

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

200206333

**“ESTUDO DA DEGRADAÇÃO DE POLÍMEROS  
SINTÉTICOS DE IMPORTÂNCIA INDUSTRIAL POR  
LINHAGENS FÚNGICAS”**

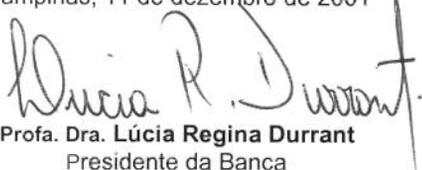
**PARECER**

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por **Karla Cristina Freitas da Costa**, aprovada pela Comissão Julgadora em 11 de dezembro de 2001.

**Karla Cristina Freitas da Costa**

Bióloga

Campinas, 11 de dezembro de 2001

  
Profa. Dra. Lúcia Regina Durrant  
Presidente da Banca

**Profa. Dra. Lucia Regina Durrant**

Orientadora

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

Campinas, dezembro de 2001.

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	T/UNICAMP
	C823
V	
T	47529
PE	837102
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PRECIS	R\$ 11,00
DATA	06-02-02
N.º CPD	

CM00163064-2

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

C823 Costa, Karla Cristina Freitas da  
Estudo da degradação de polímeros sintéticos de importância industrial por linhagens fúngicas / Karla Cristina Freitas da Costa. – Campinas, SP: [s.n.], 2001.

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

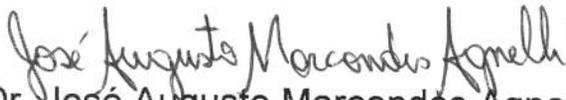
1.Biodegradação. 2.Polímeros. 3.Fungos. 4.Basidiomicetos.  
I.Durrant, Lucia Regina. II.Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III.Título.

**BANCA EXAMINADORA**



Profa. Dra. Lucia Regina Durrant

(ORIENTADORA)



Prof. Dr. José Augusto Marcondes Agnelli

(MEMBRO)

Prof. Dr. Fumio Yokoya

(MEMBRO)



Prof. Dr. Ranulfo Monte Alegre

(MEMBRO)

Dedico este trabalho à minha família, que me ensinou o sentido de se amar e ser amada, e que completa a minha vida com tanta alegria e felicidade:

**Meus pais,**

**Decelina e Luiz Candido (*"in memorian"*)**

**Minha querida maninha e sobrinho,**

**Kelly Cristina e Lucas**

*"É preciso amar as pessoas  
como se não houvesse amanhã,  
porque se você parar para pensar,  
na verdade não há."*

**(Renato Russo)**

**E ao meu marido, companheiro de todas as horas,**

**Alexander Buriti.**

**Obrigada por me fazer tão feliz! TE AMO MUITO!**

*"Eu tenho tanto pra lhe falar,  
mas com palavras não sei dizer,  
como é grande o meu amor  
por você!"*

**(Roberto Carlos)**

## AGRADECIMENTOS

À DEUS, pois sem ELE, eu não teria chegado até aqui...

Ao Departamento de Ciência de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP, que possibilitou o desenvolvimento deste projeto de pesquisa fornecendo o suporte necessário.

À Prof. Dra. Lucia Regina Durrant, minha orientadora, que me acolheu com muito carinho em sua equipe de trabalho e me acompanhou durante a realização deste projeto.

À Banca Examinadora, pelas correções.

Ao Prof. Dr. José Augusto Agnelli, que teve grande participação no desenvolvimento deste trabalho, não apenas pela sua colaboração, mas pelo incentivo e estímulo no aprofundamento dos meus conhecimentos na área de polímeros, assim como pelo apoio que sempre me foi dedicado.

Aos colegas do Departamento de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biologia da UNICAMP: Adriane, Marcel, e todos aqueles que colaboraram em parte deste trabalho, sempre dedicando muita força e afeto.

À minha querida amiga Daniela Jacobucci, que esteve presente em todas as fases deste trabalho, desde a sua elaboração até os ajustes finais, sempre me dando apoio, sugestões valiosíssimas, carinho e sobretudo a sua amizade. Muito obrigada amiga, por ter me ensinado tantas coisas.... Te adoro!!

Às minhas eternas “amiguinhas” Luciana Reyes e Gabriela Mishima, que me deram tanta força, carinho e alegrias durante estes anos de convívio. A nossa cumplicidade e amizade ficarão para sempre marcadas em meu coração. Valeu mesmo amigas, por tudo!!! Adoro vocês!!

A todos os amigos do Laboratório de Sistemática e Fisiologia Microbiana, em especial: Hamilton, Andréa e Érica, que colaboraram diretamente em diversas etapas deste projeto, muitas vezes ensinando e corrigindo, outras vezes apenas demonstrando afeto e preocupação. E também para os amigos que colaboraram indiretamente, como Márcia Reis, Fabiana, Eliane, Claudinha, Ísis, Ani, Sara e Suelma, com simples palavras e gestos de amizade que nos cativam e alegam. E é claro, à D. Norberta, que muito me ajudou neste período cuidando dos nossos materiais no laboratório.

A todos os meus familiares, principalmente minha mãe, irmã e marido, que sempre me deram o amor, o carinho e a felicidade como base primordial para o meu sucesso pessoal e profissional. Sem o apoio da minha família, nada na minha vida teria graça. Eu amo muito vocês!!!

## ÍNDICE GERAL

<b>ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS</b> .....	xvii
<b>RESUMO</b> .....	1
<b>ABSTRACT</b> .....	2
<b>I. INTRODUÇÃO</b> .....	3
<b>II. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	6
2.1. A biodegradação de polímeros sintéticos.....	6
2.2. Características gerais dos fungos de decomposição branca.....	12
2.3. Papel das enzimas lignocelulolíticas produzidas por fungos.....	14
2.4. Surfactantes de origem microbiana.....	18
2.5. Degradação de polímeros sintéticos.....	19
2.6. Técnicas para avaliação de alterações estruturais de polímeros.....	24
<b>III. OBJETIVOS</b> .....	28
<b>IV. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	29
4.1. Microrganismos.....	29
4.2. Preparo das linhagens.....	30
4.3. Preparo dos espécimes plásticos.....	30
4.4. Preparo do meio de cultura e inóculo.....	32
4.5. Observação do crescimento microbiano nos polímeros sintéticos.....	33
4.6. Obtenção do caldo enzimático.....	33
4.7. Determinação da perda de massa dos espécimes plásticos e da massa celular crescida.....	34

4.8.	Preparação e análise das amostras para Microscopia Eletrônica de Varredura.....	36
4.8.1.	Preparação das amostras.....	36
4.8.2.	Análises morfológicas dos polímeros sintéticos.....	38
4.9.	Determinação da produção de biosurfactantes.....	38
4.10.	Atividades de enzimas lignocelulolíticas produzidas.....	39
4.10.1	Lignina Peroxidase.....	39
4.10.2	Álcool Veratrílico Oxidase.....	39
4.10.3	Manganês Peroxidase.....	40
4.10.4	Lacase.....	40
4.10.5	Peroxidase.....	41
4.10.6	Carboximetilcelulase.....	41
4.10.7	Avicelase.....	41
4.10.8	Xilanase.....	42
4.11.	Avaliação de componentes de degradação no meio de cultura.....	42
4.12.	Análise de fluidez dos polímeros fundidos PP e PS / Viscosidade de soluções diluídas dos polímeros PET e PVC.....	43
4.13.	Análises de Cromatografia de Permeação em Gel .....	45
<b>V.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>47</b>
5.1.	Observação do crescimento microbiano nos polímeros sintéticos.....	47
5.2.	Determinação da perda de massa dos polímeros e da massa celular seca.....	53
5.3.	Outras alterações observadas nos polímeros.....	59
5.4.	Análises morfológicas dos polímeros sintéticos.....	60
5.5.	Seleção das linhagens capazes de degradar os polímeros.....	73
5.6.	Verificação da produção de biosurfactantes.....	73

