



CUTINASES FÚNGICAS DE INTERESSE BIOTECNOLÓGICO: UMA ABORDAGEM SUSTENTÁVEL PARA O GERENCIAMENTO DE RESÍDUOS PLÁSTICOS

PAULA MARIA CARNEIRO ROCHA; JULIA THAYS KAVA MARTINS; WALLISON JUSTINO DA SILVA; RITA DE CASSIA GARCIA SIMÃO; MARINA KIMIKO KADOWAKI

RESUMO

As Cutinases são as enzimas responsáveis pela degradação da Cutina, um polímero insolúvel com estrutura de C16-C18, ligadas entre si por ligações éster. São presentes no revestimento das partes aéreas das plantas e de seus frutos, atuando como uma barreira física contra patógenos. Podem ser obtidas através de plantas, bactérias ou fungos e são utilizadas em vários setores industriais, como no setor têxtil, atuando no biopolimento das fibras de algodão, na indústria alimentícia como flavorizantes, na indústria química como detergentes tão eficientes quanto as Lipases e na degradação de polímeros sintéticos de poliéster. Alguns polímeros sintéticos como o Polietileno Tereftalato (PET) possuem ligações éster entre seus monômeros, o que possibilita sua hidrólise por ação da enzima Cutinase. Este trabalho teve como objetivo analisar o potencial de produção da enzima Cutinase a partir dos microrganismos presentes na micoteca do LaBioqMol da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, *campus* Cascavel, Paraná. Inicialmente selecionaram-se 13 fungos para avaliação da produção de esterase em cultivo em placa onde *A. niger* e *A. aculeatus* apresentaram melhor desenvolvimento. Os dois microrganismos selecionados para o cultivo com plásticos apresentaram capacidade de adesão a superfície do polímero em análise (filme de poliéster- FP), indicando a formação de um biofilme com 5 dias de cultivo. Quanto a atividade enzimática relacionada aos cultivos com plásticos como única fonte de carbono, *A. niger* apresentou os melhores resultados nas condições analisadas, porém em ambos os cultivos, não se observou perda significativa de peso molecular dos plásticos em análise.

Palavras-chave: Biotecnologia; Biodegradação; Polímeros sintéticos; Enzimas.

1 INTRODUÇÃO

Os últimos 20 anos de produção e mal despojamento desses resíduos sólidos, somados a sua principal característica, a durabilidade, tem causado preocupação quanto ao seu acúmulo nos rios, mares, solo e ar (PERTUSSATTI, 2020). Estima-se que a produção global de plástico sintético até 2050 será de aproximadamente 1800 milhões de toneladas e dessas, aproximadamente 1200 milhões de toneladas estarão dispersas no meio ambiente (SÁNCHEZ, 2020).

Os plásticos de uso cotidiano são divididos em dois grandes grupos baseado em suas características de fusibilidade (BARBOSA, 2011). Os termoplásticos apresentam capacidade de serem moldados mais de uma vez sob condições elevadas de temperatura e pressão (SOUZA; CARO; MACHADO, 2019); já os termorrígidos, quando aquecidos não se tornam líquidos e viscosos, impedindo sua remodelação pois apresentam ponto de fusão inferior à sua temperatura de amolecimento (SILVA et al., 2022) e é exatamente essa característica que

limita a reciclagem dos materiais plásticos.

1.1 Biodegradação de polímeros sintéticos por enzimas fúngicas

A biodegradação parte do uso de microrganismos para degradação e transformação de compostos orgânicos em compostos menos complexos e mais facilmente degradáveis, com intuito de se chegar a sua completa despolimerização (CHANDRA; RUSTGI, 1998). Algumas espécies de fungos apresentam complexos enzimáticos únicos, capazes de degradar materiais presentes na estrutura dos polímeros sintéticos (FARIA; WISBECK; DIAS, 2015), levando a cisão da cadeia polimérica e induzindo a perda das propriedades químicas e físicas, como a alteração da estrutura molecular polimérica, facilitando sua assimilação como fonte de carbono para o microrganismo (BENTO et al., 2003).

