



**KAREN SANTOS SILVA**

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE ENZIMAS  
HIDROLÍTICAS MICROBIANAS NA DEGRADAÇÃO DOS  
POLÍMEROS POLIHIDROXIALCANOATOS E  
POLIURETANOS**

**LAVRAS – MG  
2025**

**KAREN SANTOS SILVA**

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS MICROBIANAS  
NA DEGRADAÇÃO DOS POLÍMEROS POLIHIDROXIALCANOATOS E  
POLIURETANOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de Doutor.

Prof. Dr. Disney Ribeiro Dias  
Orientador

Dra. Angélica Cristina de Souza  
Coorientadora

**LAVRAS – MG  
2025**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Silva, Karen Santos.

AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE ENZIMAS  
HIDROLÍTICAS MICROBIANAS NA DEGRADAÇÃO DOS  
POLÍMEROS POLIHIDROXIALCANOATOS  
EPOLIURETANOS / Karen Santos Silva. - 2024.

67 p. : il.

Orientador(a): Disney Ribeiro Dias.

Coorientador(a): Angélica Cristina de Souza.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2024.

Bibliografia.

1. fungos filamentosos. 2. enzimas microbianas. 3. degradação  
de polímeros. I. Dias, Disney Ribeiro. II. de Souza, Angélica  
Cristina. III. Título.

**KAREN SANTOS SILVA**

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS MICROBIANAS  
NA DEGRADAÇÃO DOS POLÍMEROS POLIHIDROXIALCANOATOS E  
POLIURETANOS**

**EVALUATION OF THE INFLUENCE OF MICROBIAL HYDROLYTIC ENZYMES  
ON THE DEGRADATION OF POLYMERS POLYHYDROXYALKANOATES AND  
POLYURETHANES**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de Doutor.

Aprovada em 30 de Agosto de 2024  
Dra. Cíntia Lacerda Ramos UFJVM  
Dra. Luara Aparecida Simões CIIMAR, Portugal  
Dra. Nádia Nara Batista UFLA  
Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli UFLA

Orientador  
Prof. Dr. Disney Ribeiro Dias

Coorientadora  
Dra. Angélica Cristina de Souza

**Lavras – MG  
2025**

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por ter me proporcionado a oportunidade de realizar esse trabalho, me dado coragem, saúde e por ter colocado tantas pessoas especiais na minha vida durante esse período.

Agradeço à minha mãe, Eliana, pela dedicação, pela força, pela inspiração, pelo incentivo, pela esperança, pela amizade, pelo amor... Obrigada por ser TUDO na minha vida, mãe!

Agradeço ao meu irmão, Patrick pela amizade, pelo companheirismo, pelo apoio, pela parceira e pela presença sempre.

Agradeço a minha avó, Irene (em memória) por ser inspiração nos dias difíceis e por ser uma luz na minha vida.

Agradeço à Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Programa de Pós- Graduação em Microbiologia Agrícola (PPGMA) por toda confiança e oportunidade em realizar o curso.

Agradeço ao Professor Disney Ribeiro Dias pela orientação e confiança durante a realização do trabalho.

Agradeço à pós doutora Angélica Cristina pelas orientações, pela confiança, pela dedicação, pela amizade.

Agradeço a todos os técnicos do Departamento de Microbiologia Agrícola Ivani, Dirceu e Cidinha pela disposição em ajudar.

Agradeço aos técnicos do Departamento de Zootecnia, Márcio e Flávio pela colaboração e pela amizade.

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

A todos que estiveram comigo direta ou indiretamente e fizeram parte dessa conquista, o meu muito obrigada!

## RESUMO

Os materiais obtidos a partir de combustíveis fósseis são muito utilizados, principalmente, devido às propriedades mecânicas e térmicas, confiabilidade e durabilidade que esses oferecem. Por outro lado, o acúmulo desses plásticos em aterros sanitários afeta negativamente o meio ambiente e a saúde humana. Como alternativa para reduzir o descarte de resíduos no meio ambiente, muitas pesquisas têm sido realizadas de forma a reduzir o descarte inadequado desses polímeros. O trabalho tem o objetivo de estudar a influência das enzimas microbianas protease, esterase, lipase e urease no processo de degradação dos polímeros poliuretanos (PU) e polihidroxialcanoatos (PHA). As espumas de poliuretano e sacolas plásticas de polihidroxialcanoatos foram previamente tratadas, autoclavadas e adicionadas em meios de cultura específicos para produção de cada enzima (protease, lipase, esterase e urease) contendo o microrganismo *Fusarium verticillioides* (CCDCA 11547) e *Aspergillus oryzae* (CCDCA 10203). Durante os 35 dias de incubação, foram realizados os Ensaio Enzimáticos para as enzimas citadas anteriormente, avaliação do pH e biomassa, e Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) para determinar os possíveis compostos gerados, presentes no conteúdo líquido. Além disso, foi feita a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) para a análise das estruturas dos polímeros. Os resultados mostraram que o *F. verticillioides* e o *A. oryzae* tem grande potencial de atuar na degradação dos polímeros PU e PHA. Em todos os tratamentos houve a produção das enzimas de interesse, houve o crescimento micelial durante as fermentações, e foi possível visualizar pelas imagens do MEV que houve alteração nas estruturas dos polímeros. Os resultados do trabalho evidenciaram o potencial de aplicação de enzimas microbianas no processo de degradação de polímeros.

Palavras – chave: fungos filamentosos; enzimas microbianas; poliuretano (PU); polihidroxialcanoatos (PHA); degradação de polímeros.

## ABSTRACT

Materials obtained from fossil fuels are widely used, mainly due to the mechanical and thermal properties, reliability and durability they offer. On the other hand, the accumulation of these plastics in landfills negatively affects the environment and human health. As an alternative to reduce the disposal of waste in the environment, much research has been carried out in order to reduce the improper disposal of these polymers. The work aims to study the influence of microbial enzymes protease, esterase, lipase and urease on the degradation process of polyurethane (PU) and polyhydroxyalkanoate (PHA) polymers. The polyurethane foams and polyhydroxyalkanoate plastic bags were previously treated, autoclaved and added to specific culture media for the production of each enzyme (protease, lipase, esterase and urease) containing the microorganism *Fusarium verticillioides* (CCDCA 11547) and *Aspergillus oryzae* (CCDCA 10203). During the 35 days of incubation, Enzymatic Assays were performed for the enzymes mentioned above, pH and biomass evaluation, and Fourier Transform Infrared (FTIR) to determine the possible compounds generated, present in the liquid content. In addition, Scanning Electron Microscopy (SEM) was performed to analyze the structures of the polymers. The results showed that *F. verticillioides* and *A. oryzae* have great potential to act on the degradation of PU and PHA polymers. In all treatments, there was the production of the enzymes of interest, there was mycelial growth during fermentations, and it was possible to see from the SEM images that there was an alteration in the structures of the polymers. The results of the work showed the potential application of microbial enzymes in the polymer degradation process.

Keywords: filamentous fungi; microbial enzymes; polyurethane (PU); polyhydroxyalkanoates (PHA); polymer degradation.

## IMPACTOS SOCIAIS, TECNOLÓGICOS, ECONÔMICOS E CULTURAIS

O trabalho sobre a aplicação de enzimas microbianas na degradação dos polímeros poliuretanos (PU) e polihidroxialcanoatos (PHA) apresenta impactos sociais, tecnológicos e ambientais com grande potencial de contribuir para o desenvolvimento sustentável, alinhado aos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) da ONU, em especial os ODS 9, 12 e 14. A pesquisa demonstra que os microrganismos *Fusarium verticillioides* e *Aspergillus oryzae* possuem capacidade de produzir enzimas, como protease, lipase, esterase e urease, que atuam na degradação eficiente de materiais plásticos amplamente utilizados, como PU e PHA. Esse processo biotecnológico oferece uma alternativa ambientalmente responsável para a gestão de resíduos plásticos que, quando acumulados em aterros sanitários, resultam em sérios danos ecológicos e à saúde humana. A degradação enzimática proposta contribui para a redução do descarte inadequado de plásticos no ambiente, com o potencial de mitigar a poluição, além de fomentar o desenvolvimento de tecnologias mais verdes para o tratamento de resíduos industriais e domésticos. Além disso, os resultados podem ter implicações econômicas positivas, como a redução dos custos associados ao manejo de resíduos sólidos urbanos, principalmente em áreas urbanas e industriais com alta geração de plásticos, podendo também atrair novos investimentos no setor de biotecnologia voltado para o meio ambiente. A participação de instituições de pesquisa e empresas do setor de tecnologia e produção no desenvolvimento e na aplicação dessas soluções pode favorecer a criação de um ciclo produtivo sustentável, gerando empregos e incentivando a inovação tecnológica. A pesquisa envolve diretamente a sociedade externa à UFLA, por meio de parcerias com empresas do setor de resíduos e grupos comunitários que atuam na coleta e destinação de resíduos sólidos, demonstrando um caráter extensionista significativo. Populações em áreas impactadas por aterros sanitários, assim como técnicos e estudantes envolvidos nas ações de extensão, estão entre os beneficiados, ampliando o impacto da pesquisa em diferentes territórios.



## **SOCIAL, TECHNOLOGICAL, ECONOMIC AND CULTURAL IMPACTS**

The work on the application of microbial enzymes in the degradation of polyurethane (PU) and polyhydroxyalkanoate (PHA) polymers has social, technological and environmental impacts with great potential to contribute to sustainable development, in line with the UN Sustainable Development Goals (SDGs), especially SDG 12 (Responsible Consumption and Production) and SDG 13 (Action Against Global Climate Change). The research demonstrates that the microorganisms *Fusarium verticillioides* and *Aspergillus oryzae* have the ability to produce enzymes, such as protease, lipase, esterase and urease, which act in the efficient degradation of widely used plastic materials, such as PU and PHA. This biotechnological process offers an environmentally responsible alternative for the management of plastic waste, which, when accumulated in landfills, results in serious ecological and human health damage. The proposed enzymatic degradation contributes to the reduction of inappropriate disposal of plastics in the environment, with the potential to mitigate pollution, in addition to fostering the development of greener technologies for the treatment of industrial and domestic waste. In addition, the results may have positive economic implications, such as the reduction of costs associated with the management of urban solid waste, especially in urban and industrial areas with high plastic generation, and may also attract new investments in the biotechnology sector focused on the environment. The participation of research institutions and companies in the technology and production sector in the development and application of these solutions can favor the creation of a sustainable production cycle, generating jobs and encouraging technological innovation. The research directly involves the society external to UFLA, through partnerships with companies in the waste sector and community groups that work in the collection and disposal of solid waste, demonstrating a significant extension character. Populations in areas impacted by landfills, as well as technicians and students involved in extension actions, are among the beneficiaries, expanding the impact of the research in different territories.

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	11
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
2.1.	Polímeros e impactos dos polímeros naturais e sintéticos .....	13
2.2.	Metabólitos dos fungos <i>Fusarium verticillioides</i> e <i>Aspergillus oryzae</i> .....	15
2.3.	Enzimas .....	17
2.3.1.	Protease .....	17
2.3.2.	Lipase .....	19
2.3.3.	Esterase.....	20
2.3.4.	Urease.....	20
3.	MATERIAL E MÉTODOS.....	22
3.1.	Seleção e crescimento dos microrganismos .....	22
3.1.1.	Microrganismos.....	22
3.1.2.	Triagem de protease .....	22
3.1.3.	Triagem de lipase .....	22
3.1.4.	Triagem de esterase .....	23
3.1.5.	Triagem de urease .....	23
3.1.6.	Crescimento dos microrganismos e preparo dos inóculos .....	23
3.2.	Preparo dos polímeros .....	24
3.3.	Condições de cultivo para indução de enzimas microbianas .....	24
3.3.1.	Fungos filamentosos.....	24
3.3.1.1.	Fermentação para produção de protease .....	24
3.3.1.2.	Fermentação para produção de lipase .....	25
3.3.1.3.	Fermentação para produção de esterase .....	25
3.3.1.4.	Fermentação para produção de uréase.....	26
3.4.	Ensaio enzimáticos .....	26
3.4.1.	Quantificação de protease por método colorimétrico.....	26
3.4.2.	Quantificação de lipase por método colorimétrico.....	27
3.4.3.	Quantificação de esterase por método colorimétrico.....	28
3.4.4.	Quantificação de urease por método colorimétrico.....	28
3.4.5.	Determinação do teor de proteína total .....	29
3.5.	Análises físico-químicas.....	29
3.5.1.	pH.....	29

3.5.2.	Biomassa microbiana .....	29
3.5.3.	Análise de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) .....	30
3.5.4.	Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) .....	30
3.6.	Delineamento experimental e análises estatísticas .....	30
4.	RESULTADOS .....	32
4.1.	<i>Fusarium verticillioides</i> .....	32
4.1.1.	Desempenho e produção enzimática .....	32
4.1.2.	Produção de biomassa e pH do cultivo .....	35
4.1.3.	FTIR e MEV .....	40
4.2.	<i>Aspergillus oryzae</i> .....	44
4.2.1.	Desempenho e produção enzimática .....	44
4.2.2.	Produção de biomassa e pH do cultivo .....	47
4.2.3.	FTIR e MEV .....	51
5.	DISCUSSÃO .....	57
6.	CONCLUSÃO .....	59
7.	REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO .....	60

## 1. INTRODUÇÃO

A produção e uso de polímeros continuam são impulsionados pela demanda em diversas indústrias, como a de embalagens, construção, automotiva, têxtil e eletrônica. (Subash et al, 2023). Os polímeros ganharam mercado devido ao seu baixo custo e alta aplicabilidade. Os materiais de base petroquímica são amplamente utilizados principalmente devido às propriedades mecânicas e térmicas, confiabilidade e durabilidade (Khomlaem, 2023).

No entanto, as matérias-primas utilizadas na produção de plásticos sintéticos são limitadas e o acúmulo desses polímeros não biodegradáveis em aterros sanitários está afetando negativamente o meio ambiente e a saúde humana. (Khomlaem, 2023). Além disso, esses plásticos sintéticos demoram centenas de anos para se degradar, entrando na cadeia alimentar causando efeitos nocivos ao meio ambiente e à vida selvagem (Haque, 2022).

Os polímeros quimicamente recicláveis têm atraído interesses crescentes para abordar a questão do fim de resíduos de polímeros e estabelecer uma economia circular. Esses polímeros recicláveis podem ser despolimerizados de volta aos monômeros originais ou convertidos em produtos químicos de valor agregado com alta seletividade e eficiência em condições de reaproveitamento (Haque et al., 2022).

A degradação de polímeros por microrganismos é um campo de estudo promissor na biotecnologia ambiental, especialmente devido ao impacto negativo dos plásticos não biodegradáveis no meio ambiente (Xiang et al., 2023). Microrganismos como os fungos filamentosos *Fusarium verticillioides* e *Aspergillus oryzae* têm a capacidade de produzir enzimas que podem quebrar polímeros em monômeros ou oligômeros, os quais são posteriormente utilizados como fonte de carbono e energia pelos microrganismos (Srikanth, 2022).

Os microrganismos desempenham um papel cada vez mais importante na biotecnologia, especialmente na produção de enzimas. Essas enzimas microbianas são altamente valorizadas devido à sua capacidade de catalisar reações químicas de maneira eficiente e específica, utilizando uma ampla gama de matérias-primas como substrato (Muhammad, 2020).

Os microrganismos são cada vez mais utilizados para a produção de enzimas, devido à sua produção diversificada de metabólito, eficiência de produção, variedade de matéria-prima utilizada como substrato e pela sua adaptabilidade e engenharia genética (Morila et al., 2023).

Nesse contexto, o objetivo do trabalho foi utilizar os microrganismos *F. verticillioides* e *A. oryzae* que produzem enzimas extracelulares (protease, esterase, lipase e urease) capazes de degradar os polímeros Poliuretano (PU) e Polihidroxialcanoatos (PHA) em monômeros. Por

fim, os resultados do trabalho evidenciaram o potencial das enzimas microbianas no processo de degradação dos polímeros. Dessa forma, a intenção de reduzir a quantidade de materiais descartados de forma inadequada e diminuir, também, o tempo de exposição desses compostos poliméricos no ambiente se torna plausível.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Polímeros e impactos dos polímeros naturais e sintéticos

Os materiais poliméricos estão sendo cada vez mais utilizados em aplicações da engenharia devido, principalmente a resistência e durabilidade

(Li et al., 2022). Por outro lado, existem as limitações da utilização desses compósitos como as possíveis falhas na estrutura, fissuras, absorção de umidade, condutividade elétrica, integridade do material (Idolor et al, 2022) e a questão ambiental.

Um dos principais problemas na indústria de compósitos poliméricos é que a maioria de suas matérias-primas vem da indústria do petróleo (Pu et al., 2023), o qual é um recurso natural e não renovável. Com o esgotamento do petróleo e o aumento na conscientização sobre a proteção ambiental, a síntese de polímeros a partir de recursos recuperáveis se torna significativa e necessária.

Aproximadamente, 58% dos resíduos plásticos são depositados em aterros ou liberados diretamente no meio ambiente, resultam na fuga de resíduos descartados para o ambiente ou na produção de componentes prejudiciais ao meio ambiente. 24% são incinerados e apenas 18% dos resíduos plásticos estão sendo reciclados em todo o mundo (Zhang et al., 2022). Sabe-se, também que a maioria dos polímeros derivados de petróleos levam centenas de anos para se degradar no meio ambiente (Yuan et al., 2022).

A maior parte dos plásticos utilizados em têxteis, indústria e construção de casas possuem propriedades altamente cristalinas. Dessa forma, são caracterizados como recalcitrantes à biodegradação pois, eles não possuem ligações éster acessíveis para o ataque das enzimas. Essa característica aumenta a durabilidade dos plásticos, que é uma de suas principais vantagens. Por outro lado, essa característica tornou-se um dos principais desafios na gestão de resíduos plásticos (Delangiz, 2022).

Os PHAs são poliésteres lineares hidrofóbicos e biodegradáveis que são produzidos por microrganismos procarióticos como reservas intracelulares de grânulos de energia e carbono (Lemoigne, 1926). Os biopolímeros são poliésteres metabolizados intracelularmente por bactérias e algum archaea sob uma condição limitante de nitrogênio e excesso de carbono como grânulos de armazenamento de energia.

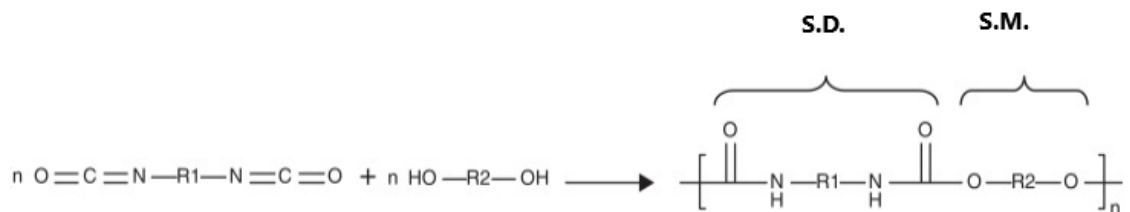
Os PHAs foram revelados pela primeira vez em 1925. É possível fabricar PHAs através de sínteses químicas com a polimerização de abertura de anel dos  $\beta$ -lactones; no entanto, é ainda mais caro e raramente é aplicado (Lemoigne, 1925).

Os polihidroxicanoatos (PHAs) são considerados polímeros biodegradáveis com alta compatibilidade biológica, resistentes a radiação UV, termoplásticos e com natureza favorável ao meio ambiente (Haque, 2022). Essas propriedades tornam os PHAs polímeros promissores para diversas aplicações biotecnológicas – engenharia, agricultura, farmacologia e biomedicina (Eesaee et al., 2022).

No entanto, existem algumas limitações no processamento desses biopolímeros, são elas: a facilidade de degradação quando dissolvidos, a dificuldade de conformidade térmica, são rígidos e/ou pegajosos quando submetidos a processos de extrusão e alto custo de produção. Além desses fatores, a degradação do PHA depende do tipo de PHA (Polihidroxibutirato -PHB ou Polihidroxivalerato – PHV), das condições ambientais, da estrutura cristalina e da morfologia do material. (Eesaee et al., 2022).

Os poliuretanos (PU) são produzidos a partir da reação entre o isocianato  $n(\text{O}=\text{R}_1=\text{N}-\text{R}_1=\text{O})$  e o poliálcool  $n(\text{HO}-\text{R}_2-\text{OH})$  em poliéter combinado e isocianato combinado (Figura 1) (Pu et al.; 2023). Poliuretanos são compostos que têm em comum a repetição do grupo funcional de uretano ( $-\text{NH}-\text{CO}-\text{O}-$ ) ao longo da cadeia de polímeros (Cowie e Arrigui, 2008).

Figura 1 – Reação geral da formação de poliuretano por policondensação, onde R2 pode ser um polímero ou uma molécula orgânica de baixo peso molecular.



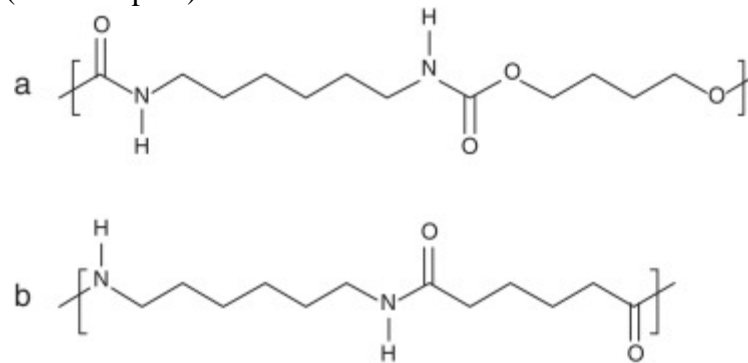
Fonte: Cowie e Arrigui (2008).