5.7.	Atividades de enzimas lignocelulolíticas produzidas.....	77
5.8.	Avaliação de componentes de degradação no meio de cultura.....	89
5.9.	Alterações estruturais nos polímeros.....	103
5.9.1.	Análise de fluidez dos polímeros fundidos PP e PS / Viscosidade de soluções diluídas dos polímeros PET e PVC.....	104
5.9.2.	Análises de Cromatografia de Permeação em Gel.....	106
<b>VI.</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>111</b>
<b>VII.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>115</b>
<b>VIII.</b>	<b>ANEXOS</b> .....	<b>127</b>
I.	Curva Padrão de Glicose.....	127
II.	Curva Padrão de Xilose.....	129
III.	Fotos de experimentos com PVC.....	131
IV.	Cromatogramas do PVC.....	133
V.	Cromatogramas do PS.....	135

## ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS

<b>FIGURA 1:</b> Estrutura química dos polímeros sintéticos: (a) polipropileno; (b) poliuretano; (c) poliestireno; (d) policloreto de vinila; (e) polietileno tereftalato.....	4
<b>TABELA 1:</b> Crescimento microbiano em plásticos comerciais.....	9
<b>TABELA 2:</b> Suscetibilidade de polímeros à degradação.....	20
<b>TABELA 3:</b> Classificação em função do crescimento microbiano.....	33
<b>TABELA 4:</b> Graus de crescimento observados semanalmente – ASTM.....	49
<b>TABELA 5:</b> Percentagem de perda de peso dos polímeros e crescimento microbiano em função do tipo de polímero e tempo de cultivo.....	55
<b>FIGURA 2:</b> Fotomicrografias do polímero PVC no MEV. (a) controle – 900x; (b) controle – 2000x; (c) PVC com <i>P.001</i> – 300x; (d) PVC com <i>P.001</i> – 1500x; (e) PVC com <i>P. sajour caju</i> – 4000x; PVC após retirada das células de <i>P. sajour caju</i> .....	63
<b>FIGURA 3:</b> Fotomicrografias do polímero PP no MEV. (a) controle – 400x; (b) controle – 350x; (c) PP com <i>P. sajour caju</i> – 430x; (d) PP com <i>P. sajour caju</i> – 1600x; (e) PP após retirada das células de <i>P. sajour caju</i> –400x.....	65
<b>FIGURA 4:</b> Fotomicrografias do polímero PET no MEV. (a) controle – 900x; (b) controle – 2000x; (c) PET com <i>P. 98/37</i> – 900x; (d) PET após retirada das células de <i>P. 98/37</i> – 2000x; (e) detalhes da morfologia do basídio do <i>P. 98/37</i> no PET; (f) visualização de basidiósporos de <i>P. 98/37</i> no PET – 6500x.....	67

<b>FIGURA 5:</b> Fotomicrografias do polímero PS no MEV. (a) controle – 80x; (b) controle – 500x; (c) PS com <i>P.001</i> – 90x; (d) PS com <i>P.001</i> – 300x; PS com <i>P.001</i> – 900x; superfície do PS após retirada das células de <i>P.001</i> – 85x.....	69
<b>FIGURA 6:</b> Fotomicrografias do polímero PU no MEV. (a) controle – 70x; (b) controle – 250x; (c) PU com <i>P.001</i> – 85x; (d) PU com <i>P.001</i> – 300x; (e) PU com densa massa celular de <i>P.001</i> – 150x; (f) PU após retirada das células de <i>P.001</i> – 75x.....	71
<b>FIGURA 7:</b> Atividades de emulsificação óleo em água de biosurfactantes produzidos pelos microrganismos nos polímeros sintéticos.....	75
<b>FIGURA 8:</b> Atividades enzimáticas produzidas pelas culturas fúngicas em PVC nos três períodos de incubação (20, 30 e 40 dias).....	79
<b>FIGURA 9:</b> Atividades enzimáticas produzidas pelas culturas fúngicas em PP nos três períodos de incubação (20, 30 e 40 dias).....	81
<b>FIGURA 10:</b> Atividades enzimáticas produzidas pelas culturas fúngicas em PET nos três períodos de incubação (20, 30 e 40 dias).....	83
<b>FIGURA 11:</b> Atividades enzimáticas produzidas pelas culturas fúngicas em PS nos três períodos de incubação (20, 30 e 40 dias).....	85
<b>FIGURA 12:</b> Atividades enzimáticas produzidas pelas culturas fúngicas em PU nos três períodos de incubação (20, 30 e 40 dias).....	87
<b>FIGURA 13:</b> Espectro UV/ visível do PVC. (a) 20 dias; (b) 30 dias; (c) 40 dias.....	93
<b>FIGURA 14:</b> Espectro UV/ visível do PP. (a) 20 dias; (b) 30 dias; (c) 40 dias.....	95
<b>FIGURA 15:</b> Espectro UV/ visível do PET. (a) 20 dias; (b) 30 dias; (c) 40 dias.....	97
<b>FIGURA 16:</b> Espectro UV/ visível do PU. (a) 20 dias; (b) 30 dias; (c) 40 dias.....	99

<b>FIGURA 17:</b> Espectro UV/ visível do PS. (a) 20 dias; (b) 30 dias; (c) 40 dias.....	101
<b>TABELA 6:</b> Valores de fluidez/ viscosidade obtidos de acordo com o método de ensaio específico para cada polímero sintético.....	105
<b>FIGURA 18:</b> Curvas de distribuição de massa molar média e valores comparativos entre controle e amostra de PVC e PS após incubação com a cultura fúngica.....	109

## RESUMO

Este trabalho descreve a ação de fungos basidiomicetos na degradabilidade dos quatro principais polímeros sintéticos utilizados em embalagens de alimentos: polietileno tereftalato (PET), polipropileno (PP), poliestireno (PS), policloreto de vinila (PVC), e um outro polímero sintético, a espuma poliuretana (PU). Os microrganismos foram crescidos em meio líquido de sais, pH 6,8, contendo 0,1 % de tiamina, com 0,5 % do polímero sintético como única fonte de carbono durante 20, 30 e 40 dias de cultivo. A biodegradabilidade destes plásticos foi avaliada pelo monitoramento de crescimento dos organismos degradadores de lignocelulose em meio líquido Carbono-deficiente, determinação da perda de massa molar dos polímeros, da massa celular crescida na superfície, e examinação microscópica no final dos ensaios de incubação por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), a qual indicou alterações na integridade dos plásticos, particularmente em amostras de PVC, que sofreram reduções de massa muito significantes (cerca de 20 %). A habilidade fúngica para produção de enzimas celulolíticas e ligninolíticas tais como avicelase, xilanase, carboximetilcelulase, manganês peroxidase, lignina peroxidase, álcool veratrílico oxidase e lacase, assim como de biosurfactantes foi observada, revelando o potencial destes organismos para processos de biodegradação. A detecção de produtos de degradação dos plásticos no meio de cultura foi verificada utilizando-se espectrofotometria UV/Visível, na faixa de comprimento de onda de 200 a 500 nm, que produziu resultados interessantes para PVC com *Pleurotus* 001. A degradação dos polímeros foi investigada utilizando métodos viscosimétricos e Cromatografia de Permeação em Gel (GPC), resultando em perda de viscosidade dos polímeros após incubação com os microrganismos e discretas alterações nas distribuições das massas molares nos polímeros testados (PVC e PS). Nossos resultados indicaram a ocorrência de alterações estruturais nos polímeros sintéticos em decorrência do processo de biodegradação.