Segundo (FLEMMING, 1998), a biodegradação ocorre inicialmente pela adesão dos microrganismos a superfície do polímero pela formação dos Biofilmes. Microrganismos agregados aos biofilmes apresentam algumas particularidades em relação aos de vida livre. A presença da matriz polimérica, produzida pelos microrganismos presentes no biofilme, consiste basicamente em um mix entre polissacarídeos, lipídeos, enzimas, proteínas e ácidos nucleicos. Os biofilmes favorecem as condições de sobrevivência dos microrganismos (CLOETE et al., 2009; FLEMMING, 1998), garantindo adesão e coesão à superfície, estabilidade mecânica, proteção e adaptação ao estresse ambiental (RATHER et al., 2021).

As principais enzimas fúngicas capazes de degradar a estrutura polimérica dos plásticos são as Carboxilesterases (E.C 3.1.1.1), Lipases (E.C 3.1.1.3) e as Cutinases (E.C 1.1.74), porém Cutinases dentre as outras serina hidrolases foram as que apresentaram melhor potencial de hidrólise de PET devido a sua habilidade de hidrolisar polímeros sintéticos de alto peso molecular em sua forma monomérica (AHMADITABATABAEI et al., 2021; CARR; CLARKE; DOBSON, 2020; DANSO; CHOW; STREITA, 2019; ODA, 2021; SÁNCHEZ, 2020).

1.2 Cutinases

Cutinases (E. C 3.1.1.74) são enzimas extracelulares secretadas por fungos fitopatogênicos para degradação da cutina, facilitando a entrada do microrganismo na cutícula da planta, levando a quebra de sua parede celular (ALTAMMAR et al., 2022). São enzimas capazes de catalisar a quebra das ligações éster presentes na Cutina que hidrolisam diferentes substratos, favorecendo sua aplicabilidade para além de seu propósito natural (CHEN et al., 2008, 2013). Pertencentes a superfamília α/β -hydrolase, são classificadas como pequenas serina esterases que atuam em substratos solúveis em água. Já as lipases, exibem ativação interfacial e necessitam da interface água/óleo para a sua atividade (CHEN et al., 2008; JOHNSON et al., 2021).

No setor Têxtil, atuam no biopolimento de tecidos, apresentando menor consumo de energia, menor custo de produção e baixas taxas de resíduos (CHEN et al., 2013; NYSSÖLÄ, 2015; TELES; CABRAL; SANTOS, 2001). Na indústria alimentícia como saborizantes de frutas. Atuam como biocatalisadores com alta especificidade e seletividade, permitindo que as reações aconteçam a temperaturas mais brandas, eliminando subprodutos e garantindo um produto final sem misturas racêmicas (DE BARROS et al., 2009). Também são usadas na indústria de detergentes e lavanderias, por apresentarem estabilidade em uma ampla faixa de temperaturas, variando de 20 °C a 50 °C e pH entre 8-10 (DUTTA; SEN; VEERANKI, 2009). Já no setor de laticínios e derivados, Cutinases podem mediar, na presença de baixos volumes de água, a transesterificação de óleos e gorduras, bem como a esterificação estereosseletiva de álcoois (ALVES MACEDO; FONTES PIO, 2005).

Recentemente a aplicação das cutinases na degradação de polímeros sintéticos que apresentem ligações éster em sua estrutura polimérica tem sido estudada. Considerando o

dano causado ao meio ambiente e a toda a cadeia alimentar pela poluição dos polímeros sintéticos derivados do petróleo, faz-se necessária a busca por novas formas de obtenção de plásticos, como os bioplásticos, produzidos por fontes renováveis e biodegradáveis. Também, persiste a necessidade de se encontrar maneiras eficazes e de baixo custo para degradação parcial e/ou total dos resíduos plásticos já existentes. A biodegradação com enzimas fúngicas como forma de biorremediação apresenta-se como uma opção viável, porém ainda pouco explorada.