Dentro da cadeia principal do poliuretano formado, é classificado em segmento duro (SD) e segmento macio (S.B.). O isocianato faz parte do segmento duro ou rígido que é dado pelos grupos de uretano que através das pontes de hidrogênio intermolecular conferem rigidez e coesão às cadeias de polímeros (Pu et al.; 2023).

Por outro lado, os podióis proporcionam flexibilidade ao polímero por meio de cadeias de hidrocarbonetos (ou com heteroátomos) e devido a essa característica é chamado de S.M. (segmento macio) (Cowie e Arrigui, 2008).

Historicamente, a reação para a formação de poliuretanos foi descoberta pela Bayer em 1937 (Figura 2), e foi em grande parte impulsionada pela necessidade da empresa alemã IG Farben (agora BAFT e Bayer) de produzir um material que pudesse competir com o nylon 6,6 (Cowie e Arrigui, 2008).

Figura 2 – Estruturas químicas para: a) poliuretano, derivado de 1,6-hexametameinato e 1,4-butanediol; e (b) nylon 6,6, derivado de 1,6-hexameimidiamina e 1,6-ácido hexanoico (ácido adipico).



Fonte: Cowie e Arrigui (2008).

O poliuretano é muito utilizado na engenharia devido às suas características favoráveis. Esse polímero apresenta excelente impermeabilidade, boa durabilidade, alta taxa de expansão, rápida velocidade de formação de espuma, isolamento térmico, forte adaptabilidade, baixa densidade e nenhum aumento no peso estrutural (Li et al., 2022).

Esses materiais são aplicados para absorção acústica melhorando a resistência de solos moles, como o solo marinho. São utilizados, também, em jateamento subaquático (Liu et al., 2021) e devido serem excelentes isolantes térmicos, são utilizados em construções de paredes externas (Li et al., 2022). Além disso, são impermeáveis e flexíveis, podendo ser aplicados em projetos de conservação de água (Guo et al., 2018).

Apesar dos desafios dos fatores químicos e ambientais que existem dificultando a degradação dos polímeros, existem estudos que relatam o potencial dos metabólitos microbianos atuarem nesse processo de degradação (Srikanth, 2022).

## 2.2. Metabólitos dos fungos *Fusarium verticillioides* e *Aspergillus oryzae*

A variabilidade das comunidades microbianas pode estar relacionada aos fatores abióticos e bióticos dos ecossistemas que elas estão expostas. Muitos estudos demonstraram que as características físico-químicas do ambiente (por exemplo, teor de umidade do solo, pH, matéria orgânica, C ou N total) têm efeitos importantes na estrutura e atividade da comunidade microbiana (Wang et al., 2023).

O aumento da cobertura vegetal após o florestamento leva a mudanças nas condições ambientais do solo atribuído a mudanças na composição da comunidade microbiana do solo e às atividades de enzimas hidrolíticas relevantes (Huang et al., 2022).



Larvas de besouros (Coleoptera: *Tenebrionidae*), incluindo *Tenebrio molitor*, *Tenebrio obscurus*, *Zophobas atratus*, *Tribolium castaneum* e *Plesiophthalmus davidis*, podem degradar diferentes plásticos, especialmente polietileno (PE) e poliestireno (PS). Essas espécies de insetos funcionam como biorreatores com microbiota intestinal e enzimas digestivas contribuindo sinergicamente para acelerar o processo de biodegradação plástica (Brandon et al., 2021).

Estudos relatam que mais da metade desses polímeros de PE, PS ou cloreto de polivinila (PVC) ingeridos podem ser digeridos, despolimerizados e biodegradados dentro de um tempo de retenção de 12 a 15 h nos intestinos digestivos de larvas de *Tenebrio molitor* (Peng et al., 2022).

Desde a década de 1970, várias cepas bacterianas e fúngicas foram relatadas para colonizar e biodegradar os principais plásticos à base de petróleo, mas as taxas de biodegradação em condições ambientais naturais são extremamente lentas (Inderthal e Tai e Harrison; 2021).

No entanto, os microrganismos são a principal fonte de enzimas, pois podem ser manipulados geneticamente para aumentar a produção de enzimas e são cultivados em larga escala em curto espaço de tempo. A produção de enzimas por microrganismos é uma área de grande potencial da biotecnologia, com aplicações amplas e variadas que impactam muitas indústrias e processos cotidianos. (Bhardwaj, 2021).

Os gêneros *Fusarium* e *Aspergillus* são importantes produtores de enzimas com várias aplicações industriais significativas. Esses fungos são utilizados para desenvolver enzimas que têm impacto significativo na produção de alimentos, biocombustíveis, papel e celulose, bem como na biorremediação e em outros processos industriais. A capacidade desses fungos de produzir enzimas em grandes quantidades e a eficiência dessas enzimas tem grande impacto em diversos setores (Almeida et al., 2019; Srikanth, 2022).

Espécies como *F. graminearum*, *F. asiaticum*, *F. culmorum*, *F. solani*, *F. avenaceum*, *F. proliferatum*, *F. oxysporum*, *F. subglutinans* e *F. verticillioides* têm sido frequentemente relatadas como causadoras de podridão da coroa, requeima da cabeça (crosta), podridão radicular e podridão da orelha em mais de 81 espécies de plantas na terra (Dinango et al., 2022).

Doenças essas que causam prejuízo significativo nas produções incluindo de cereais, trigo, cevada, arroz e milho. As espécies patogênicas de *Fusarium* dificultam a produtividade das culturas em todo o mundo (Nguvo e Gao, 2019). Esse fungo é, também, o principal responsável pelo acúmulo de fumonisina B<sub>1</sub> (FB<sub>1</sub>) na planta de milho (Lanubile et al., 2012).

Para estudos, o fungo filamentosso *Fusarium verticillioides* foi isolado de sementes comerciais de milho e sua produção de celulases e hemicelulases foi avaliada. Alguns componentes do complexo celulolítico secretado por *Fusarium verticillioides* também foram purificados e caracterizados. Três endoglucanases isoladas, demonstraram atuar em um complexo multienzimático, estando fisicamente associadas entre elas e com uma celobiohidrolase e uma xilanase (Almeida et al.; 2019).

Estudos utilizaram as enzimas celulases, xilanases, proteases, lipases, pectinases e lignases do fungo filamentosso *Fusarium verticillioides* para aplicações em indústrias de papel e celulose, indústria alimentícia e em produção de biocombustíveis (Periyasamy et al., 2023).

O fungo *Aspergillus oryzae* é conhecido pela sua produção enzimática de aplicação industrial. Suas proteases são utilizadas na maturação de queijos contribuindo em valores nutricionais e em alterações de aroma, sabor e textura. As enzimas fúngicas são utilizadas na panificação e são capazes de quebrar as ligações peptídicas (Simplicio et al, 2023).

O fungo filamentosso *A. oryzae* apresenta potencial para utilizar uma ampla variedade de resíduos agrícolas para a produção da enzima esterase em fermentação submersa quando suplementado com fontes adicionais de C (amido) e N (ureia) (Castro, M. et al., 2018, Zambare, 2010).

*A. oryzae* é uma espécie de fungo que degrada o polietileno de alto peso molecular sob condições limitadas por nitrogênio e carbono. As enzimas amilases, celulases, xilanases, proteases, pectinases e lactases do fungo filamentosso *Aspergillus oryzae* são aplicados em indústria alimentícia, indústria de panificação e bebidas e em tratamento de resíduos e biocombustíveis (Danso et al. 2019; Kawai et al. 2019).

As enzimas são componentes vitais tanto para os processos biológicos quanto para uma ampla gama de aplicações industriais. Sua capacidade de catalisar reações específicas com alta eficiência e sob condições controladas faz delas ferramentas indispensáveis para a biotecnologia, a indústria e a medicina (Srikanth, 2022).

## **2.3. Enzimas**

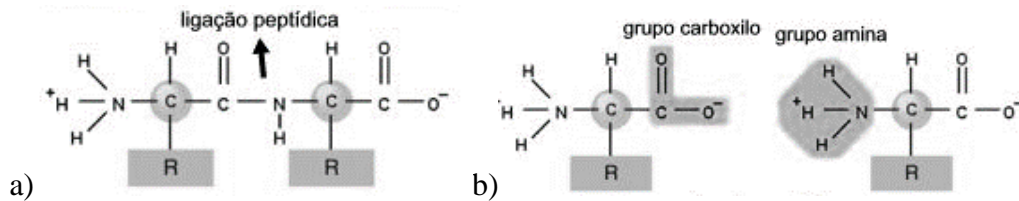
### **2.3.1. Protease**

As proteases constituem uma classe de enzimas muito utilizada em diferentes setores industriais. As proteases, conhecidas também por proteinases, peptidases e enzimas proteolíticas clivam as ligações peptídicas nas proteínas. O principal objetivo da enzima

protease é hidrolisar/catalisar a ligação peptídica presente nas proteínas. Muitos microrganismos são utilizados para a produção das proteases, onde o produto pode ser extracelular ou intracelular (Kirk et al., 2002).

As proteases são divididas em exopeptidases e endopeptidases. As exopeptidases são classificadas como aminopeptidases ou carboxipeptidases (figura 3) e são capazes de clivar as ligações peptídicas no final de uma cadeia de aminoácidos, ou seja, extracelular. Enquanto que as enzimas chamadas endopeptidases quebram ligações peptídicas dentro de cadeias de aminoácidos (intracelular) (Shaikh, et.al, 2023).

Figura 3 – a) Ligações peptídicas (amida) dentro das cadeias de aminoácidos. b) Grupos carboxila amina nas extremidades da cadeia de aminoácidos.



Fonte: Shaikh, et.al (2023).

As proteases extracelulares, são as principais protagonistas da despolimerização das moléculas de proteínas e peptídeos em N orgânico molecular, ou seja, em pequenos peptídeos e, finalmente, em aminoácidos. A maior parte do nitrogênio presente no solo é encontrado em formas orgânicas (Lemes, 2022).

O nitrogênio orgânico disponível no solo, chamado de N primário é, principalmente, de origem vegetal e microbiana. Essa deposição no solo ocorre por meio de uma grande variedade de componentes, como proteínas, peptídeos, aminoácidos e N heterocíclico (Abdella, 2022).

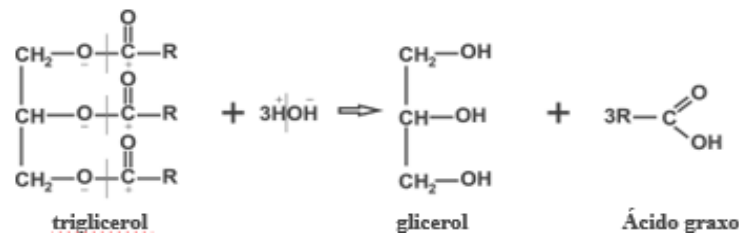
Em relação aos mecanismos de regulação microbiana descritos para síntese enzimática e produção de protease, sabe-se que proteínas extracelulares, o tamanho e o tipo das proteínas influenciam na indução da protease. Por outro lado, o substrato e várias fontes de nitrogênio, incluindo aminoácidos,  $\text{NH}_4^+$  como produto final, e fontes disponíveis de C, como a glicose limitam a atividade de protease (Sharma e Singh, 2016).

Os compostos orgânicos contendo nitrogênio devem ser mineralizados para formas inorgânicas para se tornarem disponíveis para as plantas. Acredita-se que a hidrólise de proteínas em aminoácidos seja um processo limitante no fornecimento de N disponível para as plantas (Khosrozadeh e Nourbakhsh, 2022).

### 2.3.2. Lipase

As lipases pertencem à classe de enzimas, conhecidas como serina hidrolases, que catalisa a hidrólise de triglicerídeos de cadeia longa em ácidos graxos, diacilglicerol, monocilglicerol e glicerol (figura 4) (Amenaghawon, 2022). As lipases, também, catalisam reações de biotransformação em ambientes com baixo teor de água como esterificação, acilgliceróis, interesterificação (Nimkande e Bafana, 2022), transesterificação, acidólise e alcoólise (Gurkok e Ozdal, 2021).

Figura 4 – Catálise enzimática de triglicerídeos, liberando glicerol e ácidos graxos livres.



Fonte: Amenaghawon (2022).

As lipases são enzimas solúveis em água, enquanto seus substratos são solúveis em gordura (Stemler e Scherf, 2022). A maioria das lipases depende de mecanismos de ativação interfacial para reações catalíticas, geralmente, em interfaces hidrofílicas-hidrofóbicas (interfaces água-óleo) (Li, et al., 2022).

Muitas lipases foram isoladas e caracterizadas a partir de animais, plantas e microrganismos. As lipases microbianas podem ser produzidas a menor custo de produção e com especificidade do substrato em comparação com as lipases animais e vegetais. Enzimas de microrganismos termofílicos e hipertermofílicos são mais estáveis em relação a uma variedade de desnaturantes e, portanto, representam alternativas com altos potenciais para o desenvolvimento de processos biocatalíticos industriais (Mazhar, 2022).

Esse potencial de aplicação das lipases microbianas decorre do fato de serem estereoespecíficas, ou seja, bastante estáveis e ativas em solventes orgânicos (Rabbani, 2022). Além disso, as lipases microbianas são as enzimas que apresentam as mais diversas propriedades enzimáticas como em detergentes, têxteis, aditivos alimentares, produtos farmacêuticos, diagnósticos médicos (Savickaite et al., 2021), agroquímicos, biodegradação de óleos e tratamento de resíduos (Joshi et al, 2019).

### 2.3.3. Esterase

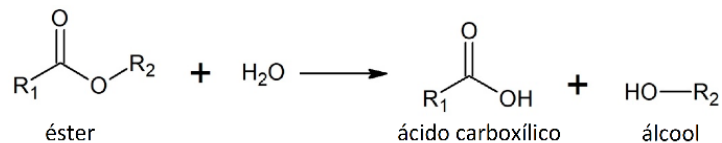
As esterases são enzimas da classe das hidrolases que podem catalisar a hidrólise de ésteres liberando álcoois e ácidos correspondentes (figura 5) (Wang et al., 2023). Baseado nos substratos, as esterases podem ser classificadas em carboxilesterase e arilesterase. A diferença é que a arilesterase tem uma capacidade mais forte de catalisar a hidrólise de ésteres aromáticos (He et al., 2022).

As esterases catalisam diferentes reações como esterificação, interesterificação e transesterificação em meio livre de água ou com restrição de água. Essas enzimas são utilizadas na remediação de pesticidas, contendo carbamato e organofosforado e, também, na remoção de compostos recalcitrantes (Bhardwaj et al., 2021).

Essas enzimas representam um grupo diversificado de hidrolases caracterizadas de animais, plantas e microrganismos, e as enzimas específicas de microrganismos são as mais utilizadas na indústria devido à facilidade e versatilidade de produção (He et al., 2022). A maioria das esterases demonstraram também catalisar reações de síntese, e isso as torna candidatas promissoras para diferentes aplicações (Karnaouri et al., 2019).

A transformação enzimática em alta temperatura é importante pois favorece a redução do risco de contaminação. Além disso, essa condição leva a menor viscosidade, maiores taxas de transferência de massa, reações mais rápidas, melhor solubilidade do substrato e do produto e, conseqüentemente, reduz o custo geral (Karnaouri et al., 2019).

Figura 5 – Catálise enzimática de ésteres liberando ácido carboxílico e álcool.



Fonte: Wang et al. (2023).

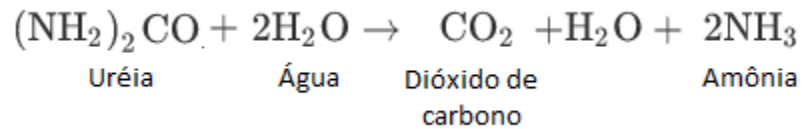
### 2.3.4. Urease

A urease é uma enzima de níquel não-redox encontrada em plantas, algas e microrganismos, que catalisa a hidrólise da ureia na última etapa da mineralização do nitrogênio orgânico, para liberar a amônia (figura 6) (Song et al., 2022). Esta enzima catalisa a hidrólise da ureia em ácido carbâmico ( $\text{CH}_3\text{NO}_2$ ) e amônia, que se decompõe ainda mais em bicarbonato ( $\text{HCO}_2^-$ ) e uma segunda molécula de amônia (Ata et al., 2023).

A precipitação de carbonato induzida por microrganismos foi testada como um novo método biológico para induzir eficientemente uma fixação *in situ* de elementos perigosos de maneira ambientalmente sustentável (Ata et al., 2023). O nitrogênio presente na amônia favorece o crescimento de microrganismos patogênicos, podendo causar efeitos negativos na saúde humana, na agricultura e no meio ambiente devido à consequência da elevação do pH (Song et al, 2022).

Os microrganismos e as plantas são as principais fontes de urease, a qual tem importância na área da bioquímica devido às aplicações significativas da enzima na indústria de alimentos, equipamentos médicos e biossensores (Pawar et al., 2022).

Figura 6 – Catálise enzimática de uréase liberando dióxido de carbono e amônia.



Fonte: Wang et al. (2023).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Seleção e crescimento dos microrganismos

##### 3.1.1. Microrganismos

Os microrganismos *Aspergillus fumigatus* (CCDCA 11586), *Aspergillus fumigatus* (CCDCA 11319), *Aspergillus niger* (CCDCA 11491), *Aspergillus niger* (CCDCA 11544), *Aspergillus oryzae* (CCDCA 10720), *Aspergillus oryzae* (CCDCA 10264), *Aspergillus oryzae* (CCDCA 10203) e *Fusarium verticillioides* (CCDCA 11547) foram testados quanto à sua capacidade de produzir as enzimas protease, lipase, esterase e urease. Todas as cepas dos microrganismos selecionados se encontram depositados na Coleção de Cultura do Departamento de Ciências de Alimentos da Universidade Federal de Lavras - DCA UFLA.

Inicialmente, os microrganismos foram selecionados após resultados obtidos pelo método qualitativo-testes de disco-difusão, realizando a triagem para cada enzima (Gaspar, 2022).

##### 3.1.2. Triagem de protease

A seleção de fungos filamentosos produtores de proteases foram realizados em placa de Petri contendo 10% de leite desnatado em ágar. O ágar foi adicionado em tampão citrato-fosfato 0,1M (pH 5,0) e esterilizado separadamente do leite desnatado, para evitar a coagulação e caramelização dos seus componentes. Cada cultivo, após mantido 7 dias à 28°C foi inoculado na superfície de uma placa, e as leituras foram feitas após 24, 48 e 72 horas (Pereira et al., 2001).

##### 3.1.3. Triagem de lipase

Os fungos filamentosos foram testados quanto à capacidade de produzir lipase em meio ágar batata dextrose (BDA) suplementado com 5% de azeite de oliva. A inoculação foi pontual no centro da placa contendo o meio. As placas foram mantidos em estufa a 30 °C por 144 horas e o crescimento dos fungos foi monitorado através da medição dos halos formados a cada 24 horas (Roveda et al., 2010).

#### 3.1.4. Triagem de esterase

Para o teste de hidrólise de ésteres, foi utilizada a metodologia modificada de Sierra (1957), utilizando meio contendo Tween 80. O meio disperso em placas de Petri é constituído por 10 g.L<sup>-1</sup> de peptona, 5 g.L<sup>-1</sup> de NaCl, 0,1 g.L<sup>-1</sup> de CaCl<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O e 10mL.L<sup>-1</sup> de Tween 80. Cada fungo foi inoculado individualmente no centro de cada placa e incubados a 25°C por 5 dias. A visualização de um halo opaco ao redor das colônias foi indicativa de resultado positivo devido ao sal de cálcio, insolúvel em ácidos graxos, provenientes da hidrólise do éster (Anduaem, B., 2014).

#### 3.1.5. Triagem de urease

Um meio sólido contendo 10g.L<sup>-1</sup> de peptona, 10 g.L<sup>-1</sup> de glicose, 10 g.L<sup>-1</sup> de NaCl, 2g.L<sup>-1</sup> de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 20 g.L<sup>-1</sup> de ureia, 18 g.L<sup>-1</sup> de ágar e 0,01 g.L<sup>-1</sup> de reagente vermelho de fenol, com pH 7 foi utilizado para identificar os microrganismos produtores de urease. Esses microrganismos que podem hidrolisar a ureia produzem amônia que faz com que o pH suba e o vermelho fenol desenvolva cor sob condições alcalinas. Porém, a reação falso-positiva pode ocorrer quando a peptona no meio provoca a liberação de resíduos de aminoácidos que também promovem a elevação do pH, fazendo com que o vermelho de fenol desenvolva cor. Então, o meio de triagem que não continha ureia foi preparado e definido como o controle negativo para a cepa que descolorir o vermelho fenol (Fan et al., 2020).

