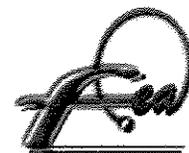




UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS



**“ESTUDO DA DEGRADAÇÃO DE POLIETILENO TEREFALATO  
(PET) POR FUNGOS BASIDIOMICETOS LIGNINOLÍTICOS“**

**PARECER**

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por **Luciana Frias Reyes**, aprovada pela Comissão Julgadora em 10 de dezembro de 2003.

Luciana Frias Reyes  
Ecóloga

Campinas, 10 de dezembro de 2003

  
Prof. Dra. **Lucia Regina Durrant**  
Presidente da Banca

Profa. Dra. Lucia Regina Durrant  
Orientadora

200403117

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da  
Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de  
Mestre em Ciência de Alimentos.

2003

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL  
SEÇÃO CIRCULANTE

JNIDADE 98  
Nº CHAMADA UNICAMP  
R33c  
V \_\_\_\_\_ EX \_\_\_\_\_  
TOMBO BCI 57138  
PROC 261 11/104  
C \_\_\_\_\_ DA \_\_\_\_\_  
PREÇO 22,00  
DATA \_\_\_\_\_  
Nº CPD \_\_\_\_\_

CM00195077-9

BIB ID 310973

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA F.E.A. – UNICAMP

R33e Reyes, Luciana Frias  
Estudo da degradação de polietileno tereftalato (PET) por  
fungos basidiomicetos ligninolíticos / Luciana Frias Reyes. –  
Campinas, SP: [s.n.], 2003.

Orientador: Lucia Regina Durrant  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de  
Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.Polietileno tereftalato (PET). 2.Biodegradação.  
3.Basidiomicetos - Fungos. 4.Polímeros. 5.Enzimas. I.Durrant,  
Lucia Regina. II.Universidade Estadual de Campinas.Faculdade  
de Alimentos. III.Título.

**BANCA EXAMINADORA**

  
\_\_\_\_\_  
**Profa. Dra. Lúcia Regina Durrant**  
Orientadora

  
\_\_\_\_\_  
**Dra. Andréa Roberta Clemente**  
Membro

  
\_\_\_\_\_  
**Prof. Dr. Ranulfo Monte Alegre**  
Membro

\_\_\_\_\_  
**Dr. Hamilton Roberto Fortes Bavutti**  
Membro Suplente

*"É melhor tentar e falhar,  
que preocupar-se e ver a vida passar.  
É melhor tentar ainda em vão,  
que sentar-se fazendo nada até o final.  
Eu prefiro na chuva caminhar,  
que em dias tristes em casa me esconder.  
Prefiro ser feliz, embora louco,  
que em conformidade, viver."*

*(Martin Luther King)*

*Dedico a meu Pai e minha Mãe,  
pelo Amor, sempre,  
pela Vida, eterna,  
pela Luz, infinita.*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus e aos anjos, pelas palavras!

A UNICAMP pela infra-estrutura cedida!

A Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro!

A Profa. Dra. Lucia Regina Durrant, minha orientadora, pela oportunidade na pesquisa científica, essencial para meu enriquecimento pessoal e profissional, de grande importância para minha vida!

A Banca Examinadora, pelas sugestões e correções que enriqueceram meu trabalho!

Ao Departamento de Ciência de Alimentos da FEA - UNICAMP, Jardete, Marquinhos e Marcão, pela disponibilidade, convivência e risos!

A Secretaria de Pós-Graduação da FEA - UNICAMP, em especial ao Cosme e Marcelo, pela ajuda, paciência e brincadeiras!

Aos funcionários da Biblioteca e Centro de Informática da FEA, em especial à Creusa e Cláudia, e Estefane, Ricardo e Marçal pela ajuda, pelo bom humor!

Ao pessoal do xerox, Marcos e Emerson, pelo auxílio "heroíno" nos momentos de pressa!

**UNICAMP**  
BIBLIOTECA CENTRAL  
SEÇÃO CIRCULANTE

Aos verdadeiros amigos, Ani, Eliane, Márcia, Andréa, Karla, Gabriela, Rose, Érica, Ana Cláudia, Cristiane, Karina, Karime, Regina e Sílvia, agradeço com um poema:

*“Amigo é quem te dá um pedacinho do chão, quando é de terra firme que você precisa, ou um pedacinho do céu, se é sonho que te faz falta! Amigo é mais que ombro amigo, é mão estendida, mente aberta, coração pulsante, costas largas... é quem tentou e fez, e não tem egoísmo de não querer compartilhar o que aprendeu! É quem sabe que viver é ter história para contar, é quem sorri sem motivo aparente, é quem fala e ouve só com um olhar! Amigo é aquele que percebe em seus olhos seus desejos, seus disfarces, suas alegrias, seus medos... é aquele que diz, inesperadamente “eu te amo” sem qualquer receio! Amigo é verdade, sonho e sentimento. Amigo é pra sempre, mesmo que o sempre não exista.”*

Aos amigos do Laboratório de Sistemática e Fisiologia Microbiana, que comigo compartilharam momentos, dividindo experiências e risos!

Ao Renato, pelo apoio e crença em meu trabalho, pelas palavras, pelo carinho, pelo amor!

A todos meus familiares, em especial a meus Pais, por tudo!

## ÍNDICE

<b>CAPÍTULO 1</b>	1
<b>Resumo</b> .....	2
<b>Abstract</b> .....	3
<b>1. Introdução</b> .....	4
<b>2. Objetivo</b> .....	5
<b>3. Revisão Bibliográfica</b> .....	6
3.1. Histórico dos polímeros sintéticos.....	6
3.2. Polietileno Tereftalato.....	6
3.3. Polímeros sintéticos e Meio Ambiente.....	8
3.4. Fungos decompositores de lignina.....	9
4.5. Degradação de polímeros.....	11
<b>4. Referências Bibliográficas</b> .....	13
<b>CAPÍTULO 2</b>	15
<b>Resumo</b> .....	16
<b>Abstract</b> .....	16
<b>1. Introdução</b> .....	17
<b>2. Objetivo</b> .....	18
<b>3. Revisão Bibliográfica</b> .....	18
3.1. Crescimento microbiano em polímeros sintéticos.....	18
3.2. Efeitos causados nos polímeros pelo crescimento microbiano.....	20

<b>4. Metodologia</b> .....	21
4.1. Crescimento dos microrganismos.....	21
4.1.1. Microrganismos.....	21
4.1.2. Preparo do inóculo.....	21
4.1.3. Meio de cultura líquido.....	22
4.2. Polímero utilizado.....	22
4.3. Desinfecção dos PETs.....	22
4.3.1. Solução Desinfetante Universal.....	23
4.4. Crescimento em meio líquido das linhagens fúngicas contendo PET como substrato.....	23
4.5. Observação qualitativa do crescimento microbiano.....	24
4.6. Determinação da massa fúngica e diminuição da massa do PET.....	24
4.7. Microscopia Eletrônica de Varredura.....	25
<b>5. Resultados e Discussão</b> .....	26
5.1. Avaliação qualitativa do crescimento microbiano.....	26
5.2. Diminuição de massa do PET.....	33
5.3. Microscopia Eletrônica de Varredura.....	38
<b>6. Conclusões</b> .....	49
<b>7. Referências Bibliográficas</b> .....	50

<b>CAPÍTULO 3</b>	53
<b>Resumo</b> .....	54
<b>Abstract</b> .....	55
<b>1. Introdução</b> .....	56
<b>2. Objetivo</b> .....	57
<b>3. Revisão Bibliográfica</b> .....	57
3.1. Características gerais de fungos de decomposição branca.....	57

3.2. Enzimas Ligninolíticas produzidas por fungos.....	58
3.2.1. Lignina Peroxidase (LiP).....	59
3.2.2. Lacase (Lac).....	59
3.2.3. Manganês Peroxidase (MnP).....	60
3.3. Produção de Biosurfactantes.....	61
<b>4. Metodologia.....</b>	<b>62</b>
4.1. Crescimento dos microrganismos.....	62
4.1.1. Microrganismos e Preparo dos Inóculos.....	62
4.1.2. Meio de Cultura Líquido.....	62
4.1.3. Meio de cultura Sólido.....	62
4.2. Polímero utilizado.....	63
4.3. Desinfecção dos PETs.....	63
4.4. Crescimento em meio líquido das linhagens fúngicas e PET.....	63
4.5. Crescimento em meio sólido das linhagens fúngicas e PET.....	64
4.6. Determinação das atividades enzimáticas.....	64
4.6.1. Atividade da Lacase.....	65
4.6.2. Atividade da Lignina Peroxidase.....	65
4.6.3. Atividade da Manganês Peroxidase.....	66
4.7. Análise da produção de biosurfactante.....	66
<b>5. Resultados e Discussão.....</b>	<b>67</b>
5.1. Atividades enzimáticas em meio líquido.....	67
5.1.1. Atividade de Lacase.....	67
5.1.2. Atividade de Lignina Peroxidase.....	69
5.1.3. Atividade de Manganês Peroxidase.....	71
5.2. Atividades enzimáticas em meio sólido.....	73
5.2.1. Atividade de Lacase.....	74
5.2.2. Atividade de Lignina Peroxidase.....	75
5.2.3. Atividade de Manganês Peroxidase.....	77
5.3. Produção de Biosurfactantes em meio líquido.....	79
5.4. Produção de Biosurfactantes em meio sólido.....	81
<b>6. Conclusões.....</b>	<b>83</b>

<b>7. Referências Bibliográficas.....</b>	<b>85</b>
<b>CAPÍTULO 4</b>	<b>89</b>
<b>Resumo.....</b>	<b>90</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>90</b>
<b>1. Introdução.....</b>	<b>91</b>
<b>2. Objetivo.....</b>	<b>92</b>
<b>3. Revisão Bibliográfica.....</b>	<b>92</b>
3.1. Viscosidade.....	92
3.2. Viscosidade de soluções diluídas.....	92
<b>4. Metodologia.....</b>	<b>94</b>
4.1. Amostras.....	94
4.2. Solubilização do PET.....	95
4.3. Viscosímetro.....	95
4.4. Equações para determinação das medidas de viscosidade.....	96
<b>5. Resultados e Discussões.....</b>	<b>96</b>
<b>6. Conclusões.....</b>	<b>99</b>
<b>7. Referências Bibliográficas.....</b>	<b>100</b>
<b>CONCLUSÕES GERAIS.....</b>	<b>103</b>

## TABELAS

Tabela 2.1.	Classificação em função do crescimento microbiano – ASTM G22-76, 1990.....	24
Tabela 2.2.	Classificação qualitativa semanal dos microrganismos crescidos em meio de cultura líquido de sais a 30 <sup>0</sup> C por 28 dias (ASTM G22-76).....	27
Tabela 2.3.	Classificação qualitativa semanal dos microrganismos crescidos em meio de cultura líquido de sais a 30 <sup>0</sup> C por 30, 60, 90 e 120 dias (ASTM G22-76).....	28
Tabela 2.4.	Massa inicial, Massa final dos pellets de PET e massa fúngica após crescimento dos fungos em PET por 30 dias a 30 <sup>0</sup> C.....	34
Tabela 2.5.	Massa inicial, Massa final dos pellets de PET e massa fúngica após crescimento dos fungos em PET por 60 dias a 30 <sup>0</sup> C.....	35
Tabela 2.6.	Massa inicial, Massa final dos pellets de PET e massa fúngica após crescimento dos fungos em PET por 90 dias a 30 <sup>0</sup> C.....	36
Tabela 2.7.	Massa inicial, Massa final dos pellets de PET e massa fúngica após crescimento dos fungos em PET por 120 dias a 30 <sup>0</sup> C.....	37
Tabela 3.1.	Medidas de halo (emulsão água em óleo) produzidas por linhagens fúngicas crescidas em meio contendo sais e pellets de PET por 30, 60, 90 e 120 dias a 30 <sup>0</sup> C.....	81
Tabela 3.2.	Medidas de halo (emulsão água em óleo) produzidas por linhagens fúngicas crescidas em meio sólido de farelo de trigo e pellets de PET por 30, 60 e 90 dias a 30 <sup>0</sup> C.....	83
Tabela 4.1.	Relação das amostras de polietileno tereftalato (PET), linhagens e tempos de incubação dos ensaios de degradação previamente realizados, submetidas às análises de viscosidade de soluções diluídas.....	95
Tabela 4.2.	Medidas do tempo de escoamento das soluções poliméricas das amostras de polietileno tereftalato (PET).....	97

Tabela 4.3. Valores de viscosidade relativa ( $\eta_r$ ), viscosidade inerente ( $\eta_{inh}$ ) e viscosidade intrínseca $[\eta]$ , medidos a 30°C e 0,50 g/dL, das amostras de PET.....	97
--	----

## FIGURAS

Figura 1.1.	Estrutura do Polietileno Tereftalato – PET.....	7
Figura 2.1.	Crescimento fúngico em pellets de PET a 30°C em meio líquido de sais. A. <i>P. sajor caju</i> (30 dias); B. <i>P. tailândia</i> (30 dias); C. <i>P. tailândia</i> (90 dias); D. <i>Pleurotus</i> sp (P.001) (30 dias).....	29
Figura 2.2.	Crescimento fúngico em pellets de PET a 30°C em meio líquido de sais. A. Flu (120 dias); B. PSC 94/03 (90 dias); C. <i>Pleurotus</i> sp (P1) (90 dias); D. PSC94/03 (120 dias).....	30
Figura 2.3.	Fotomicrografias do polímero PET e fungo PSC 94/03 por MEV. A. controle – 200x; B. PET após retirada da massa fúngica – 200x; C. controle – 800x; D. PET após retirada da massa fúngica – 800x; E. PET e PSC 94/03 – 300x; F. PET e PSC 94/03 – 500x.....	41
Figura 2.4.	Fotomicrografias do polímero PET e fungo <i>Pleurotus sajor caju</i> por MEV. A. controle – 300x; B. PET após retirada da massa fúngica – 300x; C. controle – 500x; D. PET após retirada da massa fúngica – 500x; E. PET e <i>Pleurotus sajor caju</i> – 350x; F. PET e <i>Pleurotus sajor caju</i> – 1000x.....	43
Figura 2.5.	Fotomicrografias do polímero PET e fungo <i>P. chrysosporium</i> por MEV. A. controle – 700x; B. PET após retirada da massa fúngica – 700x; C. PET e <i>P. chrysosporium</i> – 400x; D. PET e <i>P. chrysosporium</i> – 500x; E. PET e <i>P. chrysosporium</i> – 750x; F. PET e <i>P. chrysosporium</i> – 700x.....	45
Figura 2.6.	Fotomicrografias do polímero PET e fungos <i>Pleurotus</i> sp (P1 e P.001) por MEV. A. PET e P1 – 200x; B. PET e P1 – 350x; C. PET e P1 – 400x; D. PET e P1 – 1500x; E. PET e P.001 – 350x; F. PET e P.001 – 750x.....	47
Figura 3.1.	Produção de lacase pelas linhagens fúngicas crescidas em meio contendo sais minerais e pellets de PET a 30°C. A. 30 dias; B. 60 dias; C. 90 dias; D. 120 dias.....	68

Figura 3.2.	Produção de lignina peroxidase pelas linhagens fúngicas crescidas em meio contendo sais minerais e pellets de PET a 30°C. A. 30 dias; B. 60 dias; C. 90 dias; D. 120 dias.....	70
Figura 3.3.	Produção de manganês peroxidase pelas linhagens fúngicas crescidas em meio contendo sais minerais e pellets de PET a 30°C. A. 30 dias; B. 60 dias; C. 90 dias; D. 120 dias.....	72
Figura 3.4.	Produção de lacase pelas linhagens fúngicas crescidas em meio contendo farelo de trigo e pellets de PET a 30°C. A. 30 dias; B. 60 dias; C. 90 dias.....	74
Figura 3.5.	Produção de lignina peroxidase pelas linhagens fúngicas crescidas em meio contendo farelo de trigo e pellets de PET a 30°C. A. 30 dias; B. 60 dias; C. 90 dias.....	76
Figura 3.6.	Produção de manganês peroxidase pelas linhagens fúngicas crescidas em meio contendo farelo de trigo e pellets de PET a 30°C. A. 30 dias; B. 60 dias; C. 90 dias.....	78
Figura 3.7.	Produção de biosurfactante (emulsão óleo em água) pelas linhagens fúngicas crescidas em meio contendo sais minerais e pellets de PET por 30, 60, 90 e 120 dias a 30°C.....	80
Figura 3.8.	Produção de biosurfactantes (emulsão óleo em água) pelas linhagens fúngicas crescidas em meio contendo farelo de trigo e pellets de PET por 30, 60 e 90 dias a 30°C.....	82

# Capítulo 1

*Revisão Bibliográfica*

**RESUMO**

Este trabalho tem como objetivo o estudo do crescimento e da ação degradativa de linhagens fúngicas no polímero sintético Polietileno Tereftalato (PET). Para tal, foram crescidos nove fungos basidiomicetos, entre eles *Pleurotus sajor caju*, *Pleurotus tailandia*, *Pleurotus* sp (P.001), *Phanerochaete chrysosporium*, *Agaricus campestris*, *Pleurotus* sp (P1), *Pleurotus* sp (PSC 94/03), Flu e H2, em meio de cultura líquido de sais por períodos de 30, 60, 90 e 120 dias, e em meio de cultivo contendo farelo de trigo por 30, 60 e 90 dias de crescimento, a 30°C. Após incubação, foram avaliados crescimento qualitativo das linhagens, a diminuição de massa polimérica, a produção de enzimas ligninolíticas, e de biosurfactantes e determinadas medidas de viscosidade do PET. Todas as linhagens promoveram perda de massa do PET, destacando-se *Phanerochaete chrysosporium* (6,72%) com 90 dias de incubação, P.001 (5,79%) com 30 dias e *P. sajor caju* (4,82%) e PSC 94/03 (4,13%) com 120 dias de cultivo. Com relação à produção enzimática, verificou-se que a Manganês Peroxidase apresentou os maiores valores de atividade, destacando-se *Agaricus campestris* (8,16 UI/Lmin) no período de cultivo de 120 dias em meio líquido, e PSC 94/03 (1900,77 UI/Lmin) com 90 dias de incubação em meio contendo farelo de trigo. As melhores produções de biosurfactantes, em meio líquido, foram obtidas com a linhagem H2 emulsão óleo/água (0,17) e *Pleurotus* 001 emulsão água/óleo (1,8 cm) com 120 dias de cultivo, e nos ensaios em meio contendo farelo e trigo com a linhagem Flu emulsão óleo/água (0,245) em 30 dias e PSC 94/03 emulsão água/óleo (2,25 cm) com 60 dias de crescimento. As amostras de PET apresentaram diminuição da

viscosidade intrínseca, destacando-se *Pleurotus* sp (P.001) e *Pleurotus* sp (P1), indicando ocorrência de alterações estruturais do polímero causadas pelo crescimento dos microrganismos estudados neste substrato.

## **ABSTRACT**

The goal of this work was to determine the ability of ine fungal strains to grow and degradae Polyethylene Terephtalate (PET). The basidiomycete fungi (*Pleurotus sajor caju*, *Pleurotus tailandia*, *Pleurotus* 001, *Phanerochaete chrysosporium*, *Agaricus campestris*, *Pleurotus* sp (P1), *Pleurotus* sp (PSC 94/03), and the strains Flu e H2) were cultivated at 30<sup>0</sup>C either in a mineral liquid medium for 30, 60, 90 and 120 days or in a wheatbran: water solid medium for 30, 60 and 90 days, both containing PET pellets. Following the incubation periods, the qualitative growth of the fungi, the loss of polymeric mass, the production of ligninolytic enzymes and the production of biosurfactants, as well as the viscosity of the PET, were investigated.

*P. chrysosporium* showed the greatest loss of polymeric mass (6,72% in 90 days), followed by P.001 (5,79% in 30 days). *P. sajor caju* and PSC 94/03 caused 4,82% and 4,13% loss of polymeric mass, respectively, after 120 days of incubation. Strain H2 showed only 0,08% of degradation after 90 days of incubation. All the strains produced at least one of the enzymes under both culture conditions. *A. campestris* presented the highest levels of manganese-peroxidase activities in120 ddays of incubation in liquid medium, and PSC 94/03 after 90 days

of incubation in solid medium. The best production of biosurfactant activities was observed following growth of *Pleurotus tailandia* (oil/water) and of *Pleurotus* sp (P.001) (water/oil emulsion), both in liquid medium for 120 days. Following growth in solid medium best oil-in-water emulsion was produced by the strain Flu after 30 days and PSC 94/03 produced the best water-in-oil emulsion after 60 days of growth. All PET samples showed reduction on the intrinsic viscosity when compared with the controls. The fungal strain P.001 and P1 presented lowest values for viscosity indicating the occurrence of structural modification in the PET caused by these microorganisms.

## **1. INTRODUÇÃO**

O uso de polímeros sintéticos tem aumentado significativamente desde o começo do século XX (NDON et al., 1992), sendo largamente utilizados nos diversos campos industriais e domésticos e rapidamente descartados, resultando em um grave problema ambiental (MUSTAFA, 1993). De acordo com estimativas, cerca de 100 milhões de toneladas destes materiais são, atualmente, produzidas no mundo, por ano (REDIFF, 2000).

A maior parte da demanda mundial de PET está relacionada à aplicação de fibras, e grande parte do aumento de sua utilização está na área de embalagens alimentares (EDGE et al, 1996). A existência de microrganismos capazes de degradar compostos xenobióticos é de grande interesse para a biorremediação, sendo os fungos de decomposição branca um dos grupos que tem maior

notoriedade em estudos relacionados a esta área, pois são capazes de degradar uma grande variedade de poluentes tóxicos persistentes no meio ambiente (CHANDRA & RUSTGI, 1998).

O manejo total dos resíduos plásticos requer combinações complementares de biodegradação, incineração e reciclagem. A biodegradação é a solução mais eficaz a longo prazo, requerendo, portanto, intensa pesquisa e desenvolvimento (ALBERTSSON e HUANG, 1995).

## **2. OBJETIVOS**

O objetivo deste trabalho foi avaliar modificações estruturais ocorridas no polímero Polietileno Tereftalato (PET) quando utilizado como fonte de carbono para o crescimento microbiano. Para tal, foram estudadas:

- ✓ a diminuição de massa do polímero e aumento de massa celular dos microrganismos ;
- ✓ o crescimento qualitativo das linhagens em PET;
- ✓ a produção de enzimas ligninolíticas;
- ✓ a produção de biosurfactantes;
- ✓ a viscosidade de soluções diluídas das amostras de PET.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. Histórico dos polímeros sintéticos

A palavra *polímero* (“poly” + “mer”, muitas partes), vem do Grego e foi criada por Berzelius, em 1832, para designar compostos de peso moleculares múltiplos (MANO e MENDES, 1999).

Os primeiros materiais plásticos empregados na indústria foram obtidos de produtos naturais, por modificação química, como o nitrato de celulose, proveniente da celulose do algodão, a galalite originária da caseína do leite e a ebonite, da borracha natural (MANO e MENDES, 1999).