Este trabalho teve como objetivo a investigação dos microrganismos produtores de Cutinases dos fungos filamentosos presentes na micoteca do LaBioqMol da UNIOESTE de Cascavel-PR, analisando-se também seu comportamento na presença exclusiva de alguns polímeros sintéticos.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Para avaliação do potencial enzimático das linhagens o meio de cultivo foi estabelecido baseado no estudo de otimização realizado por PIO e MACEDO (2007). Os cultivos líquidos foram realizados em frascos Erlenmeyer de 150 mL contendo 30 mL de meio líquido cada. Foram inoculados em cada frasco 1 mL de solução de esporos de cada linhagem testada. Em cada Erlenmeyer também foram adicionados 1% dos plásticos de diferentes pesos moleculares analisados – Filme de Poliéster (FP), PET, PP e HDPE. Os cultivos foram estacionários durante 15 dias a 30°C.

PET, PP e HDPE foram obtidos em um mercado local da cidade de Cascavel- PR e o filme de poliéster (FP) através da empresa Sigma Aldrich®. Os plásticos PET, HDPE e o PP foram cortadas com tamanho médio de 1x1cm, imersos em álcool 70% por 1 hora. Decorrido o tempo estabelecido, os fragmentos de PET, HDPE e PP foram lavados 3 vezes com água destilada para completa limpeza de qualquer resíduo do etanol. Os plásticos foram então acondicionados em estufa ventilada a 55°C por 1 hora até estarem completamente secos e esterilizados com radiação UV. Neste processo, todos os plásticos foram submetidos a 5 ciclos de 20 minutos cada.

A determinação da atividade enzimática, foi realizada a partir dos extratos brutos extracelulares diários de cada cultivo. A atividade enzimática de todos os cultivos foram realizadas segundo o método espectrofotométrico da hidrólise de p- nitrofenilbutirato (p-NPB) (PIO; MACEDO, 2009). O substrato utilizado para a reação parte da mistura de Tetrahidrofurano (THF) 0,43M, Triton X-100 0,2% e p-NPB 1,12mM em tampão fosfato 50 mM pH 7,2 até completar o volume de 50 mL. Uma alíquota de 3,43 mL do substrato foi adicionada a 70 µL da amostra do extrato bruto, reagindo por 15 min a 30 °C contra o branco (substrato + meio de cultivo sem a presença do fungo). Decorridos os 15 minutos, a absorbância foi determinada por espectrofotômetro a 405 nm (KOLATTUKUDY, 1985).

A quantificação das proteínas foi realizada de acordo com a metodologia de Bradford (1976), utilizando albumina de soro bovino (BSA) como padrão. A concentração proteica foi expressa em mg de proteína por mL de amostra.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

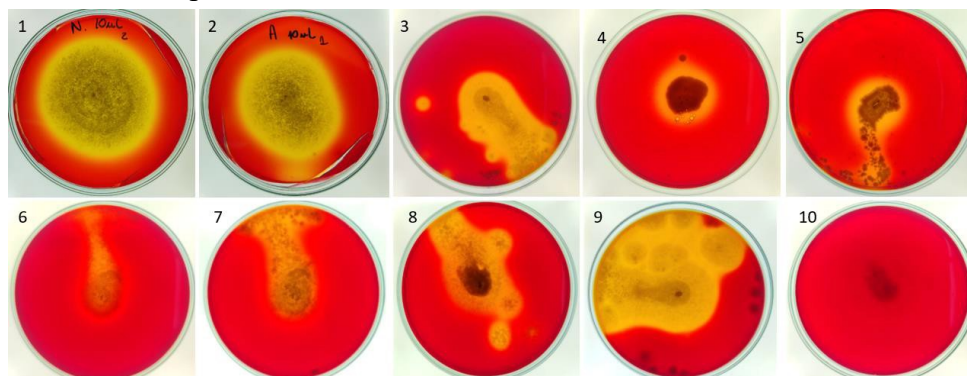
3.1 Seleção dos fungos produtores de Cutinase pela avaliação de seu potencial esterásico

A figura 2 mostra as linhagens que apresentaram formação do halo de hidrólise ocasionada pela produção de esterase com 72 horas de cultivo a 28 °C. As linhagens que não apresentaram a formação de halo não foram apresentadas. Os fungos *A. niger* e *A. aculeatus* apresentaram o melhor crescimento do halo de hidrólise em função do tempo, sendo estes selecionados para as próximas etapas.

