOESKERKEN, M. M. C. G. (2008) Cutinase and pectinase in cotton bioscouring: an innovative and fast bioscouring process. *Biocatalysis and Biotransformation*, 26, 412–21.

AUSTIN, H. P.; ALLEN, M. D.; DONOHOE, B. S.; RORRER, N. A.; KEARNS, F. L.; SILVEIRA, R. L; et al. (2018). Characterization and engineering of a plastic-degrading aromatic polyesterase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 7, 4350-4357.

AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W. L. (2007) Diversity and applications of endophytic fungi isolated from tropical plants. Ganguli BN, Desmuckh SK (eds) Fungal multifaceted microbes. Anamaya Publishers, 207-231.

BRADFORD, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 7, 248-254.

CARVALHO, C. M. L.; AIRES-BARROS, M. R.; CABRAL, J. M. S. (2000). Cutinase: From molecular level to bioprocess development. *Biotechnology and Bioengineering*, 17, 17-34.

CASTRO, A. M.; CARNIEL, A.; JUNIOR, J. N.; GOMES, A. C.; VALONI, A. (2018) 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.

CHANDRA, S. (2012) Endophytic fungi: Novel sources of anticancer lead molecules. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 95, 47-59.

CHATARINA, L.; CARELS, N. (2018) Specific enzyme functionalities of *Fusarium oxysporum* compared to host plants. *Gene*, 17, 219-226.

CHAUDHARI, S. A; SINGHAL, R. S. (2015) Cutin from watermelon peels: A novel inducer for cutinase production and its physicochemical characterization. *International Journal of Biological Macromolecules*, 79, 398-404.

CHAVES, M. R. B.; LIMA, M. L. S. O.; MALAFATTI-PICCA, L.; ANGELIS, D. A.; CASTRO, A. M.; VALONI, E.; MARSAIOLI, A. J. A practical fluorescence-Based screening protocol for polyethylene terephthalate degrading microorganisms. *Journal of Brazilian Chemistry Academy*, 29, 1278-1285.

CHEN, S.; SU, L.; CHEN, J.; WU, J. (2013) Cutinase: Characteristics, preparation, and application. *Biotechnology Advances*, 14, 1754-1767.

CHEN, S.; TONG, X.; WOODARD, R. W.; DU, G.; WU, J.; CHEN, J. (2008) Identification and characterization of bacterial cutinase. *The Journal of biological chemistry*, 8, 25854 - 25862.

DANSO, D.; CHOW, J.; STREIT, W. R. (2019) Plastics: Environmental and biotechnological perspectives on microbial degradation. *Applied and Environmental Microbiology*, 85, 14.

de CASTRO, R. J. S.; OHARA, A.; NISHIDE, T. G.; BAGAGLI, M. P.; DIAS, F. F. G.; SATO, H. H. (2015) A versatile system based on substrate formulation using agroindustrial wastes for protease production by *Aspergillus niger* under solid state fermentation. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 4, 678-684.

DEGANI, O.; GEPSTEIN, S.; DOSORETZ, C. G. (2002) Potential use of cutinase in enzymatic scouring of cotton fiber cuticle. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 103, 277-289.

de OLIVEIRA, C. T.; ALVES, E. A.; TODERO, I.; KUHN, R. C.; OLIVEIRA, D. E.; MAZUTTI, M. A. (2019) Production of cutinase by solid-state fermentation and its use as adjuvant in bioherbicide formulation. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 42, 829-838.

DEROOVER, L.; TIE, Y.; VERSPREET, J.; COURTIN, C. M.; VERBEKE, K. (2019) Modifying wheat bran to improve its health benefits. *Critical reviews in food science and nutrition*, 60, 1104-1122.

DI LENA, G.; PATRONI, E.; QUAGLIA, G. B. (1997) Improving the nutritional value of wheat bran by a white rot fungus. *International Journal of food science and technology*, 32, 513-519.

DI SOUZA, L.; TORRES, M. C. M.; RUVOLO, A. C. F. (2008) Despolimerização do poli (tereftalato de etileno) - PET: Efeitos de tensoativos e excesso de solução alcalina. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, 18, 334-341.