Os primeiros plásticos sintéticos, comercializados sob a forma de artefatos foram a bakelite, uma resina fenólica (PR), em 1910, e mais tarde, na década de 30, o policloreto de vinila (PVC), o polimetacrilato de metila (PMMA) e o poliestireno (PS). Na década de 40 surgiram o polietileno de baixa densidade (LDPE), o poliuretano (PU) e a resina epoxídica (ER). Na década de 50 foram introduzidos o polioximetileno (POM), o polietileno de alta densidade (HDPE), o polipropileno (PP) e o policarbonato (PC) (MANO e MENDES, 1999).

#### 3.2. Polietileno Tereftalato

Polímeros são macromoléculas caracterizadas por seu tamanho, estrutura química e interações intra- e intermoleculares, possuindo unidades químicas ligadas por covalências, repetidas regularmente ao longo da cadeia (MANO E MENDES, 1999). Segundo Carothers (1931), polímero é um composto químico de peso molecular elevado, formado por muitas moléculas pequenas, iguais ou de

vários tipos diferentes, unidas umas as outras por ligações covalentes, resultantes de muitas reações de adição ou de condensação (substituição) consecutivas. O Polietileno Tereftalato (PET) é obtido de uma reação química de policondensação produzido pela reação do dimetil tereftalato com o etileno glicol (PLANETA PLÁSTICO, 2003).

O PET (Figura 1.1) é classificado quimicamente como um polímero poliéster termoplástico, ou seja, se funde por aquecimento e solidifica por resfriamento, em um processo reversível. Pode ser apresentado no estado amorfo (transparente), parcialmente cristalino e orientado (translúcido) e altamente cristalino (opaco). É aplicado como fibra na indústria têxtil em geral, mantas para filtros industriais e para contenção de encostas, como artefato em indústrias automobilísticas, eletro-eletrônicos, embalagens de alimentos, cosméticos, produtos farmacêuticos e frascos de bebidas gaseificadas, e como filme, em radiografias, fotografias e reprografia (MANO e MENDES, 1999).

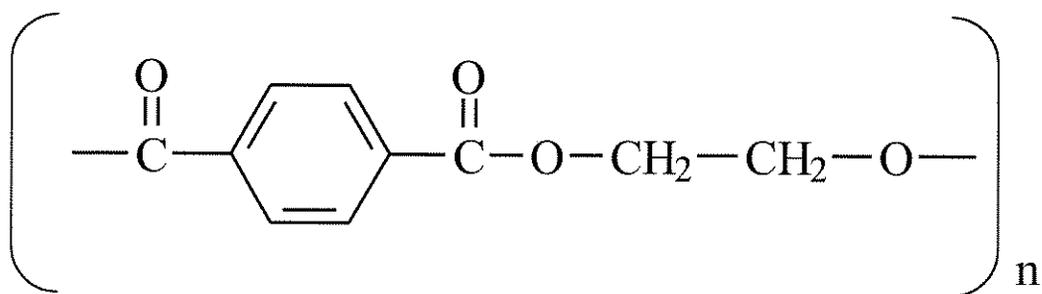


Figura 1.1: Estrutura do Polietileno Tereftalato - PET

O PET foi desenvolvido em 1941 pelos químicos ingleses Winfield e Dickson, mas as garrafas produzidas com este polímero só começaram a ser fabricadas na década de 70, após cuidadosa revisão dos aspectos de segurança e

meio ambiente (SILVA, 2002). No Brasil, as garrafas de PET começaram a ser produzidas em larga escala em 1993 (GONÇALVES, 2002).

### **3.3. Polímeros sintéticos e Meio Ambiente**

A concentração populacional e o processo de industrialização trouxeram, a partir do século XX, grande aumento da quantidade de lixo produzido e também mudanças na sua composição. Ao lixo, foram sendo incorporados novos materiais como vidro, plásticos, isopor, borracha, alumínios entre outros de difícil decomposição (COM CIÊNCIA, 2002).

A urbanização tem influenciado de forma intensa este tipo de poluição. Os plásticos são depositados no ambiente, chegando aos sistemas de coleta de esgoto resultando no seu entupimento e, conseqüentemente, em inundações locais (REDIFF, 2000).

O plástico é um material proveniente de resinas geralmente sintéticas e derivadas do petróleo. Sob o ponto de vista ambiental, o uso do plástico é considerado problemático pela sua alta durabilidade e grande volume na composição total do lixo (OSE – COC, 2002). A demanda mundial de polímeros sintéticos é de cerca de 2,2 milhões de toneladas por ano, com previsão de dobrar nos próximos cinco anos. O consumo de plásticos praticamente dobrou no Brasil em apenas 7 anos (1991-1998), produzindo 175 mil toneladas de plástico PET em 1998. No município de São Paulo, os plásticos são o segundo elemento mais encontrado no lixo, correspondendo a 23% do peso total dos resíduos encaminhados para os aterros sanitários, o que significa uma parcela muito importante, considerando-se que o plástico é um elemento extremamente leve e

de grande volume. No Rio de Janeiro, as garrafas PET correspondem em média a 1,4% em peso do lixo urbano (SILVA, 2002).

Quando depositados em lixões, os plásticos apresentam risco pela queima indevida e sem controle, que pode resultar em descargas de gases tóxicos na atmosfera. Quando colocado em aterros sanitários, esse material dificulta a compactação do material e dificulta a decomposição dos elementos biologicamente degradáveis (INSTITUTO GEA, 2002), prejudicando os processos fermentativos e impedindo a circulação de líquidos e gases, necessários à biodegradação dos materiais (FINEP, 2002).

O acúmulo indevido de polímeros sintéticos também atinge ambientes marinhos, causando inúmeros problemas, como a ingestão de sacos plásticos por tartarugas marinhas e baleias, ingestão de bolas de polietileno por aves marinhas, morte de focas por ingestão de plásticos provenientes de embalagens, dentre outros (POLUIÇÃO HOME PAGE, 2002).

### **3.4. Fungos decompositores de lignina**

O processo de deterioração microbiana da madeira é dependente de variáveis como: microrganismos degradadores, a espécie da planta e o microhabitat. A degradação se dá inicialmente pela invasão de bactérias e alguns ascomicetos, sendo posteriormente seguida por microrganismos com maior capacidade de deterioração; estes são outras espécies de ascomicetos de decomposição branda, poucas espécies de basidiomicetos de decomposição parda e várias espécies de basidiomicetos de decomposição branca (ALEXOPOULOS, 1996).

Os fungos de decomposição branca são os principais degradadores de lignina na natureza. Existem inúmeras espécies de fungos de degradação branca, sendo a maioria destas Basidiomycotina, seguidas por algumas Ascomycotina (ERIKSON et al., 1990). Os Basidiomycotina atacam tanto madeira dura como mole, enquanto que Ascomycotina provavelmente seja capaz de degradar somente madeira dura (KIRK & FARRELL, 1987).

Os fungos de degradação branca removem os componentes da parede celular, tais como a lignina, hemicelulose e celulose, simultaneamente, em taxas aproximadamente iguais. Alguns destes basidiomicetos possuem a habilidade de promover uma deslignificação seletiva, ou seja, degradar seletivamente a lignina e hemicelulose, com baixa remoção dos componentes da celulose (ALEXOPOULOS, 1996). A degradação da lignina por fungos de decomposição branca é mais rápida do que a causada por outros microrganismos, sendo estes os responsáveis pela maioria da decomposição da lignina na natureza. O crescimento destes fungos diminui em condições limitadas de nitrogênio e carbono, e a atividade de enzimas ligninolíticas aparece como forma de metabolismo secundário (KIRK & FARRELL, 1987; TUOMELA, et al., 2000). Para o fungo *Phanerochaete chrysosporium*, assim como outros de decomposição branca, o processo de degradação é maior quando há ausência de nitrogênio, enxofre e carboidratos no substrato (ALEXOPOULOS, 1996).

Na degradação da lignina, algumas enzimas fenol-oxidases extracelulares são produzidas, incluindo a lacase, a lignina peroxidase e manganês peroxidase. O processo completo de deterioração da lignina pode ocorrer parcialmente por

reações não enzimáticas (ALEXOPOULOS, 1996; BLANCHETTE, 1991; ERIKSSON et al., 1990).

A lignina contém uma variedade de ligações que estão comumente presentes em poluentes aromáticos. O sistema degradativo dos fungos de decomposição branca é inespecífico e oxidativo, e muitos laboratórios tem estudado estes microrganismos como um agente potencial na biorremediação devido a sua capacidade em degradar poluentes tóxicos (BUMPUS e AUST, 1987 e HAMMEL, 1989).

### **3.5. Degradação de Polímeros**

A decomposição de compostos orgânicos por microrganismos é um fenômeno comum. Muitos materiais orgânicos, como alimentos, produtos de madeira ou demais matérias orgânicas, são decompostos e retornam ao ambiente na forma de compostos simples, como dióxido de carbono, água ou amônia. Muitos desses materiais contém polímeros naturais, como celulose, amido, lignina e proteínas. Conseqüentemente, a biodegradação de alguns compostos orgânicos se torna um processo conhecido na natureza (MUSTAFA, 1993).

A biodegradação é um processo natural onde compostos químicos orgânicos presentes no ambiente são convertidos a componentes mais simples, mineralizados e redistribuídos através dos ciclos do carbono, nitrogênio e enxofre (CHANDRA e RUSTGI, 1998). A biodegradação foi definida por GÖPFERICH (1996) como um processo de quebra da cadeia durante o qual a cadeia polimérica é clivada para formar oligômeros e finalmente monômeros.

Polímeros sintéticos que contenham polímeros naturais em sua cadeia, como resíduos de carboidratos e lignina, podem ser biodegradados (ALBERTSSON e HUANG, 1995).

Observou-se que muitos dos polímeros orgânicos sintéticos, incluindo a maioria dos plásticos, são extremamente resistentes à biodegradação. Esse fenômeno começou a gerar um grave problema econômico e ambiental quando os aterros sanitários começaram a ficar saturados, constituindo, o plástico, uma parcela importante nesta problemática, visto que permanece inalterado no ambiente por um longo período de tempo (MUSTAFA, 1993).

Os procedimentos para a determinação da resistência de polímeros sintéticos a degradação fúngica consistem na seleção de espécimes plásticos adequados para a determinação de propriedades convenientes de resistência ao ataque microbiano, inoculação de espécimes plásticos com microrganismos selecionados, exposição dos espécimes plásticos inoculados a condições favoráveis ao crescimento microbiano e avaliação do crescimento visual (ASTM G21-90).

O estudo de microrganismos, como fungos de decomposição branca, capazes de degradar polímeros sintéticos faz-se necessário, uma vez que a incineração não adequada de compostos plásticos emite gases tóxicos ao homem e a reciclagem de materiais plásticos não é amplamente utilizada. Segundo ALBERTSSON & HUANG (1995), o manejo adequado de polímeros sintéticos requer combinações complementares de, incineração, reciclagem e biodegradação, sendo esta última a solução mais eficaz a longo prazo, requerendo, portanto, intensa pesquisa e desenvolvimento.

#### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTSSON, A. C. & HUANG, S. J. **Degradable Polymers, Recycling, and Plastics Waste Management**. New York, Marcel Dekker, Inc., 1995. 317 p.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS – ASTM. Standard Practice for determining resistance of plastics to Fungi, G21 – 90, 1990.

ALEXOPOULOS, C.J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. **Introductory Micology**. 4<sup>a</sup> ed. John Wiley & Sons, Inc. 1996. 869 p.

BLANCHETTE, R. A. Degradation of Lignocellulose Complex in Wood. **Can. J. Bot.** v. 73, p. 999-1010, 1991.

BUMPUS, J. A. & AUST, S. D. Biodegradation of environmental pollutants by white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. **BioEssays**. v. 6, p. 166 – 170, 1987.

CHANDRA, R. & RUSTGI, R. Degradable Polymers. **Prog. Polym. Sci.** v. 23, p. 1273 – 1335, 1998.

COM CIÊNCIA – Revista Eletrônica De Jornalismo Da Sociedade Brasileira Para O Progresso Da Ciência. **Lixo é problema ambiental com agravantes sociais**. Disponível em: <http://www.comciencia.br/reportagens/cidades/cid10.htm>. Acesso em: 06/maio/2002.

EDGE, M., WILES, R., ALLEN, N.S., McDONALD, W. A. & MORTLOCK, S. V. Characterization of the species responsible for yellowing in melt degraded aromatic polyesters - I: Yellowing of poly(ethylene terephthalate). **Polym. Degr. and Stabil.** v. 53, p. 141-151, 1996.

ERIKSSON, K. E. L., BLANCHETTE, R. A. & ANDER, P., Microbial and Enzymatic Degradation of Wood and Wood Components. Springer Verlag, Germany - Berlin. 1990. 407p.

GONÇALVES, E. S. V. **Lixo em Questão**. Disponível em: <<http://www.ultimaarcadenoe.com/elidialixo1.htm>>. Acesso em: 06/maio/2002.

GÖPFERICH, A. Mechanisms of Polymer Degradation and Erosion. **Biomaterials**. v.17, p. 103-114, 1996.

HAMMEL, K. E. Organopollutant degradation by ligninolytic fungi. **Enzyme Microb. Technol.** v. 11, p. 776 – 777. 1989.

INSTITUTO GEA – ÉTICA E MEIO AMBIENTE. **Plásticos**. Disponível em: <<http://www.institutogea.org.br/4b.htm>>. Acesso em: 06/maio/2002.

KIRK, T. K. & FARRELL, R. L. Enzymatic “combustion”: the microbial degradation of lignin. **Annu. Rev. Microbiol.** v. 41, p. 465 – 505, 1987.

MANO, E. B. & MENDES, L. C. **Introdução a Polímeros**. 2ª.ed. Edgard Blucher. São Paulo, 1999. 191p.

MUSTAFA, N. **Plastics Waste Management: Disposal, Recycling, and Reuse**. Marcel Dekker Inc. New York. 1993. 413 p.

NDON, U. J., LEVINE, A. D. & BRADLEY, B. S. Evaluation of biodegradability of starch-based plastics. **Wat. Sci. Tech.** v. 26, n. 9 – 11, p. 2089 – 2092, 1992.

**OSE – COC**. Disponível em: <<http://www.ose.g12.br/vantagen.htm>>. Acesso em: 06/maio/2002.

**PLANETA PLÁSTICO**. Disponível em: <<http://www.PLANETAPLASTICO.COM.BR/NOVO/LITERATURA/USOCOMERCIAL/USOPET.html>>. Acesso em: 03/Set/2003.

POLUIÇÃO HOME PAGE. **Poluição das águas**. Disponível em: <<http://lodohp.vilabol.uol.com.br/agua.htm>>. Acesso em: 06/maio/2002.

**REDIFF ON THE NET**. Disponível em: <<http://members.rediff.com/jogsn/BP4.html>>. Acesso em: 25/07/00.

SILVA, M. **Projeto Lixo Seletivo – PET**. Disponível em: <[http://www.marcelosilva.com.br/projeto\\_lixo-08.htm](http://www.marcelosilva.com.br/projeto_lixo-08.htm)>. Acesso em: 06/maio/2002.

TUOMELA, M., VIKMAN, M., HATAKKA, A. & ITÄVAARA, M. Biodegradation of lignin in compost environment: a review. **Biores. Technol.** v. 72, p. 169 – 183, 2000.

## *Capítulo 2*

*Crescimento microbiano em PET  
e diminuição da massa polimérica*

**RESUMO**

Estudou-se a perda de massa de pellets de Polietileno Tereftalato (PET) causada por nove linhagens de fungos basidiomicetos (*Pleurotus sajor caju*, *Pleurotus tailandia*, *Pleurotus* 001, *Phanerochaete chrysosporium*, *Agaricus campestris*, *Pleurotus* sp (P1), *Pleurotus* sp (PSC 94/03), Flu e H2) e o crescimento destes na superfície do polímero. Para tal, as linhagens foram incubadas por períodos de 30, 60, 90 e 120 dias em meio líquido de sais tendo como única fonte de carbono o PET.

Verificou-se que os fungos apresentaram crescimento micelial de cerca de 60%, com exceção de *Phanerochaete chrysosporium* e *A. campestris* que apresentaram aproximadamente 30% de massa celular e H2 com cerca de 10%, após 120 dias de incubação.

As linhagens que ocasionaram maior porcentagem de perda de massa do PET foram *P. chrysosporium* com 90 dias de incubação, com redução de 6,72%, *Pleurotus* 001 com 5,79% em 30 dias e *P. sajor caju* com 4,82% e PSC 94/03 com 4,13% em 120 dias de cultivo, enquanto que a linhagem H2 apresentou a menor perda de massa com 0,08% em 90 dias de cultivo.

**ABSTRACT**

The loss of polymeric mass of Polyethylene Terephthalate (PET) caused by nine Basidiomycete fungal strains (*Pleurotus sajor caju*, *Pleurotus tailandia*,

*Pleurotus* 001, *Phanerochaete chrysosporium*, *Agaricus campestris*, *Pleurotus* sp (P1), *Pleurotus* sp (PSC 94/03), Flu e H2), and their growth on the polymers's surface, was investigated. The strains were grown for 30, 60, 90 and 120 days in a mineral liquid medium containing PET as the carbon source.

All the strains presented mycelial growth of about 60%, with the exceptions for *P. chrysosporium* and *A. campestris*, which showed approximately 30% of cellular mass and for strain H2 with about 10%, after 120 days of incubation.

*P. chrysosporium* showed the greatest loss of polymeric mass (6,72% in 90 days), followed by P.001 (5,79% in 30 days). *P. sajor caju* and PSC 94/03 caused 4,82% and 4,13% loss of polymeric mass, respectively, after 120 days of incubation. Strain H2 showed only 0,08% after 90 days of incubation.

## 1. INTRODUÇÃO

Os polímeros sintéticos, em sua maioria, são recalcitrantes por não serem facilmente degradados e assimilados por microrganismos, sendo acumulados no ambiente e permanecendo inalterados por muitas décadas (ALBERTSSON & HUANG, 1995), como o Polietileno Tereftalato (PET), que possui vida de aproximadamente 48 anos no meio ambiente (MÜLLER et al., 2001).

A existência de microrganismos capazes de metabolizar compostos xenobióticos é de grande interesse para processos de biorremediação (CHANDRA & RUSTGI, 1998), e os fungos de decomposição branca, ou seja, os

degradadores de lignina, tem apresentado êxito em pesquisas relacionadas a biodegradação de poluentes (O' SULLIVAN, 1994). Estes microrganismos são capazes de transformar e mineralizar contaminantes ambientais como hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, corantes azo, herbicidas e outros compostos tóxicos através da ação de suas enzimas extracelulares (CLEMENTE, 2002; NEVES, 2002; LANG et al., 1998).

## **2. OBJETIVOS**

O objetivo desta etapa do trabalho foi avaliar qualitativamente o crescimento microbiano em meio líquido contendo como substrato o PET, e determinar a perda de massa do polímero quando utilizado como única fonte de carbono e energia para o crescimento das linhagens fúngicas.

## **3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **3.1. Crescimento microbiano em polímeros sintéticos**

Entre os polímeros sintéticos, o poliuretano (PU) foi considerado biodegradável nas primeiras pesquisas realizadas em 1966 (EL-SAYED, 1996). Darby and Kaplan relataram, em 1968, que os poliéster-uretanos são mais suscetíveis à degradação fúngica em comparação aos poliéteres-uretanos (HOWARD et al., 1998; AKUTSU et al., 1997; NAKAJIMA-KAMBE et al., 1997 e

SANTERRE et al., 1993). Foi verificado em 1981, que, adicionando-se suplementos de nitrogênio, a biodegradação do poliéster PU por fungos filamentosos e pela levedura *Cryptococcus laurentii*, aumentava (EL-SAYED, 1996).

Em 1985, foi demonstrada a função das enzimas extracelulares na biodegradação do poliuretano (EL-SAYED, 1996). Geralmente os polímeros sintéticos e naturais podem ser atacados bioquimicamente por microrganismos através da produção de enzimas hidrolíticas que catalisam a hidrólise das ligações éster, éter ou amida, como é o caso das esterases (SCHNABEL, 1981).

Desde então, um número crescente de fungos com capacidade de degradar poliéster PU tem sido isolados, e foi sugerido que o ataque enzimático do PU envolve a ação de enzimas hidrolíticas como ureases, proteases e esterases (HOWARD et al., 1998; AKUTSU et al., 1997; NAKAJIMA-KAMBE et al., 1997 e SANTERRE et al., 1993), como ocorrido em 1994, onde foram isolados quatro espécies de fungos, *Curvularia senegalensis*, *Fusarium solani*, *Aureobasidium pullulans* e *Cladosporium* sp, sendo caracterizadas suas capacidades em degradar ésteres de PU. Observou-se que *C. senegalensis* secretou uma enzima extracelular com as mesmas propriedades das esterases (HOWARD et al., 1998).

O fungo *Phanaerochaete chrysosporium* apresentou crescimento extenso, de difícil remoção, em filmes de polietileno, sendo sua degradação evidente quando comparados aos controles. As condições de cultivo foram aquelas adequadas a degradação de lignina. Foram verificadas também, que microrganismos ligninolíticos foram capazes de degradar componentes oxidados

de polietileno, observando-se reduções de massa molecular deste polímero (LEE et al., 1991).

Filmes de policloreto de vinila (PVC) apresentaram-se opacos e menos flexíveis quando incubados com os fungos basidiomicetos *P. chrysosporium*, *Peniophora cinerea* e *Trogia buccinalis*, e análise em espectro de UV revelaram mudanças significativas, indicando a presença de ácidos carboxílicos e de polienos provenientes das quebras oxidativas da cadeia macromolecular, através de processos enzimáticos (FRANCHETTI, 1998).

### **3.2. Efeitos causados nos polímeros pelo crescimento microbiano**

Os efeitos esperados quanto ao crescimento microbiano em polímeros sintéticos são: ataque da superfície do polímero, descoloração e perda de transparência. A remoção dos plastificantes, modificadores e lubrificantes resulta no aumento da firmeza (menor flexibilidade), mudanças no peso, dimensões e outras propriedades físicas, assim como, em deterioração das propriedades elétricas, tais como, resistência, constante e força dielétrica e fator de potência (ASTM G21-90, 1990).

Freqüentemente, as mudanças nas propriedades elétricas ocorrem devido, principalmente, ao crescimento microbiano na superfície e está associada à umidade e a mudanças no *pH* provocadas pela excreção de metabólitos. A não uniformidade de plastificantes, lubrificantes ou de outros aditivos de processamento na superfície polimérica também influencia no ataque microbiano, podendo ocorrer crescimento preferencial causado pela dispersão desigual destes

compostos. Mudanças físicas são observadas em produtos, tais como, filmes ou revestimentos, nos quais a relação superfície/volume é alta e onde os materiais nutrientes, como os plastificantes e lubrificantes, continuam a se difundir para a superfície quando utilizados pelos microrganismos (ASTM G21-90, 1990).