#### 3.1.6. Crescimento dos microrganismos e preparo dos inóculos

Após realizada a triagem para identificar quais fungos apresentavam potencial para produzir as enzimas de interesse, os fungos *Aspergillus oryzae* (CCDCA 10720) e *Fusarium verticillioides* (CCDCA 11547) foram selecionados quanto à capacidade de produzir as enzimas de protease, esterase, lipase e urease. Esses fungos foram reativados, separadamente, em tubo inclinado contendo o meio ágar batata dextrose (BDA), e incubado a 28°C por 7 dias até completo crescimento. Posteriormente, foi preparado um inóculo de 10<sup>8</sup> esporos/ml e adicionados em tubos Falcon de 15 mL, contendo 5 mL de caldo de batata dextrose, os quais foram incubados a 28°C por 7 dias. Após esse período de incubação, o disco de micélio que formou na superfície do tubo foi adicionado em cada biorreator contendo os meios de cultivos para iniciar as fermentações.



### 3.2. Preparo dos polímeros

As espumas de poliuretano (PU) e sacolas plásticas de polihidroxialcanoatos (PHA) foram adquiridas de lojas do comércio local e foram testadas para degradação fúngica. Pedacos de espuma (6mm de diâmetro por 6 mm) e pedacos de sacolas (6mm de diâmetro) foram lavados em água destilada, secas em temperatura ambiente e autoclavadas, a 121°C, durante 15 minutos, e posteriormente adicionados aos 80ml do respectivo meio de cultura, conforme a tabela 1.

O polímero PU foi adicionado nos meios de cultura para indução de protease, esterase e urease. Esse polímero não foi adicionado no meio para indução de lipase devido esse não apresentar estrutura de lipídeos em sua estrutura química. Enquanto o polímero PHA foi adicionado nos meios de cultura para indução de protease, lipase e esterase. Esse polímero não foi adicionado no meio par indução de urease devido ele não apresentar uretano em sua estrutura.

Tabela 1 – Polímeros Poliuretano (PU) utilizados em meios fermentativos contendo as enzimas protease, esterase e urease produzidas pelo *F. verticillioides* e *A. oryzae*; e Polímeros Polihidroxialcanoatos (PHA) utilizados em meios contendo as enzimas protease, lipase e esterase produzidas pelo *F. verticillioides* e *A. oryzae*.

Enzimas	Polímeros	
	Poliuretano (PU)	Polihidroxialcanoatos (PHA)
Protease	X	X
Lipase		X
Esterase	X	X
Urease	X	

Fonte: Do autor.

### 3.3. Condições de cultivo para indução de enzimas microbianas

#### 3.3.1. Fungos filamentosos

##### 3.3.1.1. Fermentação para produção de protease

Os fungos foram reativados em tubo inclinado contendo o meio ágar batata dextrose (BDA), e incubados a 28°C por 7 dias até completo crescimento. O micélio foi suspenso em solução esterilizada de, aproximadamente, 5mL composta de NaCl 0,9% e Tween 80, pH 7,0. Esta suspensão micelial ( $10^8$  esporos/mL) foi inoculada em Erlenmeyer de 125mL contendo 80mL do meio de cultivo dextrose (2% m/v), caseína (1% m/v), peptona 2% (m/v) e leite desnatado 1% (m/v). As culturas foram incubadas durante 36 dias à 30°C.

Após a incubação, as culturas foram centrifugadas por 2 minutos a 5000 rpm, sendo o sobrenadante utilizado para caracterização parcial da enzima proteolítica. O filtrado foi armazenado em freezer, congelado.

### **3.3.1.2. Fermentação para produção de lipase**

Micélios de sete dias de idade foram suspensos em água salina 0,9% e autoclavada, sendo a concentração ajustada em  $10^8$  esporos/mL a partir de contagem em Câmara de Neubauer. O micélio foi suspenso em, aproximadamente, 5mL de solução esterilizada composta de NaCl 0,9% e Tween 80, pH 7,0. O volume correspondente à concentração  $10^8$  esporos/mL dessa suspensão foi inoculado em frascos Erlenmeyer de 50 mL, contendo 30 mL do meio de cultura. O meio de cultivo utilizado foi o proposto por Dheeman et al. (2011), modificado como segue: 0,5g/L de bacto-peptona, 1,0g/L de extrato de levedura, 0,5g/L de nitrato de sódio ( $\text{NaNO}_3$ ), 0,5g/L de cloreto de potássio (KCl), 0,5g/L de sulfato de magnésio hepta-hidratado ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), 2,0g/L de fosfato monobásico de potássio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) e 5,0g/L de azeite de oliva, pH 5,5. Os meios inoculados foram incubados a 30 °C por 36 dias.

Após a incubação, as culturas foram centrifugadas por 2 minutos a 5000 rpm, sendo o sobrenadante utilizado para caracterização parcial da enzima lipolítica. O filtrado foi armazenado em freezer, congelado a, aproximadamente, -20 °C.

### **3.3.1.3. Fermentação para produção de esterase**

Os fungos foram reativados em ágar batata dextrose (BDA) e incubados a 28°C por 7 dias até completo crescimento. O micélio foi suspenso em, aproximadamente, 5mL de solução esterilizada composta de NaCl 0,9% e Tween 80, pH 7,0. O volume correspondente à concentração  $10^8$  esporos/mL dessa suspensão foi inoculado em frascos Erlenmeyer de 125 mL, contendo 80 mL do meio de cultura (Adaptado de Saito et al, 2022). O meio de produção contendo maltose (1,0%, m/v), óleo de algodão (4,0%, v/v), peptona (2,0%, m/v) e NaCl (0,5%,

m/v) será autoclavado a temperatura de 121 °C por 20 min. Os meios inoculados foram incubados a 30 °C por 36 dias.

Após a incubação, as culturas foram centrifugadas por 2 minutos a 5000rpm, sendo o sobrenadante utilizado para caracterização parcial da enzima lipolítica. O filtrado foi armazenado em freezer, congelado.

#### **3.3.1.4. Fermentação para produção de uréase**

Os fungos foram reativados em meio inclinado contendo ágar batata dextrose (BDA), e incubados a 28°C por 7 dias até completo crescimento. O micélio foi suspenso em, aproximadamente, 5mL de solução esterilizada composta de NaCl 0,9%, pH 7,0. Foi utilizado o meio composto por 1g/L de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,5g/L de NaCl, 2,5g/L de ureia, 20g/L de extrato. Após a concentração ajustada em pH=7,0, a concentração de 10<sup>8</sup> esporos/mL foi inoculada e os meios foram incubados durante 36 dias a 30°C.

Após a incubação, as culturas foram centrifugadas por 2 minutos a 5000rpm, sendo o sobrenadante utilizado para caracterização parcial da enzima urease. O filtrado foi armazenado em freezer, congelado.

Nos tempos analisados foram retiradas amostras para quantificação das atividades enzimáticas, quantificação de biomassa, pH, MEV e FTIR.

### **3.4. Ensaio enzimáticos**

#### **3.4.1. Quantificação de protease por método colorimético**

A quantidade de protease foi determinada usando caseína como substrato conforme proposto por Starcher, (2001). 500 µl de 0,5% (m/v) de caseína em tampão fosfato de 0,2 M de 300 µl (pH 7) e extrato de enzima bruta de 200 µl foram misturados e incubado a temperatura ambiente por 10 minutos. Após a incubação, a reação enzimática foi encerrada pela adição de 1 ml de 5% de ácido tricloacético (TCA). A reação foi, então, misturada e centrifugada para separar a caseína não consumida em 6.000 rpm por 5 minutos. Para 1 ml de sobrenadante, 5 ml de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,4 M e 1 ml de reagente folincioalten diluído de 3 vezes foram adicionados e misturados bem. A solução resultante foi incubada em temperatura ambiente de (28°C), no escuro, por 30 minutos e a absorbância foi medida em 660nm. O branco da reação corresponde ao mesmo meio reacional descrito acima, adicionando o volume de tampão ao invés de amostra.

Uma unidade de atividade protease foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 mol tirosina/ml por minuto.

#### **Ensaio para curva padrão**

Seis tubos de ensaio foram usados para preparar as diluições de tirosina para a configuração da curva. Os valores em mililitros (mL) da solução de estoque padrão de tirosina 1,1mM foram adicionados aos seis tubos de ensaio: 0,05, 0,10, 0,20, 0,40 e 0,50. O volume foi completado para 2mL com solução tampão fosfato de 0,2 M, e então 5mL de carbonato de sódio (0,5 M) e 5mL de reagente folinciocalten (0,5 M) foram adicionados. À 280nm, a absorbância foi medida.

#### **3.4.2. Quantificação de lipase por método colorimétrico**

A atividade da lipase foi medida de acordo com a metodologia descrita por Yang et al. (2002), com modificações. A reação foi realizada adicionando 250  $\mu$ L de uma solução contendo 200 mg de Triton X-100, 50 mg de goma arábica e 0,1 M de tampão fosfato (pH 7,5) a um volume total de 50mL, 250  $\mu$ l de solução enzimática (caldo filtrado e solução nos ensaios precipitados) e 45  $\mu$ l de solução contendo 15 mg de palmitato de p-nitrofenil (pNPP) diluído em 10mL de isopropanol. A reação ocorreu em banho a 40°C por 30 minutos. Após a reação, foram adicionados 0,5mL de solução Trizma base 2% (p/v). A quantificação da atividade foi realizada a partir da formação de p-nitrofenol (pNP) que produz coloração amarela, quantificada por absorbância a 398nm em leitor de placas. O branco da reação corresponde ao mesmo meio reacional descrito acima, adicionando o volume de tampão ao invés de amostra. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima necessária para hidrolisar 1  $\mu$ mol p-nitrofenol pNP por minuto nas condições descritas.

#### **Ensaio para curva padrão**

Seis tubos de ensaio foram usados para preparar as diluições de p-nitrofenol para a configuração da curva. Os valores em microlitros ( $\mu$ L) da solução de estoque padrão de p-nitrofenol 10 $\mu$ g/mL foram adicionados aos seis tubos de ensaio: 0, 200, 400, 600, 800, 1000. O volume foi completado para 1mL com solução tampão fosfato de 0,1 M, e incubado à 45°C por 30minutos. Após a incubação foi adicionado 0,5mL de solução Trizma base 2% m/v. A absorbância foi medida a 398nm.

### 3.4.3. Quantificação de esterase por método colorimétrico

A atividade de esterase foi medida pela incubação de 2,9 ml de tampão Tris (0,1M, pH 8,0) com 60µl de acetato p-nitrofenil (10mM), conforme proposto por Bhardwaj et al. (2021). Foi adicionada na mistura 40µl de enzima e incubada a 35 °C por 10 min. Para interromper a mistura, a reação foi colocada em banho de gelo por 2 minutos. A concentração de p-nitrofenol liberado foi medida em 410nm. O branco da reação corresponde ao mesmo meio reacional descrito acima, adicionando o volume de tampão ao invés de amostra. A concentração p-NP correspondente foi analisada a partir da curva padrão de p-NP. A atividade de esterase foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar um µM de p -NP de p -NPA por minuto sob condições de ensaio padrão.

#### Ensaio para curva padrão

Seis tubos de ensaio foram usados para preparar as diluições de p-nitrofenol para a configuração da curva. Os valores em microlitros (µL) da solução de estoque padrão de p-nitrofenol 10µg/mL foram adicionados aos seis tubos de ensaio: 0, 200, 400, 600, 800, 1000. O volume foi completado para 1mL com solução Tris 0,1 M, pH 8,0 e incubado à 35°C por 10 minutos. Após a incubação os tubos foram submersos à banho de gelo por 2 min. A absorbância foi medida a 410nm.

### 3.4.4. Quantificação de urease por método colorimétrico

Para o ensaio de atividade enzimática de urease, o método Weatherburn (1967) foi adotado com algumas modificações. Em um banho à a 37°C, para 100µL da amostra foram adicionados 500µL da solução tampão fosfato de potássio (C). Depois foram adicionados 1,7mL de (B) e a mistura de reação foi mantida em um banho com agitação a 37 °C por 30 min. A seguir foi adicionada 500µL de solução nitroprusside fenol-sódio para 50µL da mistura de reação, e novamente, foi mantido para 30min a 37 °C. A absorbância foi medida à temperatura ambiente a 625nm.

Reagentes Básicos:

(A) Fenol mais nitroprusside; 5g de fenol com 2 mg de nitroprusside de sódio por 500ml de solução. Armazene em garrafa âmbar na geladeira, por um mês.

(B) Cloridrato alcalino; 2,5g de hidróxido de sódio, 4,2ml de hipoclorito de sódio a 500ml de solução. Guarde em garrafa âmbar na geladeira, possivelmente 1 mês.

(C) Tampão fosfato de potássio e ureia (pH 8,0): Em 100mL de solução de uréia 10% (m/v), adicione 200mL de tampão fosfato de potássio, 50mmol.L<sup>-1</sup> pH 7,5. Para 400mL de água destilada: 4,355g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> e 3,403g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, completando o volume para 1000mL

### **Ensaio para curva padrão**

Para preparar a solução padrão, 3,8207g NH<sub>4</sub>Cl foi dissolvido em 1000ml de água (1000µg.m<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>-N). O teor de NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N do filtrado foi calculado por referência a um gráfico de calibração plotado a partir dos resultados obtidos com padrões diluídos contendo 0, 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0µg.m<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>-N.

### **3.4.5. Determinação do teor de proteína total**

A quantificação das proteínas foi realizada segundo o método de Bradford (1976), utilizando-se a albumina de soro bovino (BSA) como padrão. A curva de calibração foi preparada a partir de concentrações entre 0,1 e 1,0 mg/mL de BSA. A absorbância será medida à temperatura ambiente a 595nm.

Todos os ensaios enzimáticos foram realizados no Laboratório de Microbiologia Agrícola do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras (DBI/UFLA).

## **3.5. Análises físico-químicas**

### **3.5.1. pH**

O pH foi determinado, a cada 5 dias, conforme norma ISO 10390:2005. O pH da parte líquida foi medido com o auxílio do pHmetro Orion Star A214

### **3.5.2. Biomassa microbiana**

Essa análise foi realizada a cada 5 dias durante o processo fermentativo. A determinação da biomassa foi realizada conforme o método descrito APHA, 1998. Em placa Petri sem tampa,

foram adicionadas as biomassas formadas e, em seguida, foi colocada em estufa a 60°C por 24 horas. Posteriormente, as amostras foram resfriadas em dessecador até a temperatura ambiente e pesadas novamente para determinação das biomassas. As análises foram realizadas no Laboratório de Pesquisa Animal do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Lavras (DZO/UFLA).

### **3.5.3. Análise de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

A cada 5 dias foram coletadas amostras dos polímeros PU e PHA para visualização das suas estruturas moleculares no MEV. A fixação de amostras foi em solução Karnovsky (glutaraldeído 2,5% e formaldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,05 M pH 7,5). Após o tempo mínimo de 24 horas da fixação, as amostras foram lavadas em tampão cacodilato de sódio 0,05M pH 7,5 por 3 vezes de 10 minutos (Bozzola & Russell, 1999). Foram desidratadas com soluções de concentração crescente de acetona (24, 50, 75, 90 e três vezes de 100%, 10 minutos cada), seguido de secagem utilizando aparelho de ponto crítico (CPD 030 Bal-Tec), montagem em stubs, metalização com ouro (Sputtering SCD 050 Bal-Tec) e observação em Microscópio eletrônico de varredura FEG Tescan Clara no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural da Universidade Federal de Lavras (LME/UFLA).

### **3.5.4. Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)**

Foram realizadas as análises de espectroscopia vibracional no infravermelho, empregando um espectrômetro FT-IR Varian 600-IR com transformada de Fourier (FTIR), com acessório GladiATR da Pike Technologies acoplado para medidas por reflectância total atenuada (ATR) a 45° com cristal de seleneto de zinco. A faixa espectral analisada foi de 400 a 4.000  $\text{cm}^{-1}$ , resolução de  $4\text{cm}^{-1}$  e 32 varreduras (Silvestrin et al., 2019). As análises foram realizadas no Laboratório Central de Análise e Prospecção Química do Departamento de Química da Universidade Federal de Lavras (CAPQ/UFLA).

## **3.6. Delineamento experimental e análises estatísticas**

Para determinação das melhores condições de produção de enzimas pelos microrganismos *Fusarium verticillioides* (CCDCA 11547) *Aspergillus oryzae* (CCDCA 10203)

foi empregado um Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC), com esquema fatorial 2 x 4 x 3 x 5 para as enzimas protease e esterase, e 2 x 3 x 3 x 5 para as enzimas lipase e urease.

Os dados estatísticos foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA), e as médias dos tratamentos foram comparadas entre si pelo teste skott knott ao nível de 5% de probabilidade. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software SAS University Edition (2016).



## 4. RESULTADOS

### 4.1. *Fusarium verticillioides*

#### 4.1.1. Desempenho e produção enzimática

Durante os diferentes tratamentos realizados (tabela 2), o fungo filamentosso *Fusarium verticillioides* apresentou potencial para produzir as enzimas protease, esterase, lipase e urease, conforme as figuras 7a, 7b, 7c e 7d.

Tabela 2 – Tratamentos realizados para a produção das enzimas protease, esterase, lipase e uréase.

Fermentação para produção enzimática	Tratamentos			Meio de cultura
	PHA + F. verticillioides	PU + F. verticillioides	F. verticillioides	
protease	X	X	X	X
esterase	X	X	X	X
lipase	X		X	X
urease		X	X	X

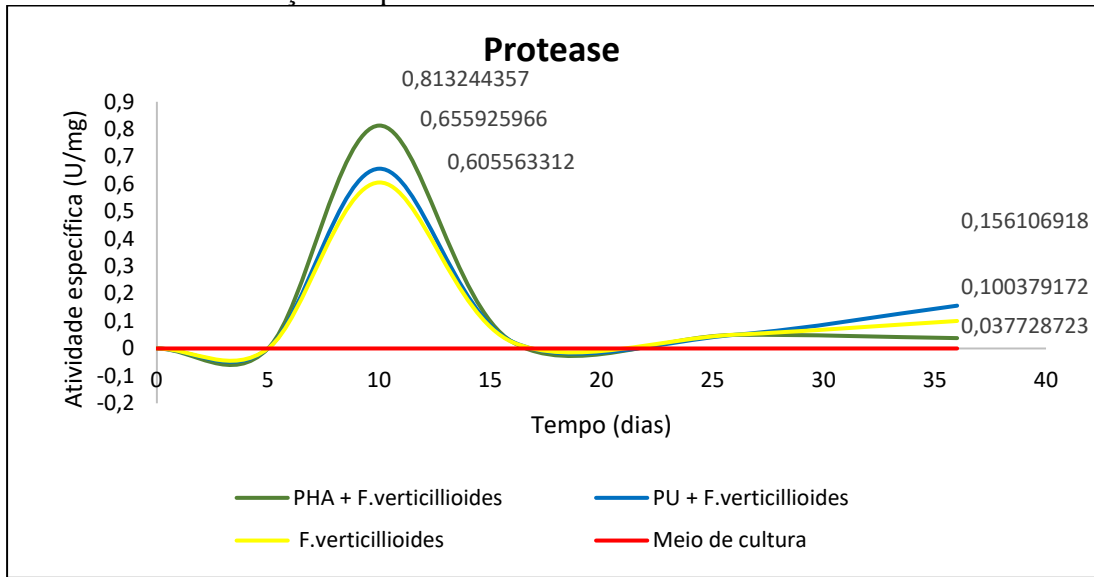
Fonte: Do autor.

As fermentações para a indução do *F. verticillioides* para produzir as enzimas ocorreram no durante 36 dias. Durante esse período, as atividades específicas variaram indicando o tempo ideal para a produção de cada enzima.

Durante a fermentação de indução a produção de protease, o *F. verticillioides* apresentou maior atividade da enzima no tratamento que continha o polímero polihidroxialcanoato (PHA), seguindo pelo tratamento com poliuretano (PU).

A atividade específica para o tratamento com PHA foi de 0,8132 U/mg e com PU foi de 0,6559 U/mg, enquanto que o tratamento contendo apenas o microrganismo foi de 0,6056 U/mg (figura 7a). Nos três tratamentos realizados para a produção de protease o período de maior atividade dessa enzima foi entre o 5º e o 15º dia, destacando entre eles o 10º dia.

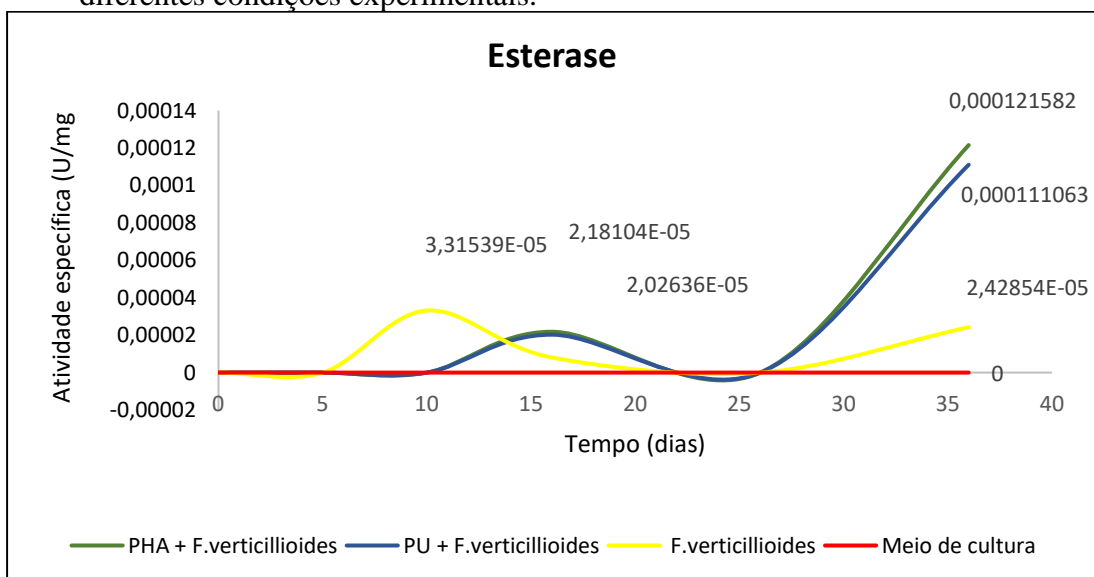
Figura 7a – Atividade específica (U/mg) de protease produzida por *Fusarium verticillioides* em diferentes condições experimentais.