Trabalhos como o de CHEN et al., 2013; KIM; RHEE, 2003; LIANG; ZOU, 2022;

QAMAR; ALI, 2021 mostram que o gênero *Aspergillus* em geral possui um grande potencial para produção de cutinases, por serem fungos encontrados em uma vasta gama de substratos, seu arsenal enzimático contempla as mais diversas categorias enzimáticas (DA SILVA et al., 2015).

Figura 1 Formação do halo de esterase positiva. 1. *Aspergillus niger* 2. *Aspergillus aculeatus* 3. *Aspergillus fumigatus* 4. *Aspergillus crysogenum* 5. *Trichoderma longibrachiatum* 6. *Aspergillus crustosum* 7. *Aspergillus flavus* 8. *Aspergillus versicolor* 9. *Hypocrea lixii*. 10. Controle negativo (glucose como fonte indutora). Avaliação da despolimerização dos polímeros sintéticos por Cutinases do extrato bruto



Fonte: acervo pessoal da autora.

3.1.1 Filme de poliéster (FP)

Para que se pudesse avaliar a capacidade fúngica de assimilação do poliéster como fonte de carbono, este cultivo foi conduzido sem a adição da glicose, utilizando-se o meio de cultivo líquido descrito no item 3.4, porém com adição de filmes de poliéster a 1% (v/v).

Após o tempo de cultivo determinado, os filmes de poliéster foram pesados para verificar se houve perda de massa em decorrência de sua despolimerização, porém os resultados não foram significativos ($p > 0,05$). Apesar de não se observar perda significativa de massa molecular durante o tempo estabelecido, os cultivos com *A. niger* e *A. aculeatus* apresentaram adesão à superfície do filme com apenas 5 dias de cultivo e atividade Cutinólítica de $3,45 \text{ U mL}^{-1}$ e $3,73 \text{ U mL}^{-1}$ respectivamente com 20 dias de cultivo.

A adesão à superfície indica que o fungo foi capaz de assimilar o filme de poliéster como suporte direto para seu crescimento e excreção de enzimas, caracterizando a formação de um biofilme, que segundo FLEMMING, 1998, é a primeira etapa necessária para a biodegradação de um polímero sintético. Semelhante a este estudo, (VIVI; MARTINS-FRANCHETTI; ATTILI-ANGELIS, 2019) relataram que o fungo *Chaetomium globosum* (ATCC 16021) apresentou adesão a superfície de filme de PVC com 28 dias de cultivo em meio sólido, porém com perda de peso molecular de até 70%.

3.1.2 Polietileno tereftalato (PET)

Quanto a produção cutinólítica frente ao polímero sintético PET, os resultados foram mais expressivos nos cultivos com *A. niger*, com atividade enzimática máxima de $11,92 \text{ U mL}^{-1}$ com 5 dias de cultivo. A atividade enzimática de *A. aculeatus* apresentou-se inexpressiva, com valores próximos a zero ($0,05 \text{ U mL}^{-1}$) com o mesmo tempo de cultivo. Alguns estudos relatam resultados similares quanto a atividade enzimática de *A. niger* quando adicionado a cultivos com PET, como o de ION et al., 2021 que relataram a conversão de 84% de PET em seu monômero BHET (bis(2- hydroxyethyl) tereftalato) com apenas 24 horas de cultivo.

A despolimerização de PET por enzimas fúngicas acontece primariamente pela quebra da ligação éster presente em sua estrutura, que pode ser hidrolisada por Lipases, Cutinases e Esterases. Porém, o PET apresenta uma alta resistência a despolimerização por apresentar natureza hidrofóbica, alto peso molecular, longas cadeias carbônicas, baixo percentual de grupos funcionais reconhecidos pelas enzimas e uma alta proporção de unidades de tereftalato aromático, que reduzem a flexibilidade das cadeias poliméricas limitando a degradação enzimática (VIVI; MARTINS-FRANCHETTI; ATTILI-ANGELIS, 2019).