## **4. METODOLOGIA**

### **4.1. Crescimento dos microrganismos**

#### **4.1.1. Microrganismos**

Foram utilizadas nove linhagens de fungos basidiomicetos, da coleção de microrganismos do Laboratório de Sistemática e Fisiologia Microbiana DCA-FEA/UNICAMP (COSTA, 2001), sendo estas: *Pleurotus sajor caju*, *Pleurotus tailandia*, *Pleurotus* 001, *Phanerochaete chrysosporium*, *Agaricus campestris*, *Pleurotus* sp (P1), *Pleurotus* sp (PSC 94/03), linhagem Flu e linhagem H2.

#### **4.1.2. Preparo do inóculo**

O preparo do inóculo foi feito em placas de Petri contendo meio de cultura sólido Batata Dextrose Ágar (BDA), da marca Merck, na proporção de 39g de ágar BDA e 1000 mL de água destilada. As linhagens foram incubadas em estufas à 30<sup>o</sup> C durante 7 dias. Após o crescimento completo e homogêneo nas placas, os microrganismos foram transferidos para o meio de crescimento líquido descrito a seguir (item 4.1.3).

#### 4.1.3. Meio de Cultura Líquido

Foi utilizado um meio de cultura líquido, à base de sais, para o crescimento dos fungos, denominado minimal buffered salt 1 supplemented (S-MSB-1) o qual foi preparado adicionando-se em 1L de água destilada:  $K_2HPO_4$ , 7g;  $KH_2PO_4$ , 3g;  $MnSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0,1g;  $(NH_4)_2SO_4$ , 1g;  $NaNO_3$ , 1g;  $(HOCOCH_2)_3N$ , 1g e 3,5mL do suplemento de sais,  $gL^{-1}$ :  $CaCl_2$ , 0,389;  $Cu(NO_3)_2$ , 0,64;  $NH_4SO_4$ , 0,6;  $ZnSO_4$ , 0,718;  $FeSO_4$ , 0,696, com pH final de 5,0 (PENDRYS, 1989 – modificado; EL-SAYED, 1996 - modificado).

#### 4.2. Polímero utilizado

O polímero sintético utilizado nos ensaios apresentava-se na forma de pellets cilíndricos de 3mm de diâmetro e 2mm de altura de Polietileno Tereftalato, resina PET Rhodia S80, doados pela Divisão de Embalagens da Alcoa Alumínio S. A., Queimados – RJ.

#### 4.3. Desinfecção dos PETs

Os pellets de PET foram previamente pesados em aproximadamente 0,25g e colocados em “saquinhos”, confeccionados com gaze, e numerados. Estes “saquinhos” foram colocados em um bequer contendo 1L da Solução Desinfetante Universal, descrita no item 4.3.1, e deixados à temperatura ambiente, por 60 minutos, agitando-se ocasionalmente com um bastão de vidro estéril. A seguir, com o auxílio de uma pinça estéril, estes foram removidos e transferidos para outro béquer com água destilada estéril onde permaneceram à temperatura

ambiente por mais um período de 60 minutos, agitando-se ocasionalmente. Após estes procedimentos, os “saquinhos” foram transferidos, assepticamente, para um béquer com solução de etanol 70% por 30 minutos à temperatura ambiente (ASTM D-5247-92, 1992). Por fim, as amostras de PET foram colocadas em béqueres estéreis fechados, e deixados à temperatura ambiente para secagem por um período de 12 dias.

#### **4.3.1. Solução Desinfetante Universal**

Em um bequer estéril foi adicionado, assepticamente, 1 L de água destilada, 14,0 mL de detergente Tween 80 e 20 mL de cloro previamente esterilizados por filtração em membranas de filtro Millipore 0,22 µm.

#### **4.4. Crescimento em meio líquido das linhagens fúngicas contendo PET como substrato**

Foram utilizados frascos Erlenmeyers de 125 mL nos quais foram adicionados 50 mL do meio de crescimento de sais e autoclavados a 121°C por 15 min. Em câmara de fluxo laminar adicionou-se aproximadamente 0,25g de pellets de PET já desinfetados.

Os fungos previamente crescidos em placas de Petri contendo PDA foram inoculados em câmara de fluxo laminar, na proporção de 1 cm<sup>2</sup> de micélio para cada 10 mL do meio de cultura líquido (CLEMENTE, 2002; PAVARINA, 2002).

A incubação foi feita em estufas a 30°C, sem agitação, por períodos de 30, 60, 90 e 120 dias. Após incubação, as amostras foram filtradas em lã de vidro e

mantidas, em frascos âmbar, à  $-10^{\circ}\text{C}$  para análise de determinação das atividades enzimáticas e de biosurfactantes.

Todos os experimentos foram realizados em triplicata, incluindo os ensaios controle bióticos e abióticos.

#### 4.5. Observação qualitativa do crescimento microbiano

Todos os ensaios realizados foram acompanhados semanalmente, e os dados referentes ao crescimento das linhagens no PET foram registrados e classificados conforme descrito pela American Society for Testing and Materials (ASTM G22-76, 1990) (Tabela 2.1).

Tabela 2.1. Classificação em função do crescimento microbiano – ASTM G22-76, 1990

CRESCIMENTO	CLASSIFICAÇÃO
Nenhum	0
Traços de crescimento (< 10 %)	1
Baixo crescimento (10 a 30 %)	2
Médio crescimento (30 a 60 %)	3
Alto crescimento (> 60 %)	4

#### 4.6. Determinação da massa celular fúngica e diminuição da massa do PET

Os pellets de PET foram pesados em balança analítica tendo como peso inicial aproximadamente 0,25 g. Após incubação, os polímeros foram colocados em pesa-filtros e deixados em estufas de secagem a  $50^{\circ}\text{C}$  por 12h para determinação do crescimento de massa celular.

A determinação da perda de massa dos polímeros foi baseada na metodologia ASTM D5247-92 (1992), que constituiu em colocar as amostras de PET em solução de NaOH 5 mol.L<sup>-1</sup> por aproximadamente 8h , em temperatura ambiente, para retirada da massa microbiana, em seguida lavando-as em água corrente e deixando-as em repouso cerca de 8h em água destilada. Após este período, as amostras, em pesa-filtros, foram colocadas em estufas de secagem a 50°C por 12h para determinação da perda de massa dos PETs.

#### **4.7. Microscopia Eletrônica de Varredura**

As amostras de PET foram preparadas para visualização morfológica por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) segundo adaptações do protocolo de Bal-TEC, 1999.

A preparação foi realizada pela fixação das células microbianas através de imersão das amostras em solução de glutaraldeído 2% em tampão fosfato de sódio 0,1 M e ácido tânico 0,2% por 3 horas. Depois, as amostras foram lavadas 3 vezes em tampão fosfato de sódio 0,1 M durante 10 minutos, submetidas a uma etapa de pós-fixação, onde foram imersas em solução de tetróxido de ósmio 1% em tampão fosfato de sódio 0,1 M por 60 minutos e mergulhadas 3 vezes em água destilada durante 10 minutos.

A desidratação das amostras foi realizada com a imersão destas em soluções crescentes de 30 a 100% de etanol absoluto, sendo posteriormente secas em equipamento de ponto crítico, colocadas em suportes específicos

(stubs), metalizadas com ouro e mantidas em dessecadores, para visualização no MEV.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Avaliação qualitativa do crescimento microbiano

São apresentados na Tabela 2.2 os resultados dos ensaios realizados em triplicata, onde verificou-se que, nas 4 semanas iniciais de observação, a maioria dos microrganismos apresentou bons níveis de crescimento segundo a classificação apresentado pela American Society for Testing Materials (Tabela 2.1), sendo as linhagens *P. sajor caju*, *P. thailandia* e P. 001 as que apresentaram as maiores porcentagens de massa celular com classificação 3, correspondente até 60% de crescimento micelial. As linhagens *Phanerochaete chrysosporium* e H2, não apresentaram bom crescimento, com classificação 1, equivalente a cerca de 10%. Para as demais linhagens a classificação foi 2, equivalente a cerca de 30% de crescimento micelial.

Tabela 2.2. Classificação qualitativa dos microrganismos crescidos em meio de cultura líquido de sais a 30°C por 28 dias (ASTM G22-76).

FUNGOS	7 dias	14 dias	21 dias	28 dias
<i>P. sajor caju</i>	1	2	3	3
<i>P. tailandia</i>	2	2	3	3
P.001	2	3	3	3
<i>P. chrysosporium</i>	1	1	1	1
<i>A. campestris</i>	2	2	2	2
H2	1	1	1	1
PSC 94/03	2	2	2	2
P1	2	2	2	2
F. lu	1	1	2	2

onde: 1 = traços de crescimento (< 10 %); 2 = baixo crescimento (10 a 30 %); 3 = médio crescimento (30 a 60 %); 4 = alto crescimento (> 60 %).

Os dados do crescimento das linhagens fúngicas da Tabela 2.3 referem-se aos resultados dos ensaios realizados nas demais semanas analisadas (até 120 dias), sendo apresentados num intervalo de 15 dias devido a pouca variação no crescimento após 30 dias de incubação. Verificou-se que a maioria dos microrganismos apresentaram bom crescimento, chegando à classificação 3 (até 60 % de crescimento micelial) segundo normas de classificação da ASTM (Tabela 2.1), sendo apenas as linhagens *P. chrysosporium*, *A. campestris* as que atingiram classificação 2 (10 à 30%), e o fungo H2, que permaneceu com classificação 1, com porcentagem de crescimento celular menor que 10%.

Tabela 2.3. Classificação qualitativa dos microrganismos crescidos em meio de cultura líquido de saís a 30°C por 30, 60, 90 e 120 dias (ASTM G22-76).

FUNGOS	30 dias	45 dias	60 dias	75 dias	90 dias	105 dias	120 dias
<i>P. sajor caju</i>	3	3	3	3	3	3	3
<i>P. thailandia</i>	3	3	3	3	3	3	3
P.001	3	3	3	3	3	3	3
<i>P. chrysosporium</i>	1	2	2	2	2	2	2
<i>A. campestris</i>	2	2	2	2	2	2	2
H2	1	1	1	1	1	1	1
PSC 94/03	2	2	3	3	3	3	3
P1	2	2	3	3	3	3	3
F. lu	2	2	3	3	3	3	3

onde: 1 = traços de crescimento (< 10 %); 2 = baixo crescimento (10 a 30 %); 3 = médio crescimento (30 a 60 %); 4 = alto crescimento (> 60 %).

O crescimento dos fungos *Pleurotus sajor caju* (Figura 2.1.A), *Pleurotus thailandia* (Figura 2.1.B e 2.1.C) e *Pleurotus* sp (P.001) (Figura 2.1.D), ocorreu de forma intensa, recobrando a superfície do meio de cultura líquido. As massas miceliais, principalmente das linhagens *Pleurotus thailandia* (Figura 2.1.B e 2.1.C), *Pleurotus* sp (P.001) (Figura 2.1.D), Flu (Figura 2.2.A), P1 (Figura 2.2.C) e PSC 94/03 (Figuras 2.2.D) alcançaram o fundo dos erlenmeyers, envolvendo e aderindo-se ao PET.

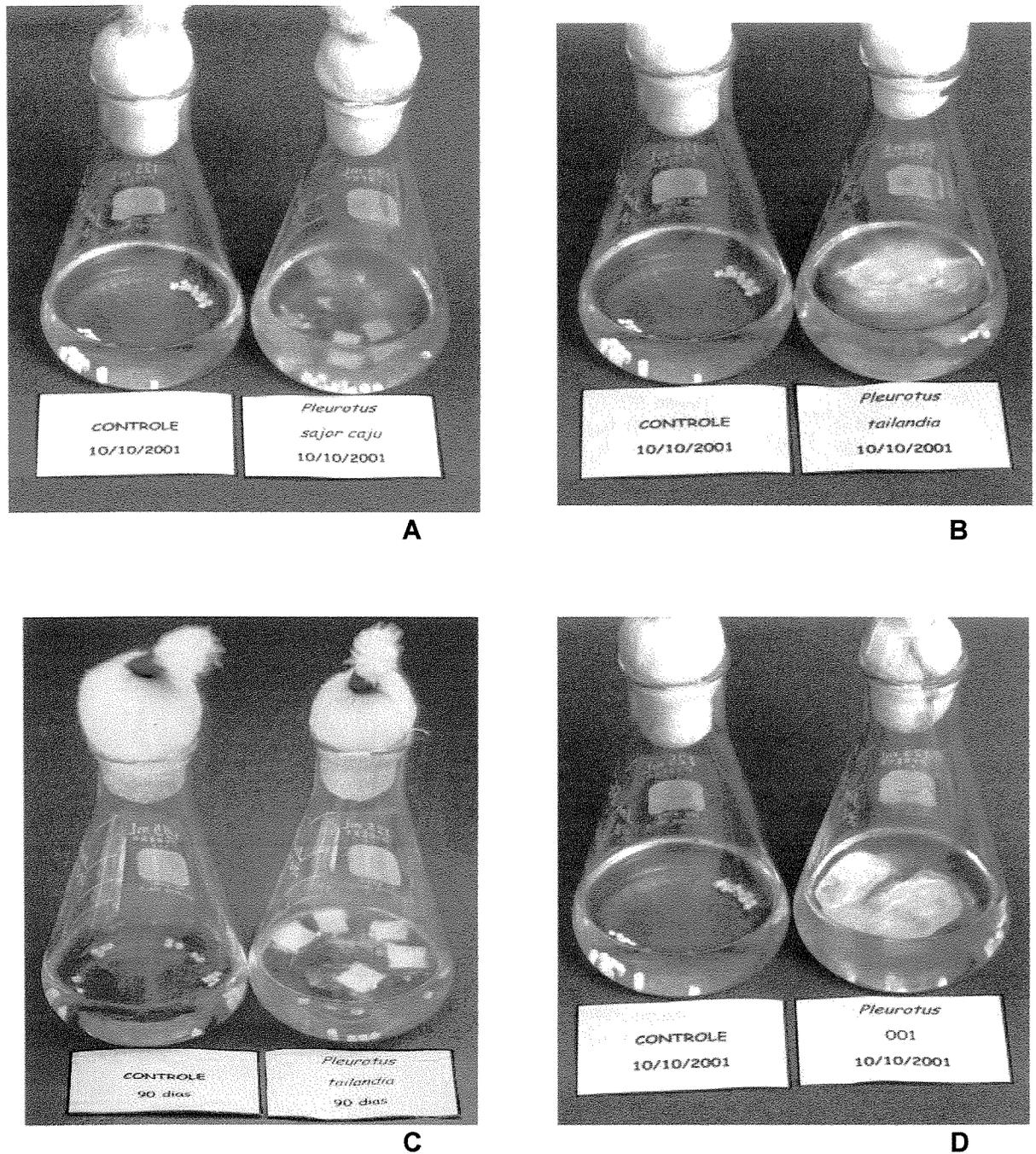


Figura 2.1. Crescimento fúngico em pellets de PET a 30°C em meio líquido de sais. A. *P. sajor caju* (30 dias); B. *P. thailandia* (30 dias); *P. thailandia* (90 dias); D. *Pleurotus* sp (P.001) (30 dias).

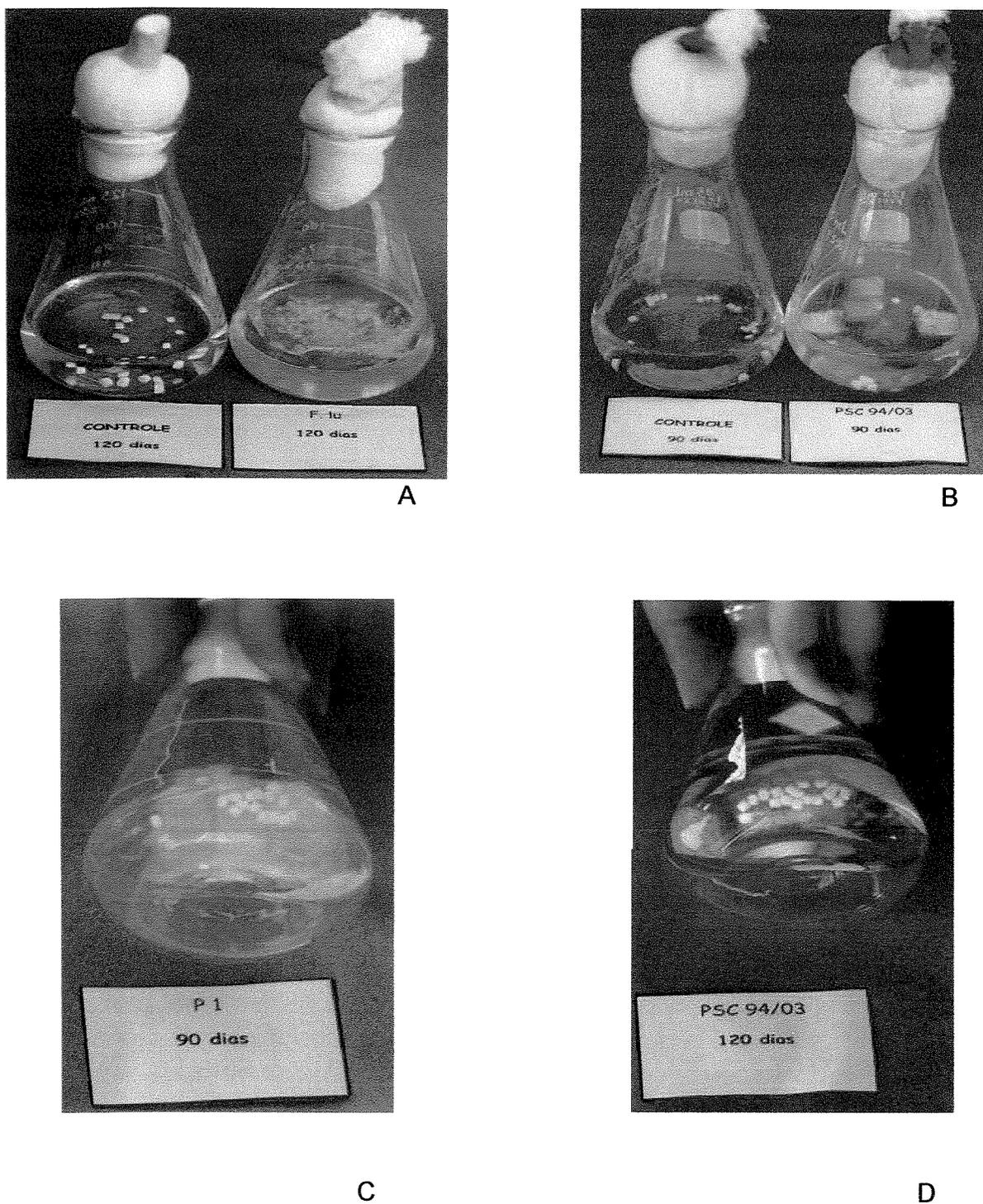


Figura 2.2. Crescimento fúngico em pellets de PET a 30°C em meio líquido de sais. A. Flu (120 dias); B. PSC 94/03 (90 dias); C. *Pleurotus* sp (P1) (90 dias); D. PSC 94/03 (120 dias).

## 5.2 Diminuição de massa do PET

Todas as amostras de PET apresentaram decréscimo em sua massa após incubação com as linhagens fúngicas nos períodos de 30, 60, 90 e 120 dias (Tabelas 2.4, 2.5 e 2.6).

Destacaram-se as linhagens *Pleurotus* 001 e *Agaricus campestris* no período de 30 dias de cultivo, conforme observado na Tabela 2.4, as quais promoveram maior diminuição de massa do plástico, atingindo, respectivamente, diminuição de 0,0146 g, correspondente a perda de 5,79%, e 0,0071g, equivalente a perda de 2,83% da massa inicial. Os resultados obtidos neste ensaio com *Pleurotus* 001 (diminuição de 5,79%), foram superiores aos apresentados por COSTA (2001) onde este causou diminuição de massa polimérica, em forma de filme, de 1,6%.

Com relação às massas fúngicas, a linhagem *Pleurotus* 001 apresentou também, juntamente com *Pleurotus tailandia*, os maiores valores de massa celular, 0,0097 g e 0,0083 g, respectivamente.

Pode-se verificar na Tabela 2.4, que ambos os fungos, *Phanerochaete chrysosporium* e *Pleurotus sajor caju*, apresentaram valores de massa fúngica de 0,0044 g, próximos ao apresentado por *Agaricus campestris* (0,0042 g), sem, contudo, promoverem significativa diminuição de massa do polímero, sendo estes resultados semelhantes aos apresentados por COSTA (2001).

Tabela 2.4. Diminuição de massa e % de diminuição de massa dos pellets de PET e massa fúngica após crescimento dos fungos em PET por 30 dias a 30°C.

MICROORGANISMOS	Dimin. massa PET (g)*	% dimin. massa PET*	Massa fúngica (g)*
<i>P. sajor caju</i>	0,0005	0,2%	0,0044
<i>P. tailandia</i>	0,0008	0,32%	<u>0,0083</u>
P.001	<u>0,0146</u>	<u>5,79%</u>	<u>0,0097</u>
<i>P. chrysosporium</i>	0,0012	0,48%	0,0044
<i>A. campestris</i>	<u>0,0071</u>	<u>2,83%</u>	0,0042
H2	0,0008	0,32%	0,0030
PSC 94/03	0,0013	0,52%	0,0016
P1	0,0015	0,6%	0,0007
F. lu	0,0005	0,2%	0,0028

\* resultados representam a média de 3 experimentos (triplicata).

Destacaram-se no período de incubação de 60 dias (Tabela 2.5), as linhagens *Pleurotus tailandia* e P1, as quais promoveram diminuição de massa polimérica de 0,0081 g e 0,0085 g respectivamente, correspondente a diminuição de 3,20% e 3,34% da massa inicial do plástico.

Observa-se na Tabela 2.5 que, de um modo geral, as porcentagens de perda de massa polimérica no período de cultivo de 60 dias foram altas em comparação com os demais períodos de crescimento (30, 90 e 120 dias), sendo a menor diminuição de massa inicial apresentada por *P. sajor caju*, com 1,75%.

Com relação as massas fúngicas crescidas no polímero PET, todas as linhagens apresentaram bons valores de crescimento micelial, sendo os fungos

*Pleurotus sajor caju* e Flu, os que apresentaram os maiores valores de massa celular, com 0,0096 g e 0,0093 g, respectivamente (Tabela 2.5).

Tabela 2.5. Diminuição de massa e % de diminuição de massa dos pellets de PET e massa fúngica após crescimento dos fungos em PET por 60 dias a 30°C.

MICROORGANISMOS	Dimin. massa PET (g)*	% dimin. massa PET*	Massa fúngica (g)*
<i>P. sajor caju</i>	0,0044	1,75%	<u>0,0096</u>
<i>P. tailandia</i>	0,0081	<u>3,20%</u>	0,0086
P.001	0,0057	2,27%	0,0080
<i>P. chrysosporium</i>	0,0068	2,69%	0,0075
<i>A. campestris</i>	0,0047	1,87%	0,0069
H2	0,0027	1,07%	0,0057
PSC 94/03	0,0055	2,18%	0,0080
P1	0,0085	<u>3,34%</u>	0,0079
F. lu	0,0066	2,61%	<u>0,0093</u>

\* resultados representam a média de 3 experimentos (triplicata).