Fonte: Do autor.

Sob as mesmas condições que os outros tratamentos, no meio de cultivo específico para a produção de esterase, foi quantificada em  $1,22 \times 10^{-4}$  U/mg para o tratamento que continha o polímero polihidroxialcanoato (PHA) e  $1,11 \times 10^{-4}$  U/mg no tratamento com poliuretano (PU) no mesmo período de 36 dias. Enquanto nesse mesmo período de 35 dias, no meio de cultivo sem polímeros o *F.verticillioides* foi capaz de produzir  $2,43 \times 10^{-5}$  U/mg (figura 7b).

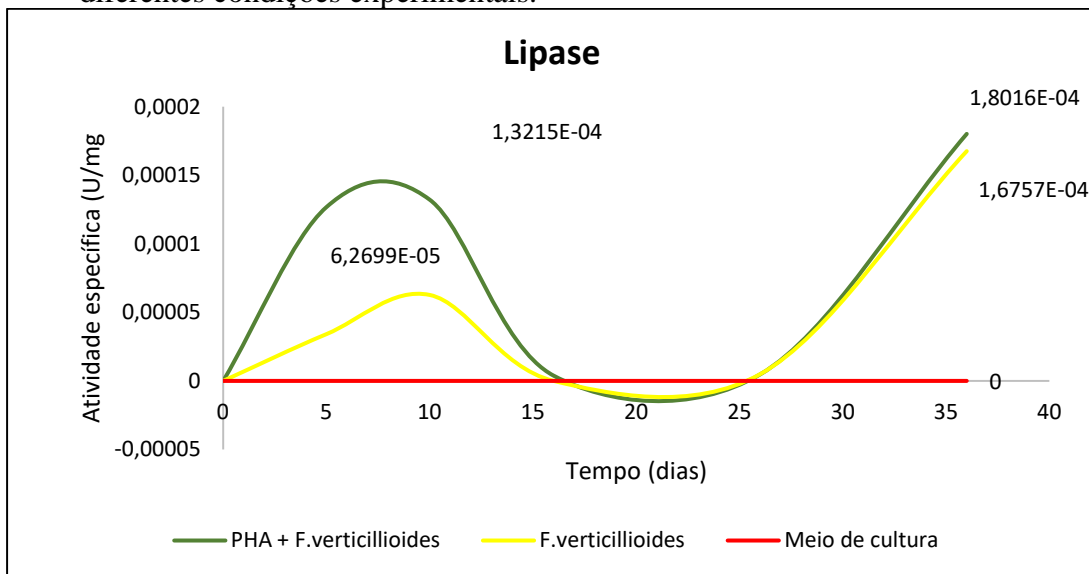
Figura 7b – Atividade específica (U/mg) de esterase produzida por *Fusarium verticillioides* em diferentes condições experimentais.



Fonte: Do autor.

O gráfico para a atividade de lipase apresentou um pico de atividade específica no período de 10 dias para os tratamentos contendo o polihidroxialcanoatos (PHA) e para o tratamento contendo apenas o microrganismo. Porém, a maior produção de lipase pelos dois tratamentos foi após o 33º dia, com  $1,8 \times 10^{-4}$  U/mg e  $1,67 \times 10^{-4}$  U/mg, respectivamente (figura 7c).

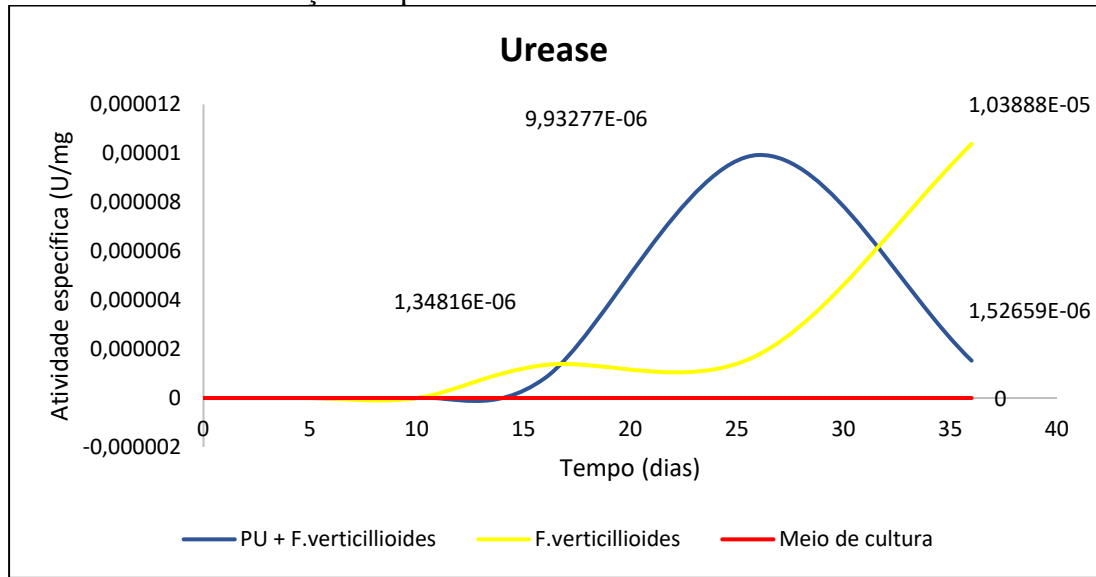
Figura 7c – Atividade específica (U/mg) de lipase produzida por *Fusarium verticillioides* em diferentes condições experimentais.



Fonte: Do autor.

Por fim, analisando o perfil do gráfico para urease, esse apresentou um perfil diferente dos demais, onde a maior atividade específica de urease ( $9,9328 \times 10^{-6}$  U/mg) ocorreu no 25º dia de fermentação do tratamento com PU. Enquanto que o no tratamento contendo apenas o fungo, no 25º dia a atividade específica começou a aumentar e no 35º foi quantificada  $1,039 \times 10^{-5}$  U/mg de uréase (figura 7d).

Figura 7d – Atividade específica (U/mg) de urease produzida por *Fusarium verticillioides* em diferentes condições experimentais.



Fonte: Do autor.

#### 4.1.2. Produção de biomassa e pH do cultivo

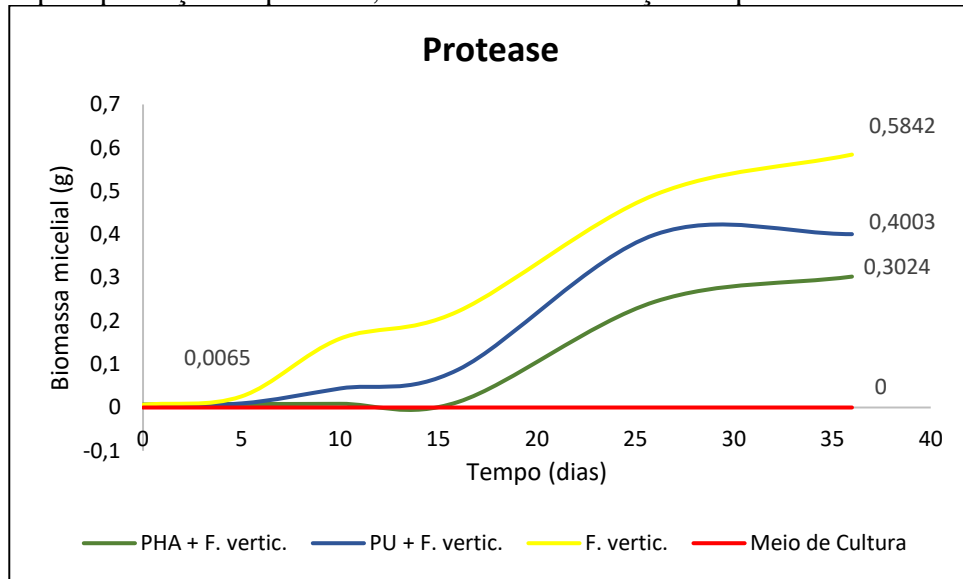
O *Fusarium verticillioides* apresentou aumento de biomassa em todos os tratamentos. A massa média micelial adicionada inicialmente nos tratamentos foi de 0,00695g e o aumento variou de acordo com cada fermentação (figuras 8a, 8b, 8c e 8d).

As figuras 9a, 9b, 9c e 9d representam o comportamento da curva de pH ao longo do período de incubação. Com isso, é possível relacionar a variação de pH com a biomassa obtida em cada tratamento.

Ao longo do tratamento para produção da enzima protease contendo apenas o fungo, o aumento da biomassa micelial após os 35 dias de incubação foi de 0,57725g, e os dois tratamentos contendo os polímeros poliuretano e polihidroxialcanoato tiveram, respectivamente, um aumento de 0,3933 e 0,2954g (figura 8a).

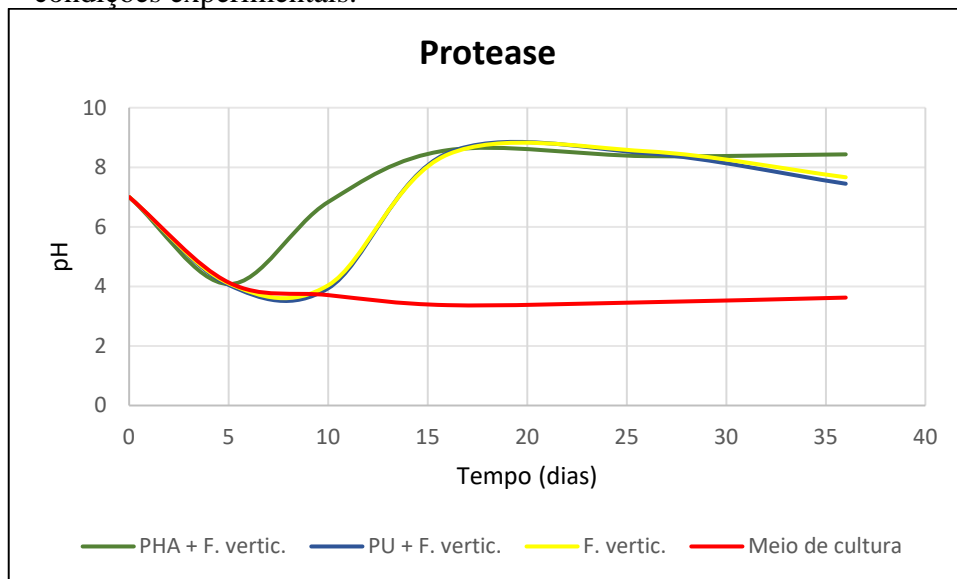
Esse aumento da biomassa iniciou entre o 10º e 15º dias de incubação para os tratamentos com poliuretano e polihidroxialcanoatos (figura 8a). E nesse mesmo período os valores de pH dos dois tratamentos aumentaram para 8,0, após uma redução brusca nos 10 primeiros dias (figura 9a). O aumento do pH pode ter interferido positivamente na produção da enzima, uma vez que no 10º dia foi quantificada a maior taxa de atividade dessa enzima (figura 7a).

Figura 8a – Variação da biomassa micelial de *Fusarium verticillioides*, durante a fermentação para produção de protease, em diferentes condições experimentais.



Fonte: Do autor.

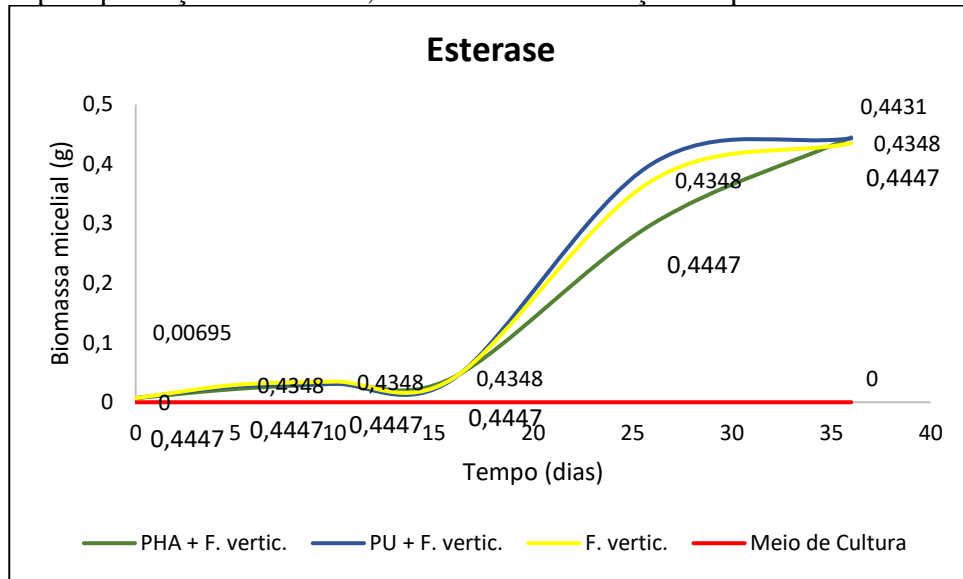
Figura 9a – Variação de pH, durante a fermentação para a produção de protease, em diferentes condições experimentais.



Fonte: Do autor.

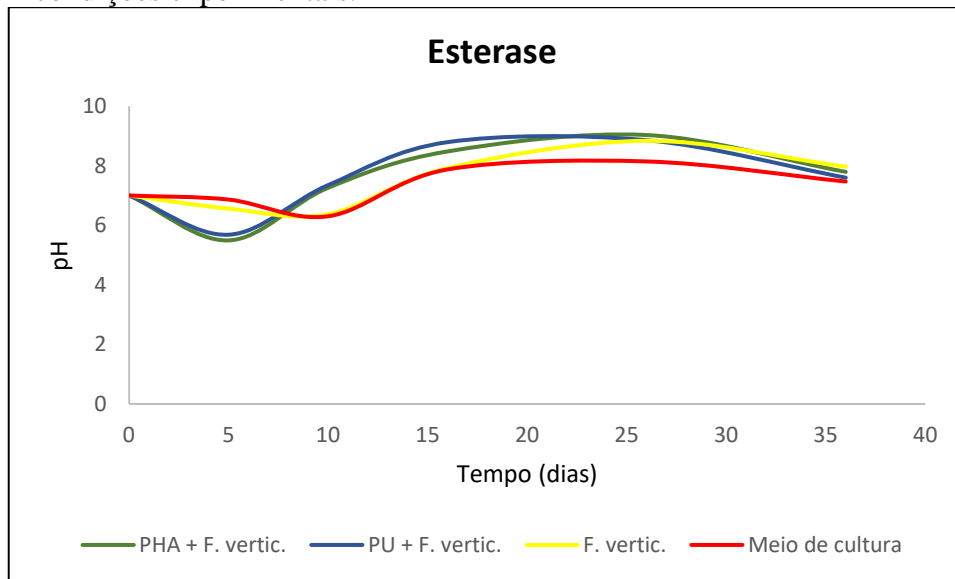
O cultivo de *F. verticillioides* para produção de esterase foi favorável para o crescimento micelial nos três tratamentos: com PU, com PHA e apenas com o fungo, a partir do 15º dia. Os valores para as biomassas no final de cada cultivo foram de 0,436g, 0,428g e 0,438g, respectivamente (figura 8b). Já a variação de pH sofreu uma pequena variação ao longo da fermentação (figura 9b).

Figura 8b – Variação da biomassa micelial de *Fusarium verticillioides*, durante a fermentação para produção de esterase, em diferentes condições experimentais.



Fonte: Do autor.

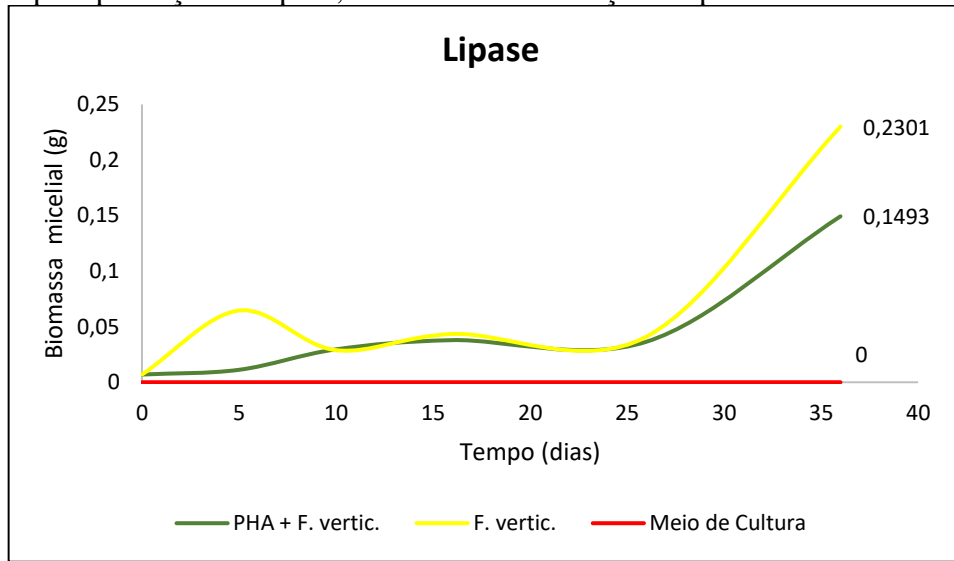
Figura 9b – Variação de pH, durante a fermentação para a produção de esterase, em diferentes condições experimentais.



Fonte: Do autor.

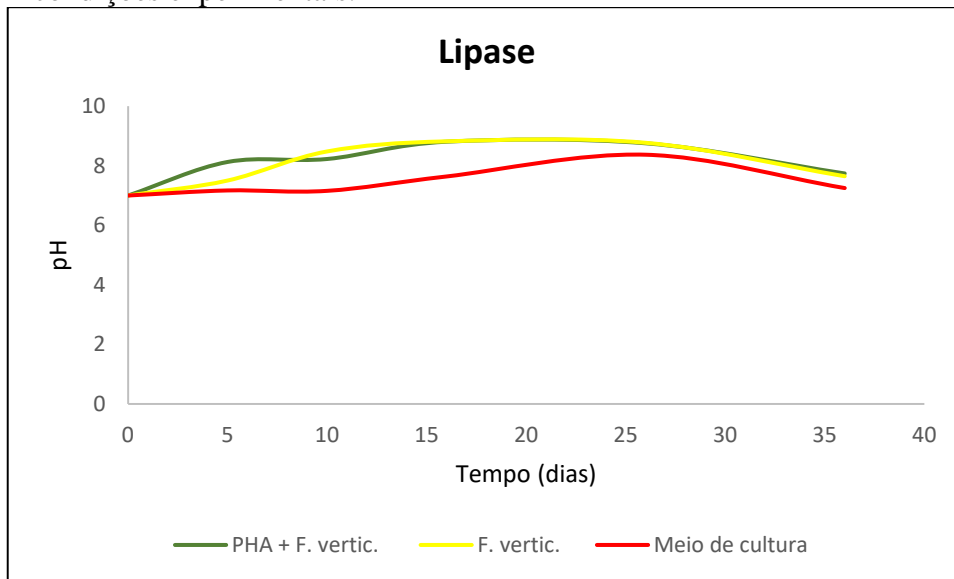
Nos processos fermentativos para a produção de lipase, desde o início da incubação, as biomassas dos tratamentos com PHA e apenas com o fungo apresentaram um aumento, porém a partir do 15º dia as biomassas foram aumentando diariamente (figura 8c), enquanto o pH não teve grandes variações (figura 9c). A variação de biomassa de cada tratamento foi de 0,2231g para o tratamento com o poliuretano e de 0,1424g para o tratamento que contém apenas o microrganismo.

Figura 8c – Variação da biomassa micelial de *Fusarium verticillioides*, durante a fermentação para produção de lipase, em diferentes condições experimentais.



Fonte: Do autor.

Figura 9c – Variação de pH, durante a fermentação para a produção de lipase, em diferentes condições experimentais.

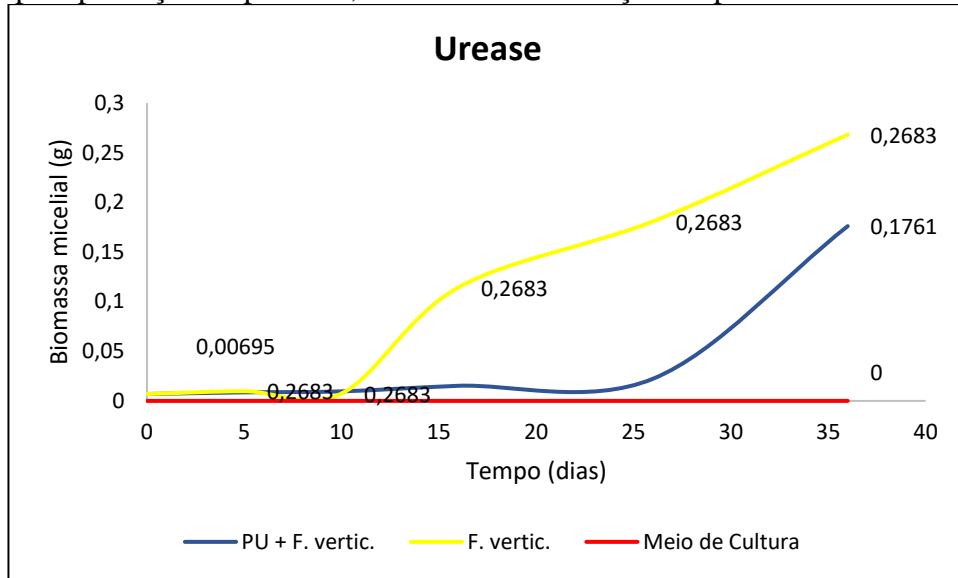


Fonte: Do autor.