3.1.3 Polipropileno (PP)

Os resultados obtidos quanto a biodegradação de Polipropileno se assemelha muito aos encontrados com PET. *A. niger* apresentou maior eficiência enzimática com uma produção de $8,51 \text{ U mL}^{-1}$ enquanto *A. aculeatus* apresenta atividade próxima de zero $0,08 \text{ U mL}^{-1}$. Diferente dos cultivos anteriores, neste caso não houve adesão a superfície do polímero pelo fungo, o que pode ser justificado pela sua recalcitrância.

Como todos os polímeros sintéticos, o Polipropileno apresenta alta hidrofobicidade inerente a sua estrutura, o que dificulta a adesão fungo-plástico. Somado a estes fatores, são encontrados em PP altas concentrações de plastificantes, aditivos com a finalidade de suavizar o produto, aumentando sua flexibilidade. CACCIARI et al. (1993) conduziu um estudo com microrganismos coletados do solo de 15 diferentes locais de deposição de plásticos. Os cultivos foram conduzidos por 175 dias e apresentaram perda de 40% do peso molecular inicial, contudo 90% desta redução foi atrelada a perda de plastificantes adicionados a superfície do PP e apenas 10% representam a perda de hidrocarbonetos inerentes a estrutura polimérica do PP.

OJHA et al. (2017), isolaram fungos presente no solo de um depósito de lixo e relataram que os fungos *Penicillium oxalicum* e *Penicillium chrysogenum* são capazes de degradar HDPE e LDPE. Os cultivos foram conduzidos por 90 dias com coletas realizadas nos dias 30, 60 e 90. *Penicillium chrysogenum* apresentou aos 90 dias de cultivo uma redução de 58,6% do peso inicial de HDPE e *Penicillium oxalicum* com o mesmo tempo de cultivo apresentou redução de 55,3%. Esses resultados foram confirmados por MEV e FTIR. As análises de MEV mostram adesão a superfície do HDPE e formação de biofilme por ambos os fungos com 15 e 30 dias de cultivo e mudanças estruturais como rachaduras, poros, danificação e rugosidade da superfície com 45, 60 e 90 dias de incubação.

4 CONCLUSÃO

A biodegradação de polímeros sintéticos por meio de enzimas fúngicas pode ser considerada como uma forma alternativa biologicamente viável para o problema da má disposição dos resíduos sólidos, porém mais estudos são necessários para que se possa aumentar sua efetividade, tanto em condições laboratoriais quanto em condições ambientais.

Além da caracterização bioquímica da enzima, mais ensaios quanto as condições de cultivo são necessárias para que se possa otimizar a produção cutinolítica e consequentemente, a despolimerização dos materiais sintéticos.

REFERÊNCIAS

AHMADITABATABAEI, S. et al. Fungal Enzymes as Catalytic Tools for Polyethylene Terephthalate (PET) Degradation. 2021.

ALTAMMAR, K. A. et al. Characterization of AnCUT3, a plastic-degrading paucimannose cutinase from *Aspergillus niger* expressed in *Pichia pastoris*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 222, n. PB, p. 2353–2367, 2022.

ALVES MACEDO, G.; FONTES PIO, T. a Rapid Screening Method for Cutinase Producing Microorganisms. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, p. 388–394, 2005.

CACCIARI, I. et al. Isotactic polypropylene biodegradation by a microbial community: Physicochemical characterization of metabolites produced. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 11, p. 3695–3700, 1993.

CARR, C. M.; CLARKE, D. J.; DOBSON, A. D. W. Microbial Polyethylene Terephthalate Hydrolases: Current and Future Perspectives. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, n. November 2020, p. 1–23, 2020.