No período de 90 dias de incubação (Tabela 2.6), as linhagens estudadas promoveram pequena diminuição de massa polimérica, com exceção do fungo *Phanerochaete chrysosporium* que promoveu a maior diminuição de massa em comparação as demais linhagens nos outros períodos de cultivo, com diminuição de 0,0170 g, correspondente a redução de 6,72% da massa inicial do PET.

Os fungos *Pleurotus tailandia*, PSC 94/03 e P1 apresentaram os melhores valores de massa celular crescida no período de 90 dias, com 0,0042 g, 0,0056 g e 0,0064 g, respectivamente.

Observa-se ainda na Tabela 2.6, que a linhagem H2, em comparação com os demais fungos, promoveu pouca diminuição de massa do PET, apresentando somente redução de 0,08% da massa inicial, sendo este o menor valor apresentado em todos os ensaios realizados.

Tabela 2.6. Diminuição de massa e % de diminuição de massa dos pellets de PET e massa fúngica após crescimento dos fungos em PET por 90 dias a 30°C.

MICROORGANISMOS	Dimin. massa PET (g)*	% dimin. massa PET*	Massa fúngica (g)*
<i>P. sajor caju</i>	0,0014	0,55%	0,0017
<i>P. tailandia</i>	0,0023	0,91%	<u>0,0042</u>
P.001	0,0012	0,47%	0,0039
<i>P. chrysosporium</i>	<u>0,0170</u>	<u>6,72%</u>	0,0009
<i>A. campestris</i>	0,0012	0,48%	0,0011
H2	0,0002	0,08%	0,0010
PSC 94/03	0,0004	0,16%	<u>0,0056</u>
P1	0,0010	0,40%	<u>0,0064</u>
F. lu	0,0014	0,55%	0,0035

\* resultados representam a média de 3 experimentos (triplicata).

As linhagens *Pleurotus sajor caju* e PSC 94/03 se destacaram por apresentar maior perda de massa do PET quando incubados no período de 120 dias, promovendo, respectivamente, redução de 0,0122 g, correspondente a perda de 4,82%, e 0,0104 g, equivalente a perda de 4,13% da massa inicial (Tabela 2.7).

Verificou-se também na Tabela 2.7, que as linhagens *P. sajor caju*, *Pleurotus* 001, *A. campestris* e PSC 94/03 foram as que apresentaram os maiores valores de massa celular crescida no polímero PET, com 0,0114 g, 0,0101 g, 0,0111 g e 0,0098 g de massa micelial, respectivamente.

Tabela 2.7. Diminuição de massa e % de diminuição de massa dos pellets de PET e massa fúngica após crescimento dos fungos em PET por 120 dias a 30°C.

MICROORGANISMOS	Dimin. massa PET (g)*	% dimin. massa PET*	Massa fúngica (g)*
<i>P. sajor caju</i>	0,0122	4,82%	0,0114
<i>P. thailandia</i>	0,0022	0,87%	0,0087
P.001	0,0062	2,47%	0,0101
<i>P. chrysosporium</i>	0,0075	2,98%	0,0079
<i>A. campestris</i>	0,0075	2,97%	0,0111
H2	0,0022	0,87%	0,0028
PSC 94/03	0,0104	4,13%	0,0098
P1	0,0051	2,02%	0,0083
F. lu	0,0024	0,95%	0,0063

resultados representam a média de 3 experimentos (triplicata).

### 5.3. Microscopia Eletrônica de Varredura

As amostras de PET submetidas à incubação com as linhagens fúngicas apresentaram morfologias distintas dos controles, conforme observa-se nas micrografias obtidas com a análise de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) (Figuras 2.3, 2.4 e 2.5) do polímero.

Verifica-se, na Figuras 2.3 B e 2.3 D, modificações na superfície do PET, após a retirada da massa celular da linhagem *Pleurotus* sp (PSC 94/03), em comparação aos controles (Figuras 2.3 A e 2.3 C) que apresentam superfície com maior grau de uniformidade. Observa-se uma densa rede de filamentos do fungo recobrindo o polímero, onde a superfície adquire aspectos quebradiços (Figura 2.3 E), e as hifas penetram na estrutura do pellet (Figura 2.3 F). A linhagem PSC 94/03, no período de 120 dias incubação, promoveu diminuição de massa do PET de 4,13%, e destacou-se na produção da enzima Lignina Peroxidase (Capítulo 3, item 5.1.2, página 69), em meio de sais, e da enzima Manganês Peroxidase (Capítulo 3, item 5.2.3, página 77), em meio contendo farelo de trigo.

Nas Figuras 2.4 B e 2.4 D, verificamos que o PET sofreu grande desgaste da superfície polimérica, quando comparadas com os controles (Figuras 2.4 A e 2.4 C) após a retirada da massa fúngica de *Pleurotus sajor caju*, com descamações e rupturas na superfície. Observa-se, nas Figuras 2.4 E e 2.4 F, o crescimento de *P. sajor caju*, recobrindo e aderindo-se à superfície do PET. O fungo destacou-se na diminuição de massa do PET (4,82%), em 120 dias de crescimento, na produção da enzima Lacase em meio de sais (Capítulo 3, item 5.1.1, página 67), e na produção de biosurfactante emulsão água/óleo (Capítulo 3,

item 5.4, página 81) e enzima Lignina Peroxidase (Capítulo 3, item 5.2.2, página 75) em meio contendo farelo de trigo.

O crescimento de *Phanerochaete chrysosporium* no PET pode ser observado nas Figuras 2.5 C, 2.5 D, 2.5 E e 2.5 F, com uma densa rede de hifas e esporos, recobrando e aderindo-se à superfície do pellet. Na Figura 2.5 B, verificamos alterações provocadas pelo fungo no substrato polimérico, em comparação ao controle apresentado na Figura 2.5 A, observando-se grande desgaste da superfície polimérica. O *P. chrysosporium* destacou-se como a linhagem que promoveu a maior diminuição de massa do PET, 6,72% em 90 dias de incubação, estando entre os melhores produtores da enzima Lacase em meio de sais (Capítulo 3, item 5.1.1, página 67) e meio contendo farelo de trigo (Capítulo 3, item 5.2.1, página 74).

Verifica-se nas Figuras 2.6 A, 2.5 B, 2.5 C e 2.5 D o crescimento de *Pleurotus* sp (P1), com grande quantidade de hifas aderidas à superfície, envolvendo o pellet de PET. Observa-se, na Figura 2.5 D, a presença de estruturas características de basidiomicetos, denominados grampos de conexão. A linhagem P1 destacou-se na diminuição de massa do PET em 60 dias de incubação (3,34%), na produção da enzima Lacase em meio de sais (Capítulo 3, item 5.1.1, página 67) e na produção de biosurfactante emulsão óleo/água em meio de sais (Capítulo 3, item 5.3, página 79) e emulsão água/óleo em meio contendo farelo de trigo (Capítulo 3, item 5.4, página 81). Na Figura 2.5 E e 2.5 F observa-se a um denso micélio da linhagem *Pleurotus* sp (P.001) aderida ao PET, verificando-se, na Figura 2.5 F, que o polímero apresenta descamações e

rupturas em sua superfície. O fungo P.001, em 30 dias de incubação, promoveu diminuição de massa do PET de 5,79%, destacando-se na produção da enzima lacase (Capítulo 3, item 5.1.1, página 67) e de biosurfactantes emulsão água/óleo (Capítulo 3, item 5.3, página 79) em meio de sais.

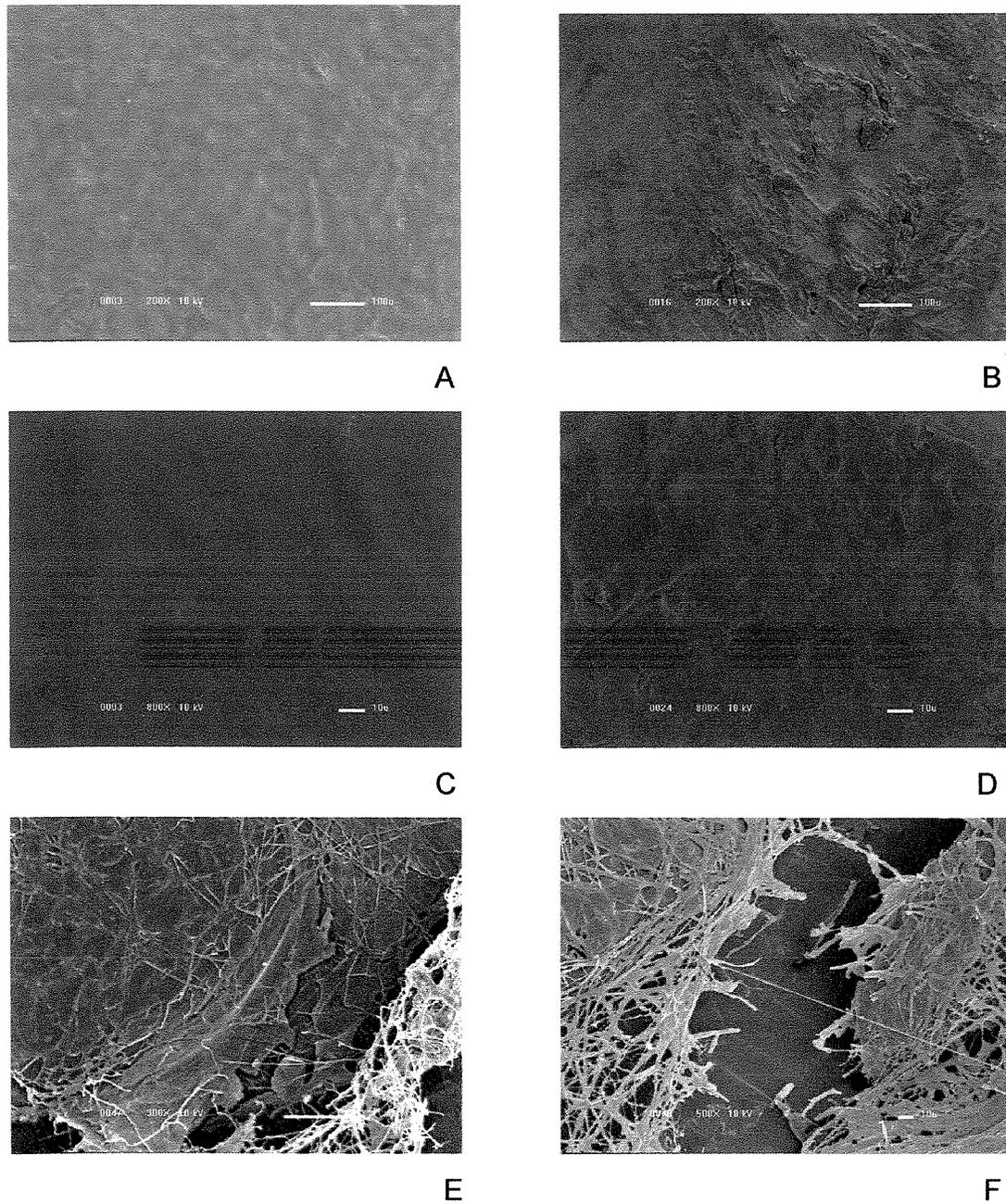


Figura 2.3. Fotomicrografias do polímero PET e fungo PSC 94/03 por MEV. A. controle – 200x; B. PET após retirada da massa fúngica – 200x; C. controle – 800x; D. PET após retirada da massa fúngica – 800x; E. PET e PSC 94/03 – 300x; F. PET e PSC 94/03 – 500x.

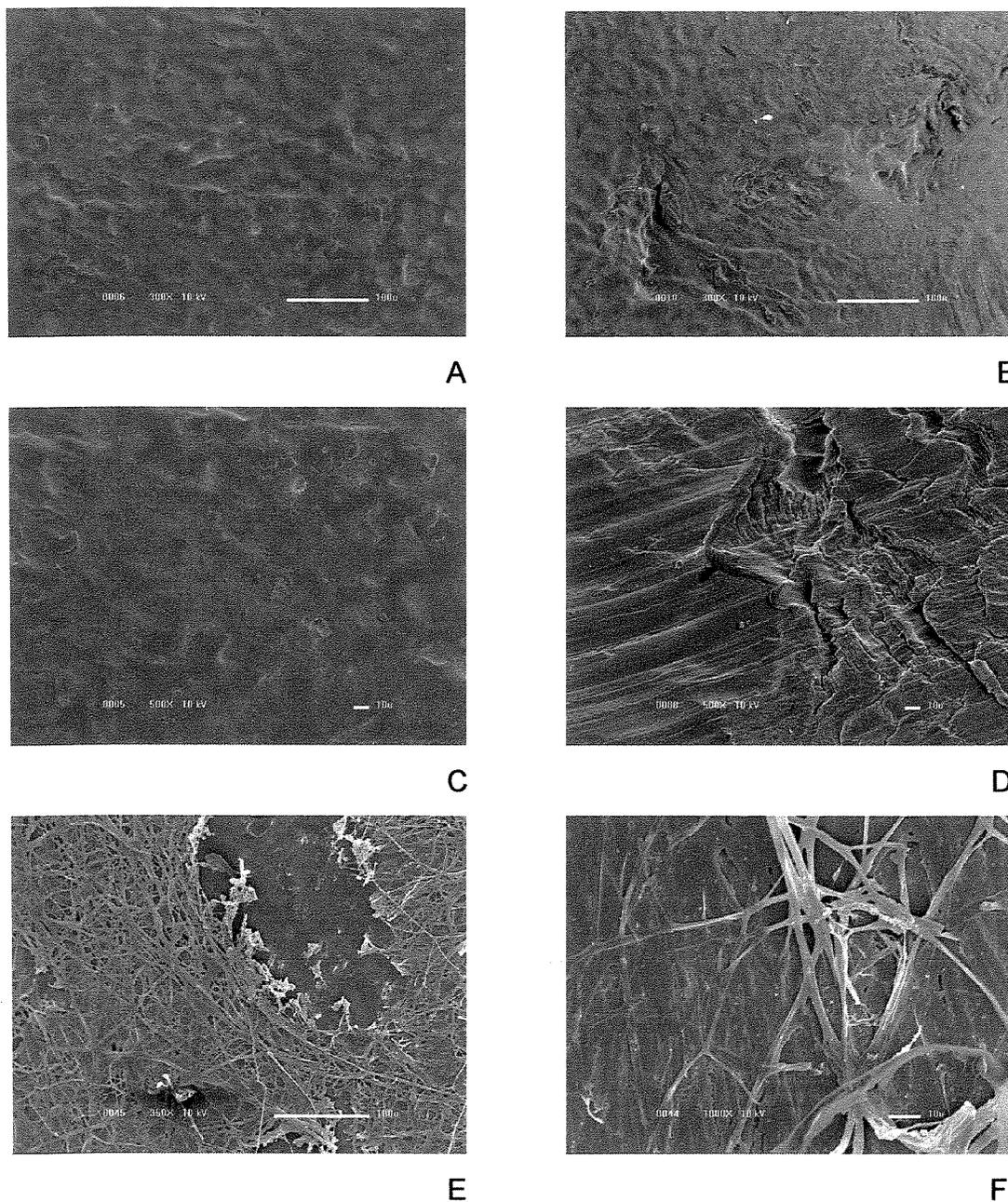


Figura 2.4. Fotomicrografias do polímero PET e fungo *Pleurotus sajor caju* por MEV. A. controle – 300x; B. PET após retirada da massa fúngica – 300x; C. controle – 500x; D. PET após retirada da massa fúngica – 500x; E. PET e *Pleurotus sajor caju* – 350x; F. PET e *Pleurotus sajor caju* – 1000x.

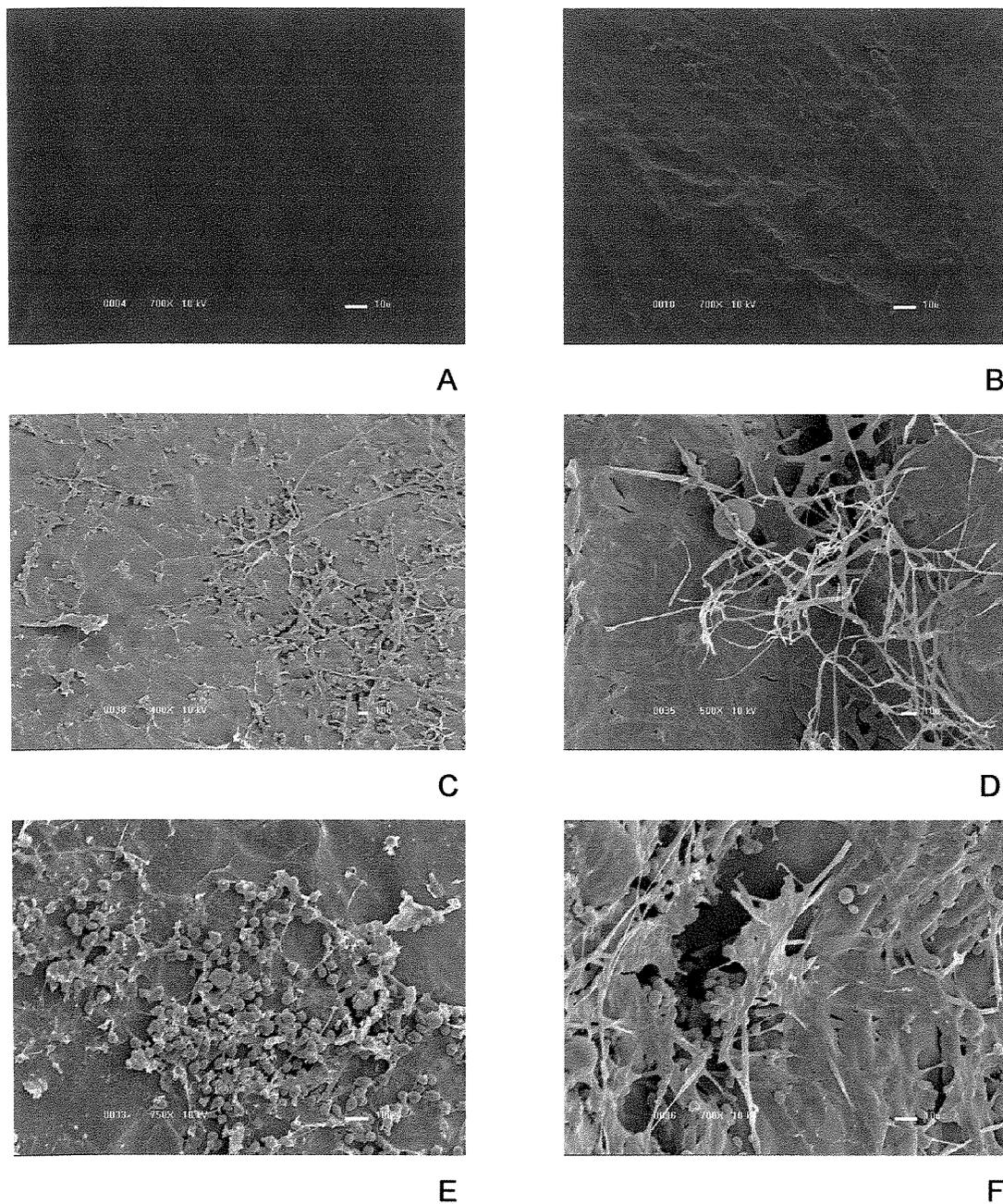


Figura 2.5. Fotomicrografias do polímero PET e fungo *P. chrysosporium* por MEV. A. controle – 700x; B. PET após retirada da massa fúngica – 700x; C. PET e *P. chrysosporium* – 400x; D. PET e *P. chrysosporium* – 500x; E. PET e *P. chrysosporium* – 750x; F. PET e *P. chrysosporium* – 700x.

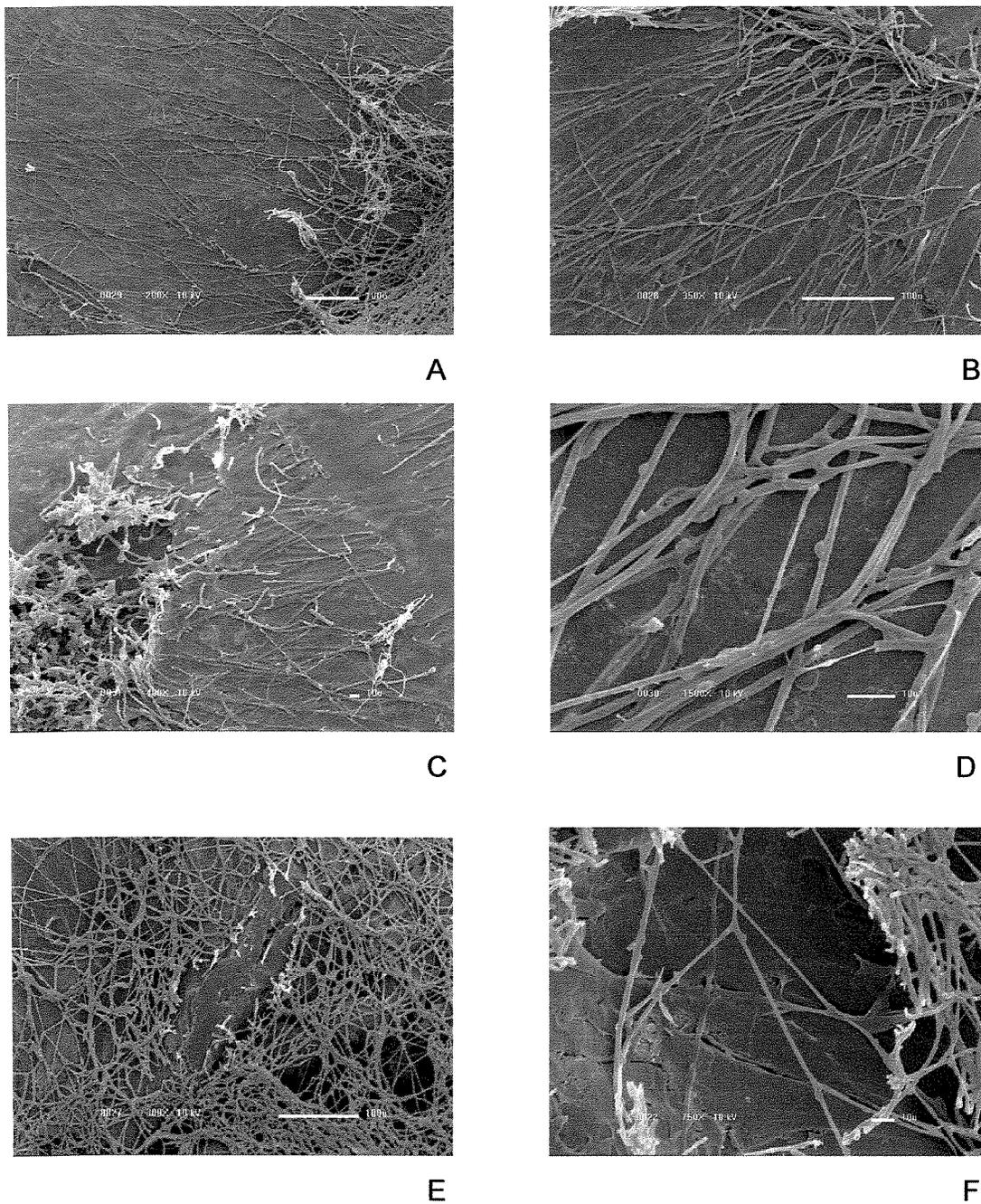


Figura 2.6. Fotomicrografias do polímero PET e fungos *Pleurotus* sp (P1 e P.001) por MEV. A. PET e P1 – 200x; B. PET e P1 – 350x; C. PET e P1 – 400x; D. PET e P1 – 1500x; E. PET e P.001 – 350x; F. PET e P.001 – 750x.