## ABSTRACT

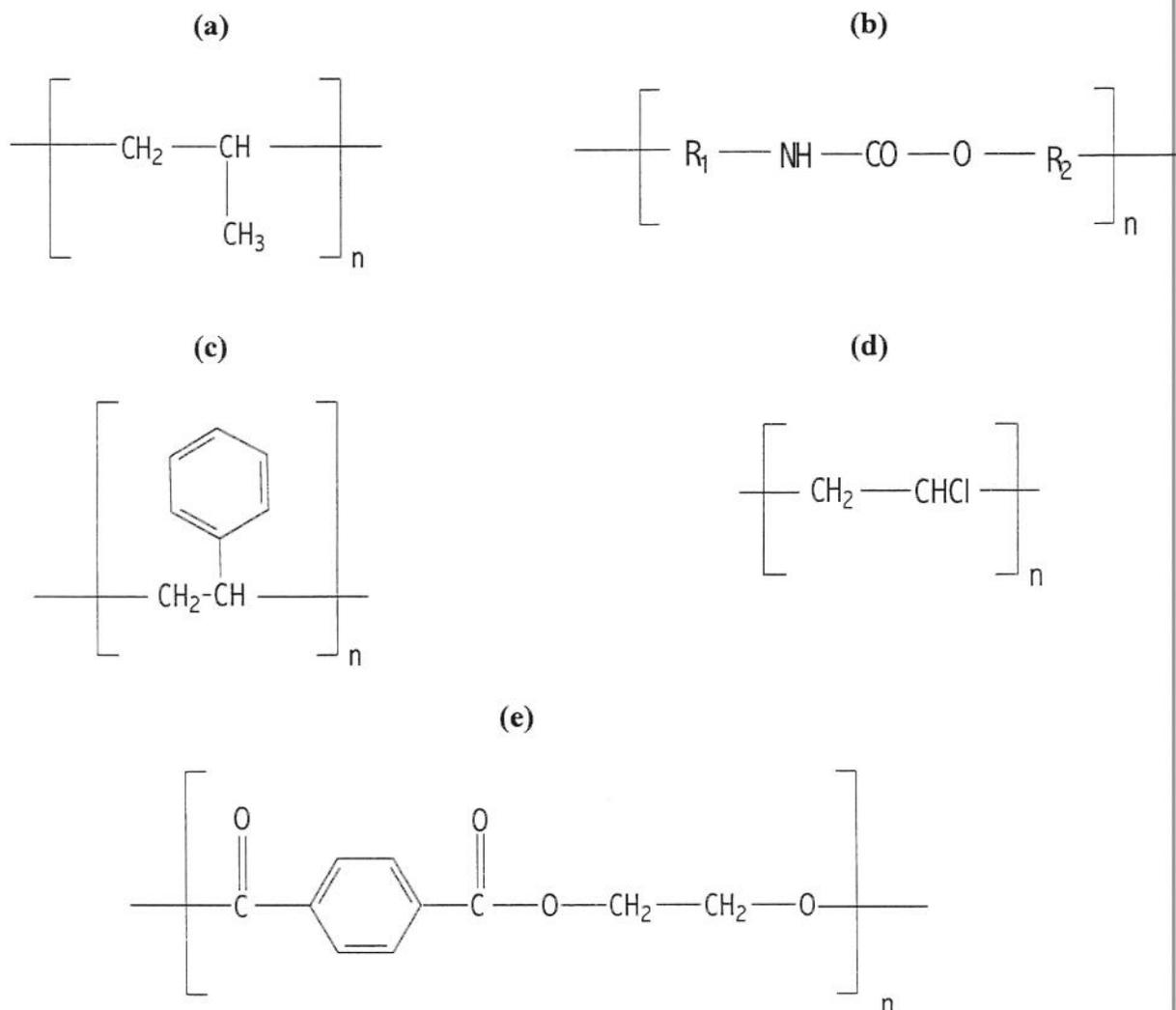
This work describes the action of basidiomycetes fungi on the degradability of the four main synthetic polymers used in food packaging: polyethylene terephthalate (PET), polypropylene (PP), polystyrene (PS), polyvinyl chloride (PVC) and another synthetic polymer, a polyurethane foam (PU). The microorganisms were grown in the salts liquid medium, pH 6.8, containing 0.1 % of thiamine, with 0.5 % of synthetic polymer as the sole carbon source for 20, 30 and 40 days of cultivation. The biodegradability of these plastics was evaluated by monitoring the growth of the lignocellulose-degrading organisms on carbon-deficient liquid medium; determination of the molar mass loss of the polymers, of the cellular mass grown on the surface, and microscopic examination at the end of the incubation assays by Scanning Electron Microscopy (SEM), which indicated changes in the integrity of the plastics, particularly in PVC specimens, which suffered very significant mass reductions (about 20 %). The ability of the fungi to produce cellulolytic and ligninolytic enzymes, such as avicelase, xylanase, carboxymethylcellulase, manganese peroxidase, lignin peroxidase, alcohol veratryl oxidase and laccase, as well as of biosurfactants was observed, revealing the potential of these organisms in biodegradation processes. The detection of degradation products of the plastics in the culture medium was verified using ultraviolet-visible spectrophotometry, in the wavelength range of 200 to 500 nm, which produced interesting results for PVC with *Pleurotus* 001. The degradation of the polymers, investigated using viscosimetric methods and Gel Permeation Chromatography (GPC), resulted in viscosity loss on the polymers following incubation with microorganisms and small changes in the molar mass distribution in the polymers tested (PVC and PS). Our results indicated structural alterations in the synthetic polymers due to biodegradation process.

## I. INTRODUÇÃO

Os polímeros sintéticos têm sido largamente utilizados nos diversos campos industriais e domésticos desde o começo do século passado, com inúmeras aplicações, principalmente como materiais de embalagens, poliuretanos, poliestirenos, e outros compostos que são rapidamente descartados resultando em um grave problema ambiental (MUSTAFA, 1993). Ao contrário dos polímeros naturais, a maioria das macromoléculas sintéticas são recalcitrantes porque não podem ser assimiladas pelos microrganismos, desta forma, os plásticos que são depositados no meio ambiente permanecem inalterados por muitas décadas (ALBERTSSON & HUANG, 1995). A existência de organismos capazes de metabolizar compostos xenobióticos é de grande interesse para atuação em processos de biorremediação. Um dos grupos mais importantes nesta área são os fungos de decomposição branca que degradam uma ampla variedade de organopoluente persistentes no ambiente e estruturalmente diversos a  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$  (CHANDRA & RUSTGI, 1998).

Apesar da busca incessante por melhorias na utilização e descarte de resíduos sólidos, é nítida a grande quantidade de materiais plásticos presentes em aterros sanitários no Brasil. Dentre a grande variedade de resinas termoplásticas (que sofrem alterações com aplicação de calor, mas que podem ser remoldadas sem perderem suas características iniciais), o polietileno de baixa e alta densidade (PE), o policloreto de vinila (PVC), o poliestireno ou isopor (PS), o polipropileno (PP) e o polietileno tereftalato (PET) representam cerca de 90% do consumo no Brasil. As resinas termofixas (que uma vez moldadas não podem sofrer novos

ciclos de processamento) representam uma parcela muito menos significativa do total de plásticos consumidos no país, como é o caso dos Poliuretanos (PU) (Manual de Gerenciamento Integrado, 1996; SEYMOUR & CARRAHER, 1987). A figura 1 ressalta a estrutura química dos polímeros sintéticos analisados neste estudo: polipropileno, poliuretano, poliestireno, policloreto de vinila e polietileno tereftalato.



**FIGURA 1. Estrutura química dos polímeros sintéticos: (a) polipropileno; (b) poliuretano; (c) poliestireno; (d) policloreto de vinila; (e) polietileno tereftalato.**

Recentemente, há uma tendência no estudo de plásticos biodegradáveis que vem atraindo muito interesse no desenvolvimento de novos materiais com as mesmas propriedades físicas exigidas pelo consumidor e com padrões de segurança durante o seu uso e descarte. Até então, os polímeros que não são biodegradáveis continuam sendo extremamente utilizados (ONODERA *et al.*, 2001).

Com uma produção imensa, a indústria de embalagens é a grande responsável pelo aumento da poluição por plásticos. Este é o caso, por exemplo, do polietileno tereftalato que vem sendo extremamente utilizado como embalagem de bebidas carbonatadas e que possui um tempo de vida previsto no meio ambiente em torno de 20 a 48 anos (MÜLLER *et al.*, 2001). Os modos pelos quais estes resíduos plásticos podem ser descartados/ tratados são através da deposição em aterros, compostagem (em bioreatores), incineração e reciclagem. Atualmente, a maior parte dos descartes plásticos está sendo incinerada ou enterrada. Contudo, a incineração destes resíduos pode provocar poluição ambiental secundária devido à produção de gases tóxicos (KIM *et al.*, 2000). Por outro lado, a reciclagem dos polímeros não é efetiva por apresentar alto custo. Assim, a administração de resíduos sólidos plásticos requer combinações complementares de biodegradação, incineração e reciclagem. A biodegradação é a solução mais indicada a longo prazo e necessita de intensa pesquisa antes de ser colocada em prática (MUSTAFA, 1993; ONODERA *et al.*, 2001).