CHANDRA, R.; RUSTGI, R. BIODEGRADABLE POLYMERS. **Science**, v. 23, n. 97, p. 1273–1335, 1998.

CHEN, S. et al. Identification and characterization of bacterial cutinase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 38, p. 25854–25862, 2008.

CHEN, S. et al. Cutinase: Characteristics, preparation, and application. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 8, p. 1754–1767, 2013.

CLOETE, E. et al. Biofilms in the food and beverage industries: An introduction. **Biofilms in the Food and Beverage Industries**, p. 3–41, 2009.

DA SILVA, F. C. et al. Taxonomia Polifásica Para Identificação De Aspergillus Seção Flavi: Uma Revisão. **Revista Ifes Ciência**, v. 1, n. 1, p. 18–40, 2015.

DANSO, D.; CHOW, J.; STREITA, W. R. Plastics: Environmental and biotechnological perspectives on microbial degradation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 85, n. 19, 2019.

DE BARROS, D. P. C. et al. Synthesis of alkyl esters by cutinase in miniemulsion and organic solvent media. **Biotechnology Journal**, v. 4, n. 5, p. 674– 683, 2009.

DUTTA, K.; SEN, S.; VEERANKI, V. D. Production, characterization and applications of microbial cutinases. **Process Biochemistry**, v. 44, n. 2, p. 127–134, 2009.

FLEMMING, H. C. Relevance of biofilms for the biodeterioration of surfaces of polymeric materials. **Polymer Degradation and Stability**, v. 59, n. 1–3, p. 309–315, 1998.

ION, S. et al. Sequential biocatalytic decomposition of BHET as valuable intermediary of PET recycling strategy. **Catalysis Today**, v. 366, n. December 2019, p. 177–184, 2021.

JOHNSON, A. N. et al. Current progress towards understanding the biodegradation of synthetic condensation polymers with active hydrolases. **Polymer International**, v. 70, n. 7, p. 977–983, 2021.

KIM, D. Y.; RHEE, Y. H. Biodegradation of microbial and synthetic polyesters by fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 61, n. 4, p. 300–308, 2003.

KOLATTUKUDY, P. E. Plant Cuticle By Fungal. **Ann. Rev. Phytopathol.**, v. 23, n. 49, p. 223–50, 1985.

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

NYSSÖLÄ, A. Which properties of cutinases are important for applications? **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 12, p. 4931–4942, 2015.

ODA, M. Structural basis for Ca²⁺-dependent catalysis of a cutinase-like enzyme and its engineering: application to enzymatic PET depolymerization. **Biophysics and physicobiology**, v. 18, p. 168–176, 2021.

OJHA, N. et al. Evaluation of HDPE and LDPE degradation by fungus, implemented by statistical optimization. **Scientific Reports**, v. 7, n. January, p. 1–13, 2017.

PIO, T. F.; MACEDO, G. A. **Chapter 4 Cutinases: Properties and Industrial Applications**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2009. v. 66

QAMAR, H.; ALI, S. Review on Production and Purification of Microbial Cutinase for Biotechnological Applications. **International Journal of Biology and Biotechnology**, v. 18, n. 1, p. 83–91, 2021.

RATHER, M. A. et al. Microbial biofilm: A matter of grave concern for human health and food industry. **Journal of Basic Microbiology**, v. 61, n. 5, p. 380–395, 2021.

SÁNCHEZ, C. Fungal potential for the degradation of petroleum-based polymers: An overview of macro- and microplastics biodegradation. **Biotechnology Advances**, v. 40, p. 107501, 1 maio 2020.

TELES, F. R. R.; CABRAL, J. M. S.; SANTOS, J. A. L. Enzymatic degreasing of a solid waste from the leather industry by lipases. **Biotechnology Letters**, v. 23, n. 14, p. 1159–1163, 2001.

VIVI, V. K.; MARTINS-FRANCHETTI, S. M.; ATTILI-ANGELIS, D. Biodegradation of PCL and PVC: *Chaetomium globosum* (ATCC 16021) activity. **Folia Microbiologica**, v. 64, n. 1, p. 1–7, 2019.