## 6. CONCLUSÕES

➤ De uma maneira geral, as linhagens utilizadas neste trabalho apresentaram crescimento micelial e também foram capazes de diminuir a massa molar do PET;

➤ Os fungos apresentaram crescimento micelial classificados como nível 3 (30-60%) segundo normas da ASTM, com exceção de *P. chrysosporium* e *A. campestris* que obtiveram classificação 2 (10-30%) e H2 com classificação 1 (<10%) após 120 dias de incubação;

➤ As linhagens que ocasionaram maior porcentagem de perda de massa do PET foram: *Phanerochaete chrysosporium* em 90 dias de incubação, com redução de 6,72%, *Pleurotus* 001 com 5,79% em 30 dias e *P. sajor caju* com 4,82% e PSC 94/03 com 4,13% em 120 dias de cultivo;

➤ O fungo que apresentou a menor perda de massa de PET foi a linhagem H2 com 0,08% em 90 dias de incubação.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTSSON, A. C. & HUANG, S. J. **Degradable Polymers, Recycling, and Plastics Waste Management**. New York, Marcel Dekker, Inc., 1995. 317 p.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS – ASTM. Standard Practice for determining resistance of plastics to Bacteria, G22 – 76, 1990.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS – ASTM. Standard Practice for determining resistance of plastics to Fungi, G21 – 90, 1990.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS – ASTM. Standard Test Method for Aerobic Biodegradability of degradable plastics by specific microorganisms, D5247 – 92, 1992.

AKUTSU, Y., NAKAJIMA-KAMBE, T., NOMURA, N. & NAKAHARA, T. Purification and properties of a polyester polyurethane – degrading enzyme from *Comamonas acidovorans* TB-35. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 64. n. 1, p. 62 – 67, 1998.

**BAL-TEC Preparation Technology for Electron Microscopy** – Catalogue N. 5 A-Systems and Devices. Liechtenstein: Bal-Tec AG, 1999.

CHANDRA, R. & RUSTGI, R. Degradable Polymers. **Prog. Polym. Sci.**, v. 23, p. 1273 – 1335, 1998.

CLEMENTE, A. R. & DURRANT, L. R. **Degradação de Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos por Fungos**. Tese (Doutorado) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas- SP, 2002.

COSTA, K. C. F. & DURRANT, L. R. **Estudo da degradação de polímeros sintéticos de importância industrial por linhagens fúngicas**. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, Universidades Estadual de Campinas, Campinas – SP, 2001.

EL-SAYED, A. H. M. M., MAHMOUD, W. M., DAVIS, E. M. & COUGHLIN, R. W. Biodegradation of polyurethane coatings by hydrocarbon-degrading bacteria. **Int. Biodet. Biodeg.** p. 69 – 79, 1996.

FRANCHETTI, S. M.M., NICOLETI, J. & RODRIGUES, M. L. B. O. Biotransformação de filmes de PVC por fungos basidiomicetos. **II Reunião Nacional de Microbiologia Aplicada ao Meio Ambiente**, UFSC – Florianópolis, 12-15 out., 1998.

HOWARD, G. T. & BLAKE, R. C. Growth of the *Pseudomonas fluorescens* on a polyester-polyurethane and the purification and characterization of a polyurethanase-protease enzyme. **Int. Biodet. Biodegr.** v. 42, p. 231 – 220, 1998.

LANG, E., NERUD, F., ZADRAZIL, F. Production of Ligninolytic Enzymes by *Pleurotus* sp and *Dichomitus squalens* in Soil and Lignocellulose Substrate as Influence by Soil Microorganisms. **FEMS Microb. Lett.**, v. 167, p. 239 – 244, 1998.

LEE, B., POMETTO III, A. L., FRATZKE, A. & BAILEY JR., T. B. Biodegradation of degradable plastic polyethylene by *Phanaerochaete* and *Streptomyces* species. **Appl. Envirom. Microb.** v. 57, n. 3, p. 678 – 685, 1991.

MÜLLER, R. J., KLEEBERG, I., DECKWER, W. D. Biodegradation of polyesters containing aromatic constituents. **J. of Biotech.**, v. 86, p. 87 – 95, 2001.

NAKAJIMA-KAMBE, T., ONUMA, F., AKUTSU, Y. & NAKAHARA, T. Determination of the polyester polyurethane breakdown products and distribution of the polyurethane degrading enzyme of *Comamonas acidovorans* strain TB-35. **J. Ferm. Bioeng.**, v. 83, n. 5, p. 456 – 460, 1997.

NEVES, E. B. & DURRANT, L. R. **Degradação de Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos por Bactérias**. Tese (Doutorado) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas – SP, 2002.

O’SULLIVAN, C. Mechanisms of Pollutant Degradation by White Rot Fungi. **Appl. Catal B: Environm.**, v. 5, issue: 1-2, p. n3 – n5, 1994.

PAVARINA, E. C. & DURRANT, L. R. **Fungos Microaeróbios na bioconversão de material lignocelulósico**. Tese (Doutorado) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas – SP, 2002.

PENDRYS, J. P. Biodegradation of asphalt cement-20 by aerobic bacteria. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 55, n. 6, p. 1357 – 1362, 1989.

SANTERRE, J. P., LABOW, R.S. & ADAMS, G.A. Enzyme-biomaterial interactions: Effect of biosystems on degradation of polyurethanes. **J. Biom. Mat. Res.**, v. 27. p. 97 – 109, 1993.

SCHANABEL, W. **Polymer Degradation – Principles and Practical Applications**. 1<sup>a</sup>ed. New York: Macmillan Publishing Co, New York, 1981. 177p.

# *Capítulo 3*

*Produção de enzimas ligninolíticas e  
biosurfactantes na presença de  
polietileno tereftalato (PET)*

**RESUMO**

Foram estudadas nove linhagens de fungos basidiomicetos de decomposição branca, *Pleurotus sajor caju*, *Pleurotus tailandia*, *Pleurotus* sp (P.001), *Phanerochaete chrysosporium*, *Agaricus campestris*, *Pleurotus* sp (P1), *Pleurotus* sp (PSC 94/03), Flu e H2, cultivadas em meio líquido de sais contendo pellets de polietileno tereftalato (PET), e em meio de cultura contendo farelo de trigo com pellets de PET, determinando-se as enzimas ligninolíticas lacase, lignina peroxidase (LiP) e manganês peroxidase (MnP) e a produção de biosurfactantes.

Todas as linhagens produziram, pelo menos, uma das enzimas estudadas, em ambos os meios de cultivo testados, sendo a enzima manganês peroxidase a que apresentou os maiores valores de atividade enzimática com o fungo *Agaricus campestris* no período de crescimento de 120 dias em meio líquido, e PSC 94/03 em 90 dias de incubação em meio contendo farelo de trigo.

Observou-se que a melhor atividade de biosurfactante (emulsão óleo/água), foi produzida pela linhagem *Pleurotus tailandia* após crescimento em meio líquido por 120 dias. *Pleurotus* 001 produziu a melhor atividade de emulsão água/óleo após 120 dias de cultivo. Nos ensaios realizados em meio contendo farelo de trigo, o fungo Flu apresentou a melhor produção de emulsão óleo/água em 30 dias de incubação e PSC 94/03 a melhor emulsão água/óleo em 60 dias de crescimento.

**ABSTRACT**

Nine white-rot fungal strains, *Pleurotus sajor caju*, *Pleurotus tailandia*, *Pleurotus* sp (P.001), *Phanerochaete chrysosporium*, *Agaricus campestris*, *Pleurotus* sp (P1), *Pleurotus* sp (PSC 94/03), Flu e H2, were cultivated either in mineral liquid medium or wheatbran water medium, containing pellets of PET. The production of the ligninolytic enzymes laccase, lignin peroxidase (LiP) and manganese peroxidase (MnP), and the production of biosurfactantes were investigated.

All the strains produced at least one of the enzymes under both culture conditions. *Agaricus campestris* presented the highest levels of Manganese Peroxidase activities in 120 days of incubation in liquid medium, and PSC 94/03 after 90 days of incubation in solid medium.

The best production of biosurfactant activities was observed following growth of *Pleurotus tailandia* (oil/water emulsion) and of *Pleurotus* 001 (water/oil emulsion) both in liquid medium for 120 days. Following growth in solid medium the best oil-in-water emulsion was produced by the strain Flu after 30 days and PSC 94/03 produced the best water-in-oil emulsion after 60 days of growth.

## 1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a utilização de fungos de decomposição branca em estratégias da biorremediação tem obtido êxito na pesquisa devido à sua capacidade em mineralizar uma grande variedade de compostos altamente tóxicos encontrados no meio ambiente (WU et al, 1996). Estes microrganismos degradam um amplo espectro de poluentes através de seu sistema enzimático extracelular, que possui características oxidativas e inespecíficas. As enzimas mais estudadas atualmente são: lacase, lignina peroxidase e manganês peroxidase (TUOMELA, et al., 2000), que atuam na degradação da lignina, uma macromolécula estrutural encontrada nas paredes celulares de plantas, com estrutura complexa e presença de anéis aromáticos e ligações de difícil degradação.

O Polietileno Tereftalato (PET) é um polímero sintético que tem sido muito utilizado na área de embalagens alimentares, especialmente na de bebidas gaseificadas, apesar da maior parte da demanda mundial deste plástico ainda estar relacionada à aplicação de fibras (EDGE et al, 1996). O grande consumo deste materiais pela sociedade atual tem gerado dúvidas de como estes produtos sintéticos podem retornar ao meio ambiente sem causarem maiores danos (HEYDE, 1998), pois quando descartados inadequadamente, permanecem inalterados por um longo período de tempo.

## **2. OBJETIVOS**

Esta etapa do trabalho teve como objetivo avaliar a produção de enzimas ligninolíticas e de biosurfactantes pelas linhagens fúngicas crescidas em meio de cultura líquido de sais e pellets de PET e meio de cultura contendo farelo de trigo e pellets de PET.

## **3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **3.1. Características gerais de fungos de decomposição branca**

Os fungos de decomposição branca são os principais degradadores de lignina na natureza. Existem inúmeras espécies de fungos de decomposição branca, sendo a maioria destas Basidiomycotina, seguidas por algumas Ascomycotina (ERIKSON et al., 1990). A degradação da lignina por fungos de decomposição branca é mais rápida do que a causada por outros microrganismos, sendo estes os responsáveis pela maioria da decomposição da lignina na natureza (KIRK & FARRELL, 1987; TUOMELA, et al., 2000). Sendo a degradação da lignina um processo complexo, as enzimas produzidas possuem, provavelmente, efeito sinérgico entre si (TUOMELA, et al., 2000).

Fungos de decomposição branca são também objeto de considerável atenção devido a sua capacidade de degradar poluentes tóxicos. Uma vez que a lignina contém uma variedade de ligações que estão comumente presentes em poluentes aromáticos e sendo o sistema degradativo destes fungos inespecífico e

oxidativo, muitos laboratórios tem estudado tais fungos como um agente potencial na biorremediação (BUMPUS e AUST, 1987 e HAMMEL, 1989).

### **3.2. Enzimas Ligninolíticas produzidas por fungos**

Fungos de decomposição branca são capazes de degradar lignina, o polímero estrutural existente nas plantas, a partir de um sistema enzimático produzido durante o metabolismo secundário. As enzimas ligninolíticas produzidas pertencem a duas famílias de isoenzimas, chamadas de lignina peroxidase (LiP) e manganês peroxidase (MnP) (WU, 1996). Nos anos 80 o principal objetivo foi definir as condições laboratoriais destes microrganismos, especialmente o fungo *Phanaerochaete chrysosporium*, para a máxima mineralização da lignina (HATAKKA, 1994).

A mineralização completa da lignina pelos microrganismos requer dois processos importantes: a hidrólise do polímero e clivagem do anel do núcleo aromático. A biodegradação da lignina é um processo oxidativo, no entanto, o metabolismo dos fragmentos de lignina envolve uma combinação de reações de oxido-redução (SCHOEMAKER, 1990).

Devido à natureza e tamanho da molécula de lignina, as enzimas responsáveis pelo ataque inicial precisam ser extracelulares e não-específicas. As enzimas extracelulares melhores estudadas, produzidas por estes fungos, são: lignina peroxidase (LiP), manganês peroxidase (MnP), e lacase. O papel de LiP e MnP na degradação da lignina tem sido verificado, enquanto que outras enzimas são, ainda, incertas. Diferentes fungos de decomposição branca produzem diferentes combinações de enzimas: existem os produtores de LiP e MnP, outros

que produzem MnP e lacase, fungos que produzem LiP e lacase, e ainda os que não produzem LiP nem MnP, mas sim lacase e álcool aril oxidase (AAO), ou ainda outras enzimas (TUOMELA, et al., 2000).

### **3.2.1. Lignina Peroxidase (LiP)**

Algumas Peroxidases extracelulares específicas, conhecidas como lignina peroxidase (LiP), estão envolvidas no processo *in vivo* da despolimerização da lignina (FRÍAS, et al., 1995).

A descoberta da LiP foi fundamental no entendimento do mecanismo de degradação da lignina. O álcool veratrílico tem sido o substrato escolhido para a determinação da LiP, onde, neste método, a LiP catalisa a transformação do álcool veratrílico a veratraldeído, que possui maior absorbância a 310nm (ARORA & GILL, 2001).

A LiP, isolada em 1983 por TIEN e KIRK e GLENN e GOLD, é uma glicoproteína que contém ferro como grupo prostético, sendo dependente de peróxido de hidrogênio para a sua atividade (KIRK e FARREL, 1987; BOOMINATHAN et al., 1992).

A LiP catalisa uma variedade de compostos modelo de lignina não fenólicos (KIRK e FARREL, 1987, SCHOEMAKER et al., 1990) bem como a lignina sintética (HAMMEL et al., 1991).

### **3.2.2. Lacase (Lac)**

A lacase é uma glicoproteína que contém cobre no seu sítio ativo, e catalisa o transporte de quatro elétrons de oxigênio para água. A lacase é dependente de

quatro íons de cobre distribuídos entre três diferentes sítios de ligação, possuindo, cada íon, importante função no mecanismo de catálise (YOUN, et al., 1995).

As lacases são muito difundidas na natureza, sendo produzidas por fungos ou plantas, podendo oxidar, desmetilar, polimerizar ou despolimerizar compostos fenólicos. Em plantas, tem sido associadas com lignificação. Em fungos, por outro lado, estão associadas à degradação de lignina. Lacase fúngica oxida fenóis e subestruturas de lignina fenólica (THURSTON, 1994). Seu potencial ligninolítico tem sido utilizado em processos de branqueamento e despolpação, aperfeiçoando a digestão de substratos lignocelulósicos e removendo os componentes fenólicos de efluentes, sucos de uva e frutas e vinhos (ARORA & GILL, 2001).

### **3.2.3. Manganês Peroxidase (MnP)**

A peroxidase extracelular mais comumente encontrada, produzida por fungos de decomposição branca, é a manganês peroxidase (MnP) uma glicoproteína que atua como isoenzimas, oxidando diretamente Mn(II) a Mn(III), que é quelado por ácidos orgânicos, como o oxalato (MESTER & FIELD, 1997).

A MnP foi isolada em culturas de *P. chrysosporium* em 1984 por KUWAHARA et al (1984). A maioria de suas propriedades estruturais assemelha-se a LiP. É uma glicoproteína com ferro como grupo prostético, dependente de peróxido de hidrogênio para a sua atividade (GLENN e GOLD, 1985, GOLD et al., 1989). A enzima é produzida simultaneamente com a LiP, durante o metabolismo secundário, e é regulada pelas concentrações de carbono e nitrogênio no meio de cultura (BUSWELL e ODIER, 1987).

A MnP é conhecida por oxidar vários fenóis, componentes de lignina fenólica e clorofenóis. Recentemente, também foi demonstrado a oxidação de componentes de lignina não-fenólica e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos na presença de co-oxidantes (lipídeos insaturados) ou organossolventes (acetona) por estas enzimas. Considerada como um biocatalisador potencial na biotecnologia ambiental, é produzida por diferentes fungos de decomposição branca, e tem sido utilizada na remediação de solos contaminados, descoloração de dejetos, despolpação e processos de branqueamento (MESTER & FIELD, 1997).

### **3.3. Produção de Biosurfactantes**

Componentes de superfície ativa de origem microbiana, os biosurfactantes, têm obtido muita atenção nos últimos anos devido à sua função no crescimento de microrganismos em compostos insolúveis, materiais hidrofóbicos como hidrocarbonetos ou outros substratos lipofílicos. Os biosurfactantes constituem um grupo diverso de biomoléculas que possuem as mesmas propriedades dos surfactantes sintéticos e, em alguns casos, produzem microemulsões água-óleo ou óleo-água superiores aos sintéticos (ASHTAPUTRE, *et al.*, 1995). Devido à sua biodegradabilidade e a produção a partir de fontes de energia renováveis, os biosurfactantes têm tido notoriedade. Seu sucesso tem sido constantemente relatado em aplicações como derramamento de óleos, remediação de solos ou águas contaminados com metais, ou aumento do restabelecimento do estado natural do ambiente. Os biosurfactantes possuem a propriedade de reduzir a tensão superficial, a concentração crítica micelar e a tensão interfacial, assim

como, a estabilização de emulsões em ambas as soluções de água e hidrocarbonetos (HOMMEL, 1990). Suas propriedades de surfactantes e emulsificantes resultam da presença das duas regiões, uma hidrofílica e outra hidrofóbica, na mesma molécula (FIECHTER, 1992).

A produção dos biosurfactantes em meios de cultura é, muitas vezes, considerada pré-requisito para interações entre hidrocarbonetos e células microbianas, podendo aumentar a acessibilidade do polímero insolúvel aos microrganismos (HOMMEL, 1990), tornando-os mais hidrofílicos, facilitando, assim, a atuação das enzimas produzidas e excretadas ao meio aquoso.

## **4. METODOLOGIA**

### **4.1. Crescimento dos microrganismos**

#### **4.1.1. Microrganismos e Preparo dos inóculos**

As linhagens fúngicas utilizadas e a preparação dos inóculos para os ensaios estão previamente descritos nos itens 4.1.1. e 4.1.2. página 21, Capítulo 2.

#### **4.1.2. Meio de Cultura Líquido**

O meio líquido utilizado está descrito no Capítulo 2, item 4.1.3, página 22.

#### **4.1.3. Meio de Cultura contendo farelo de trigo**

Foi utilizado farelo de trigo (1:4) em água destilada como meio de cultivo para o crescimento das linhagens fúngicas (CLEMENTE, 2002).

#### **4.2. Polímero utilizado**

O polímero sintético que foi utilizado nos ensaios foram pellets cilíndricos de 3mm de diâmetro e 2mm de altura de Polietileno Tereftalato, resina PET Rhodia S80, doados pela Divisão de Embalagens da Alcoa Alumínio S. A., Queimados – RJ.

#### **4.3. Desinfecção dos PETS**

A desinfecção dos pellets de PET, assim como a Solução Desinfetante Universal utilizada durante este procedimento, estão previamente descritos nos itens 4.3. e 4.3.1., respectivamente, do Capítulo 2 nas páginas 22 e 23.

#### **4.4. Crescimento em meio líquido das linhagens fúngicas na presença de PET**

Este teste foi realizado em frascos Erlenmeyers de 125 mL nos quais foram adicionados 50 mL do meio de crescimento de sais e autoclavados a 121°C por 15 min. Após autoclavagem, em câmara de fluxo laminar, adicionou-se aproximadamente 0,25g de pellets de PET já desinfetados.

Os fungos previamente crescidos em placas de Petri contendo BDA foram inoculados em câmara de fluxo laminar, na proporção de 1 cm<sup>2</sup> de micélio para cada 10 mL do meio de cultura líquido (CLEMENTE, 2002; PAVARINA, 2002).

A incubação foi feita em estufas a 30°C, sem agitação, por períodos de 30, 60, 90 e 120 dias. Após incubação, as amostras foram filtradas em lã de vidro e uma alíquota do caldo de cultura foi transferida a frascos âmbar, para análises de atividades enzimáticas e de produção de biosurfactantes.

Todos os experimentos foram realizados em triplicata, incluindo os ensaios controle bióticos e abióticos.

#### **4.5. Crescimento das linhagens fúngicas em farelo de trigo e PET**

Este ensaio foi realizado em frascos Erlenmeyers de 300 mL nos quais foram adicionados 5 g de farelo de trigo e 20 mL de água destilada (1:4) autoclavados duas vezes a 121°C por 15 min. As linhagens fúngicas foram inoculadas na proporção de 1 cm<sup>2</sup> de micélio para cada 1g de farelo de trigo, e incubadas por 7 dias a 30°C.

Após este período, adicionou-se aos frascos, em câmara de fluxo laminar, aproximadamente 50g de pellets de PET, já desinfetados, e 10 mL de água destilada estéril homogeneizando esta mistura com o auxílio de bastões de vidro estéreis. Incubou-se em estufas à 30°C, sem agitação, por períodos de 30, 60 e 90 dias. Após incubação, foram adicionados às amostras 50 mL de água destilada e centrifugadas a 9.000 rpm à 5°C durante 20 minutos. Uma alíquota do caldo foi transferida para frascos âmbar, para análises de atividades enzimáticas e de biosurfactantes.

Todos os experimentos foram realizados em triplicata, incluindo os ensaios controle bióticos e abióticos.

#### **4.6. Determinação das atividades enzimáticas**

Ensaio de determinação das atividades das enzimas ligninolíticas foram realizadas para todas as linhagens de fungos filamentosos. As enzimas analisadas foram avaliadas através da sua atividade enzimática, que representa a quantidade

de substrato transformado (ou produto formado) por unidade de tempo. Em 1961, foi estabelecida uma unidade enzimática (U), mais tarde denominada como Unidade Internacional (UI), como a quantidade da enzima que transforma 1  $\mu\text{mol}$  de substrato por minuto sob condições específicas (PALMER, 1985). Todas as atividades enzimáticas analisadas foram expressas em UI/Lmin.

#### **4.6.1. Atividade da lacase**

Esta atividade foi determinada na ausência de  $\text{H}_2\text{O}_2$  exógeno no meio da reação. A mistura de reação para determinar esta atividade foi constituída de: 0,6mL de caldo; 0,2 mL de tampão citrato-fosfato 0,05 M (pH 3,0); 0,1 mL de siringaldazina 1,0 mM em etanol ( $\epsilon$  525 = 65.000 1/M x cm). Para o preparo da amostra controle (branco) substituiu-se o caldo por água destilada. As leituras foram feitas em 525 nm, durante 10 minutos (PALMER, 1985).