Já no tratamento para induzir o *F. verticillioides* a produzir a enzima urease sem a adição de polímero, a biomassa micelial começou a aumentar a partir do 10º dia de cultivo, atingindo no 35º dia de cultivo uma biomassa de 0,2683g. No tratamento contendo o poliuretano, o aumento da biomassa micelial iniciou mais tardiamente, no 25º de incubação, chegando no último dia de fermentação com 0,1761g.

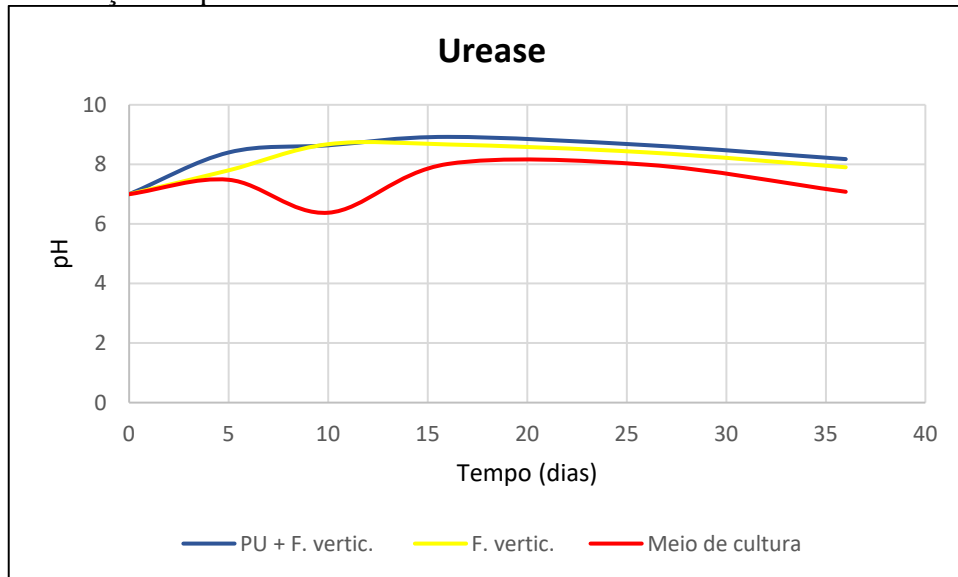
Por outro lado, os tratamentos não sofreram grandes variações durante o período de incubação.

Figura 8d – Variação da biomassa micelial de *Fusarium verticillioides*, durante a fermentação para produção de protease, em diferentes condições experimentais.



Fonte: Do autor.

Figura 9d – Variação de pH, durante a fermentação para a produção de urease, em diferentes condições experimentais.



Fonte: Do autor.

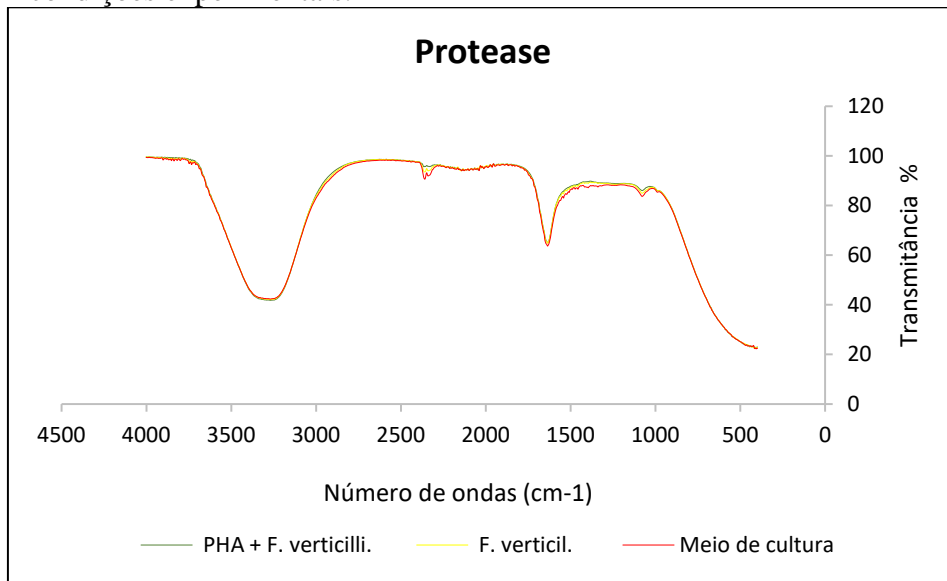
Observando os gráficos referente às biomassas produzidas em cada processo fermentativo, foi possível observar que a adição de polímeros, em geral, interferiu no crescimento micelial ao longo dos dias de incubação.



### 4.1.3. FTIR e MEV

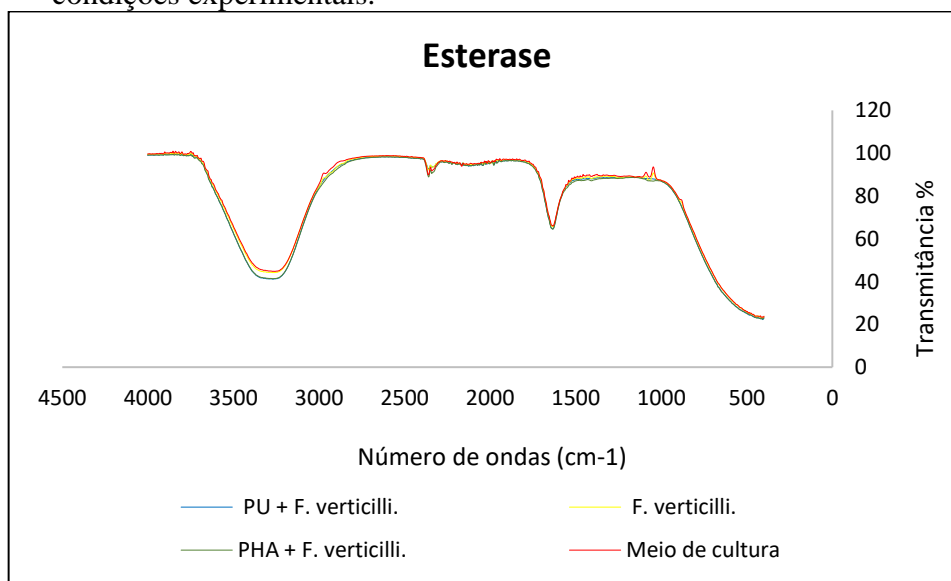
Os espectros de FTIR, das figuras 10a, 10b, 10c e 10d apresentaram regiões com intensidades muito semelhantes. Esse perfil dos espectros não apresenta dados suficientes para a identificação de possíveis compostos orgânicos formados após a fermentação.

Figura 10a – Espectro de FTIR do meio de cultura para a produção de protease em diferentes condições experimentais.



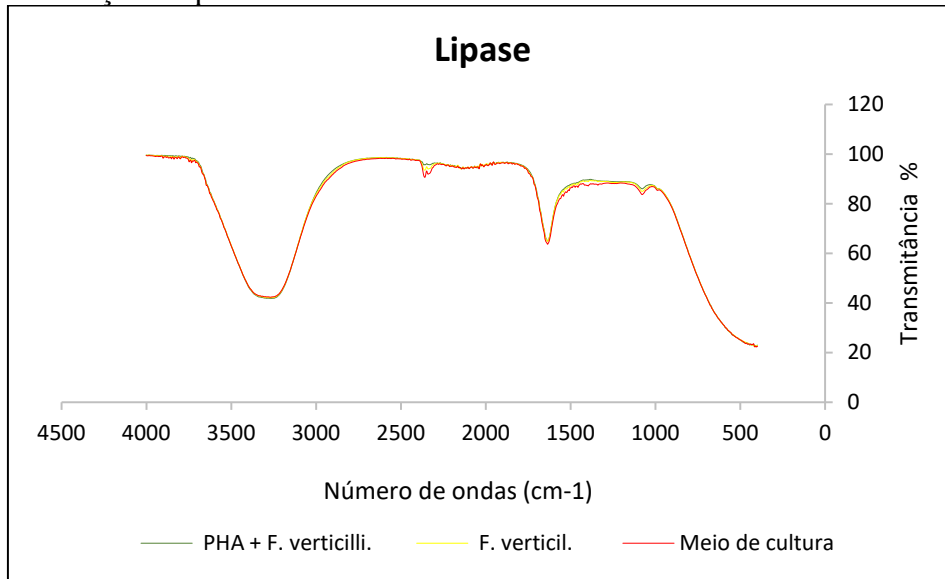
Fonte: Do autor.

Figura 10b – Espectro de FTIR do meio de cultura para a produção de esterase em diferentes condições experimentais.



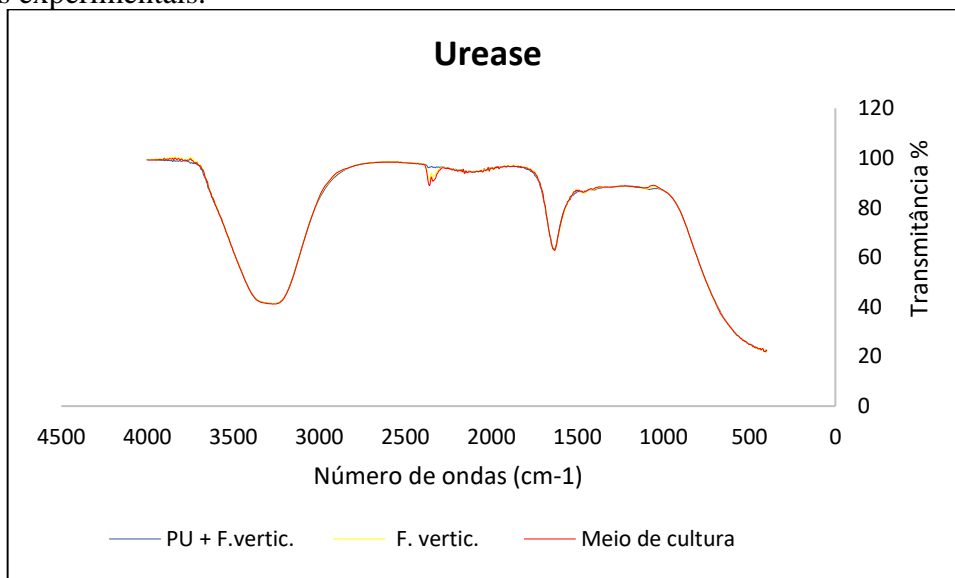
Fonte: Do autor.

Figura 10c – Espectro de FTIR do meio de cultura para a produção de lipase em diferentes condições experimentais.



Fonte: Do autor.

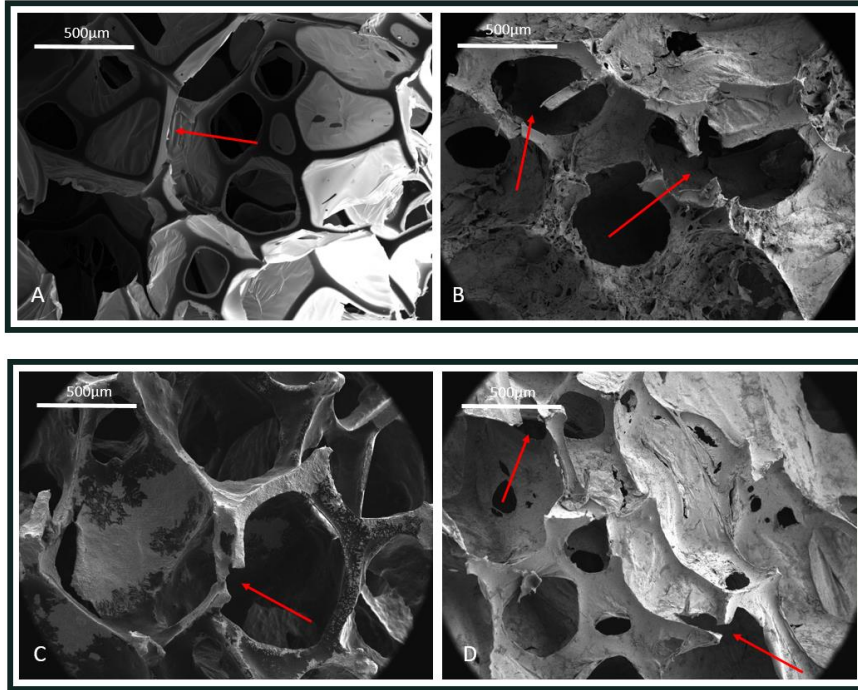
Figura 10d – Espectro de FTIR do meio de cultura para a produção de urease em diferentes condições experimentais.



Fonte: Do autor.

Por outro lado, as imagens obtidas pelo microscópio eletrônico de varredura (MEV) apresentaram possíveis danos nas estruturas dos compostos poliméricos poliuretanos (figuras 11b, 11c e 11d) e polihidroxialcanoatos (figuras 12b, 12c e 12d).

Figura 11a – Polímero poliuretano (PU); 11b: Polímero poliuretano após a fermentação para a produção de protease; 11c: Polímero poliuretano após a fermentação para a produção de esterase; 11d: Polímero poliuretano após a fermentação para a produção de uréase.

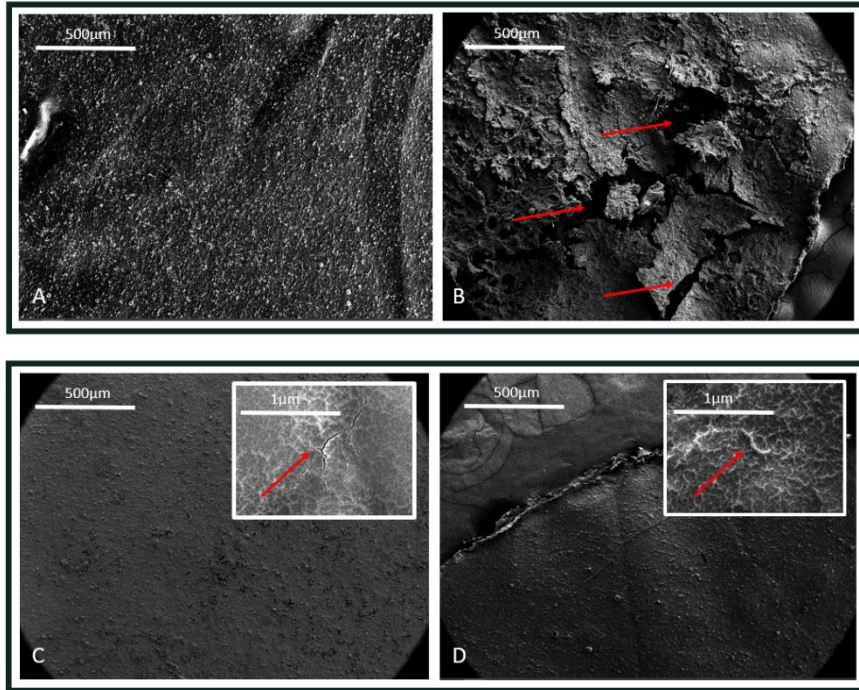


Fonte: Do autor.

Na figura 11 é possível observar a diferença entre a estrutura da figura 11a e as rupturas presentes nas estruturas do PU sinalizadas pelas setas (figura 11b, 11c e 11d).

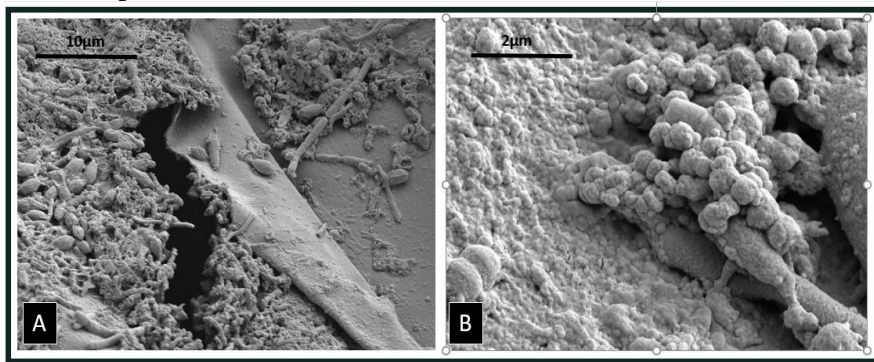
Na figura 12, as fissuras causadas nas estruturas do PHA (figura 12b, 12c e 12d) são nítidas, enquanto na figura 12a a estrutura do polímero aparece em perfeitas condições.

Figura 12b – Polímero polihidroxicanoato (PHA); 12b: Polímero polihidroxicanoato após a fermentação para a produção de protease; 12c: Polímero polihidroxicanoato após a fermentação para a produção de esterase; 12d: Polímero polihidroxicanoato após a fermentação para a produção de urease.



Fonte: Do autor.

Figura 13a – Fungo filamentososo *Fusarium verticillioides* na superfície de poliuretano no final da fermentação para produção de uréase; 13b: Fungo filamentososo *Fusarium verticillioides* na superfície de poliuretano no final da fermentação para produção de protease.



Fonte: Do autor.

Apesar dos resultados obtidos pelo espectro de FTIR não terem sido suficientes para determinar a presença de compostos orgânicos originados a partir da decomposição dos polímeros, as imagens obtidas pelo MEV revelaram como o *Fusarium verticillioides* é capaz de aderir a superfície dos polímeros (figura 13) e atuarem no processo de decomposição desses materiais.

## 4.2. *Aspergillus oryzae*

### 4.2.1. Desempenho e produção enzimática

Durante os diferentes tratamentos realizados (tabela 3), o fungo filamentososo *Aspergillus oryzae* apresentou potencial para produzir as enzimas protease, esterase, lipase e urease, conforme as figuras 14a, 14b, 14c e 14d.

Tabela 3: Tratamentos realizados para a produção das enzimas protease, esterase, lipase e urease.

Fermentação para produção enzimática	Tratamentos			Meio de cultura
	PHA + A. oryzae	PU + A. oryzae	A. oryzae	
protease	X	X	X	X
esterase	X	X	X	X
lipase	X		X	X
urease		X	X	X

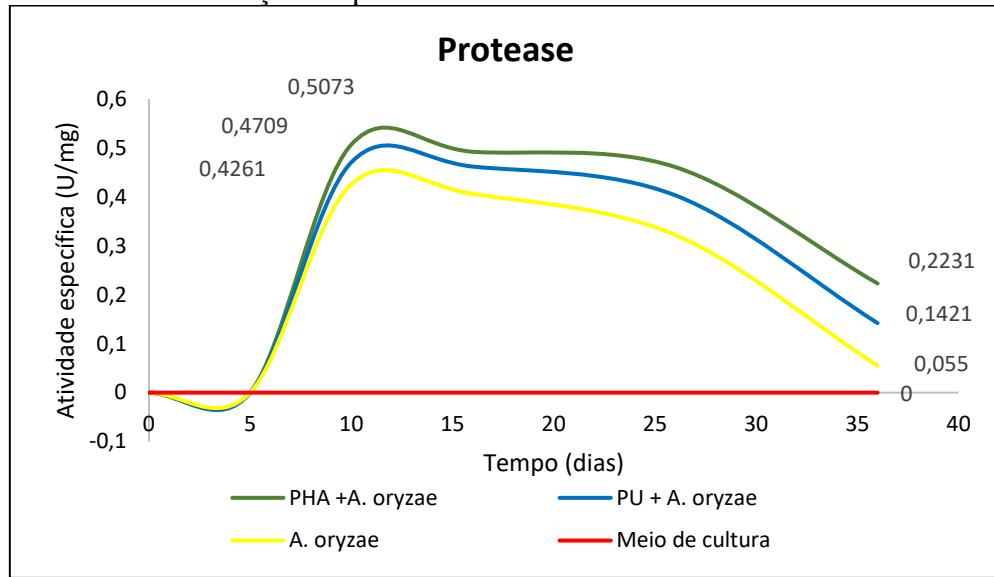
Fonte: Do autor.

As fermentações para a indução do *A. oryzae* para produzir as enzimas ocorreram durante 36 dias. Durante esse período, as atividades específicas variaram indicando o tempo ideal para a produção de cada enzima.

Durante a fermentação de indução a produção de protease, o *A. oryzae* apresentou maior atividade da enzima no tratamento que continha o polímero polihidroxialcanoato (PHA), seguindo pelo tratamento com poliuretano (PU).

A atividade específica para o tratamento com PHA foi de 0,2231U/mg e com PU foi de 0,1421U/mg, enquanto que o tratamento contendo apenas o microrganismo foi de 0,055U/mg (figura 14a). Nos três tratamentos realizados para a produção de protease o período de maior atividade dessa enzima foi entre o 5º e o 15º dia, destacando entre eles o 10º dia.