## II. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1) A Biodegradação de polímeros sintéticos

Especialmente em países em desenvolvimento, a poluição ambiental causada por polímeros sintéticos tem assumido proporções drásticas. Atualmente as maiores áreas de interesse ambiental são a biodegradação de compostos tóxicos, como por exemplo pesticidas e hidrocarbonetos clorados, e o descarte de resíduos sólidos, como é o caso típico dos plásticos. A biodegradação é um processo natural pelo qual compostos químicos orgânicos presentes no ambiente são convertidos a componentes menores, mineralizados e redistribuídos através dos ciclos elementares do carbono, nitrogênio e enxofre (CHANDRA & RUSTGI, 1998; MADIGAN *et al.*, 2000). GÖPFERICH (1996) definiu biodegradação como o processo de cisão de cadeia durante o qual a cadeia polimérica é clivada para formar oligômeros e finalmente monômeros; e erosão como a perda de material devido à migração de monômeros e oligômeros do composto polimérico.

Os estudos realizados sobre a biodegradação de polímeros sintéticos até o momento relatam que apenas a porção resínica destes materiais é freqüentemente resistente à degradação microbiana, e por isso não serve como fonte de carbono para o crescimento de fungos e bactérias. São geralmente outros componentes presentes nos materiais poliméricos, como os aditivos, que são suscetíveis ao ataque dos microrganismos (LEE *et al.*, 1991; MILSTEIN *et al.*, 1992; CHANDRA & RUSTGI, 1998; PENG & SHEN, 1999; GUMARGALIEVA *et al.*, 1999; KIM *et al.*, 2000). De uma forma geral, os aditivos representam cerca de

20 % em peso do plástico comercial. Dentre eles, as cargas (ou materiais de preenchimento) representam a maioria do consumo (em peso) dos aditivos pois são utilizadas como redutores de custo. Outros aditivos, como os lubrificantes (facilitam o processamento) e antioxidantes (inibem ou reduzem a velocidade de degradação oxidativa) são empregados em quase todos os polímeros porém em pequenas concentrações. Já os plastificantes (conferem flexibilidade e melhoram a processabilidade e resistência ao impacto) são muito pouco utilizados na maioria dos polímeros, mas é característico no PVC. Os aditivos são geralmente substâncias de baixo peso molecular e, em alguns casos, possuem baixa miscibilidade com os polímeros acarretando problemas de migração. A migração do aditivo presente num composto polimérico depende dos seguintes fatores: tipo de polímero, solubilidade e difusividade no polímero (relacionado ao tamanho do aditivo), natureza do ambiente, tempo de contato e temperatura (RABELLO, 2000).

Portanto, é importante o conhecimento da composição da cada material polimérico para se estabelecer a resistência destes plásticos aos microrganismos quando aplicadas condições de temperatura e umidade favoráveis ao processo degradativo. No caso do polipropileno, polietileno e poliestireno, que possuem um esqueleto constituído unicamente de átomos de carbono, existe uma grande resistência às influências ambientais, ao contrário de outros polímeros que contém heteroátomos na cadeia principal apresentando-se potencialmente susceptíveis à clivagem hidrolítica (MÜLLER *et al.*, 2001). Quando a degradação ocorre, os efeitos esperados são: ataque da superfície, descoloração e mudanças nas

propriedades ópticas, elétricas e mecânicas dos polímeros (ASTM G21-90, 1990; SANTERRE *et al.*, 1993).

Os polímeros naturais, tais como proteínas, amido e celulose, são prontamente biodegradados por hidrólise seguida de oxidação. Por outro lado, a maioria dos polímeros sintéticos comerciais é resistente à biodegradação aparentemente porque microrganismos não são capazes de assimilá-los diretamente. A suscetibilidade de degradação dos polímeros sintéticos está diretamente relacionada ao crescimento microbiano nestes polímeros, conforme apresentado na tabela 1(SCHNABEL, 1981).

A iniciação da degradação de compostos sintéticos pelos microrganismos está intimamente relacionada à natureza do material, através da habilidade de clivagem enzimática de ligações hidrolisáveis contidas nas cadeias poliméricas, como é o caso de ligações éster, uréia e uretana. Outros fatores que também afetam a biodegradabilidade de polímeros sintéticos são o pH, que pode funcionar como catalisador de reações hidrolíticas aumentando as taxas de degradação, e o efeito da copolimerização através da introdução de um segundo monômero na cadeia, alterando as propriedades originais do polímero, favorecendo a degradação de acordo com o tipo de ligação prevalente (SCHNABEL, 1981; GÖPFERICH, 1996; CHANDRA & RUSTGI, 1998).

**TABELA 1: Crescimento microbiano em plásticos comerciais (SCHNABEL, 1981).**

<b>PRODUTOS COMERCIAIS</b>	<b>TAXA DE CRESCIMENTO MICROBIANO</b>
Poliisobuteno, Polimetilmetacrilato, Poliformaldeído, Acetato de celulose, Poliéter etil vinil	0
Acetato de polivinila, Estireno butadieno, Cloreto de polivinila, Poliestireno, Polipropileno, Polietileno tereftalato	1 ( < 10 % )
Polietilenos	2 ( 10-30 % )
Cloreto de polivinila plastificado	3 ( 30-60 % )
Poliuretano	4 ( 60-100 % )

Ao contrário da grande maioria dos polímeros sintéticos, o poliuretano que constitui a espuma flexível (também denominado poliéster uretano) possui um tempo de vida de 5 anos à temperatura ambiente e umidade elevada, devido à degradação hidrolítica que sofre no meio ambiente (PHUA *et al.*, 1987). De fato, vários autores vêm pesquisando este processo e um dos meios mais estudados para se desvendar este fenômeno é a biodegradação. Devido às aplicações de materiais compostos de poliuretanos na área biomédica, estudos têm demonstrado uma variedade de enzimas hidrolíticas e oxidativas envolvidas na biodegradação *in vivo*, que podem ocasionar complicações sérias com relação à biocompatibilidade e funcionalidade de dispositivos médicos conforme relatado por SMITH *et al.* (1987) e SANTERRE *et al.* (1993). Estudos *in vitro* realizados por

BLAKE *et al.* (1998) relataram a suscetibilidade destes polímeros quanto à biodegradação com espécies de *Bacillus* sp., ou simplesmente reduções na massa/volume aparente do poliuretano por microrganismos ao longo do tempo conforme observado por PHUA *et al.* (1987) e RATNER *et al.* (1988). Os poliuretanos contendo grupos éster são afetados por microrganismos, mas não aqueles baseados em grupos éter, o que deve ser levado em consideração na confecção de tais dispositivos médicos para aplicações *in vivo* (SCHNABEL, 1981).

A biodegradabilidade do polipropileno foi observada por CACCIARI *et al.* (1993) quando incubado sem nenhum tratamento prévio com um consórcio de bactérias aeróbias e anaeróbias estritas do solo adaptadas a condições limitantes de oxigênio.

A utilização de hidroquinona peroxidase produzida por *Azotobacter beijerinckii* para degradar polímeros sintéticos insolúveis em água foi realizada por NAKAMIYA *et al.* (1997), que relataram sucesso na degradação do poliestireno, porém não obtiveram êxito com polietileno, polipropileno e polipropileno glicol.

O estudo de biodegradação do poliestireno com os fungos de decomposição branca *Pleurotus ostreatus*, *Phanerochaete chrysosporium* e *Trametes versicolor* realizado por MILSTEIN *et al.* (1992) revelou taxas de decomposição insignificantes, porém, quando sintetizado como copolímero com lignina alcançou taxas muito elevadas de degradação no ambiente, sendo diretamente proporcional ao conteúdo de lignina no composto. Outros componentes podem ser copolimerizados com o poliestireno para aumentar sua biodegradabilidade, como por exemplo grupos piridínicos que são altamente hidrofílicos e com isso

promovem uma redução na hidrofobicidade deste polímero sintético, tornando-o mais acessível para atuação microbiana (PENG & SHEN, 1999).