#### **4.6.2. Atividade da lignina peroxidase**

Esta atividade foi determinada pela oxidação do álcool veratrílico ( $\epsilon$  310 = 9.300 1/M x cm). A mistura da reação foi composta de 0,6 mL de caldo, 0,2 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  mM e 0,2 mL de solução de álcool veratrílico 2,0 mM em tampão tartarato de sódio 0,4 M (pH 3,0). A reação foi iniciada pela adição de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e o aparecimento do aldeído veratrílico foi determinado lendo-se a absorbância a 310 nm (BUSWELL e ERIKSSON, 1994).

#### 4.6.3. Atividade da manganês peroxidase

Esta atividade foi quantificada pela oxidação do vermelho de fenol ( $\epsilon_{610} = 4.460 \text{ l/M} \times \text{cm}$ ), na presença de manganês e peróxido de hidrogênio. A mistura da reação foi composta de 0,5mL de caldo filtrado; 0,1mL de lactato de sódio 0,25M; 0,05 mL de  $\text{MnSO}_4$  2,0mM; 0,2mL de albumina bovina 0,5%; 0,1mL de vermelho de fenol 0,1%; 0,05mL de peróxido de hidrogênio 2,0mM em tampão succinato 0,2M (pH 4,5). A mistura foi mantida a 30°C durante 5 minutos, sendo a reação da formação do cromóforo finalizada pela adição de 0,04mL de NaOH 2,0 mol.L<sup>-1</sup>.

Após a adição do NaOH, a absorbância foi determinada em 610nm. A preparação do branco foi feita de maneira semelhante, sendo o caldo substituído por água destilada (SUTHERLAND, 1992).

#### 4.7. Análise da produção de biosurfactantes

As atividades de biosurfactantes foram determinadas através de agitação vigorosa de tubos contendo 3,5mL do caldo de cultura e 2,0 mL de hidrocarboneto (tolueno) em agitador de tubos (Vortex) durante 1 minuto. Após uma hora em repouso, a densidade óptica da emulsão óleo em água foi determinada a 610nm. A densidade óptica foi relatada como atividade de emulsificação (JOHNSON, *et al.*, 1992). Após 24 horas, a coluna de emulsão água em óleo foi quantificada, e a atividade de emulsificação foi expressa em centímetros (cm) (COOPER, e GOLDENBERG, 1987).

## 5. RESULTADOS e DISCUSSÃO

### 5.1. Atividades Enzimáticas em meio líquido

Os fungos estudados produziram pelo menos uma das enzimas ligninolíticas determinadas (Lac, LiP ou MnP) nos períodos de 30, 60, 90 e 120 dias de incubação.

#### 5.1.1. Atividade de Lacase

Todas as linhagens produziram atividade de lacase, com exceção do fungo Flu no período de 30 dias de incubação.

A atividade enzimática de lacase produzida pelos microrganismos variou de 0,4 UI/Lmin a 0,6 UI/Lmin. As linhagens *P. chrysosporium* com 0,58 UI/Lmin, *A. campestris* e P1, ambas com 0,59 UI/Lmin, foram as que apresentaram os maiores níveis de atividade no ensaio realizado em 30 dias de crescimento (Figura 3.1 A).

Com 60 dias de cultivo (Figura 3.1 B) as linhagens apresentaram níveis de lacase maiores quando comparados com 30 dias (Figura 3.1 A), sendo todos superiores a 1,2 UI/Lmin, com exceção do fungo H2, que apresentou valores inferiores em 60 dias de incubação em comparação aos detectados em 30 dias. O fungo que apresentou o maior valor de atividade enzimática foi P.001, com 1,62 UI/Lmin.

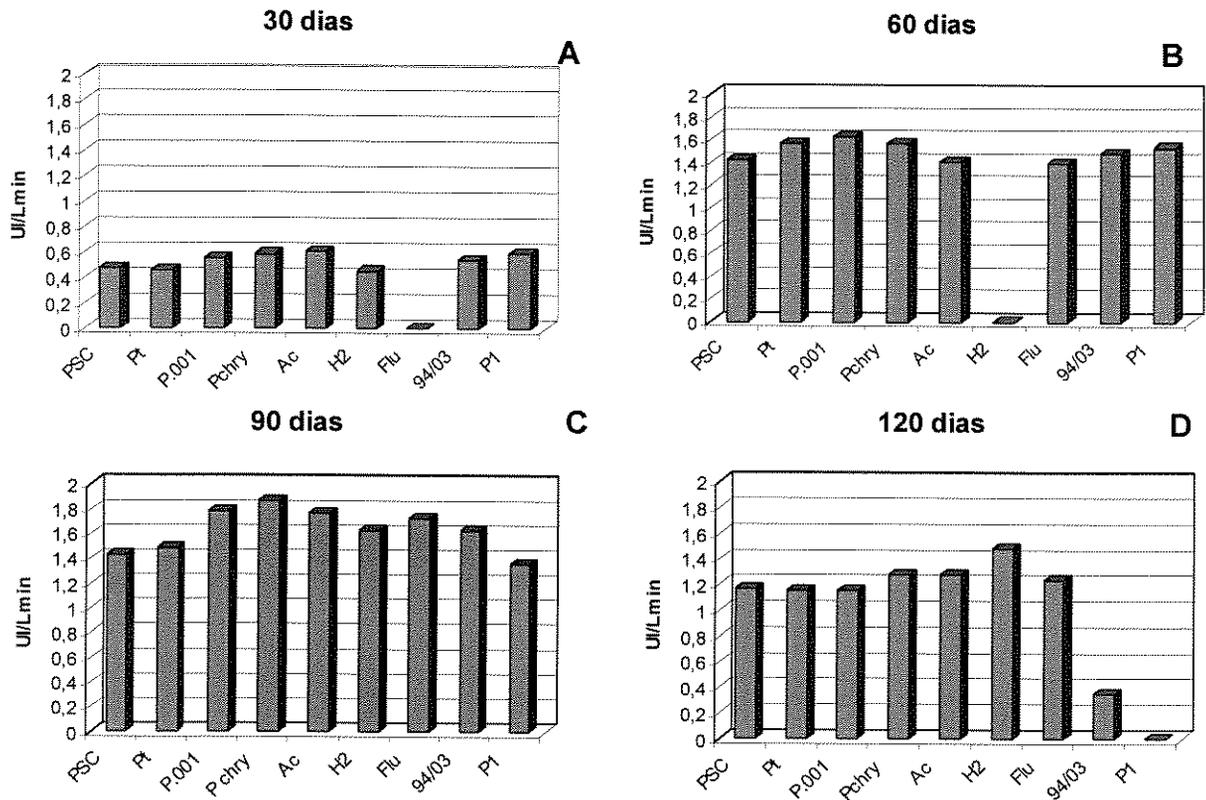


Figura 3.1. Produção de lacase pelas linhagens fúngicas crescidas em meio contendo sais minerais e pellets de PET a 30°C. A. 30 dias; B. 60 dias; C. 90 dias; D. 120 dias.

Destacaram-se, em 90 dias de crescimento (Figura 3.1 C), as linhagens P.001, *A. campestris* (1,77 UI/Lmin), Flu (1,73 UI/Lmin), e principalmente *P. chrysosporium* com 1,86 UI/Lmin, que apresentaram os maiores valores de atividade enzimática. Para a linhagem H2 a atividade de lacase mostra um aumento, com 1,63 UI/Lmin, visto que em 60 dias detectou-se 0,31 UI/Lmin. O fungo P1 foi o único que apresentou os valores de atividade (1,35 UI/Lmin) reduzido neste período de crescimento em comparação com 60 dias de incubação (1,53 UI/Lmin).

Verifica-se na Figura 3.1 D, que os valores de atividade de lacase apresentaram níveis reduzidos com 120 dias de incubação quando comparados com 90 dias de cultivo, sendo H2, com 1,48 UI/Lmin, o fungo que expressou maior atividade de lacase. A linhagem P.94/03, quando comparado com 30 dias de incubação (0,53 UI/Lmin), apresentou diminuição dos valores de atividade da enzima (0,36 UI/Lmin) no período de 120 dias de cultivo e a linhagem que expressou os menores valores de atividade de lacase foi P1, com 0,08 UI/Lmin.

Foi possível observar que, no período de incubação de 30 dias (Figura 3.1 A), os microrganismos apresentaram menores níveis de produção da enzima lacase quando comparados aos demais tempos de crescimento. Os melhores valores de atividade de lacase produzidos pelos microrganismos ocorreram no período de incubação de 90 dias (Figura 3.1 C).

Segundo Youn et al (1995), a lacase é classificada como uma polifenol oxidase, possuindo uma ampla especificidade para compostos aromáticos que contenham grupos hidroxila e amino. Visto que a lignina contém grupos fenólicos hidroxila, e a maioria dos fungos de decomposição branca secretam lacase em condições de cultivo ligninolíticos, tem-se sugerido que a lacase possui uma importante função na degradação da lignina. Neste estudo, foi verificado que o maior produtor dessa enzima foi *P. chrysosporium* aos 90 dias, quando também houve a maior perda de massa do PET (6,72%).

### **5.1.2. Atividade de Lignina Peroxidase**

Todas as linhagens estudadas apresentaram atividade de lignina peroxidase (LiP), com exceção do fungo Flu no período de 30 dias de incubação.

Os valores de atividades da enzima LiP apresentadas na Figura 3.2 A, foram maiores para PSC 94/03, seguido da linhagem H2, que apresentou no período de cultivo de 30 dias, sua melhor atividade, com 0,43 UI/Lmin.

Os microrganismos PSC 94/03, com 0,9 UI/Lmin, e P1, com 0,8 UI/Lmin, foram os que expressam os melhores valores de atividade desta enzima, sendo, para a linhagem P1, o melhor valor de atividade de LiP expresso nos períodos de incubação testados. Já os fungos *P. taiandia*, *A. campestris* e H2 foram os que apresentaram os menores valores de atividade no período de 60 dias de incubação (Figura 3.2 B).

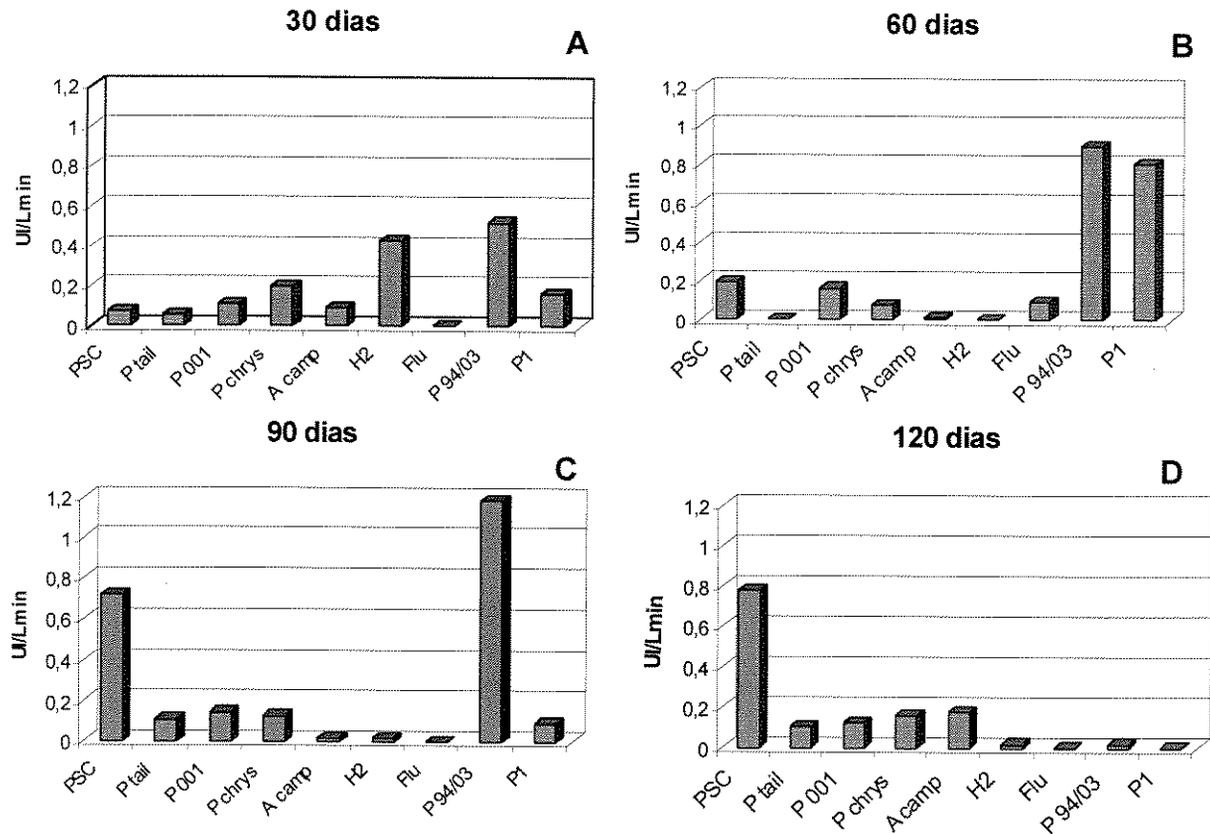


Figura 3.2. Produção de lignina peroxidase pelas linhagens fúngicas crescidas em meio contendo sais minerais e pellets de PET a 30°C. A. 30 dias; B. 60 dias; C. 90 dias; D. 120 dias.

O máximo de atividade de LiP foi produzido pelo fungo PSC 94/03 (1,18 UI/Lmin) dentre todas as linhagens e tempos de crescimento estudados, no período de 90 dias de incubação. Outro microrganismo que se destacou neste período foi *P. sajor caju* (PSC) (0,72 UI/Lmin) sendo as linhagens *A. campestris* e H2, as que apresentaram os menores valores de atividade, e Flu, que não expressou atividade para LiP (Figura 3.2 C).

O fungo *Pleurotus sajor caju* (PSC) se destacou no período de 120 dias de crescimento (Figura 3.2 D) apresentando neste período seu maior valor médio de atividade (0,77 UI/Lmin). Não detectou-se atividade de LiP para a linhagem Flu, e H2 e PSC 94/03 foram as que expressaram menores valores de LiP neste período.

### 5.1.3. Atividade de Manganês Peroxidase

Nos resultados apresentados na Figura 3.3 A, a linhagem Flu apresentou os maiores valores de atividade de MnP no período de incubação de 30 dias (3,4 UI/Lmin), seguido de *A. campestris* (2,6 UI/Lmin). Os fungos com menores atividades de MnP neste período foram *P. chrysosporium* e H2.

Na Figura 3.3 B, observamos que os microrganismos *P. chrysosporium*, Flu e PSC 94/03 não produziram atividade de MnP no período de crescimento de 60 dias, sendo os fungos *P. sajor caju* (PSC), (1,3 UI/Lmin), P.001 (1,2 UI/Lmin) e *A. campestris* (1,1 UI/Lmin), os que mais produziram atividade desta enzima.

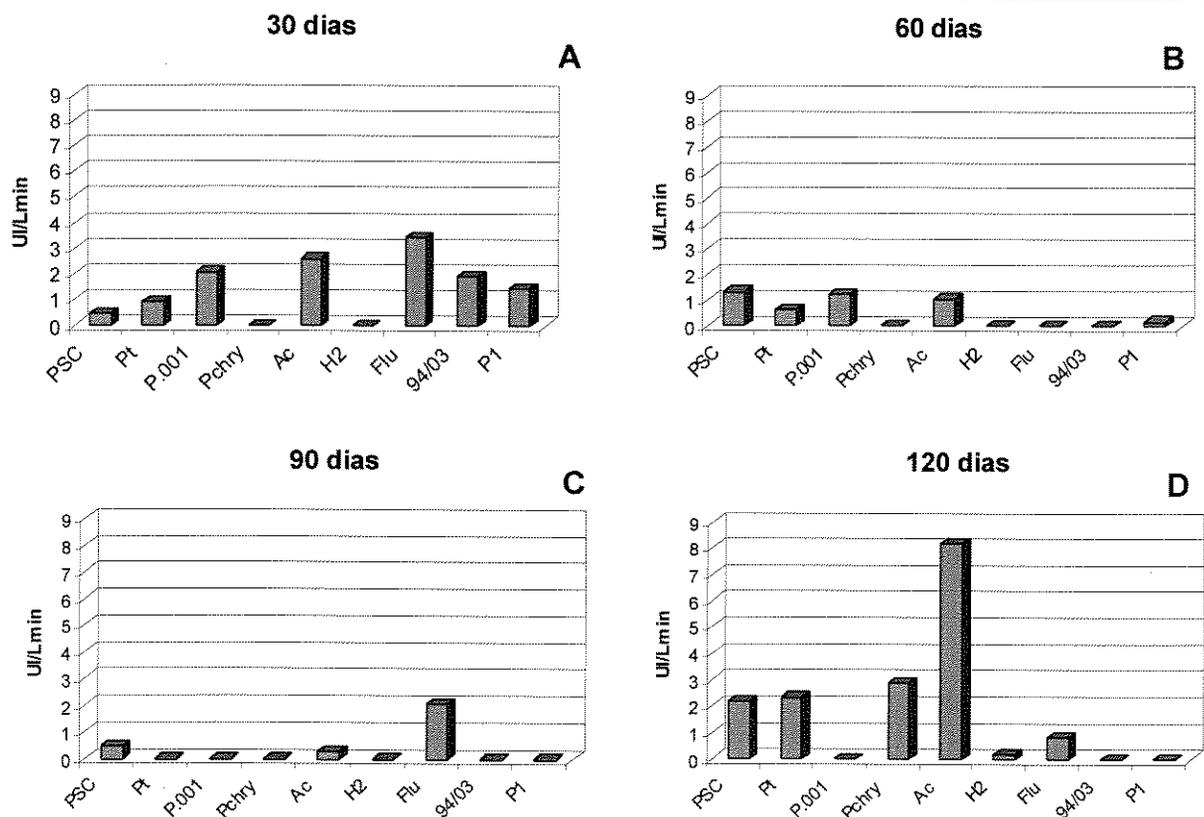


Figura 3.3. Produção de manganês peroxidase pelas linhagens fúngicas crescidas em meio contendo sais minerais e pellets de PET a 30°C. A. 30 dias; B. 60 dias; C. 90 dias; D. 120 dias.

Os valores de atividade de MnP expressos pelos microrganismos, em 90 dias de incubação (Figura 3.3 C), foram os mais baixos observados, em comparação com os demais períodos de crescimento, destacando-se apenas a linhagem Flu (2,1 UI/Lmin). Para os fungos *P. taiandia*, P.001, *P. chrysosporium*, H2, PSC 94/03 e P1, esta atividade enzimática não foi detectada sob esta condição de cultivo.

O período de incubação no qual as linhagens estudadas apresentaram melhor produção da enzima MnP foi em 120 dias (Figura 3.3 D), onde atingiu o

máximo de produção enzimática com o fungo *A. campestris* (8,16 UI/Lmin), seguido por *P. chrysosporium* (2,87 UI/Lmin), *P. taiandia* (2,33 UI/Lmin) e *P. sajor caju* (2,15 UI/Lmin). Para P.001, PSC 94/03 e P1, não detectou-se atividade de MnP.

## **5.2. Atividades enzimáticas em meio contendo farelo de trigo**

Foi testada a capacidade das 9 linhagens estudadas em produzir as enzimas Lac, LiP e MnP quando inoculadas em meio contendo farelo de trigo. As mesmas foram cultivadas durante 7 dias e, após este período, o sobrenadante foi coletado com a finalidade de verificar a produção das enzimas ligninolíticas sem a adição de pellets de PET. Este experimento foi feito a fim de verificar se o farelo de trigo interfere ou não na produção enzimática das linhagens estudadas, ou seja, se a enzima produzida seria devido à presença do farelo de trigo ou do PET. Após análises dos resultados verificou-se que nenhuma enzima foi detectada neste período. Este comportamento se deve, provavelmente, ao fato das linhagens estarem utilizando o farelo de trigo como fonte de carbono para seu desenvolvimento, pois sabe-se que as enzimas ligninolíticas são produzidas pelos fungos de decomposição branca somente em condições limitantes de carbono e nitrogênio (KIRK & FARRELL, 1987; TUOMELA et al., 2000).

Com 30, 60 e 90 dias de cultivo, os microrganismos estudados produziram pelo menos uma das enzimas determinadas (Figuras 3.4, 3.5 e 3.6), pois, provavelmente, a fonte de carbono do farelo de trigo havia terminado.

### 5.2.1. Atividade de Lacase

Verificamos na Figura 3.4 A que, no período de 30 dias de crescimento, o fungo H2 apresentou o melhor valor de atividade enzimática (280,35 UI/Lmin) em comparação aos demais microrganismos e tempos de incubação, destacando-se ainda neste período P1 (168,41 UI/Lmin), P.001 (155,58 UI/Lmin) e *P. thailandia* (107,35 UI/Lmin). A produção da enzima não foi observada nas linhagens *P. sajour caju* e PSC 94/03.

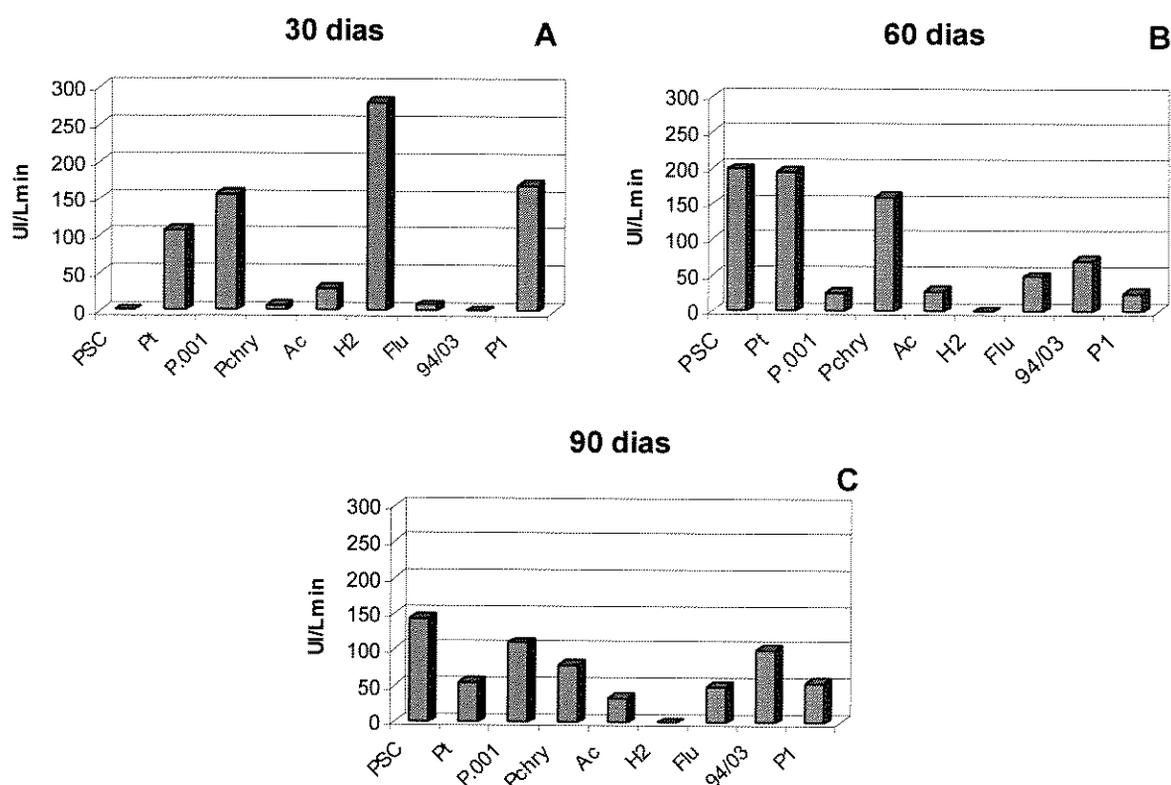


Figura 3.4. Produção de lacase pelas linhagens fúngicas crescidas em meio contendo farelo de trigo e pellets de PET a 30°C. A. 30 dias; B. 60 dias; C. 90 dias.