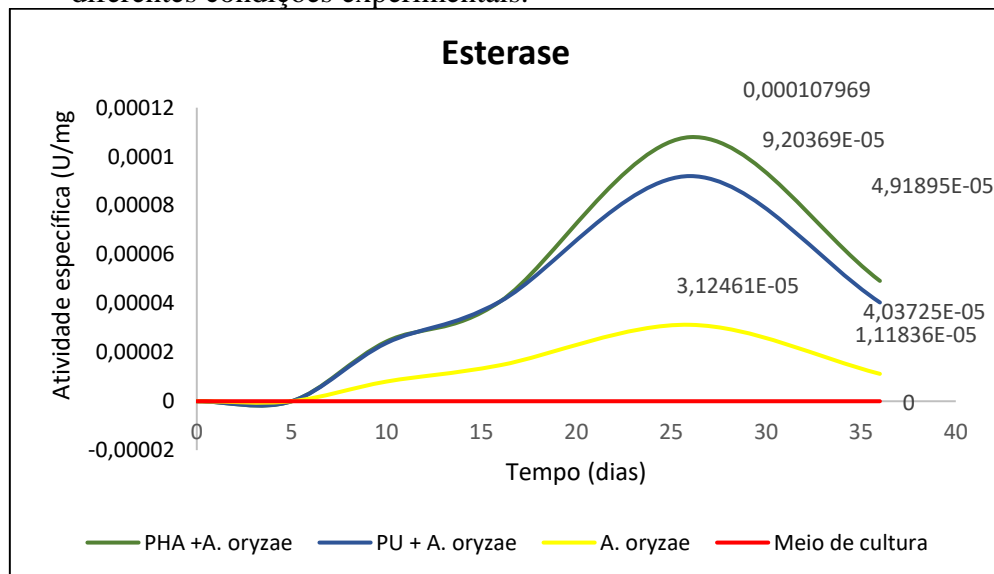
Figura 14a: Atividade específica (U/mg) de protease produzida por *Aspergillus oryzae* em diferentes condições experimentais.



Fonte: Do autor.

Sob as mesmas condições que os outros tratamentos, no meio de cultivo específico para a produção de esterase, foi quantificada em  $4,919 \times 10^{-5}$  U/mg para o tratamento que continha o polímero polihidroxialcanoato (PHA) e  $4,037 \times 10^{-5}$  U/mg no tratamento com poliuretano (PU) no mesmo período de 36 dias. Enquanto nesse mesmo período de 35 dias, no meio de cultivo sem polímeros o *F.verticillioides* foi capaz de produzir  $1,118 \times 10^{-5}$  U/mg (figura 14b).

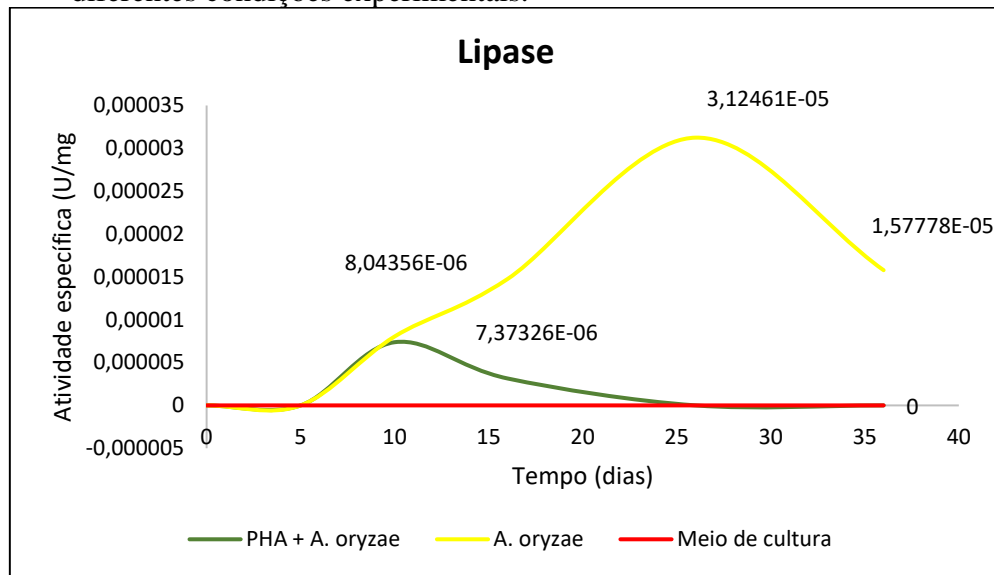
Figura 14b – Atividade específica (U/mg) de esterase produzida por *Aspergillus oryzae* em diferentes condições experimentais.



Fonte: Do autor.

O gráfico para a atividade de lipase apresentou um pico de atividade específica no período de 10 dias para os tratamentos contendo o polihidroxialcanoatos (PHA) com  $8,044 \times 10^6$  U/mg. Porém, a maior produção de lipase ocorreu após o 25º dia durante o tratamento apenas com o microrganismo, com  $3,125 \times 10^5$  U/mg (figura 14c).

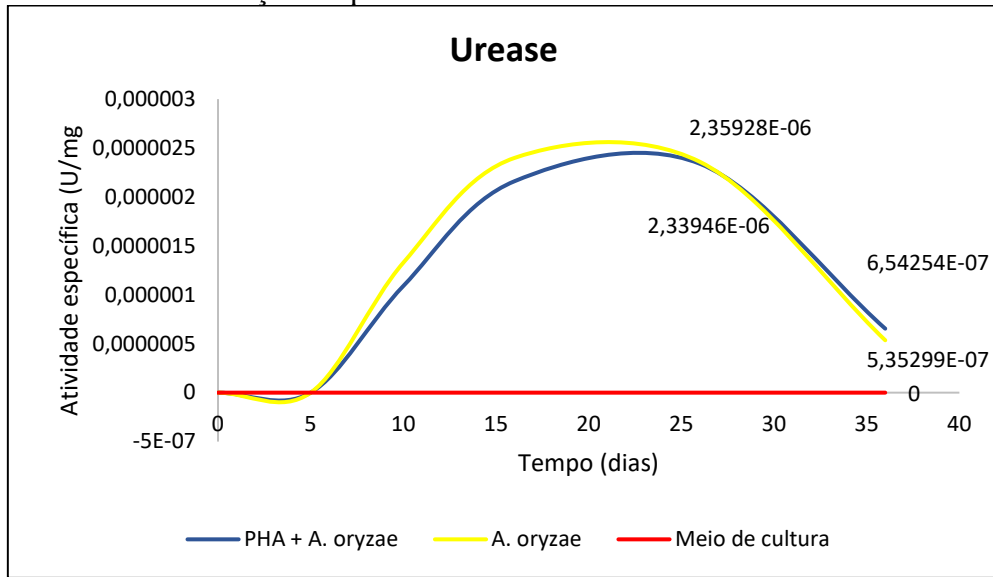
Figura 14c – Atividade específica (U/mg) de lipase produzida por *Aspergillus oryzae* em diferentes condições experimentais.



Fonte: Do autor.

Por fim, analisando o perfil do gráfico para urease, esse apresentou um perfil onde a maior atividade específica de urease ocorreu no 25º dia de fermentação do tratamento com PU e para o tratamento contendo apenas o fungo *A. oryzae*. As quantificações para o tratamento com PU e para o tratamento contendo apenas o fungo foram de  $2,3395 \times 10^{-6}$  U/mg e  $2,3593 \times 10^{-6}$  U/mg de urease, respectivamente (figura 14d).

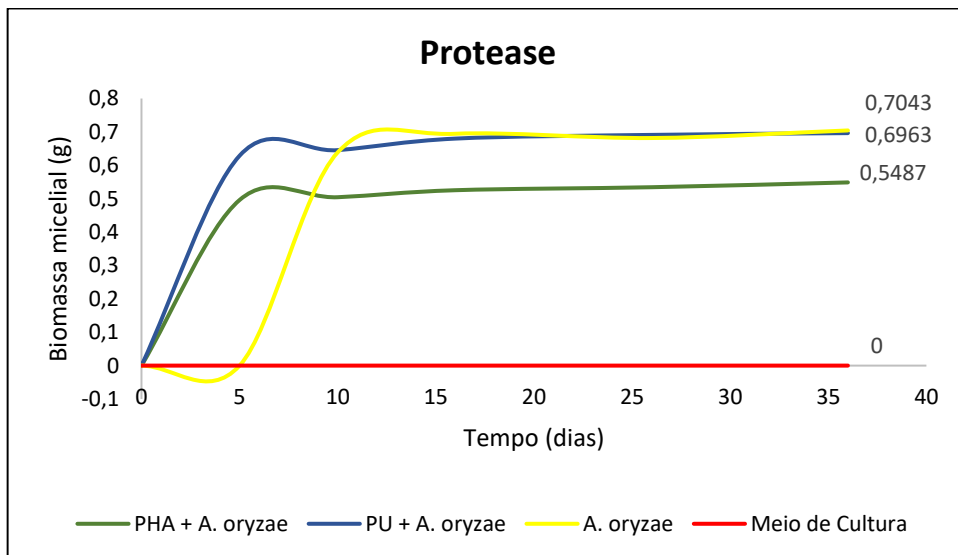
Figura 14d: Atividade específica (U/mg) de urease produzida por *Aspergillus oryzae* em diferentes condições experimentais.



Fonte: Do autor.

#### 4.2.2. Produção de biomassa e pH do cultivo

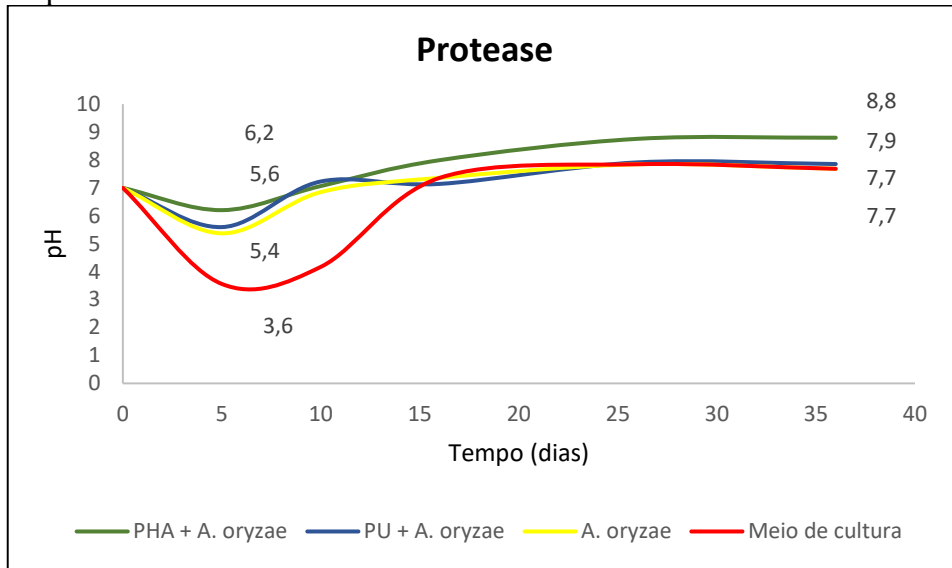
Figura 15a – Variação da biomassa micelial de *Aspergillus oryzae*, durante a fermentação para produção de protease, em diferentes condições experimentais.



Fonte: Do autor.

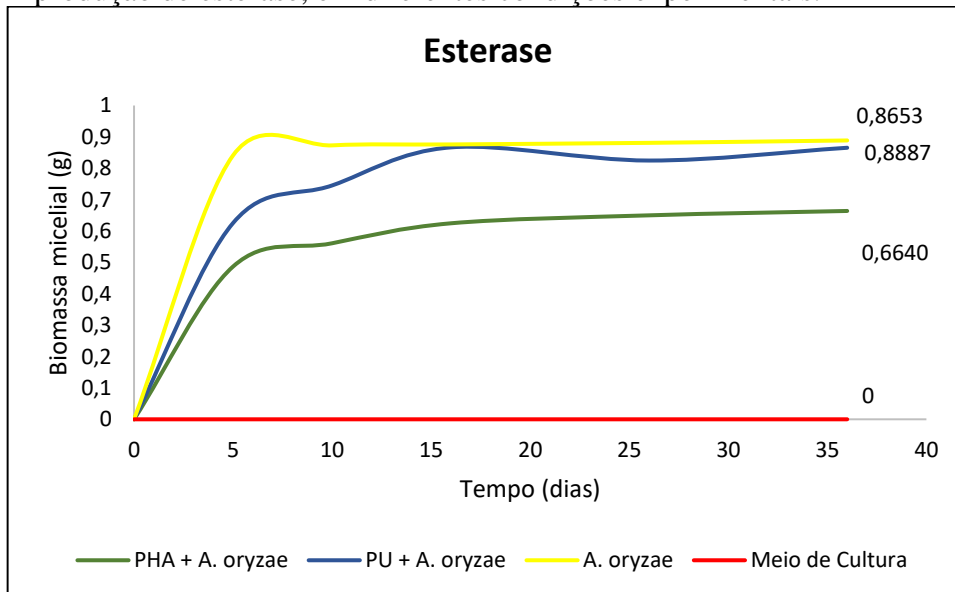


Figura 16a – Variação de pH, durante a fermentação para a produção de protease, em diferentes condições experimentais.



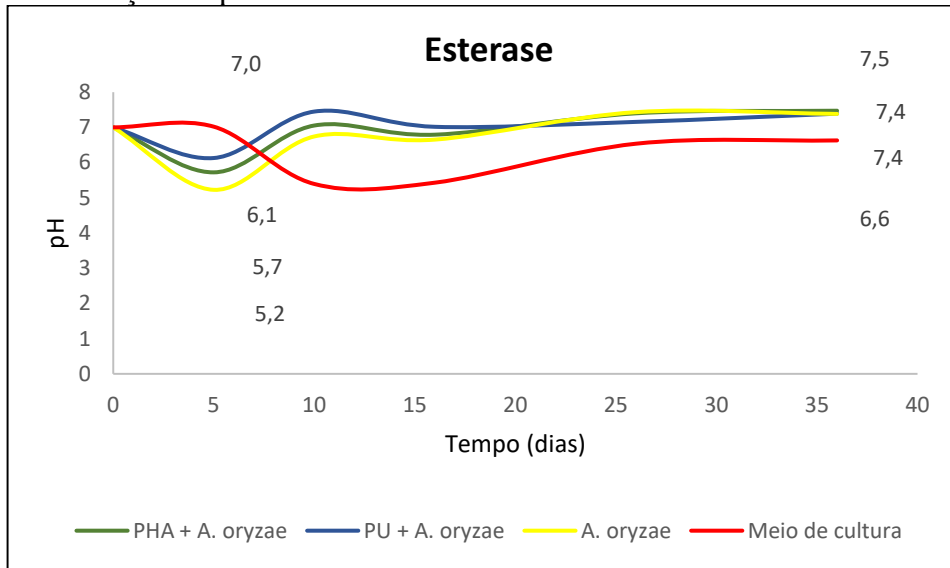
Fonte: Do autor.

Figura 15b: Variação da biomassa micelial de *Aspergillus oryzae*, durante a fermentação para produção de esterase, em diferentes condições experimentais.



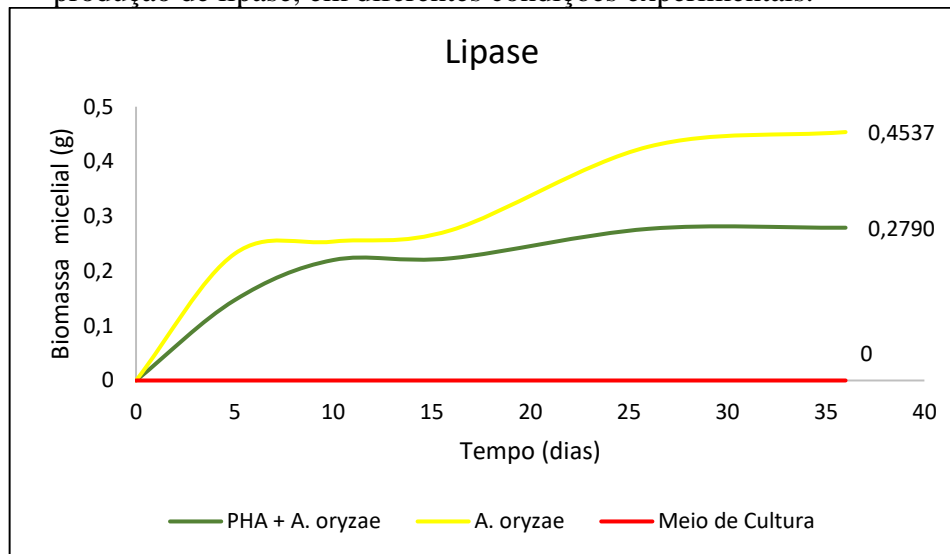
Fonte: Do autor.

Figura 16b – Variação de pH, durante a fermentação para a produção de esterase, em diferentes condições experimentais.



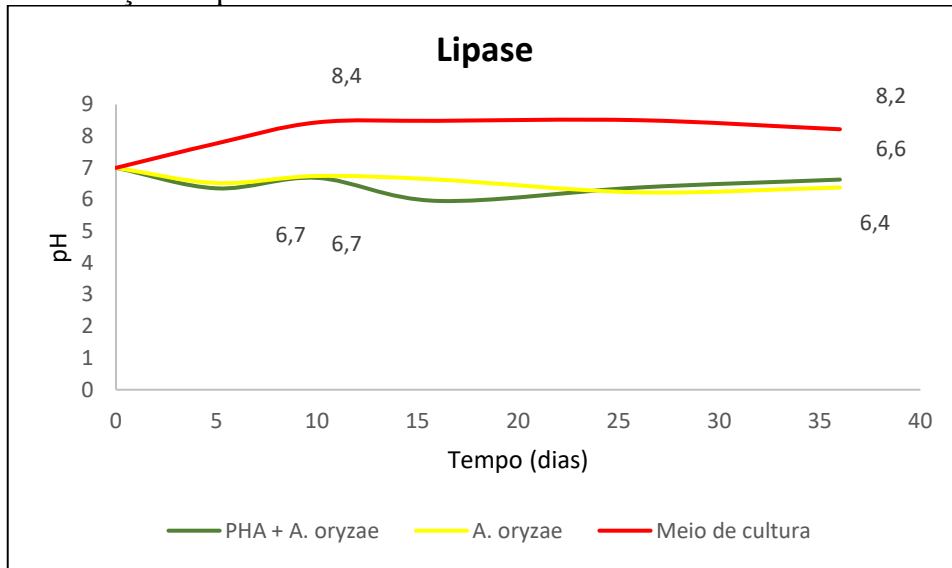
Fonte: Do autor.

Figura 15c – Variação da biomassa micelial de *Aspergillus oryzae*, durante a fermentação para produção de lipase, em diferentes condições experimentais.



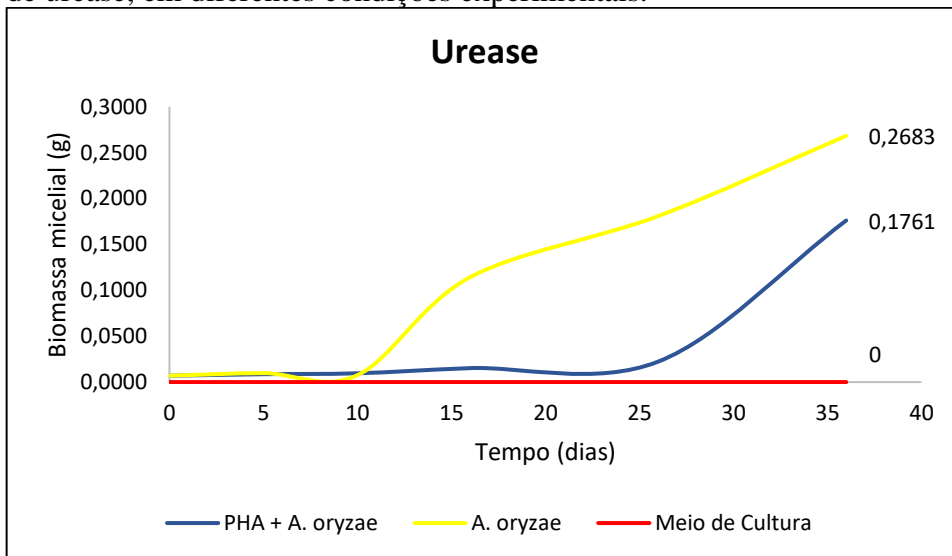
Fonte: Do autor.

Figura 16c – Variação de pH, durante a fermentação para a produção de lipase, em diferentes condições experimentais.