DUTTA, J.; DUTTA, K. P. (2010). Antimicrobial activity of chitin, chitosan and their oligosaccharides. *Chitin, Chitosan, Oligosaccharides and Their Derivatives*, 19.

DUTTA, K.; SEM, S.; VEERANKI, V. D. (2009) Production, characterization and applications of microbial cutinases. *Process Biochemistry*, 44, 127-134.

FERREIRA, C. T.; FONSECA, J. B.; SARON, C. (2011). Reciclagem de rejeitos de poli (tereftalato de etileno) (PET) e de poliamida (PA) por meio de extrusão reativa para preparação de blendas. *Polímeros*, 5, 118-122.

FETT, W. F., GÉRARD, H. C.; MOREAU, R. A.; OSMAN, S. F.; JONES, L. E. (1992) Cutinase production by *Streptomyces* spp. *Current Microbiology*, 25, 165-171.

FRAGA, L. P. (2008) Produção de cutinase por *Fusarium oxysporum* utilizando subprodutos agroindustriais. 93. Dissertação - Universidade Estadual de Campinas.

FRAGA, L. P.; CARVALHO, P. O.; MACEDO, G. A. (2012) Production of cutinase by *Fusarium oxysporum* on brazilian agricultural by-products and its enantioselective properties. *Food and Bioprocess Technology*, 5, 138-146.

FURUKAWA, M.; KAWAKAMI, N.; TOMIZAWA, A.; MIYAMOTO, K. (2019) Efficient degradation of poly(ethylene terephthalate) with *Thermobifida fusca* cutinase exhibiting improved catalytic activity generated using mutagenesis and additive-based approaches. *Scientific Reports*, 9, 16038.

GAO, M.; SUN, L.; GUO, Y.; SHI, J.; ZHANG, J. (2017) Modification of polyethylene terephthalate (PET) films surface with gradient roughness and homogenous surface chemistry by dielectric barrier discharge plasma. *Chemical Physics Letters*, 5, 179-184.

GARCÍA, E. B.; MONTES, C. P.; RODRÍGUEZ, J. A. C.; CANTO, A. G.; OCAÑA, A. N. FARRÉS, A. (2017) ANCUT2, a thermo-alkaline cutinase from *Aspergillus nidulans* and its potential application. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 182, 1014–1036.

GARCÍA, J. M. (2018) Catalyst: Design challenges for the future of plastics recycling. *Chemistry*, 7, 813-815.

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

GRIGORE, M. E. (2017) Methods of recycling, properties and applications of recycled thermoplastic polymers. *Recycling*, 2, 14.

HATTI-KAUL, R.; NILSSON, L. J.; ZHANG, B. Z.; REHNBERG, N.; LUNDMARK, S. (2020) Designing biobased recyclable polymers for plastics. *Trends in Biotechnology*, 38, 50-67.

HEMERY, Y.; ROUAU, X.; DRAGAN, C.; BILICI, M.; BELECA, R.; DASCALESCU, L. (2009) Electrostatic properties of wheat bran and its constitutive layers: Influence of particle size, composition, and moisture content. *Journal of Food Engineering*, 93, 114–24.

HEMERY, Y.; ROUAU, X.; LULLIEN-PELLERIN, V.; BARRON, C.; ABECASSIS, J. (2007). Dry processes to develop wheat fractions and products with enhanced nutritional quality. *Journal of Cereal Science*, 46, 327–47.

HISCOCK, S. J.; DEWEY, F. M.; COLEMAN, J. O. D.; DICKINSON, H. G. (1994) Identification and localization of an active cutinase in the pollen of *Brassica napus* L. *Planta*, 193, 377-384.