No período de 60 dias de incubação, os microrganismos que produziram os melhores valores de atividade enzimática foram *P. sajour caju* (198,5 UI/Lmin), *P. thailandia* (194,64 UI/Lmin) e *P. chysosporium* (159,23 UI/Lmin). A linhagem H2,

que destacou-se como a melhor produtora de lacase com 30 dias, não apresentou atividade desta enzima com 60 dias de cultivo (Figura 3.4 B).

Conforme a Figura 3.4 C, observou-se que, em 90 dias de cultivo, os valores de atividade enzimática foram menores dos que os obtidos nos tempos de crescimento anteriores, onde *P. sajor caju* destacou-se, com produção de 142,91 UI/Lmin. O fungo H2 continuou não expressando atividade de lacase em 90 dias de crescimento.

### **5.2.2. Atividade de Lignina Peroxidase**

Conforme mostrado na Figura 3.5 A, as linhagens *P. sajor caju* (918,94 UI/Lmin), *P. chrysosporium* (724,42 UI/Lmin) e *P. thailandia* (703,36 UI/Lmin) apresentaram, em 30 dias de incubação, os maiores valores de atividade de LiP em comparação aos demais tempos analisados (60 e 90 dias). As atividades apresentadas por Flu (509,02 UI/Lmin) e H2 (238,43 UI/Lmin) também se destacaram neste período. Para as demais linhagens, esta enzima não foi detectada.

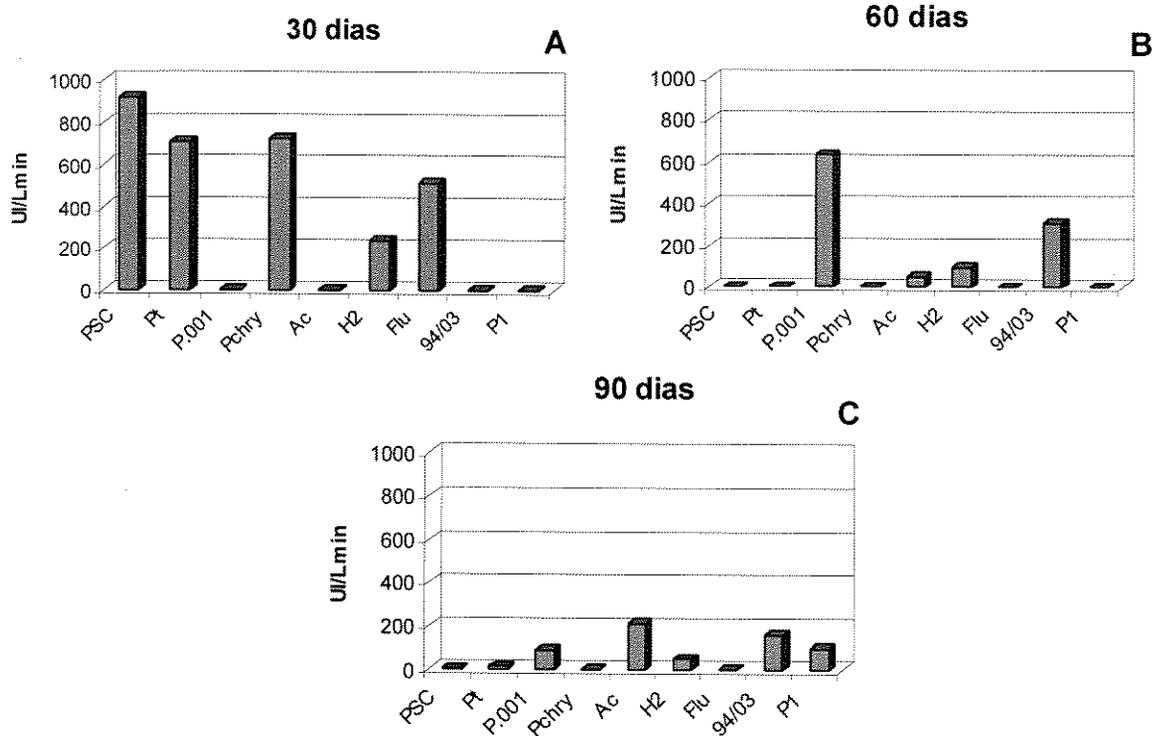


Figura 3.5. Produção de lignina peroxidase pelas linhagens fúngicas crescidas em meio contendo farelo de trigo e pellets de PET a 30°C. A. 30 dias; B. 60 dias; C. 90 dias.

Na Figura 3.5 B, observamos que, em 60 dias de crescimento, poucas linhagens produziram LiP, destacando-se somente P.001 (633,38 UI/Lmin) e PSC 94/03 (307,33 UI/Lmin). Os fungos H2 (94,98 UI/Lmin) e *A. campestris* (49,37 UI/Lmin) apresentaram baixos valores de atividade quando comparadas aos apresentados em 30 dias de cultivo (Figura 3.15 A), e os demais microrganismos estudados não apresentaram atividade de LiP neste tempo de incubação.

Na Figura 3.5 C, verificou-se que os valores de atividades de LiP em 90 dias de cultivo foram os menores apresentados pelas linhagens estudadas. Esta enzima não foi detectada para *P. sajor caju*, *P. thailandia*, *P. chrysosporium* e Flu. O fungo *A. campestris* apresentou seu melhor valor de produção de LiP neste

ensaio (213,61 UI/Lmin), e P1, que nos tempos de cultivo anteriores não havia produzido a enzima, apresentou, em 90 dias de incubação, atividade de 98,47 UI/Lmin.

### 5.2.3 Atividade de Manganês peroxidase

Conforme a Figura 3.6 A, somente PSC 94/03 e P1 produziram atividade de MnP, 559,47 UI/Lmin e 141,69 UI/Lmin respectivamente, no período de 30 dias de crescimento. Os demais fungos não produziram atividade de MnP neste período, com exceção de Flu (50,31 UI/Lmin) e *P. chrysosporium* (40,36 UI/Lmin).

Na Figura 3.6 B, verificou-se que *P. sajor caju* (463,65 UI/Lmin), foi o fungo que apresentou o melhor valor de atividade para o período de 60 dias de cultivo, seguido por PSC 94/03 (121,07 UI/Lmin), o qual havia se destacado em 30 dias de crescimento (Figura 3.6 A). Não foram detectados valores de atividades de MnP para as demais linhagens estudadas.

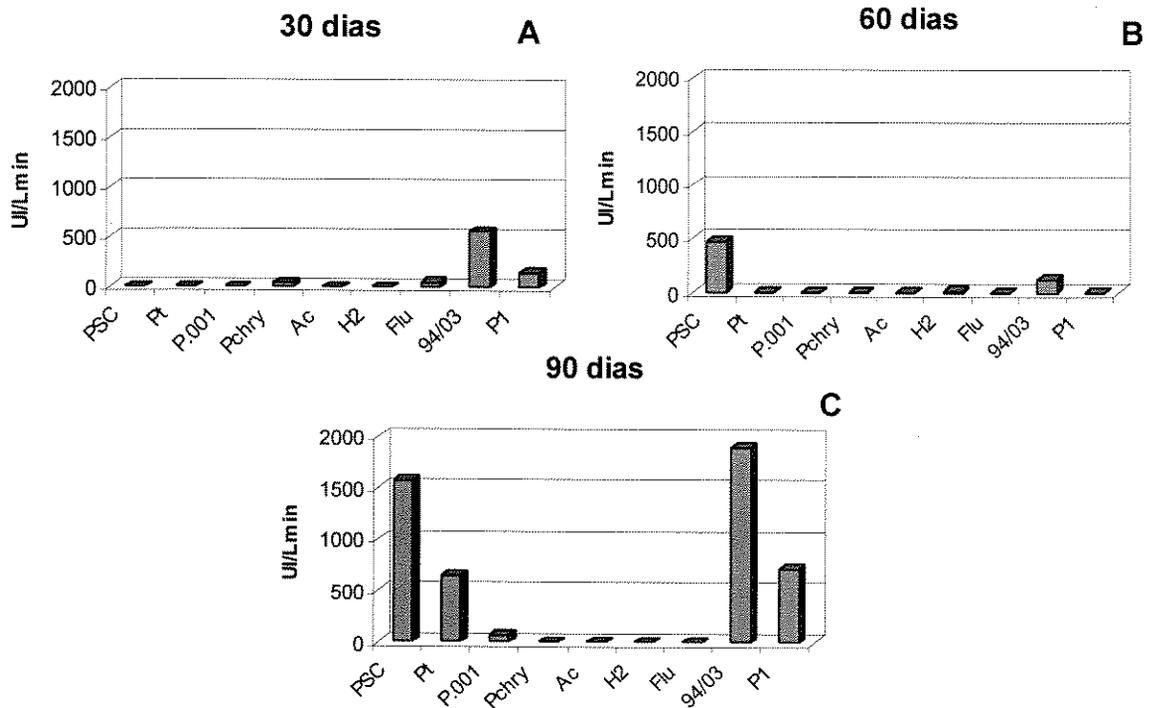


Figura 3.6. Produção de manganês peroxidase pelas linhagens fúngicas crescidas em meio contendo farelo de trigo e pellets de PET a 30°C. A. 30 dias; B. 60 dias; C. 90 dias.

Conforme observado na Figura 3.6 C, detectou-se os maiores valores de atividade de MnP no período de cultivo de 90 dias, destacando-se PSC 94/03 (1900,77 UI/Lmin), seguido das linhagens *P. sajor caju* (1572,1 UI/Lmin), P1 (712,51 UI/Lmin) e *P. thailandia* (641,21 UI/Lmin). Para o fungo P.001 verificou-se uma pequena produção da enzima somente neste período de incubação, com atividade de 65,02 UI/Lmin. *Phanerochaete chrysosporium*, *Agaricus campestris*, H2 e Flu não produziram valores de atividade de MnP em nenhum dos tempos de cultivo estudados.

### 5.3. Produção de Biosurfactantes em meio líquido

A produção de biosurfactantes foi observada em todos os períodos de cultivo e em todas as linhagens, mesmo que em pequena quantidade.

Observou-se na Figura 3.7 que no período de 30 dias de crescimento o máximo de atividade de biosurfactante do tipo emulsão óleo em água foi detectado no sobrenadante da linhagem H2 (0,17), seguida por P1 (0,14), PSC 94/03 (0,13) e *Agaricus campestris* (0,12), os quais apresentaram os melhores valores de atividade em todos os períodos de cultivo estudado. Estes valores são inferiores aos apresentados por COSTA (2001), que utilizou PET na forma de filme com 20, 30 e 40 dias de incubação. Para o fungo H2, detectou-se emulsão óleo/água com 30, 90 e 120 dias, sendo que com 30 dias foi obtido o maior valor (0,17) comparando com as demais linhagens, contudo, o mesmo não apresentou emulsão satisfatória em 60 dias.

No período de crescimento de 60 dias, observou-se os menores valores de absorvância, onde as linhagens apresentaram valores semelhantes, entre 0,02 e 0,03. Nos ensaios realizados com 90 dias de incubação, a linhagem que se mostrou mais eficiente foi H2, com absorvância de 0,06, seguida de *P. taiandia* e *A. campestris*, com 0,04. A linhagem *P. taiandia* (0,09) apresentou a maior absorvância no período de incubação de 120 dias. (Figura 3.7).

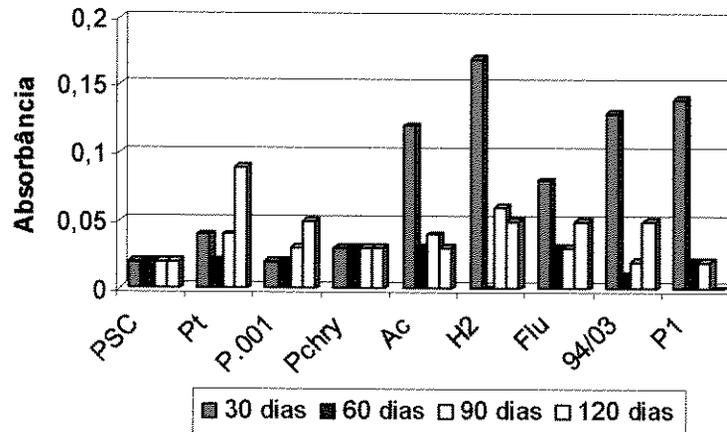


Figura 3.7. Produção de biosurfactante (emulsão óleo em água) pelas linhagens fúngicas crescidas em meio contendo sais minerais e pellets de PET por 30, 60, 90 e 120 dias a 30°C.

Verifica-se, na Tabela 3.1, que a linhagem que apresentou maior coluna (emulsão água em óleo) foi P.001, com 1,8 cm nos períodos de incubação de 60 e 90 dias, seguido por *P. taiandia*, com 1,1 cm para 60 dias de crescimento, PSC 94/03, com 0,8 cm em 30 dias e 0,7 cm para 90 dias de incubação. As demais linhagens não apresentaram este tipo de atividade de biosurfactante. Segundo COSTA (2001), o fungo PSC 94/03 mostrou-se mais eficiente na produção de coluna água em óleo para o polímero policloreto de vinila (PVC), atingindo 2,2 cm, enquanto que para o PET na forma de filme, o microrganismo com melhor atividade de emulsificação (água em óleo) foi uma levedura não identificada, com 2,5 cm. Este tipo de atividade de biosurfactante não foi detectado para os fungos *P. chrysosporium* e Flu.

Tabela 3.1. Medidas de halo (emulsão água em óleo) produzidas pelas linhagens fúngicas crescidas em meio contendo sais e pellets de PET por 30, 60, 90 e 120 dias a 30°C.

MICROORGANISMOS	Halo (cm) 30 dias	Halo (cm) 60 dias	Halo (cm) 90 dias	Halo (cm) 120 dias
<i>P. sajor caju</i>	0,2	ND	ND	ND
<i>P. tailandia</i>	ND	0,7	<u>1,1</u>	0,2
P.001	ND	<u>1,8</u>	<u>1,8</u>	ND
<i>P. chrysosporium</i>	ND	ND	ND	ND
<i>A. campestris</i>	ND	ND	ND	0,2
H2	ND	ND	0,3	ND
PSC 94/03	0,8	ND	0,7	0,3
P1	0,2	ND	ND	ND
Flu	ND	ND	ND	ND

Onde: ND = não detectado.

#### 5.4. Produção de Biosurfactantes em meio contendo farelo de trigo

A produção de biosurfactantes foi observada, mesmo que em pequenas quantidades, por todas as linhagens em todos os períodos de incubação.

Conforme observado na Figura 3.8, o fungo Flu apresentou as melhores atividades de biosurfactantes, emulsão óleo em água, em todos os períodos de cultivo estudados, sendo a maior emulsificação determinada para esta linhagem em 30 dias de crescimento. De um modo geral, os microrganismos apresentaram, no período de 30 dias, uma produção de biosurfactante ligeiramente superior aos demais tempos de incubação, com exceção P.001 e *P. chrysosporium* que apresentaram maior atividade de biosurfactante em 60 dias e P1 em 90 dias.

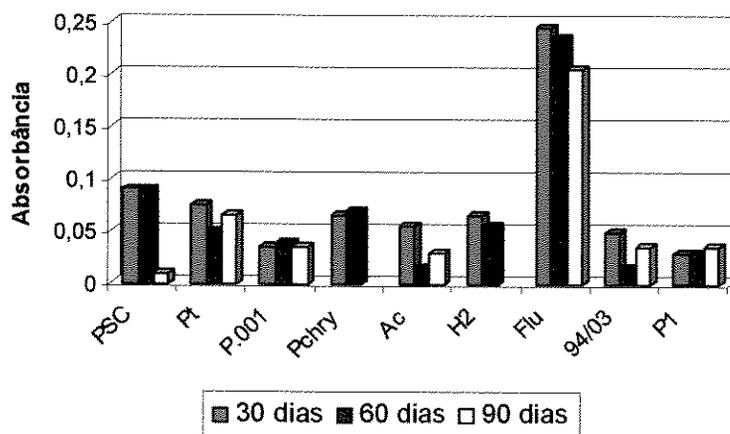


Figura 3.8. Produção de biosurfactantes (emulsão óleo em água) pelas linhagens fúngicas crescidas em meio contendo farelo de trigo e pellets de PET por 30, 60 e 90 dias a 30°C.

Conforme a Tabela 3.2, verificou-se que todos os fungos produziram atividade de emulsificação água em óleo em pelo menos um período de incubação. As linhagens que apresentaram as maiores medidas de colunas foram *P. sajor caju* (2,2 cm), P1 (1,5 cm) e *P. tailândia* (1,1cm) em 30 dias de cultivo, PSC 94/03, com 2,25 cm e *P. tailândia* com 2,05 cm em 60 dias e *Pleurotus* 001 em 90 dias com halo de 1,0 cm. Observou-se que nos ensaios realizados em 90 dias de crescimento, um menor número de microrganismos produziram emulsão óleo/água quando comparados com 30 e 60 dias.

Tabela 3.2. Medidas de halo (emulsão água em óleo) produzidas pelas linhagens fúngicas crescidas em meio contendo de farelo de trigo e pellets de PET por 30, 60 e 90 dias a 30°C.

MICROORGANISMOS	Halo (cm)	Halo (cm)	Halo (cm)
	30 dias	60 dias	90 dias
<i>P. sajor caju</i>	<u>2,2</u>	ND	ND
<i>P. tailandia</i>	<u>1,1</u>	<u>2,05</u>	0,35
P.001	0,7	0,45	<u>1,0</u>
<i>P. chrysosporium</i>	0,05	0,35	ND
<i>A. campestris</i>	ND	0,3	0,3
H2	0,2	0,3	ND
PSC 94/03	0,55	<u>2,25</u>	0,35
P1	<u>1,5</u>	ND	ND
Flu	0,3	ND	0,2

Onde: ND = não detectado.

## 6. CONCLUSÕES

- As enzimas analisadas nos períodos de crescimento (30, 60, 90 e 120 dias), produziram resultados distintos em cada determinação para os ensaios em meio líquido e meio contendo farelo de trigo;
- Para a enzima lacase, em meio líquido, os microrganismos que expressaram melhores valores de atividade foram *Pleurotus* sp (P.001), *A. campestris*, Flu, e principalmente *P. chrysosporium*, no período de 90 dias de incubação. Em meio de cultivo contendo farelo de trigo, a enzima Lacase

apresentou melhores valores de atividade produzidos por H<sub>2</sub> em 30 dias de incubação;

➤ A linhagem que apresentou o maior valor de atividade de lignina peroxidase (LiP), em meio líquido, foi PSC 94/03 no período de 90 dias de incubação. Nos ensaios realizados em meio contendo farelo de trigo, as melhores atividades de LiP foram expressas por *P. sajor caju*, seguido por *P. chrysosporium* e *P. thailandia* em 30 dias de crescimento;

➤ A enzima manganês peroxidase (MnP) foi a que apresentou os maiores valores de atividade dentre as três enzimas estudadas, tanto nos ensaios realizados em meio líquido como em meio contendo farelo de trigo. A linhagem *Agaricus campestris* foi a melhor produtora desta enzima no período de crescimento de 120 dias em meio líquido, e PSC 94/03, seguido por *P. sajor caju* foram os melhores produtores em meio de farelo de trigo, em 90 dias de incubação;

➤ A linhagem *Pleurotus thailandia* foi a melhor produtora de biosurfactante do tipo emulsão óleo em água em 120 dias de incubação, nos ensaios realizados em meio de cultivo líquido. Em meio contendo farelo de trigo, a linhagem Flu foi a melhor produtora deste tipo de emulsão, no período de 30 dias de incubação;

➤ O melhor produtor de biosurfactante do tipo água em óleo, em meio líquido, foi *Pleurotus* sp (P.001), que apresentou o maior medida de halo. A linhagem PSC 94/03 obteve maior coluna deste biosurfactante nos ensaios em meio contendo farelo de trigo.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARORA, D.S. & GILL, P. K. Comparison of two assay procedures for lignin peroxidase. **Enz. and Microb. Technol.**, v. 28. p. 602 - 605, 2001.

ASHTAPUTRE, A. A. & SHAH, A. K. Emulsifying property of a viscous exopolysaccharide from *Sphingomonas paucimobilis*. **World J. of Microb & Biotech.**, v. 11, p 219-222, 1995.

BOOMINATHAN, K. & REDDY, C. A. **Fungal degradation of lignin: Biotechnological applications.**, In: Arora, D. K., Elaner, R. P., and Mukerji, K. G., Handbook of Appl. Mycol. 4, Fungal Biotech. eds. Marcel Dekker, New York, 1992. p. 822.

BUMPUS, J. A. & AUST, S. D. Biodegradation of environmental pollutants by white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. **BioEssays.**, v. 6, p. 166 – 170, 1987.

BUSWELL, J. A. & ERIKSSON, K. E. Effect of lignin-related phenols and their methylated derivatives on the growth of eight white-rot fungi. **World J. Microb. Biotech.**, v. 10, p. 169 – 174, 1994.

BUSWELL, J. A. & ODIER, E. Lignin biodegradation. **Crit. Rev. Biotech.**, v. 6, p. 1 - 60, 1987.

CLEMENTE, A. R. & DURRANT, L. R. **Degradação de Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos por Fungos.** Tese (Doutorado) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas – SP, 2002.

COOPER, D. & GOLDENBERG, B. G. Surface active agents from two *Bacillus* species. **App. and Environm. Microb.**, v. 53, p. 224-229, 1987.

COSTA, K. C. F. & DURRANT, L. R. **Estudo da degradação de polímeros sintéticos de importância industrial por linhagens fúngicas.** Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas – SP, 2001.

EDGE, M., WILES, R., ALLEN, N.S., McDONALD, W. A. & MORTLOCK, S. V. Characterization of the species responsible for yellowing in melt degraded aromatic polyesters - I: Yellowing of poly(ethylene terephthalate). **Polym. Degr. and Stabil.**, v. 53, p 141-151, 1996.