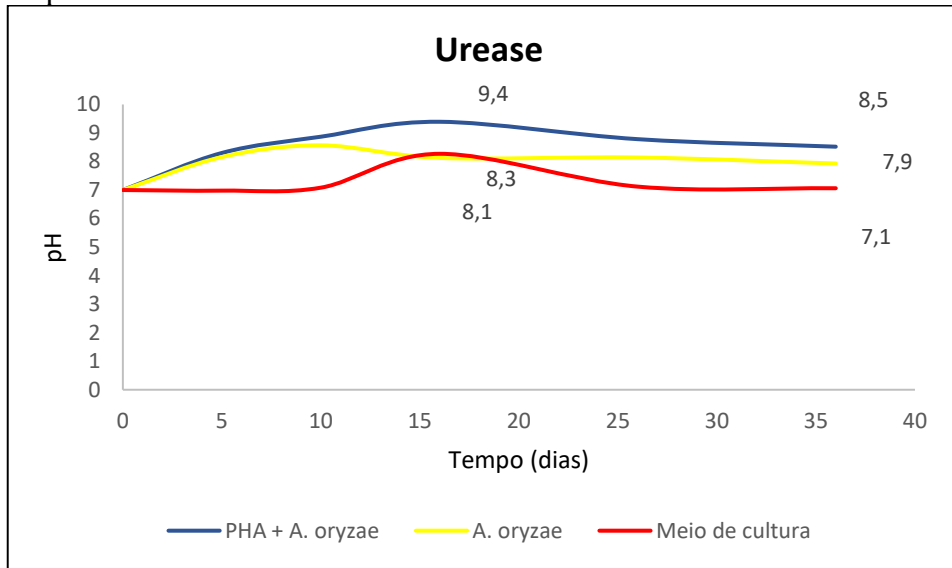
Fonte: Do autor.

Figura 15d – Variação da biomassa micelial de *Aspergillus oryzae*, durante a fermentação para produção de urease, em diferentes condições experimentais.



Fonte: Do autor.

Figura 16d – Variação de pH, durante a fermentação para a produção de urease, em diferentes condições experimentais.

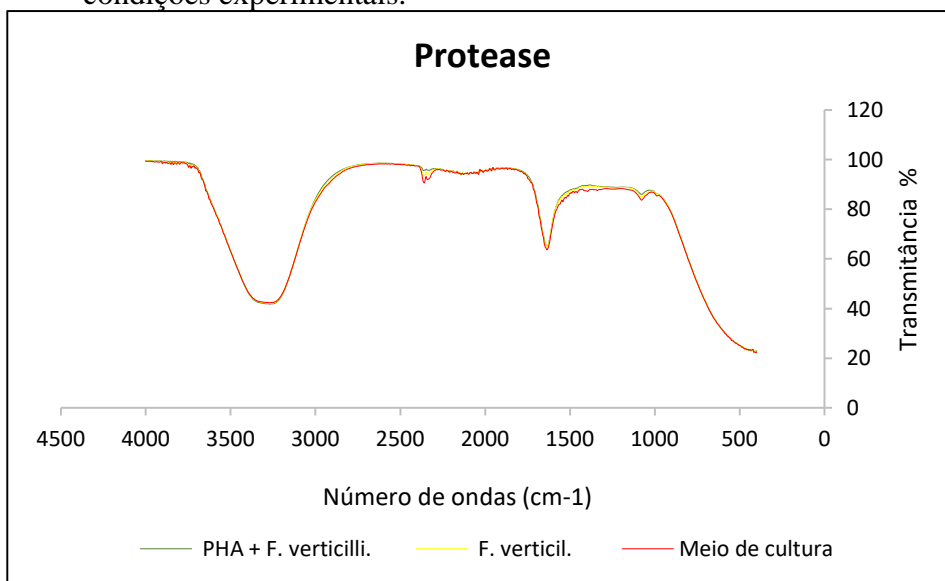


Fonte: Do autor.

#### 4.2.3. FTIR e MEV

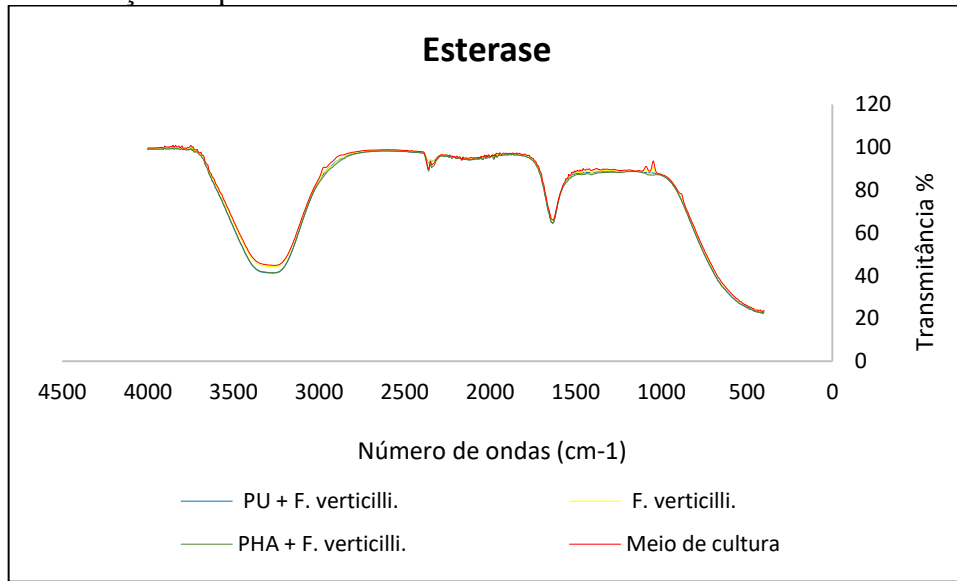
Os espectros de FTIR, das figuras 17a, 17b, 17c e 17d apresentaram regiões com intensidades muito semelhantes. Esse perfil dos espectros não apresenta dados suficientes para a identificação de possíveis compostos orgânicos formados após a fermentação.

Figura 17a – Espectro de FTIR do meio de cultura para a produção de protease em diferentes condições experimentais.



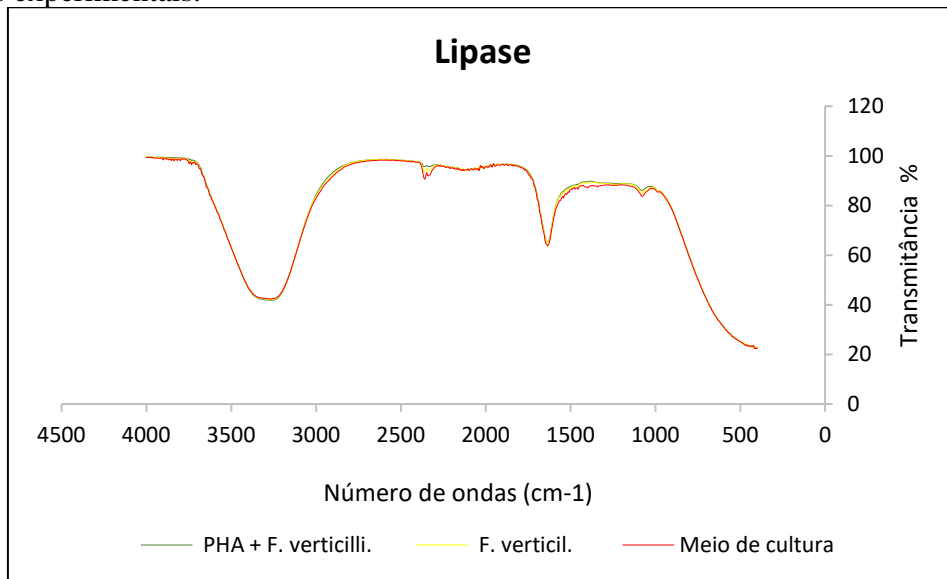
Fonte: Do autor.

Figura 17b – Espectro de FTIR do meio de cultura para a produção de esterase em diferentes condições experimentais.



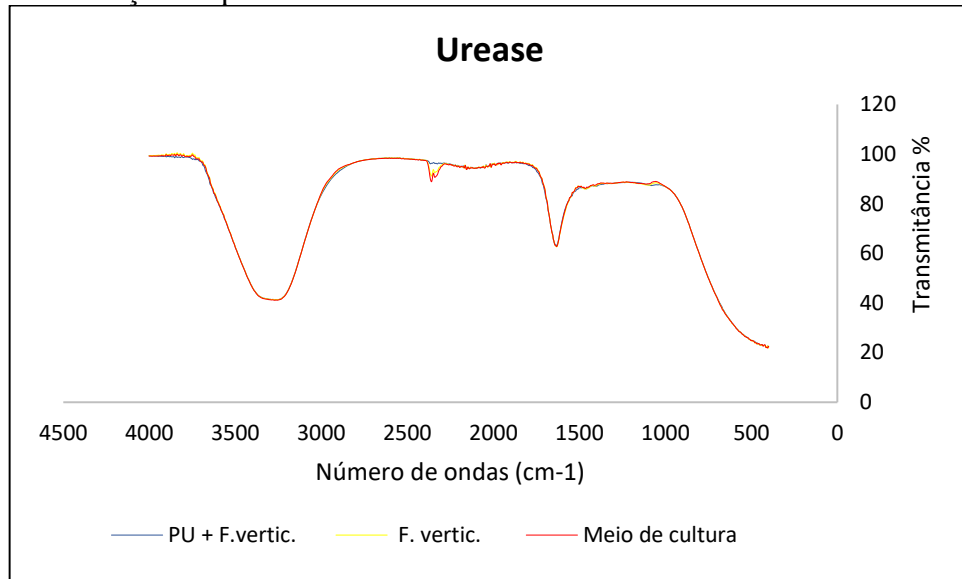
Fonte: Do autor.

Figura 17c – Espectro de FTIR do meio de cultura para a produção de lipase em diferentes condições experimentais.



Fonte: Do autor.

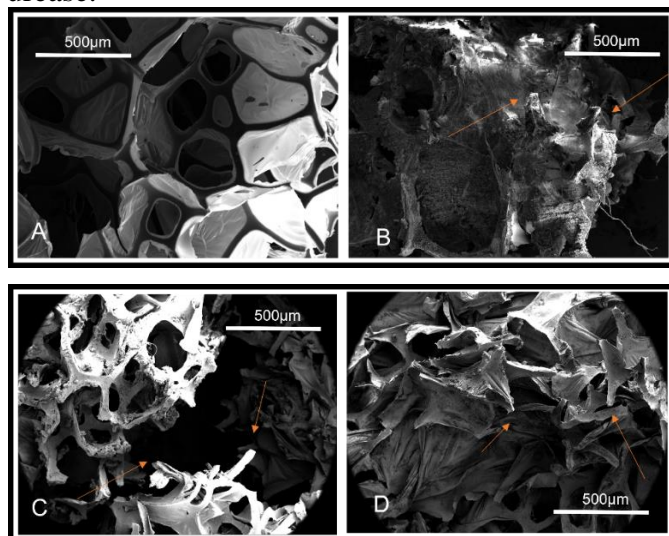
Figura 17d – Espectro de FTIR do meio de cultura para a produção de urease em diferentes condições experimentais.



Fonte: Do autor.

Por outro lado, as imagens obtidas pelo microscópio eletrônico de varredura (MEV) apresentaram possíveis danos nas estruturas dos compostos poliméricos poliuretanos (figuras 18B, 18C e 18D) e polihidroxialcanoatos (figuras 19B, 19C e 19D).

Figura 18a – Polímero poliuretano (PU); 18B: Polímero poliuretano após a fermentação para a produção de protease; 18C: Polímero poliuretano após a fermentação para a produção de esterase; 18D: Polímero poliuretano após a fermentação para a produção de uréase.

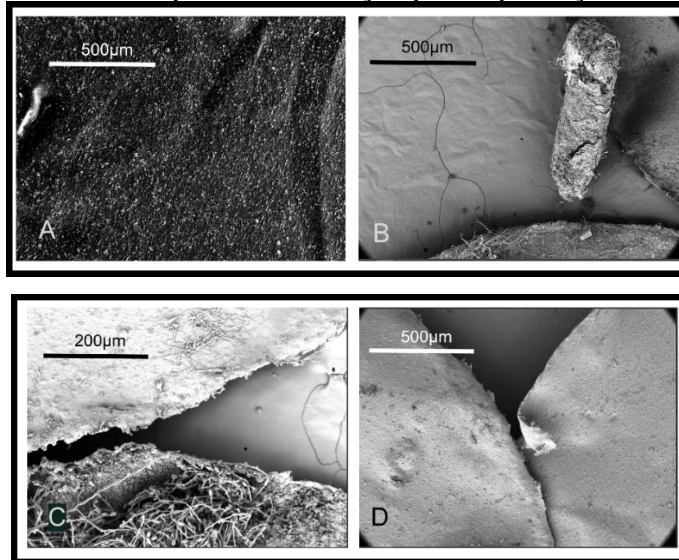


Fonte: Do autor.

Na figura 18 é possível observar a diferença entre a estrutura da figura 18A e as rupturas presentes nas estruturas do PU sinalizadas pelas setas (figura 18b, 18c e 18d).

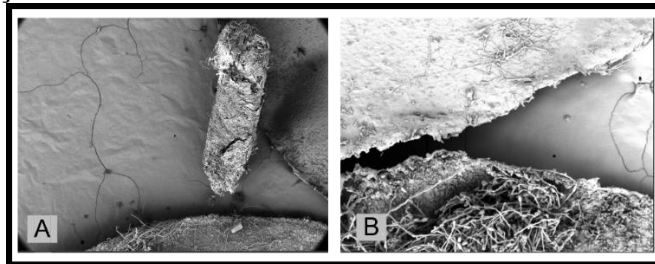
Na figura 19, as fissuras causadas nas estruturas do PHA (figura 19b, 19c e 19d) são nítidas, enquanto na figura 19a a estrutura do polímero aparece em perfeitas condições.

Figura 19a – Polímero polihidroxialcanoato (PHA); 19b: Polímero polihidroxialcanoato após a fermentação para a produção de protease; 19c: Polímero polihidroxialcanoato após a fermentação para a produção de esterase; 19d: Polímero polihidroxialcanoato após a fermentação para a produção de urease.



Fonte: Do autor.

Figura 20a – Fungo filamentososo *Aspergillus oryzae* na superfície de polihidroxialcanoato no final da fermentação para produção de protease; 20b: Fungo filamentososo *Aspergillus oryzae* na superfície de polihidroxialcanoato no final da fermentação para produção de esterase.



Fonte: Do autor.

Entre os tempos de coleta, houve diferença significativa entre o tempo e os tratamentos ( $p \leq 0,001$ ). Com base no teste de média de Scott-Knott, no tempo 10 dias o tratamento PHA + *F. verticillioides* apresentou maior valor de atividade específica (U/mg), no tempo 5 dias o tratamento PHA + *A. oryzae* apresentou maior crescimento de biomassa e pH para enzima protease (Tabelas 3, 4 e 5).

Os resultados do teste de média de Scott-Knott no tempo 15 dias os tratamentos e PU + *A.oryzae* e *A.oryzae* apresentaram maior valor de atividade específica (U/mg) no tempo 5 dias o tratamento *A. oryzae* apresentou maior crescimento de biomassa e maior pH para enzima esterase (Tabelas 3, 4 e 5).

No tempo 10 dias, o tratamento *F. verticillioides* apresentou maior valor de atividade específica (U/mg), no tempo 5 dias o tratamento *A. oryzae* apresentou maior crescimento de biomassa e o tratamento PHA + *F. verticillioides* apresentou maior valor de pH para enzima lipase (Tabelas 3, 4 e 5).

O mesmo teste apresentou no tempo 15 dias o tratamento PU + *F. verticillioides* maior atividade específica (U/mg) e maior valor para biomassa, e para o tempo 5 dias não houve diferença significativa entre os tratamentos para a enzima urease (Tabelas 3, 4 e 5).

Tabela 3- Resultados da atividade específica (U/mg) das enzimas protease, esterase, lipase e urease pelos fungos *Fusarium verticillioides* e *Aspergillus oryzae*.

Tratamento	Atividade específica (U/mg) / Nível de significância					
	Fusarium verticillioides	Fusarium verticillioides	Fusarium verticillioides	Aspergillus oryzae	Aspergillus oryzae	Aspergillus oryzae
Polímeros	PHA	PU	-	PHA	PU	-
Protease(10dias)	0,7799110 / B	0,6505987 / B	0,6722300 / B	0,5072610 / C	0,4709167 / C	0,4260923 / C
Esterase(15dias)	0,0004013 / A	0,000408 / A	0,000408 / A	0,0002180 / B	0,0002026 / B	0,0002313 / B
Lipase (10 dias)	3,19 x 10 <sup>-4</sup> / B	-	6,27 x 10 <sup>-4</sup> / A	3,17x 10 <sup>-5</sup> / C	-	8,03 x 10 <sup>-5</sup> / C
Urease (15 dias)	-	9,13 x 10 <sup>-5</sup> / A	1,37 x 10 <sup>-5</sup> / C	-	2,17 x 10 <sup>-5</sup> / B	2,4 x 10 <sup>-5</sup> / B

Fonte: Do autor.

Tabela 4 - Resultados da biomassa micelial dos *Fusarium verticillioides* e *Aspergillus oryzae* quando adicionados nos meios de cultivo para induzir as das enzimas protease, esterase, lipase e urease.

Tratamento	Biomassa / Nível de significância					
	Fusarium verticillioides	Fusarium verticillioides	Fusarium verticillioides	Aspergillus oryzae	Aspergillus oryzae	Aspergillus oryzae
Polímeros	PHA	PU	-	PHA	PU	-
Protease(10dias)	0,0082 / D	0,0064 / D	0,0256 / D	0,62 / A	0,498 / C	0,561 / B
Esterase(15dias)	0,0195 / D	0,0264 / D	0,0276 / D	0,6257 / B	0,487 / C	0,847 / A
Lipase (10 dias)	0,01119 / C	-	0,0435 / C	0,1467 / B	-	0,2313 / A
Urease (15 dias)	-	0,01523 / A	0,0 / B	-	0,0 / B	0,0 / B

Fonte: Do autor.



Tabela 5 - Resultados do pH dos meios indutores para produção das enzimas protease, esterase, lipase e urease pelos fungos *Fusarium verticillioides* e *Aspergillus oryzae*.

Tratamento	pH / Nível de significância					
	Fusarium verticillioides	Fusarium verticillioides	Fusarium verticillioides	Aspergillus oryzae	Aspergillus oryzae	Aspergillus oryzae
<b>Polímeros</b>	PHA	PU	-	PHA	PU	-
<b>Protease(10dias)</b>	4,11 / C	4,05 / C	4,1 / C	6,20 / A	5,59 / B	5,71 / B
<b>Esterase(15dias)</b>	5,49 / B	5,68 / B	6,56 / A	5,72 / B	6,13 / A	5,22 / B
<b>Lipase (10 dias)</b>	8,46 / A	-	7,5 / B	6,35 / C	-	6, 52 / C
<b>Urease (15 dias)</b>	-	8,4	7,8	-	8,3	8,16

Fonte: Do autor.

## 5. DISCUSSÃO

A seleção dos substratos utilizados para o preparo dos cultivos se mostrou eficiente diante aos resultados obtidos. As figuras 7a, 7b, 7c e 7d, e 14a, 14b, 14c e 14d representam as atividades específicas das enzimas protease, esterase, lipase e urease obtidas durante os tratamentos com os fungos filamentosos *F. verticillioides* e *A. oryzae*.

A seleção de um substrato adequado para o preparo da fermentação é essencial para suprir todas as exigências nutricionais dos fungos filamentosos e, assim, alcançar um crescimento rápido e uma boa produção de enzimas de interesse. Há estudos que relatam que baixas concentrações de N e C na fermentação submersa influencia o metabolismo secundário responsável pela produção de enzimas (González-Rodríguez et al., 2022).

No tratamento contendo o microrganismo *A. oryzae* foi identificado 0,055U/mg para a atividade específica de protease. Após análises do experimento Sandhya et al (2005) relata que o *A. oryzae* é um excelente microrganismo para produzir a enzima protease. A atividade específica para o tratamento com PHA foi de 0,8132 U/mg e com PU foi de 0,6559 U/mg contendo o *F. verticillioides*, enquanto que o tratamento contendo apenas o microrganismo foi de 0,6056 U/mg.

O fungo filamentoso *A. oryzae* apresentou atividade específica de  $1,118 \times 10^{-5}$  U/mg com o óleo de algodão utilizado como substrato. Zambare (2010) demonstrou que *A. oryzae* tem potencial para utilizar uma ampla variedade de substratos agrícolas para a produção de esterase em fermentação submersa obtendo  $1,36 \times 10^{-3}$  U/mg. No meio de cultivo específico para a produção de esterase, foi quantificada em  $1,22 \times 10^{-4}$  U/mg a atividade específica obtida pelo fungo *F. verticillioides*.

Estudos relatam que proteases são enzimas que clivam a cadeia peptídica longa em peptídeos curtos ou quebram proteínas em cadeias polipeptídicas por hidrólise, esse processo é denominado proteólise. *Aspergillus* é uma espécie fúngica importante que estão produzindo proteases para degradar plásticos (Ozsagioglu et al. 2012; Srikanth,M. 2022).

As esterases também estão envolvidas na degradação do plástico que é produzida por fungos. Os *Aspergillus* secretam esterases responsáveis pela degradação de plásticos. As esterases são enzimas hidrolases que dividem os ésteres em álcoois e ácidos pela adição de moléculas de água. (Khan et al. 2017; Tokiwa et al. 2009).

As lipases e ureases são enzimas que catalisam a hidrólise dos lipídios e ureia, respectivamente. Algumas espécies de fungos que são bem conhecidas por produzir lipases e ureases e estão envolvidas na degradação de plásticos (Pereira et al. 2001).

Os resultados obtidos pelo espectro de FTIR não foram suficientes para determinar a presença de compostos orgânicos originados a partir da degradação dos polímeros, possivelmente, por não ter sido formados compostos (monômeros, dímeros ou outros compostos que não estivessem no banco de dados para identifica-los.