A habilidade de degradação de policloreto de vinila recalcitrantes por *Phanerochaete chrysosporium*, *Poliporus versicolor* e algumas espécies de *Pleurotus*, foi proposta por KIRBAS *et al.* (1999), para investigação da influência da oxigenação na biodegradação do PVC e das condições ótimas para crescimento e atividade fúngica neste substrato. Já a suscetibilidade de biodegradação do PVC por *Aspergillus niger* foi observada por GUMARGALIEVA *et al.* (1999) através da difusão e desorção de plastificantes aditivos do material, principalmente de plastificantes ftalatos que são amplamente utilizados em PVC e prontamente acumulados pelos microrganismos.

A degradação do polietileno por *Penicillium simplicissimum* foi observada por ONODERA *et al.* (2001) que relataram a eficiência de degradação do polietileno em função da fase de crescimento na cultura pura do fungo e da inserção de grupos funcionais no polímero, em decorrência de irradiação com luz ultravioleta ou pela presença de agentes oxidantes.

Ao contrário da maioria dos poliésteres alifáticos, os poliésteres aromáticos, como o polietileno tereftalato (PET), possuem excelentes propriedades físicas e são amplamente utilizados comercialmente, porém são considerados como resistentes ao ataque microbiano. KAWAI (1996), relatou a biodegradabilidade de poliésteres de tereftalato, ftalato ou isoftalato policondensados com polietileno glicol (PEG), que aumentou sua susceptibilidade à degradação pela adição de componentes dihidroxílicos. MÜLLER *et al.* (2001) observaram quebra hidrolítica da cadeia polimérica de PET pela introdução de componentes ácidos alifáticos.

Até o momento, nenhum ataque microbiano ou enzimático direto significativo foi observado em poliésteres aromáticos puros (MÜLLER *et al.*, 2001).

De forma geral, os fungos são especialmente importantes para estudos de biodegradação, pois apresentam um sistema enzimático capaz de clivar ligações éster, como já mencionado, muito importante em plastificantes de PVC e espumas de poliéster uretanas. As substâncias resultantes possuem peso molecular reduzido e podem então ser assimiladas por vários outros organismos. Portanto, a biodegradação de polímeros sintéticos deve ser catalisada por enzimas extracelulares produzidas pelos microrganismos, pois estes polímeros são insolúveis em água e não podem atravessar a parede celular microbiana (PENG & SHEN, 1999).

## **2.2) Características gerais dos fungos de decomposição branca**

Existem milhares de espécies de fungos que causam a podridão branca na madeira, a maioria deles pertencentes à subdivisão Basidiomycotina. A degradação da lignina por estes fungos é mais rápida do que de qualquer outro organismo, sendo os maiores responsáveis pela decomposição da lignina na natureza. Contudo, o substrato para o seu crescimento não é somente a lignina, mas também celulose e hemiceluloses. O crescimento dos fungos filamentosos diminui em condições de esgotamento de nitrogênio e carbono, em pHs acima de 7,5 e é facilitado em faixas mesófilas de temperatura. A atividade ligninolítica aparece como uma forma de metabolismo secundário (MADIGAN *et al.*, 2000; TUOMELA *et al.*, 2000).

Os fungos da podridão branca podem causar deslignificação seletiva ou não seletiva da madeira. Na deslignificação seletiva, a lignina é removida sem nenhuma perda marcante de celulose, e na deslignificação não seletiva todos os componentes da parede celular vegetal são degradados. Embora a maioria dos fungos ataque a madeira ou de forma seletiva ou não seletiva, existem fungos que são capazes de realizar ambas as vias de degradação, como é o caso de *Heterobasidion annosum*. As espécies de fungos de decomposição branca mais estudadas são *Phanerochaete chrysosporium* e *Phlebia radiata*, que degradam a lignina seletivamente, e *Trametes versicolor* que degrada a lignina não seletivamente (BLANCHETTE, 1995). A maioria das espécies de *Pleurotus spp.* possuem uma habilidade saprofítica altamente competitiva contra a microbiota do solo em sistemas solo- lignocelulose, quando comparadas com outras linhagens de basidiomicetos de degradação branca.

Os fungos degradadores de lignina são capazes de transformar e mineralizar poluentes ambientais tais como hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, corantes azo, e vários outros compostos recalcitrantes que são decompostos pela ação de suas enzimas extracelulares, constituindo uma grande fonte de aplicação nos processos de biorremediação de ambientes contaminados (LANG *et al.*, 1998).

### **2.3) Papel das enzimas lignocelulolíticas produzidas por fungos**

Dentre os polímeros naturais mais abundantes, a lignocelulose representa o composto de maior biomassa presente na Terra, sendo encontrada como material integrante da parede celular de vegetais. É constituída por uma mistura de celulose (~ 40 %), hemicelulose (~ 20-30 %) e lignina (~ 20-30 %). A celulose é um polímero altamente cristalino formado por resíduos de glicose unidos por ligações  $\beta$ -1,4, com alto peso molecular e de difícil solubilidade, por isso é usualmente convertida em seus derivados para facilitar seu processamento. As hemiceluloses, encontradas amplamente associadas à celulose, são constituídas por polímeros de galactose, xilose, arabinose e manose. Já a lignina, o segundo composto mais amplamente distribuído no planeta, é um polímero aromático em parte cristalino, tridimensional, que se encontra envolvido por microfibrilas compostas de celulose e hemicelulose para proteção contra a atividade hidrolítica de enzimas e outros fatores externos formando uma estrutura complexa e estável (CHANDRA & RUSTGI, 1998; LEONOWICZ, 1999).

A maioria dos resíduos agroindustriais como os resíduos agrícolas, os lixos urbanos e os resíduos do processamento das indústrias de papel e alimentos são compostos de lignocelulose. Para utilizar esta biomassa se faz necessária a sua conversão em compostos utilizáveis como glicose, etanol, adubos orgânicos, ração animal e outros. Daí a necessidade do estudo da biodegradação de polímeros naturais e conseqüentemente da sua bioconversão em produtos reutilizáveis (HIGUCHI, 1993).

Os fungos da podridão branca degradam a lignina por meio de enzimas oxidativas. Devido à natureza e tamanho da molécula de lignina, as enzimas responsáveis pelo ataque inicial devem ser extracelulares e inespecíficas (HATAKKA, 1994). As enzimas mais estudadas dos fungos de decomposição branca são: Lignina Peroxidase (LiP), Manganês Peroxidase (MnP) e Lacase, que são produzidas em diferentes combinações pelas espécies; por exemplo, *P. chrysosporium*, *P. radiata* e *T. versicolor* pertencem ao grupo LiP-MnP. Frequentemente, membros deste grupo também produzem lacase mas somente em condições específicas. Diversos fungos pertencentes aos grupos LiP-MnP e MnP-lacase são degradadores efetivos de lignina, fato este que parece estar relacionado com o papel essencial da MnP na degradação da lignina (TUOMELA *et al.*, 2000).

A Lignina Peroxidase (LiP), uma glicoproteína contendo grupo heme, é responsável pela degradação da lignina na presença de peróxido de hidrogênio e tem capacidade para oxidar um grande número de substâncias aromáticas, incluindo compostos altamente poluentes e recalcitrantes, tais como corantes azo e pesticidas. Estas propriedades fazem a LiP potencialmente útil em produções que utilizam matéria-prima lignocelulósica tais como a indústria de papel e de polpas, e na conversão da lignina em sub-produtos tais como combustível e ração animal (MACEDO *et al.*, 1999).

A Manganês Peroxidase (MnP) que também contém grupo heme, oxida o  $Mn^{+2}$  a  $Mn^{+3}$  que então oxida os anéis fenólicos a radicais fenoxi na presença de peróxido de hidrogênio levando à decomposição dos compostos. O papel crucial da MnP na biodegradação da lignina está relacionado à despolimerização e

desmetilação da lignina e clorolignina, no branqueamento de polpas e na mediação das etapas iniciais de degradação da lignina de alto peso molecular (HATAKKA, 1994).

A enzima álcool veratrílico oxidase (AVO) catalisa a oxidação de álcoois insaturados aos seus aldeídos correspondentes, através da redução de  $O_2$  a  $H_2O_2$ , favorecendo a atuação de peroxidases durante a degradação da lignina.