ERIKSSON, K. E. L., BLANCHETTE, R. A. & ANDER, P., **Microbial and Enzymatic Degradation of Wood and Wood Components.**, Springer Verlag, Berlin - Germany. 1990. 407p.

FIECHTER, A. Biosurfactants: moving towards industrial application. **Trends Foods Sc. Techn.**, v. 3, p. 286 – 293, 1992.

FRÍAS, I., TRUJILLO, J. M., ROMERO, J., HERNANDEZ, J. & PÉREZ, J. A. Lignan models as inhibitors of *Phanerochaete chrysosporium* lignin peroxidase. **Biochem.**, v. 77, p. 707 – 712, 1995.

GLENN, J. K. & GOLD, M. H. Purification and characterization of an extracellular Mn (II)-dependent peroxidase from lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 242, p. 329 – 341, 1985.

GOLD, M. H., WARIISHI, H. & VALLI, K. Extracellular peroxidases involved in lignin degradation by the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. **ACS Symp. Ser.**, v. 389, p. 127 – 140, 1989.

HAMMEL, K. E. Organopollutant degradation by ligninolytic fungi. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 11, p. 776 – 777. 1989.

HATAKKA, A. Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: production and role in lignin degradation. **FEMS Microb. Rev.**, v. 13, p. 125 – 135, 1994.

HEYDE, M. Ecological considerations in the use and production of biosynthetic and synthetic biodegradable polymers. **Polym. Degr. and Stabil.**, v. 59, p. 3 - 6, 1998.

HOMMEL, R. K. Biosurfactants in Hydrocarbon Utilization. **Biodegr.**, v. 1, p.107-119, 1990.

KIRK, T. K. & FARRELL, R. L. Enzymatic "combustion": the microbial degradation of lignin. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 41, p. 465 – 505, 1987.

KUWAHARA, M., GLENN, J. K., MORGAN, M. A. & GOLD, M. H. Separation and Characterization of two extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 178, p. 1092-1098, 1991.

MESTER, T. & FIELD, J.A. Optimization of manganese peroxidase production by the white rot fungus *Bjerkandera* sp. strain BOS55. **FEMS Microb. Lett.**, v. 155, p. 161 – 168, 1997.

PALMER, T. B. A. **Understanding enzymes.**, 2<sup>a</sup> ed., Ellis Horwood Limited, England, 1985.

PAVARINA, E. C. & DURRANT, L. R. **Fungos Microaeróbios na bioconversão de material lignocelulósico.** Tese (Doutorado) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas – SP, 2002.

SCHOEMAKER, H. E. On the chemistry of lignin biodegradation. **Recl. Trav. Chim. Pays-Bas Neth.**, v. 109, p. 255 – 272, 1990.

SUTHERLAND, J. B. Detoxification of polycyclic aromatic hydrocarbons by fungi. **J. Indust. Microb.**, v. 9, p. 53 – 61, 1992.

THURSTON, C. F. The structure and function of fungal laccases. **Microbiol.**, v. 140, p. 19 – 26, 1994.

TIEN, M. & KIRK, T. K. Lignin-degrading enzyme from hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium* burds. **Science.**, v. 221, p. 661 – 663, 1983.

TUOMELA, M., VIKMAN, M., HATAKKA, A. & ITÄVAARA, M. Biodegradation of lignin in compost environment: a review. **Biores. Technol.**, v. 72, p. 169 – 183, 2000.

WU, F., OZAKI, H., TERASHIMA, Y., IMADA, T. & OHKOUCHI, T. Activities of ligninolytic enzymes of the white rot fungus, *Phanerochaete chrysosporium* and its recalcitrant substance degradability. **Wat. Sci. Tech.**, v. 34, p. 69 – 78, 1996.

YOUN, H-D., HAH, Y. C. & KANG, S-A. Role of laccase in lignin degradation by white-rot fungi. **FEMS Microb. Lett.**, v. 132, p. 183-188, 1995.

# *Capítulo 4*

*Determinação de medidas de viscosidade de  
polietileno tereftalato (PET)*

## **RESUMO**

Foram determinadas medidas de viscosidade de soluções diluídas de pellets de polietileno tereftalato (PET), sendo estas amostras previamente incubadas com quatro linhagens de basidiomicetos (*Pleurotus* sp (P.001), *Pleurotus* sp (P1), *Phanerochaete chrysosporium*, *Pleurotus sajor caju*) por períodos de 30, 60, 90 e 120 dias, tendo o PET a única fonte de carbono disponível no meio de cultivo utilizado.

Verificou-se que todas as amostras de PET apresentaram diminuição da viscosidade intrínseca quando comparadas aos controles, destacando-se os fungos P.001 e P1 os quais apresentaram os menores valores de viscosidade das amostras poliméricas, indicando a ocorrência de alterações estruturais do PET causadas pelo crescimento dos microrganismos estudados.

## **ABSTRACT**

The viscosity of diluted solutions of Polyethylene Terephthalate (PET) pellets previously incubated with four basidiomycete strains for periods of 30, 60, 90 e 120 days, was determined and compared with the viscosity of PET samples, incubated under the same conditions but without the fungi.

It was verified that all the samples of PET showed reduction of the intrinsic viscosity when compared with the controls. The fungal strains P.001 and P1 presented lowest values for viscosity indicating the occurrence of structural modification in the PET caused by these microorganisms.

## 1. INTRODUÇÃO

A concentração populacional e o processo de industrialização trouxeram, a partir do século XX, grande aumento na quantidade de descartes domésticos e industriais (COM CIÊNCIA, 2002), sendo os polímeros sintéticos um dos grande causadores de problemas ambientais devido a sua persistência no meio ambiente (REDIFF, 2000). No Brasil, são produzidos anualmente cerca de 270 mil toneladas de Polietileno Tereftalato (PET).

O PET é o mais importante membro da família dos poliésteres, sendo utilizado em vários setores de atividade, desde fibras têxteis a recipientes de bebidas carbonatadas, passando por filmes para fotografia, embalagens e componentes de automóveis (MONTENEGRO, et al., 2003).

Os fungos de decomposição branca têm obtido êxito na área científica, sendo considerados agentes potenciais em processos de biorremediação, pois possuem capacidade de degradar poluentes tóxicos através de seu sistema enzimático inespecífico e oxidativo utilizado na degradação da lignina, uma macromolécula que contém uma variedade de ligações complexas que estão comumente presentes em poluentes aromáticos (BUMPUS e AUST, 1987 e HAMMEL, 1989).

## **2. OBJETIVOS**

O objetivo desta etapa do trabalho foi determinar as viscosidades relativa ( $\eta_r$ ), inerente ( $\eta_{inh}$ ) e intrínseca  $[\eta]$  de amostras de Polietileno Tereftalato (PET) através de viscosimetria de soluções diluídas.

## **3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **3.1. Viscosidade**

A viscosidade pode ser definida como a resistência de um fluido ao fluxo, ou a uma alteração de forma. É uma medida do atrito interno de um fluido (KEMPENICH, 1985).

A viscosidade é uma indicação da habilidade de um material em resistir ao escoamento. As características de escoamento de líquidos referem-se diretamente ao atrito interno. Qualquer variável que influencie a fricção interna, como solventes, temperatura ou agitação, influenciará, portanto, no escoamento (HUND, 2000). A viscosidade de uma solução polimérica é fundamentalmente relatada como a concentração de volume de partículas poliméricas (NG, et al, 1999).

### **3.2. Viscosidade de soluções diluídas**

As medidas de viscosidade de uma solução são realizadas pela comparação do tempo de fluxo do polímero ( $t$ ), que é o tempo requerido para que

um determinado volume de solução de um polímero passe através do capilar de um tubo viscosimétrico e do tempo de fluxo do solvente ( $t_0$ ). A partir de  $t$  e  $t_0$ , e da concentração do soluto, podem ser obtidas: viscosidade relativa, viscosidade específica, viscosidade específica reduzida, viscosidade inerente ou viscosidade logarítmica e viscosidade intrínseca (RIBEIRO et al., 2002).

Avaliando-se a viscosidade de soluções antes e depois de experimentos hidrolíticos, pode-se determinar o efeito desta hidrólise. De acordo com a redução da viscosidade, a diminuição do tamanho das moléculas pode ser calculada. Assim, com um método simples, o efeito viscosimétrico é observado pela diminuição do tempo de escoamento livre da solução polimérica antes e após hidrólise (GRIGOLON, 2001).

A medição da viscosidade intrínseca pode ser utilizada na verificação e controle da hidrólise do biopolímero quitosana para a observação da variação dos valores de viscosidade. A hidrólise enzimática ou química promove a diminuição da viscosidade de soluções da quitosana pela ruptura da cadeia polimérica (MUZZARELLI et al., 1994).

Segundo Martínez-Richa (1997), a monitoração de processos enzimáticos degradativos de celulose pode ser realizada através da determinação da variação da viscosidade intrínseca com relação ao tempo de hidrólise. Desta forma, podem ser obtidas informações a respeito da taxa de hidrólise, da atividade enzimática e da quebra da cadeia polimérica em diferentes estágios de degradação.

A utilização da viscosidade de soluções como uma medida de massa molar tem sido muito importante no estudo de polímeros. Esta medida se relaciona empiricamente com a massa molar para polímeros lineares, sendo importante

para a caracterização das moléculas poliméricas (RIBEIRO et al., 2002), pois através da determinação da viscosidade intrínseca de soluções poliméricas, é possível se determinar a massa molar de polímeros (PETER & FRANCO, 2001), além de ser uma alternativa interessante na monitoração da variação da média da massa molar do polímero durante as reações de polimerização, especialmente para resinas poliméricas que apresentam baixa solubilidade em solventes orgânicos (GOMES, et al., 2000).

## **4. METODOLOGIA**

### **4.1. Amostras**

As amostras de pellets de polietileno tereftalato utilizadas (Tabela 4.1) para determinação das medidas de viscosidade foram escolhidas de acordo com os melhores valores de perda de massa polimérica obtidos após os ensaios de degradação realizados com as linhagens fúngicas: *Pleurotus sajor caju*, *Pleurotus* sp (P.001), *Phanerochaete chrysosporium* e *Pleurotus* sp (P1). Deu-se preferência para as amostras de PET que obtiveram a maior diminuição de massa molar em cada tempo de incubação (30, 60, 90 e 120 dias), descritos no Capítulo 2, Tabelas 2.4, 2.5, 2.6 e 2.7, nas páginas 34, 35, 36 e 37, respectivamente. Todas as condições dos ensaios realizados, assim como preparo das amostras de PET, linhagens estudadas e condições e meio de cultivo também se encontram descritos no Capítulo 2, itens 4.1, 4.3 e 4.4, nas páginas 21, 22 e 23, respectivamente.

Tabela 4.1. Relação das amostras de polietileno tereftalato (PET), linhagens e tempos de incubação dos ensaios de degradação previamente realizados, submetidas à análise de viscosidade de soluções diluídas.

AMOSTRA	LINHAGEM	TEMPO do ENSAIO
1	<i>Pleurotus</i> sp (P.001)	30 dias
2	<i>Pleurotus</i> sp (P1)	60 dias
3	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	90 dias
4	<i>Pleurotus sajor caju</i>	120 dias
Controle	Controle	Controle

#### 4.2. Solubilização das amostras de polietileno tereftalato

Foi utilizado como solvente uma mistura de fenol/1,1,2,2-tetracloroetano (60:40) e temperatura de 30°C para a solubilização das amostras de pellets de PET (ASTM D4603, 1996; ASTM D2857).

#### 4.3. Viscosímetro

As viscosidades relativa, inerente e intrínseca das amostras de PET foram determinadas empregando-se viscosímetro capilar de vidro, tipo Ubbelohde 1B.

#### 4.4. Equações para determinação das medidas de viscosidade

A viscosidade inerente, a 30°C e na concentração de 0,5 g/dL, foi determinada como descrita na equação 1:

$$\eta_{inh0,5\%}^{30^{\circ}C} = \frac{\ln \eta_r}{C} \quad (1)$$

onde: C = concentração (0,5 g/dL);

$\eta_r$  = a viscosidade relativa

A viscosidade relativa ( $\eta_r$ ) a 30°C e na concentração de 0,5 dL/g está descrita na equação 2:

$$\eta_r = \frac{t}{t_0} \quad (2)$$

onde: t = tempo médio de escoamento da solução polimérica;

$t_0$  o tempo médio de escoamento do solvente.

A viscosidade inerente ( $\eta_{inh0,5\%}^{30^{\circ}C}$ ) é dada em dL/g enquanto que a viscosidade relativa ( $\eta_r$ ) é adimensional.

A viscosidade intrínseca [ $\eta$ ] (dL/g) é determinada pela equação 3:

$$[\eta] = \frac{0,25(\eta_r - 1 + 3 \ln \eta_r)}{C} \quad (3)$$

onde C = concentração (0,5 g/dL)

$\eta_r$  = viscosidade relativa.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados dos tempos médios de escoamento, tanto das soluções poliméricas quanto do solvente, foram realizados em triplicata, conforme solicitação da norma ASTM D4603 (1996).

Os tempos de escoamento das soluções poliméricas (t1, t2 e t3) estão descritos na Tabela 4.2. O tempo médio de escoamento do solvente puro foi de 64,567 segundos.

A amostra controle de PET recebeu o mesmo tratamento das amostras de PET previamente tratadas para obtenção das medidas de viscosidade, sendo realizadas triplicatas.

Tabela 4.2. Medidas do tempo de escoamento das soluções poliméricas das amostras de polietileno tereftalato (PET).

AMOSTRAS	Tempo de Escoamento da Solução Polimérica (s) <sup>a</sup>			
	t 1	t 2	t 3	Média (t)
1	93,0	93,0	92,9	92,967
2	92,8	93,0	92,7	92,850
3	93,2	93,1	93,4	93,240
4	93,2	93,2	93,1	93,167
Controle	93,5	93,4	93,5	93,467

Onde: t 1, t 2 e t 3 referem-se as triplicatas realizadas;

<sup>a</sup> concentração real da solução: 0,5000 g/dL.

Com os valores médios dos tempos de escoamento das soluções poliméricas ( $t$ ), das concentrações empregadas e do tempo de escoamento para o solvente puro, determinou-se a viscosidade inerente ( $\eta_{inh}$ ), a viscosidade relativa ( $\eta_r$ ) e viscosidade intrínseca  $[\eta]$ , como mostrado na Tabela 4.3, medidos a 30°C e 0,50 g/dL, das amostras de PET.

Tabela 4.3. Valores de viscosidade relativa ( $\eta_r$ ), viscosidade inerente ( $\eta_{inh}$ ) e viscosidade intrínseca  $[\eta]$ , medidos a 30°C e 0,50 g/dL, das amostras de PET.

AMOSTRAS	Visc. Relativa $\eta_r$	Visc. Inerente $\eta_{inh}$ (dL/g)	Visc. Intrínseca $[\eta]$ (dL/g)
1	1,4399	0,7291	<u>0,7667</u>
2	1,4380	0,7271	<u>0,7646</u>
3	1,4441	0,7355	<u>0,7739</u>
4	1,4429	0,7340	<u>0,7721</u>
Controle	1,4476	0,7398	<u>0,7787</u>

Conforme a Tabela 4.3, verificou-se que as medidas de viscosidade intrínseca das amostras de PET analisadas são inferiores a apresentada pelo controle (0,7787 dL/g), destacando-se principalmente as amostras 1 e 2, onde verifica-se que os valores de viscosidade intrínseca são 0,7667 dL/g e 0,7646 dL/g, respectivamente. A amostra 1 refere-se aos ensaios de degradação do PET realizados com a linhagem *Pleurotus* sp (P.001) e 30 dias de crescimento, e a amostra 2 aos ensaios realizados com o fungo *Pleurotus* sp (P1) com 60 dias de cultivo.

Estes resultados (Tabela 4.3) indicam que houve alterações na estrutura polimérica das amostras de PET após incubação com os fungos estudados, os quais causaram redução na viscosidade do polímero, em concordância com os resultados apresentados por COSTA (2001), onde a linhagem P.001, após os ensaios de degradação, também diminuiu a viscosidade intrínseca de amostras de filme de PET, atingindo aproximadamente 0,76 dL/g. A biodegradação de polímeros ocorre através da cisão da cadeia polimérica pela sua clivagem para formar oligômeros e finalmente monômeros (GÖPFERICH, 1996).

As linhagens estudadas mostraram-se promissoras para estudos futuros relacionados a processos de biodegradação de polímeros sintéticos, como o Polietileno Tereftalato, pois o tratamento adequado destes resíduos sólidos faz-se necessário para a preservação dos recursos naturais e da qualidade de vida do homem.

## **6. CONCLUSÕES**

- As amostras de PET obtiveram valores de viscosidade intrínseca menores do que o apresentado pelo controle;
- A diminuição dos valores de viscosidade intrínseca das amostras de PET indica que houve alterações na estrutura polimérica;
- Destacaram-se as amostras 1 e 2, tratadas com P.001 (30 dias) e P1 (60 dias), respectivamente, em comparação as demais amostras (90 e 120 dias de experimento).

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS – ASTM D4603 – Standard Test Method for Determining Inherent Viscosity of Poly(Ethylene Terephthalate) (PET) by Glass Capillary Viscometer, 1996.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS – ASTM D2857 – Standard Practice for Diluted Solution Viscosity of Polymers,

BUMPUS, J. A. & AUST, S. D. Biodegradation of environmental pollutants by white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*: Involvement of the lignin degrading system. *BioEssays.*, v. 6, p. 166 – 170, 1987.

COSTA, K. C. F. & DURRANT, L. R. **Estudo da degradação de polímeros sintéticos de importância industrial por linhagens fúngicas.** Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas – SP, 2001.

**COM CIÊNCIA** – REVISTA ELETRÔNICA DE JORNALISMO DA SOCIEDADE BRASILEIRA PARA O PROGRESSO DA CIÊNCIA. Lixo é problema ambiental com agravantes sociais. Disponível em: <<http://www.comciencia.br/reportagens/cidades/cid10.htm>> Acesso em: 06/maio/2002.

GOMES, D., BORGES, C. P., PINTO, J. C. Evaluation of parameter uncertainties during the determination of the intrinsic viscosity of polymer solution. *Polymer.*, v. 41. p. 5531 – 5534, 2000.

GRIGOLON, L. B. Modificação de quitina e quitosana por via enzimática. Dissertação (Mestrado), Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas – SP, 2001.

HAMMEL, K. E. Organopollutant degradation by lignilolytic fungi. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 11, p. 776 – 777. 1989.

HUND, J. P. **Determination of Viscosity**. Metal Finishing. 6 ed., v.9. 2000. 573 p.

JACQUES, B., DEVAUX, J., LEGRAS, R. Reactions induced by triphenyl phosphite addition during melt mixing of poly(ethylene terephthalate)/poly(butylene terephthalate) blends: influence on polyester molecular structure and thermal behaviour. **Polymer**. v. 37. n 7. p. 1189 – 1199, 1996.

KEMPENICH, G. **Medição de Viscosidade – Manual de Instrumentação**. Rio de Janeiro, IBP/INST. 1985. 27p.

MARTÍNEZ-RICHA, A. Variation of intrinsic viscosity in the hydrolysis of hydroxyethylcellulose, and its relationship with resistance to enzymatic degradation. **Polymer**., v. 39. n 14. p. 31153118, 1998.

MONTENEGRO, R. S. P., MONTEIRO FILHA, D. C., PAN, S. S. K., RIBEIRO, M. C. M., OLIVEIRA, K. M. V. D. **Resina PET para Recipientes**. Disponível em: <http://www.bndes.gov.br/conhecimento/bnset/repet8.pdf>. Acesso em: 16/09/2003.

MUZZARELLI, R. A. A., TOMASETTI, M. ILARI, P. Depolymerization of chitosan with the aid of papain. **Enz. And Microb. Technol.**, v. 16. p. 110 – 114, 1994.

NG, W. K., TAM, K. C., JENKINS, R. D. Evaluation of intrinsic viscosity measurements of hydrophobically modified polyelectrolyte solutions. **Europ. Polym. J.**, v. 35. p. 1245 – 1252, 1999.

PETER, M. G. & FRANCO, T. T. Tópicos especiais em processos bioquímicos: Biopolímeros. Apostila de aula teórica IQ 824-U. FEQ – UNICAMP, 2001.

**REDIFF ON THE NET.** Disponível em:  
<<http://members.rediff.com/jogsn/BP4.html>>. Acesso em: 25/07/2000.

RIBEIRO, J. W., KIANG, C. T., FRANCESCONI, A. Z. **Pós-condensação em Estado Sólido de Poli(etileno Tereftalato)**. Dissertação (Mestrado), Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas - SP, 2002.

## CONCLUSÕES GERAIS

De modo geral, as linhagens fúngicas utilizadas neste trabalho além de apresentaram bom crescimento micelial, também foram capazes de diminuir a massa polimérica do polietileno tereftalato (PET). Os fungos que se destacaram foram: *Phanerochaete chrysosporium* em 90 dias de incubação, com redução de 6,72%, *Pleurotus* 001 com 5,79% em 30 dias e *P. sajor caju* com 4,82% e PSC 94/03 com 4,13% em 120 dias de cultivo, sendo a linhagem H2, a que promoveu a menor perda de massa de PET, com 0,08% em 90 dias de incubação.

Dentre as enzimas analisadas, a manganês peroxidase (MnP) foi a que apresentou os maiores valores de atividade, tanto nos ensaios realizados em meio líquido como em meio contendo farelo de trigo. A linhagem *Agaricus campestris* foi a melhor produtora desta enzima no período de crescimento de 120 dias em meio líquido, e PSC 94/03, seguido por *P. sajor caju* foram os melhores produtores desta enzima em meio contendo farelo de trigo, em 90 dias de incubação.

Com relação à produção de biosurfactantes, a linhagem *Pleurotus tailandia* foi a melhor produtora da emulsão óleo em água, em 120 dias de incubação, nos ensaios realizados em meio líquido, sendo, a linhagem Flu a melhor produtora deste tipo de emulsão, no período de 30 dias de incubação, em meio contendo farelo de trigo. Para a emulsão do tipo água em óleo a linhagem que se destacou, em meio líquido, foi *Pleurotus* sp (P.001), e, em meio contendo farelo de trigo, *Pleurotus* sp (PSC 94/03).

Os resultados das análises de viscosidade de soluções diluídas, apresentaram diminuição da viscosidade intrínseca, indicando que houve alterações na estrutura polimérica do PET, possivelmente pela ação das enzimas e biosurfactantes produzidos pelas linhagens fúngicas.

Estas linhagens mostraram-se promissoras para estudos futuros relacionados à biodegradação, tanto do polietileno tereftalato (PET) quanto de outros tipos de polímeros sintéticos, demonstrando o potencial destes microrganismos na solução de questões ambientais. É necessário, portanto, que sejam realizados trabalhos complementares que objetivem maximizar a capacidade destas linhagem, possibilitando o uso das mesmas para processos de biorremediação.