- HOLKER, U.; HOFER, M.; LENZ, J. (2004) Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64, 175-86.
- 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. (2018) Structural insight into molecular mechanism of poly(ethylene terephthalate) degradation. *Nature Communications*, 9, 382.
- KIKOT, G. E.; HOURS, R. A.; ALCONADA, T. A. (2010) Extracellular enzymes of *Fusarium graminearum* isolates. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 5, 779-786.
- KOLATTUKUDY, P. E. (1985) Enzymatic penetration of the plant cuticle by fungal pathogens. In *Annual Review of Phytopathology*, 23, 223-250.
- KOSHTI, R.; MEHTA, L.; SAMARTH, N. (2018) Biological recycling of polyethylene terephthalate: A mini-review. *Journal of Polymers and the Environment*, 26, 3520-3529.
- LEE, A.; LIEW, M. S. (2019) Ecologically derived waste management of conventional plastics. *Journal of Material Cycles and Waste Management*, 22, 1-10.
- LIM, G. T. T.; WANG, G. P.; HEMMING, M. N.; BASUKI, S.; MCGRATH, D. J.; CARROLL, B. J.; JONES, D. A. (2006) Mapping the I-3 gene for resistance to *Fusarium* wilt in tomato: Application of na I-3 marker in tomato improvement and progress towards the cloning of I-3. *Australasian Plant Pathology*, 35, 671-680.
- LIN, T. S.; KOLATTUKUDY, P. E. (1980). Structural studies on cutinase, a glycoprotein containing novel amino acids and glucuronic acid amide at the N terminus. *European Journal of Biochemistry*, 106, 341-351.
- MAITI, I. B.; KOLATTUKUDY, P. E. S.; SHAYKH, M. (1979). Purification and characterization of a novel cutinase from *Nasturtium (Tropaeolum majus)* pollen. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 196, 412-426.
- MANDELS, M.; WEBER, J. (1969). The production of cellulases. *Advances in Chemistry Series*, 23, 391-414.
- MAROLDI, M. M. C.; VASCONCELLOS, V. M.; LACAVA, P. T.; FARINAS, C. S. (2018). Potential of mangrove-associated endophytic fungi for production of carbohydrases with high saccharification efficiency. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 184, 806-820.
- MARTINS, S.; MUSSATTO, S. I.; MARTÍNEZ, J. A.; MONTAÑEZ, J. S.; AGUILAR, C. N.; TEIXEIRA, J. A. (2011) Bioactive phenolic compounds: Production and extraction by solid-state fermentation. *Biotechnology Advances*, 29, 365-373.

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

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

NIMCHUA, T.; PUNNAPAYAK, H.; ZIMMERMANN, W. (2007) Comparison of the hydrolysis of polyethylene terephthalate fibers by a hydrolase from *Fusarium oxysporum* LCH I and *Fusarium solani* pisi. *Biotechnology Journal*, 2, 361-364.

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

NYSSÖLÄ, A.; PIHLAJANIEMI, V.; JÄRVINEN, R.; MIKANDER, S.; KONTKANEN, H.; KRUUS, K.; KALLIO, H.; BUCHERT, J. (2013) Screening of microbes for novel acidic cutinases and cloning and expression of an acidic cutinase from *Aspergillus niger* CBS 513.88. *Enzyme and Microbial Technology*, 52, 272-278.

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

PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; MITCHELL, D. (2000) New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. *Process Biochemistry*, 35, 1153-1169.

PASCHOALATI, S. F.; STANGARLIN, J. R.; LEITE, B.; SCHWEN, K. R. E. F. (1998) Mecanismo de patogenicidade em fungos. *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, 6, 1-47.

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

PURDY, R. E.; KOLATTUKUDY, P. E. (1973) Depolymerization of a hydroxy fatty acid biopolymer, cutin, by an extracellular enzyme from *Fusarium solani* f. *pisi*: Isolation and some properties of the enzyme. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 159, 61-69.

PURDY, R. E.; KOLATTUKUDY, P. E. (1975) hydrolysis of plant cuticle by plant pathogens - Properties of cutinase-1, cutinase-2, and a nonspecific esterase isolated from *Fusarium-solani-pisi*. *Biochemistry*, 14, 2832-2840.

RAGHAVARAO, K. S. M. S.; RANGANATHAN, T. V.; KARANTH, N. G. (2003) Some engineering aspects of solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 13, 127-135.