As fenol oxidases, comumente denominadas lacase, catalisam a oxidação de vários compostos fenólicos pela redução do oxigênio molecular a água através de um sistema oxido-redutor multicobre. O provável papel catabólico de fenol oxidases fúngicas na biodegradação da lignina têm atraído muito interesse para aplicações potenciais não somente em processos de produção de papel e de polpas, mas também na bioconversão de muitos compostos aromáticos xenobióticos com estruturas similares à da lignina. O papel fisiológico desta enzima, que é biossintética em plantas e biodegradativa em fungos, ainda continua como objeto de investigação, porém já foram descritas no mínimo três diferentes lacases que são produzidas por *Pleurotus ostreatus*. Contudo, a deslignificação é um processo complexo e as enzimas provavelmente tem um efeito sinérgico entre si (SRINIVASAN *et al.*, 1995; TUOMELA *et al.*, 2000). Estudos relatam a degradação acelerada de lignina na presença de celulose e seus oligômeros, propondo uma teoria de interdependência tipo "feedback" entre os processos de deslignificação e degradação da celulose (LEONOWICZ *et al.*, 1999).

A bioconversão da celulose em açúcares solúveis e glicose é catalisada por um grupo de enzimas denominada celulases. Microrganismos incluindo fungos,

bactérias e actinomicetos produzem principalmente três tipos de celulases: endocelulases, exocelulases e  $\beta$ -glucosidase, tanto separadamente quanto na forma de um complexo. As celulases mais conhecidas são carboximetilcelulase (CMCase), que hidrolisa a carboximetilcelulose, e avicelase, que hidrolisa a avicel ou celulose microcristalina, liberando polímeros de celulose. Hemicelulases são tipicamente produzidas como uma mistura de diferentes enzimas hidrolíticas, como é o caso das xilanases que atuam na xilana degradando seu esqueleto em oligômeros menores denominados xilose. Recentemente vem crescendo o interesse em novas enzimas xilanolíticas de fontes microbianas para numerosas aplicações na indústria de polpas e papel, alimentos e de ração animal (SÁ-PEREIRA *et al.*, 2000; LI *et al.*, 2000).

Considerando que as enzimas ligninolíticas extracelulares estão envolvidas na catálise das reações iniciais críticas da transformação de compostos poluentes, que geralmente são pobremente solúveis em água, fica comprovada a capacidade da hifa fúngica em secretar as enzimas não somente em seu substrato natural, a lignocelulose, mas também em ambientes contaminados (LANG *et al.*, 1998). Daí, a importância de se obter informações sobre o sistema enzimático de microorganismos envolvidos na biodegradação de compostos recalcitrantes para permitir a manipulação de condições ambientais, aumentando a utilização do substrato e o aproveitamento das enzimas liberadas para aplicações industriais.

## 2.4) Surfactantes de origem microbiana

O crescimento microbiano em fontes de carbono insolúveis em água é acompanhado por alterações metabólicas e estruturais da célula. O aparecimento de biosurfactantes ou compostos de superfície ativa no meio de cultura ou unido às paredes celulares é geralmente considerado um pré requisito para as interações iniciais entre os hidrocarbonetos e a célula microbiana, porque reduzem a tensão interfacial entre o óleo e a fase aquosa, diminuindo o diâmetro médio das gotas de óleo e propiciando o aumento da área interfacial (ROUSE *et al.*, 1994). O maior mercado para aplicação de surfactantes é a indústria de petróleo, onde são utilizados para a produção e incorporação nas formulações de óleo, além de também aumentar a recuperação de compostos oleosos. Outro grande mercado de utilização de surfactantes é a polimerização de emulsões para tintas e revestimentos de papel (VANDYKE *et al.*, 1991).

Surfactantes microbianos incluem uma grande variedade de estruturas químicas como glicolipídeos, lipopeptídeos, complexos de polissacarídeos ou proteínas, fosfolipídios, ácidos graxos e lipídeos neutros, sendo que cada família de biosurfactantes apresenta propriedades e funções fisiológicas diferentes (GEORGIU *et al.*, 1992). Estudos têm revelado que os biosurfactantes estão aumentando a biodisponibilidade e biodegradação de poluentes hidrofóbicos no solo, assim como a dispersão e/ou solubilização de poluentes insolúveis em água que constitui uma importante etapa na biorremediação (FIECHTER, 1992; CARVALHO *et al.*, 1997; CARVALHO *et al.*, 1998; HARWELL *et al.*, 1999).

Os polímeros sintéticos, por serem constituídos por cadeias de hidrocarbonetos altamente hidrofóbicas, necessitam aumentar sua solubilidade no meio, ou seja, tornarem-se mais hidrofílicos para que possam estar mais acessíveis à célula microbiana e, deste modo, serem disponibilizados para utilização nos processos metabólicos do microrganismo.

Os biosurfactantes apresentam vantagens especiais sobre surfactantes químicos, tais como: baixa toxicidade, biodegradabilidade, produção a partir de substratos renováveis, capacidade de modificação estrutural através da engenharia genética ou técnicas bioquímicas e estabilidade em valores extremos de pH e temperatura (GEORGIU *et al.*, 1992; ROUSE *et al.*, 1994). Portanto, em virtude de todas estas propriedades, os biosurfactantes representam uma fonte potencial para estudos de biorremediação de ambientes contaminados com compostos xenobióticos, mas a maneira pela qual isto ocorre ainda não está bem esclarecida.

## **2.5) Degradação de polímeros sintéticos**

Uma comparação significativa da resistência intrínseca de diferentes polímeros a um processo degradativo particular é difícil de se estabelecer devido à grande variedade de condições testes, à sensibilidade dos polímeros a traços de impurezas e aditivos, e às diversas formas físicas dos polímeros como espessura, morfologia, orientação, formato, etc. Além disso, a degradação pode resultar da exposição a dois ou mais processos combinados. Portanto, apenas uma comparação qualitativa entre os polímeros pode ser determinada em relação aos

diferentes processos de degradação (HUMMEL & SCHOLL, 1988). A suscetibilidade de polímeros sintéticos à degradação pode ser claramente resumida conforme a Tabela 2:

**TABELA 2. Suscetibilidade de polímeros à degradação (MARK *et al.*, 1986)**

POLÍMEROS	RESISTÊNCIA A PROCESSOS DEGRADATIVOS				
	TERMO- OXIDAÇÃO	FOTO- OXIDAÇÃO	OZÔNIO	HIDRÓLISE	$\gamma$ - OXIDAÇÃO
Polipropileno (PP)	MP	MP	E	E	P
Poliestireno (PS)	F	P	E	E	B
Policloreto de vinila (PVC)	MP	P	E	E	P
Polietileno tereftalato (PET)	B	B	E	B	B
Poliuretano (PU)	F	F	B	B	F

E = excelente; B = boa; F = falha; P = pouca; MP = muito pouca

O Polipropileno é suscetível à oxidação térmica, geralmente durante o processamento com temperaturas de extrusão de 180-250 °C e até mesmo à temperatura ambiente, por isso ele nunca é produzido sem um antioxidante. A iniciação de oxidação térmica em polímero sólido é freqüentemente atribuída aos peróxidos ou hidroperóxidos formados durante o processamento ou estocagem,

talvez em parte como o resultado de um ataque muito lento por ozônio (MARK *et al.*, 1986). A foto-degradação ocorre por ação de irradiação solar e leva à cisão dos polímeros e formação de produtos de oxidação, como grupamentos hidroxilas (OH) que são dominantes e quantidades apreciáveis de grupos carbonilas também são formados. Por constituir um hidrocarboneto saturado, não absorve radiação além de 180 nm, com isso, o PP pode ser rapidamente fotodegradado pela presença de impurezas que funcionam como fotoiniciadores do processo de degradação. Os estudos de degradação por radiação  $\gamma$  de PP têm sido relacionados com suas utilidades para aplicação na área médica, principalmente na esterilização de equipamentos. São lentamente atacados por ácidos fortemente concentrados, tais como o sulfúrico ( $H_2SO_4$ ), especialmente se um agente oxidante estiver presente, o que caracteriza sua estabilidade em meios agressivos. Com relação à composição do polipropileno (PP), por exemplo, existe uma necessidade de empregar aditivos na sua formulação, porque sua forma pura é rapidamente degradada em presença de luz e oxigênio. Deste modo, possui boa resistência a gases e ao vapor d'água, a ácidos fortes e álcalis, não sendo afetado pela maioria dos solventes orgânicos à temperatura ambiente (SCHNABEL, 1981).