Apesar dos resultados obtidos pelo espectro de FTIR não terem sido suficientes as imagens obtidas pelo MEV revelaram como o *Aspergillus oryzae* e o *Fusarium verticillioides* são capazes de aderir a superfície dos polímeros e atuarem no processo de degradação desses materiais, como mostram os rompimentos das estruturas (Figuras 18 e 19).

## 6. CONCLUSÃO

Nesse trabalho foi possível mostrar a influência dos metabolitos enzimáticos dos fungos filamentosos *Fusarium verticillioides* e *Aspergillus oryzae* no processo de degradação dos polímeros poliuretano e polihidroxialcanoato.

O fungo apresentou crescimento e seu aumento de biomassa aumentou ao longo do tempo de incubação. Com exceção do pH nas fermentações para a produção de urease, em todos os outros os tratamentos houve diferenças significativas ( $p \leq 0,001$ ) apresentadas pelo teste de média de Scott-Knott.

Nos quatro processos fermentativos houve a produção das respectivas enzimas de interesse, sendo que as atividades das enzimas lipase e protease foram quantificadas a partir do 5º dia de incubação, enquanto que as atividades de esterase e urease foram determinadas a partir do 15º dia.

Embora os resultados de FTIR não tenham sido suficientes para concluir a presença de monômeros, dímeros ou compostos obtidos a partir da degradação dos polímeros, as imagens obtidas a partir do MEV revelaram como o *F. verticillioides* e o *A. oryzae* são capazes de atuar rompendo as estruturas dos polímeros PU e PHA.

Por fim, os resultados do trabalho evidenciaram o potencial de aplicação de enzimas microbianas no processo de degradação de polímeros. Dessa forma, a intenção de reduzir a quantidade de materiais descartados de forma inadequada e diminuir, também, o tempo de exposição desses compostos poliméricos no ambiente se torna plausível.

## 7. REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

ABASTABAR, Mahdi *et al.* **Development of RFLP method for rapid differentiation of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus oryzae*, two species with high importance in clinical and food microbiology.** Journal of Medical Mycology 32, 2022, 101274

ABDELLA, M.A.A.; AHMED, S.A.; IBRAHIM, O.A. **Statistical improvement of protease production from a new isolate *Bacillus thuringiensis* strain-MA8 and its application in the production of enzyme-modified cheese.** International Journal of Biological Macromolecules Available online 11 November, 2022

ALMEIDA, Maíra *et al.* **Study of gamba grass as carbon source for cellulase production by *Fusarium verticillioides* and its application on sugarcane bagasse saccharification.** Industrial Crops & Products. 133 ,2019, 33- 43

AMENAGHAWON, Andrew.Nosakhare *et al.* **Enhanced lipase production from a ternary substrate mix of agricultural residues: A case of optimization of microbial inducers and global sensitivity analysis.** Bioresour. Technol. Rep., 17, Article 101000, 2022.

ANDUALEM, B. **Isolation and screening of amylase producing thermophilic spore forming Bacilli from starch rich soil and characterization of their amylase activities using submerged fermentation.** International Food Research Journal. v. 21, n.2, p. 831-837, 2014.

APHA Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 20th Edition, American Public Health Association, **American Water Works Association and Water Environmental Federation**, Washington. DC,1998

ATA, Amber *et al.* **Identification of potential urease inhibitors and antioxidants based on saccharin derived analogs: Synthesis, in vitro, and in silico studies.** Journal of Molecular Structure 1274, 134376, 2023.

BHARDWAJ, Kamal Kumar *et al.* **Optimization of culture conditions by response surface methodology for production of extracellular esterase from *Serratia sp.* EST-4,** Journal of King Saud University - Science, Volume 33, Ed. 8, 2021.

BOZZOLA, J. J.; RUSSELL, L. D. **Electron Microscopy.** 2nd. Ed, Boston, Jones and Bartlett Publishers. 1999. 670p.

BRANDON, Anja Malawi *et al* **bioavailability and microbial biodegradation of polystyrene in an enrichment derived from the gut microbiome of *Tenebrio molitor* (mealworm Larvae).** Environ. Sci. Technol., vol. 55, Ed. 3, 2021, pp. 2027-2036

CAMPANO, Cristina *et al.* **Gaining control of bacterial cellulose colonization by polyhydroxyalkanoate-producing microorganisms to develop bioplasticized ultrathin films.** International Journal of Biological Macromolecules 223, 2022, 1495–1505

COWIE, J.M.G.; ARRIGUI, V. **Polymers: Chemistry and physics of modern materials.** CRC Press Taylor & Francis Group, Florida, USA, 2008, p. 47-48

DANSO, D.; CHOW. J.; STREIT, W.R. **Plastics: environmental and bio technological perspectives on microbial degradation.** *Appl Environ Microbiol* ,2019, 85:1–14

DELANGIZ, Nasser *et al.* **Can polymer-degrading microorganisms solve the bottleneck of plastics' environmental challenges?** *Chemosphere.* 294, 2022, 133709

DINANGO *et al.* **Endophytic bacteria derived from the desert-spurge (*Euphorbia antiquorum* L.) suppress *Fusarium verticillioides*, the causative agent of maize ear and root rot.** *Rhizosphere* Vol. 23, 2022, 100562

EESAE, Mostafa *et al.* **Morphology and crystallization behaviour of polyhydroxyalkanoates-based blends and composites: A review.** *Biochemical Engineering Journal* 187, 2022, 108588

FAN, Yijin *et al.* **Urease producing microorganisms for coal dust suppression isolated from coal: Characterization and comparative study.** *Advanced Power Technology.* Vol. 31, 2020, p.4095–4106

GASPAR, Suelen *et al.* **Dynamics of microbiota and physicochemical characterization of food waste in a new type of composter.** *Frontiers In Sustainable Food Systems* v. 6, p. 1-13, 2022.

GONZÁLEZ, Rodríguez *et al.*, 2022 S. González-Rodríguez, T.A. Lu-Chau, A. Trueba-Santiso, G. Eibes, M.T. Moreira **Bundling the removal of emerging contaminants with the production of ligninolytic enzymes from residual streams** *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 106, 2022, pp. 1299-1311

GU, Shuaifeng *et al.* **Characteristics of a recombinant *Fusarium verticillioides* cutinase and its effects on enzymatic hydrolysis of rice straw.** *Revista Internacional de Macromoléculas Biológicas.* 171, 2021, p.382 - 388

GUO, C.; CHU, X.; WANG, F. **The feasibility of non-water reaction polymer grouting technology application in seepage prevention for tailings reservoirs.** *Water Science & Technology: Water Supply*, 18 (1/2), 2018,, pp. 203-213.

GURKOK, S.; OZDAL, M.. **Purification and characterization of a novel extracellular, alkaline, thermoactive, and detergent-compatible lipase from *Aeromonas caviae* LipT51 for application in detergent industry.** *Protein Expr. Purif.*, 180, 2021, 105819

GUTSCHMANN, Bjorn *et al.* **Native feedstock options for the polyhydroxyalkanoate industry in Europe: A review.** *Microbiological Research* 264, 2022, 127177

HAGI, Tatsuro *et al.* **Effect of sake lees on cheese components in cheese ripened by *Aspergillus oryzae* and lactic acid bacteria.** *Journal of Dairy Science* Volume 105, Issue 6, June 2022, Pages 4868-4881

HAQUE, Fariyah M. *et al.* **Defining the macromolecules of tomorrow through synergistic sustainable polymer research.** Chem. Rev., 122, 2022, pp. 6322-6373

HAQUE, Md. Ariful *et al.* **Advancements and current challenges in the sustainable downstream processing of bacterial polyhydroxyalkanoates.** 36, 100631, 2022.

HAVSTAD. M.R. **Biodegradable plastics.** Plastic Waste and Recycling, Elsevier, 2020, pp. 97-129

He, Xi *et al.* **Construction and analysis of a food-grade *Lactiplantibacillus plantarum* esterase/lipase overexpression system.** LWT - Food Science and Technology 163, 2022, 113539

HOFFMANN, G.; TEICHER, K., **Colorimetric determination of urease activity in soils.** Z. Pflanzenern~hr. Dfing. Bodenk. 95, 1961, p. 55-63.

HUANG, Hanyue *et al.* **Effects of afforestation on soil microbial diversity and enzyme activity: A meta-analysis.** Geoderma 423, 2022 115961.

INDERTHAL, H.; TAI, S.L.; HARRISON, S.T.L. **Non-hydrolyzable plastics-an interdisciplinary look at plastic bio-oxidation.** Trends Biotechnol., Vol. 39. Ed. 1, 2021, pp. 12-23

IDOLOR, Ogheneovo *et al.* **Nondestructive examination of polymer composites by analysis of polymer-water interactions and damage-dependent hysteresis.** Composite Structures 287, 2022, 115377

JOSHI, R.; SHARMA, A.; KUILA, A. **Lipase production from *Fusarium incarnatum* KU377454 and its immobilization using Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> NPs for application in waste cooking oil degradation.** Bioresour. Technol. Rep., 5, 2019, pp. 134-140

JUODEIKIENE, Grazina *et al* **Functionalization of soya press cake (okara) by ultrasonication for enhancement of submerged fermentation with *Lactobacillus paracasei* LUHS244 for wheat bread production.** LWT - Food Science and Technology 152, 2021, 112337

KATO, T.; SHIONO, Y.; KOSEKI, T. **Identification and characterization of an acetyl xylan esterase from *Aspergillus oryzae*.** Journal of Bioscience and Bioengineering VOL. 132 No. 4, 2021. P. 337-342.

KARNAOURI, Anthi *et al.* **Thermophilic enzyme systems for efficient conversion of lignocellulose to valuable products: Structural insights and future perspectives for esterases and oxidative catalysts.** Bioresource Technology. Volume 279, May 2019, Pages 362-372

KAWAI, F.; KAWABATA, T.; ODA, M. (2019) **Current knowledge on enzymatic PET degradation and its possible application to waste stream management and other fields.** Appl Microbiol Biotechnol 103:p. 4253–4268.

KHAN, Sehroon *et al.* **Biodegradation of polyester polyurethane by *Aspergillus tubingensis***. Environ Pollut 225:p. 469–480.

KHOMLAEM, Chanin *et al.* **Production of polyhydroxyalkanoates and astaxanthin from lignocellulosic biomass in high cell density membrane bioreactor**. Chemical Engineering Journal . 451, 2023, 138641.

KHOSROZADEH, S.; NOURBAKHS, F. **Deforestation alters protease regulation by amino acids**. Geoderma 426, 2022, 116097

KIRK, O.; BORCHERT, T.V.; FUGLSANG, C.C. **Industrial enzyme applications**. Curr. Opin. Biotechnol., 13 (2002), p. 345-351

LANUBILE, Alessandra *et al.* **Differential activation of defense genes and enzymes in maize genotypes with contrasting levels of resistance to *Fusarium verticillioides***. Environmental and Experimental Botany 78, 2012, p.39–46

LEE, S. Y. Bacterial polyhydroxyalkanoates. Biotechnol. Bioeng., Vol. 49,1996, p. 1-14

Lemes, A.C.; Egea, M.B.; Filho, J.G.d.O.; Gautério, G.V.; Ribeiro, B, D.; Coelho, M.A.Z. **Biological approaches for extraction of bioactive compounds from agroindustrial by-products: a review** Front. Bioeng. Biotechnol., Ed. 9, 2022, Article 802543

LEMOIGNE, M. **Etudes sur L'autolyse microbienne acidification par formation D'acide  $\beta$ -oxybutyrique**. Ann. Inst. Pasteur, Vol. 39, 1925, p. 144-173

LEMOIGNE, M. **Produits de deshydratation et de polymerisation de l'acide  $\beta$ -oxybutyrique**  
Bull. Soc. Chim. Biol., Vol. 8, 1926, p. 770-782

LI, Jinlong *et al.* **Effect of triblock copolymers on the lipase catalytic behavior at the interface of conventional O/W emulsions**. LWT - Food Science and Technology 172, 2022,114178

LI, Manjun *et al.* **Study on the new polyurethane material suitable for foaming in water**. Construction and Building Materials, 2022, p.129-163

LI, W.; FISHMAN, A.; ACHAL, V. **Whole cell evaluation and the enzymatic kinetic study of urease from ureolytic bacteria affected by potentially toxic elements**. Microbiological Research 265, 2022, 127208

LIU, Zhidong *et al.* **Experimental study on the damage characteristics of polymer slabs subjected to air contact and close-in explosions**. Adv. Mater. Sci. Eng., 2021, pp. 1-14

CASTRO, Aline *et al.* **Solid-state fermentation for the production of proteases and amylases and their application in nutrient medium production** Current Developments in Biotechnology and Bioengineering, Elsevier B.V.2018.

MAHADIK, Nutan *et al.* **Production of acidic lipase by *Aspergillus Niger* in solid state fermentation**. Process Biochem., Vol.38 2002, p. 715-721



MAZHAR, Haniya *et al.* **Optimization of low-cost solid-state fermentation media for the production of thermostable lipases using agro-industrial residues as substrate in culture of *Bacillus amyloliquefaciens***. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. (2022), doi: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2022.102559>.

MORADALI, M.F., REHM, B.H.A. **Bacterial biopolymers: from pathogenesis to advanced materials**. Nat Rev Microbiol 18, 2020, p. 195–210.

MORILA, E.A.; STEGMANN, P.M.; TUBIO, G. **Enzymatic cocktail production by a co-cultivation Solid-State Fermentation for detergent formulation** Food and Bioproducts Processing Vol. 140, 2023, p 110-121

MUHAMMAD, M., ALOUI H., KHOMLAEM, C. **Produção de polihidroxiálcanoatos e carotenoides através do cultivo de diferentes cepas bacterianas usando hidrólise de algas marrons como fonte de carbono**. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology Vol. 30, 2020, 101852

NGUVO, K. J.; GAO, X. **Weapons hidden underneath: bio-control agents and their potentials to activate plant induced systemic resistance in controlling crop *Fusarium* diseases**. Journal of Plant Diseases and Protection. 2019, p.177–190

NIMKANDE, V.D.; BAFANA, A. **A review on the utility of microbial lipases in wastewater treatment**. Journal of Water Process Engineering, Vol. 46,2022,, Article 102591

OZSAGIROGLU, E.; IYISAN, B.; GUVENILIR, Y.A. (2012) **Biodegradation and Characterization studies of different kinds of polyurethanes with several enzyme solutions**. Pol J Environ Studies Ed. 6, p.1777–1782

PAWAR, Varsha *et al.* **Investigating purification and activity analysis of urease enzyme extracted from jack bean source: A green chemistry approach**. Analytical Biochemistry 659, 2022, 114925

PENG, Bo Yu *et al.* **Biodegradation of polystyrene and low-density polyethylene by *Zophobas atratus* larvae: Fragmentation into microplastics, gut microbiota shift, and microbial functional enzymes**. Journal of Cleaner Production 367, 2022, 132987

PEREIRA, E.B.; CASTRO, H.F.; MORAES, F.F. Kinetic studies of lipase from *Candida rugosa*. Appl Biochem Biotechnol 91:739

PEREIRA, C.I.; CRESPO, M.T.; ROMAO, M.V. **Evidence for proteolytic activity na biogenic amines production in *Lactobacillus curvatus* and *L. homohiochii***. Int. J. Food Microbiol., v.68, n.3, 2001, p.211-6

PERIYASAMY, Selvakumar *et al.* **Recent advances in consolidated bioprocessing for conversion of lignocellulosic biomass into bioethanol – A review**. Chemical Engineering Journal 453, 2023, 139783

PU, Mengyuan *et al.* **A facile, alternative and sustainable feedstock for transparent polyurethane elastomers from chemical recycling waste PET in high-efficient way**. Waste Management Vol. 155, 2023, p. 137–145

PUREWAL, S. S.; SANDHU, K. S. **Debittering of citrus juice by different processing methods: A novel approach for food industry and agro-industrial sector.** *Scientia Horticulturae* Vol. 276, 2021, 109750.

RABBANI *et al.* **Structural features, temperature adaptation and industrial applications of microbial lipases from psychrophilic, mesophilic and thermophilic origins.** *International Journal of Biological Macromolecules*. 2022.

ROVEDA, M.; HEMKEMEIER, M.; COLLA, L.M. **Evaluation of lipase production using different strains of microorganisms isolated from dairy effluent through submerged fermentation.** *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, Vol. 30, Ed. 1, 2010, p.126-131.

SAITO, *et al.* **Gelation of konjac glucomannan by acetylmannan esterases from *Aspergillus oryzae*.** *Enzyme and Microbial Technology* 160, 2022, 110075

SHAIKH *et al.* **Extracellular protease production, optimization and partial purification from *Bacillus nakamurai* PL<sub>4</sub> and its applications** *Journal of King Saud University – Science*, 2022, 102429

SANDHYA *et al.* **Avaliação comparativa da produção de protease neutra por *Aspergillus oryzae* em fermentação submersa e em estado sólido** *Process Biochem.*, 40 (2005), pp. 2689-2694.

SHARMA, A. K.; SINGH, S. P. **Effect of amino acids on the repression of alkaline protease synthesis in haloalkaliphilic *Nocardioopsis dassonvillei*.** *Biotechnol. Rep.*, 12, 2016, p. 40-51

SILVESTRIN *et al.* **Identificação Estectrométrica de Compostos Orgânicos.** 8<sup>a</sup> ed. Editora LTC. 2019

SIMPLICIO, Jad *et al.* **Production, Pre-Purification and Encapsulation of Proteolytic Enzyme Secreted by Filamentous Fungus** *The Journal of Engineering and Exact Sciences – jCEC*, Vol. 09, Ed. 03, 2023.

Srikanth, M.; Sandeep, T.S.R.S.; Sucharitha, K; Godi, S. **Biodegradation of plastic polymers by fungi: a brief review** *Bioresources and Bioprocessing* volume 9, Article number: 42, 2022.

Song, W.Q.; Liu, M.L.; Yuan, L.C.; Li, S.Y.; Wang, Y.N.; Xiao, Z.P.; Zhu, H.L. **Synthesis, evaluation and mechanism exploration of 2-(N-(3-nitrophenyl) -N-phenylsulfonyl) aminoacetohydroxamic acids a novel urease inhibitors.** *Borg. Med. Chem. Lett.* 78, 2022, 129043

STARCHER, B., 2001. **A ninhydrin–based assay to quantitate the total protein content of Tissue smaples.** *Anal. Biochem.* 292, p. 125–129.

STEMLER, C.D.; SCHERF, K.A. **Comparative characterization of baking lipase substrate specificities using emulsions and the *p*-nitrophenyl assay.** *LWT - Food Science and Technology* 168, 2022, 113914.

SUBASH, A.; NAEBE, M.; WANG, X. **Biopolymer – A sustainable and efficacious material system for effluent removal.** Journal of Hazardous Materials 443, 2023, 130168.

TANAKA, K.; GOTO, T.; MANABE, M. **Traditional Japanese fermented foods free from mycotoxin contamination.** Japan Agricultural Research Quarterly. 2002; 36. p. 45–50.

TARRAHI, Roshanak *et al.* **Polyhydroxyalkanoates (PHA): From production to nanoarchitecture,** International Journal of Biological Macromolecules, Vol. 146, 2020, p. 596-619,

TIAN, Huaixiang *et al.* **Effect of microwave radiation combined with cellulase treatment of soybean residue on the culture of *Aspergillus oryzae*.** Food Bioscience. 2022, 101988.

TOKIWA, Y.; CALABIA, B.P. **Biodegradability of plastics.** Int J Mol Sci Vol. 10, 2009, p. 3722–3742

YAASHIKA, P.R.; KUMAR, P.S.; KARISHMA, S. **Review on biopolymers and composites – Evolving material as adsorbents in removal of environmental pollutants.** Environmental Research 212, 2022, 113114

YANG, Junhao *et al.* **Modifying the chain-length selectivity of the lipase from *Burkholderia cepacia* KWI-56 through in vitro combinatorial mutagenesis in the substrate-binding site.** Protein Engineering. V. 15, 2002, p.147-152.

YUAN, Liyun *et al.* **Chemically recyclable polyurethanes based on bio-renewable  $\gamma$ -butyrolactone: From thermoplastics to elastomers.** Polymer Degradation and Stability 204, 2022, 110116

XIANG, Yangzhou *et al.* **Grass cover increases soil microbial abundance and diversity and extracellular enzyme activities in orchards: A synthesis across China.** Applied Soil Ecology 182, 2023, 104720

WANG, Chengliang *et al.* **Seasonal variation modifies the spatial patterns of soil microbial community structure and enzyme activity in a meadow steppe.** Applied Soil Ecology 182, 2023, 104686

WANG, Fan *et al.* **A chemiluminescent probe for the real-time monitoring of esterases activities.** Sensors & Actuators: B. Chemical 375, 2023, 132880.

WEATHERBURN, M. W. **Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia.** Analytical Chemistry Vol. 39, Ed. 8, 1967, p.971-974.

WHO (World Health Organization). **International Programme on Chemical Safety. Environmental Health Criteria 219: Fumonisin B1.** World Health Organization (Publ.), Geneva, 2000.

ZAMBARE, V.. **Fermentação em estado sólido de *Aspergillus oryzae* para produção de glucoamilase em resíduos agropecuários** Int. J. Life Sci., Ed. 4, 2010, pp. 16-25.

ZHANG, Yan *et al.* **Biodegradation of polyethylene and polystyrene: From microbial deterioration to enzyme** Discovery. Biotechnology Advances Vol. 60, 2022, 107991

**Normas e referências protocolares**

International Standard ISO 10390:2005, Soil Quality – **Determination of pH.**