RAHIMI, A.; GARCÍA, J. (2017) Chemical recycling of waste plastics for new materials production. In *Nature Reviews Chemistry*, 0046.

ROMA, L. P. Composição química e morfologia das ceras cuticulares foliares de diferentes espécies de *Simaba* Aubl. sensu stricto e *Homalolepis Turcz.* (Simaroubaceae). 177. Dissertação - Universidade de São Paulo.

RONKVIST, A. M.; XIE, W.; LU, W.; GROSS, R. A. (2009) Cutinase-Catalyzed Hydrolysis of Poly(ethylene terephthalate). In *Macromolecules*, 42, 5128-5138.

SALES, J. C. S. (2018) Produção de enzimas por *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 em fermentação no estado sólido visando o uso biodespolimerização. 106. Dissertação - Universidade Federal do Rio de Janeiro.

SEBASTIAN, J.; CHANDRA, A. K.; KOLATTUKUDY, P. E. (1987) Discovery of a cutinase-producing *Pseudomonas* sp. cohabiting with an apparently nitrogen fixing *Corynebacterium* sp. in phyllosphere. *Journal of Bacteriology*, 169, 131-136.

SEBASTIANES, F. L. S.; ROMÃO-DUMARESQ, A. S.; LACAVA, P. T.; HARAKAVA, R.; AZEVEDO, J. L.; MELO, I. S.; PIZZIRANI-KLEINER, A. L. (2013) Species diversity of culturable endophytic fungi from Brazilian mangrove forests. *Current Genetics*, 59, 153-166.

SENILA, L.; NEAG, E.; CADAR, O.; KOVAC, M. H.; BECZE, A.; SENILA, M. (2020) Chemical, nutritional and antioxidant characteristics of different food seeds. *Applied Sciences*, 10 1589-1604.

SHENOY, H. A.; PRAKASH, J. (2002) Wheat bran (*Triticum aestivum*): Composition, functionality and incorporation in unleavened bread. *Journal of Food Quality*, 25, 197-211.

SHIRSATH, L. P.; PATIL, S. P.; PATIL, U. K. (2018) Incidence of leaf spot disease on cotton caused by *Curvularia verruculosa* and role of its hydrolytic enzymes in pathogenesis. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 24, 711-714.

SILVA, M. A. M.; BARCELOS, M. F. P.; SOUSA, R. V. S.; LIMA, H. M.; FALCO, I. R.; LIMA, A. L.; PEREIRA, M. C. A. (2003) *Ciências agrotécnicas*, 27, 1321-1329.

SOARES, A. B. (2010) Produção do poli(tereftalato de etileno) modificado com glicerol e derivados. 87. Dissertação - Universidade Federal do Rio de Janeiro.

SPERANZA, P. (2010) Caracterização bioquímica de cutinases produzidas em diferentes meios de cultivo por *Fusarium oxysporum* e avaliação do potencial enantiosseletivo destas enzimas. 94. Tese - Universidade Estadual de Campinas.

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

SULAIMAN, S.; YAMATO, S.; KANAYA, E.; KIM, J. J.; KOGA, Y.; TAKANO, K.; KANAYA, S. (2012) Isolation of a novel cutinase homolog with polyethylene terephthalate-degrading activity from leaf-branch compost by using a metagenomic approach. *Applied and Environmental microbiology*, 78, 1556-1562.

UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAMME (UNEP). Single-use plastics: A roadmap for sustainability (2018).

van DAM, P.; SALN, M.; HORST, A.; GRAGT, M.; REP, M. (2018). Use of comparative genomics-based markers for discrimination of host specificity in *Fusarium oxysporum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 84, 1868-1885.

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

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

YANG, S.; XU, H.; YAN, Q.; LIU, Y.; ZHOU, P.; JIANG, Z. 2013. A low molecular mass cutinase of *Thielavia terrestris* efficiently hydrolyzes poly(esters). *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 40, 217-226.

ZHANG, D. C.; MOORE, W. R. (1997). Effect of wheat bran particle size on dough rheological properties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 74, 490-496.