No caso do poliestireno (PS ou isopor), a forma expandida utilizada para embalagens de alimentos (carnes, peixes, sorvetes, congelados etc.) confere características protetoras ao seu conteúdo devido ao seu processo de fabricação por extrusão de pequenas esferas do material junto com um agente de expansão (geralmente hidrocarbonetos alifáticos) e um aditivo para controlar o tamanho das células formadas. A degradação térmica e de foto-iniciação do poliestireno é uma

das áreas mais estudadas de deterioração deste polímero. A foto-degradação pode ocorrer na presença ou não de oxigênio, e o que irá variar entre estes dois processos será a formação de hidroperóxidos, na presença de oxigênio e em comprimentos de onda  $\leq 290$  nm, que irá acelerar a degradação pois este produto absorve a luz por si próprio, desencadeando fotoreações posteriores. Em geral, o PS é fotodegradado por dois processos distintos dependendo do comprimento de onda da irradiação: quando  $\lambda \leq 290$  nm, os anéis aromáticos absorvem diretamente ocasionando um amarelecimento da superfície; e em  $\lambda > 295$  nm, como a luz solar por exemplo, as fotoreações resultam de impurezas introduzidas durante a polimerização, processamento, ou estocagem (KROSCWITZ, 1990). A degradação térmica se inicia acima de  $200$  °C, provocando rompimento da cadeia e é grandemente dependente da presença de impurezas, contudo a temperatura máxima de utilização para assegurar que não ocorra termo-degradação é em torno de  $50$  °C. Comparado com outros polímeros aromáticos, o PS é atacado muito lentamente por ozônio (HUMMEL & SCHOLL, 1988).

Já o policloreto de vinila (PVC) não pode ser convertido sem a inclusão de aditivos na sua composição, tais como estabilizantes (para resistir às condições de processamento sem que ocorram danos à sua estrutura), lubrificantes (evitar aderência e amolecimento pelo contato com superfícies quentes), plastificantes (para assumir a forma flexível e plástica) e pigmentos. O PVC é extremamente sensível à degradação induzida por aquecimento e luz e a sua variada aplicabilidade é atribuída à estabilização tecnológica desenvolvida ao longo dos anos. A degradação térmica na ausência de oxigênio começa a  $100 - 150$  °C, e é

caracterizada pela evolução corrosiva do ácido clorídrico (HCl), perda de propriedades elétricas e descoloração. Esta produção de HCl, denominada dehidrocloração, é elevada rapidamente com o aumento da temperatura em filmes flexíveis de PVC e chega a 100 % à 250 °C em 5 horas (KELEN, 1983; KROSCWITZ, 1990). Se considerar um PVC puro, ele não absorve acima de 220 nm, contudo, muitas das impurezas responsáveis pela degradação térmica e produtos deste processo, podem absorver próximo à região UV e provocar a foto-iniciação. O amarelecimento observado em alguns casos, resulta da formação de polienos e a perda de HCl (desidrocloração) é muito mais nítida sendo iniciado por impurezas no polímero. O PVC é talvez um dos exemplos mais conhecidos onde a desidrocloração produz seqüências de polienos fortemente absorvedoras, pois as ligações múltiplas conjugadas absorvem mais intensamente nas regiões de UV com maiores comprimentos de ondas (SHIN *et al.*, 1998).

A deterioração do PET pode ocorrer por duas rotas: pela foto clivagem direta do polímero e por subsequente foto oxidação dos grupos glicol. Quando expostos à luz solar, a foto oxidação não é uniforme, sendo degradado preferencialmente na superfície orientada para a luz. Com relação à degradação hidrolítica, todos os poliésteres aromáticos podem ser degradados a temperaturas de extrusão, porém para evitar a termo degradação do PET, a temperatura máxima de utilização deve ser de 105 °C (MARK *et al.*, 1986). Embora sua estabilidade térmica seja relativamente alta, substâncias voláteis tóxicas são emitidas a temperaturas de 200-300 °C, durante a produção, processamento e reciclagem do material, produzindo principalmente acetaldeído, formaldeído, monóxido de carbono e benzeno. As reações de degradação termo-oxidativas são mais complicadas com

a participação do O<sub>2</sub> formando hidroperóxido seguido pela ruptura da cadeia (DZIECIOL & TRZESZCZYNSKI, 1998).

O poliuretano de espumas flexíveis pode sofrer cisão tanto nas ligações éster como nas uretano, sendo o grupo éster mais sensível à hidrólise do que o outro. Os produtos ácidos formados catalisam hidrólises posteriores. A clivagem da cadeia é acompanhada por um aumento na cristalinidade com mudanças acentuadas nas propriedades mecânicas. A degradação térmica ocorre em temperaturas acima de 150 °C, provocando a clivagem de ligações uretano e formando uma variedade de produtos de reação. A substituição de grupos lábeis nos compostos uretanos por segmentos alifáticos leves reduzem significativamente a instabilidade térmica de poliuretanos na faixa de 50-200 °C. Na presença de O<sub>2</sub>, todos os PU sofrem oxidação, especialmente os segmentos leves. Em geral, são sensíveis à luz, embora o grau de sensibilidade seja dependente especificamente da estrutura, que produz efeitos no poder elástico, na fratura da superfície e de formação de gel (SCHNABEL, 1981; HUMMEL & SCHOLL, 1988; KROSCWITZ, 1990).

## **2.6) Técnicas para avaliação de alterações estruturais de polímeros**

Um dos métodos analíticos mais simples utilizados para avaliação de alterações decorrentes de biodegradação polimérica é a pesagem dos espécimes plásticos, antes e após os ensaios de incubação com os microrganismos, para controle da perda de peso dos polímeros com a biodegradação (ASTM D 5210-92, 1992).

Para caracterizar a química de degradação, os métodos de espectroscopia são mais informativos e tem a vantagem de serem não destrutivos. A espectroscopia UV/visível, produz uma correlação direta com a descoloração do polímero e pode ser muito sensível. Todos os polímeros contendo anéis aromáticos e/ou ligações insaturadas absorvem na região UV, porém as absorções nas regiões UV/visível podem também ser produzidas pelos produtos de oxidação e degradação. A espectroscopia de UV é de considerável importância para a detecção de aditivos e para a investigação dos processos envolvidos no envelhecimento de polímeros sob influência da luz, oxigênio e aquecimento (KELEN, 1983; HUMMEL & SCHOLL, 1988). Outras técnicas para a identificação de produtos de degradação são a espectroscopia de infravermelho (IR) e a de ressonância magnética nuclear (NMR), sendo que a IR tem uma maior sensibilidade do que a NMR, porém tem menor poder de resolução.

O método físico-químico mais utilizado para a separação, identificação e quantificação de componentes de uma mistura é a cromatografia. Os tipos de técnicas cromatográficas aplicadas para polímeros são muito variadas, dentre elas: a cromatografia em papel, de camada delgada, gasosa e líquida são as mais importantes na separação e identificação dos produtos de hidrólises de polímeros e resinas (COLLINS *et al.* 1997). A cromatografia de permeação em gel (GPC), também conhecida por cromatografia por exclusão de tamanho (SEC), vem sendo extremamente explorada por diversos autores para caracterização e identificação de degradação em polímeros através de mudanças na distribuição de pesos moleculares do composto. A GPC promove uma seletiva e dinâmica distribuição das moléculas do soluto (polímero) entre duas fases líquidas separadas, e

dependentes de uma estrutura estacionária (coluna de gel) contendo poros de tamanho controlado por onde as moléculas do soluto permeiam e vão sendo eluídas da coluna a partir das partículas de maior massa. Esta técnica possui algumas propriedades desejáveis, tais como: simplicidade técnica, pouca sensibilidade a solventes e temperatura, e versatilidade, pois é possível separar componentes com faixas de massas molares muito extensas através da variação da matriz do gel (ALLEN & BEVINGTON, 1989; SCOTT & GILEAD, 1995). Além das determinações diretas das massas molares média dos polímeros, obtidas por cromatografia por exemplo, sob o aspecto prático são muito importantes também as avaliações indiretas destes valores médios, cujas principais vantagens são a rapidez do método e a facilidade experimental relacionada à manipulação dos equipamentos.

As determinações indiretas de massa molar média de polímeros são feitas principalmente através dos parâmetros relacionados com o método das viscosidades de soluções diluídas, onde se destacam as medidas de viscosidade intrínseca (muito importante em polietileno tereftalato) e o valor K (específico para o policloreto de vinila), ou através da determinação do índice de fluidez ou índice de fusão (para polipropileno, poliestireno, etc.). A viscosidade é basicamente uma medida do tamanho ou extensão no espaço das moléculas poliméricas, relacionada empiricamente com o peso molecular dos polímeros lineares. O valor K é a medida de viscosidade feita somente em PVC para especificação industrial deste tipo de resina. O índice de fluidez é indicativo da uniformidade da taxa de fluxo do polímero, constituindo um parâmetro definido empiricamente e altamente influenciado tanto pelas propriedades físicas e estrutura molecular do polímero

como das condições de ensaio. Os parâmetros obtidos nos métodos indiretos para avaliação dos pesos moleculares médios podem ser relacionados com aqueles obtidos com avaliações diretas da degradação de polímeros (ASTM D 1238-94, 1995; AGNELLI, 2000).

As análises de superfícies mais empregadas no campo da ciência de polímeros para investigações morfológicas são as de Microscopia Eletrônica. O Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) é uma das ferramentas mais indispensáveis utilizadas por várias empresas para analisar os constituintes e estrutura dos novos materiais desenvolvidos, até mesmo como técnica de rotina (SCOTT & GILEAD, 1995). Deste modo, a utilização da Microscopia Eletrônica de Varredura como técnica complementar permite obter um detalhamento da morfologia e avaliação dos elementos presentes em resíduos superficiais (BASSET, 1981).

### III. OBJETIVOS

Os objetivos deste projeto foram:

- ❖ Observação do crescimento e seleção de fungos capazes de utilizar como fonte de carbono polímeros sintéticos de importância na área de embalagem de alimentos (policloreto de vinila, polipropileno, polietileno tereftalato, poliestireno expandido) e comparação com outro polímero sintético (poliuretano) que já é conhecido biodegradável.
  
- ❖ Determinação da perda de massa das amostras de polímeros após incubação com os microrganismos, assim como da massa celular crescida em contato com o substrato plástico.
  
- ❖ Observação das alterações morfológicas e/ou estruturais dos polímeros após a biodegradação.
  
- ❖ Verificação do potencial das linhagens selecionadas na produção de biosurfactantes e de enzimas lignocelulolíticas de interesse industrial utilizando polímeros sintéticos como substrato.

## IV. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1) Microrganismos

As linhagens estudadas neste trabalho fazem parte da coleção de culturas do Laboratório de Sistemática e Fisiologia Microbiana, pertencente ao Departamento de Ciências de Alimentos da UNICAMP. Foram utilizadas:

- *Phanerochaete chrysosporium*
- *Pleurotus* sp. (P1)
- *Pleurotus sajor caju*
- *Pleurotus* 98/33
- *Pleurotus* 98/36
- *Pleurotus* 98/37
- *Pleurotus* 001
- *Pleurotus tailandia*
- PSC 94/03
- Fungo A15
- Levedura L7A
- Levedura Tolu

## 4.2) Preparo das linhagens

O crescimento das linhagens utilizadas neste estudo foi realizado em Placas de Petri contendo meio sólido específico para cada uma delas, como segue: *Phanerochaete chrysosporium*, *Pleurotus* sp. (P1), *Pleurotus sajor-caju* e fungo A15 no meio PDA (Batata Dextrose Ágar); *Pleurotus* 98/33, *Pleurotus* 98/36, *Pleurotus* 98/37, *Pleurotus* 001, *Pleurotus tailandia* e PSC 94/03 no meio MA + 0,2% EL (Extrato de Malte Agar + 0,2 % Extrato de levedura) e para as duas leveduras, L7A e Tolu, foi utilizado o meio GYP (Glicose Extrato de levedura Peptona). A temperatura de incubação foi de 30 °C para todas as linhagens, com exceção de *P. chrysosporium* que tem seu ponto ótimo de crescimento a 37 °C e o tempo ótimo de crescimento para realização do inóculo foi de 14 dias para os fungos e 7 dias para as leveduras.

## 4.3) Preparo dos espécimes plásticos

Esta etapa constituiu-se na pesagem dos plásticos para obtenção de filmes com peso fixo de 0,25 g para todas as amostras (PVC, PET, PP, PU e Isopor) que representou 0,5 % de fonte de carbono no meio de cultivo, e então foi efetuada a desinfecção das amostras de polímeros para eliminação de contaminantes microbianos. Este procedimento foi composto de um protocolo desenvolvido e validado pela “American Society for Testing and Materials” (ASTM G21-90, 1990; ASTM G22-76, 1990) e constituído pelos seguintes passos:

- Preparo da solução desinfetante universal (LEE *et al.*, 1991): adicionou-se assepticamente 14 mL do detergente Tween 80 a um litro de água estéril e esterilizou-se esta solução por filtração com membranas de éster de celulose de porosidade 0,22  $\mu\text{m}$  (Millipore cód. GSWP04700) com bomba de vácuo. Depois de filtrada, adicionou-se 20 mL de cloro a esta solução. É importante ressaltar que todas as etapas deste procedimento de desinfecção dos plásticos foram realizadas em câmara de fluxo laminar.
- Os espécimes plásticos foram adicionados à solução desinfetante universal por 60 minutos. Cada litro desta solução foi utilizado para a desinfecção de cerca de 20 a 25 espécimes plásticos. Para garantir a eficácia do método, foram utilizadas pipetas estéreis para homogeneizar a mistura ocasionalmente a fim de atingir toda a superfície dos filmes.
- Com o auxílio de uma pinça estéril, cada plástico imerso na solução desinfetante universal foi removido e transferido para outro frasco contendo apenas água estéril à temperatura ambiente, também misturando-se ocasionalmente para ocorrer uma lavagem efetiva, por no mínimo 1 hora.
- Os plásticos foram novamente removidos e mergulhados numa solução de etanol 70 %, sempre mantendo o frasco coberto e à temperatura ambiente, por 30 minutos.
- As amostras plásticas desinfectadas foram acondicionadas em frascos estéreis e cobertos com alumínio estéril em local arejado e à temperatura ambiente para propiciar a evaporação de resíduos de etanol das amostras durante 72 horas.

#### 4.4) Preparo do meio de cultura e inóculo

O meio de cultura denominado meio líquido base foi preparado para receber posteriormente as amostras de polímeros e os microrganismos. Este meio foi composto basicamente de sais minerais (0,5 g /  $(\text{NH}_4)_2 \text{HPO}_4$  ; 0,8 g /  $\text{H}_2\text{PO}_4$ ; 0,3 g /  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  ; 0,3 g /  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,004 g /  $\text{ZnSO}_4$  ; 0,005 g /  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  ; 0,055 g /  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) e de uma fonte de nitrogênio (0,2 g/ extrato de levedura) preparado nas proporções mencionadas para um volume final de 1000 mL de água destilada e pH 6,8. Além destes componentes, também foi adicionado um suplemento vitamínico de tiamina com concentração final de 10 mg /L de meio, que foi previamente filtrada em membrana Millipore 0,22  $\mu\text{m}$  utilizando um sistema Millipore com bomba de vácuo.

Cada amostra pesando 0,25 g foi transferida para erlenmeyers contendo 50 mL do meio líquido base autoclavado durante 15 minutos a 121  $^\circ\text{C}$  e posteriormente suplementado com 0,1 % de tiamina. O inóculo foi realizado na proporção de 1  $\text{cm}^2$  de fungos para cada 10 mL do meio líquido base, com o auxílio de espátulas estéreis para “recortar” o meio sólido e retirar a cobertura celular aderida no ágar. No caso das leveduras, o inóculo foi de uma alçada (alça de inoculação de 10  $\mu\text{L}$ ) para cada 10 mL de meio. O procedimento de inoculação foi realizado em Câmara de Fluxo Laminar, e os instrumentos flambados para esterilização. Os experimentos foram realizados em períodos de 20, 30 e 40 dias de incubação e mantidos em estufas incubadoras à 30  $^\circ\text{C}$  ou 37  $^\circ\text{C}$  (somente para *P. chrysosporium*). Todo o experimento foi baseado em ensaios em duplicata,

incluindo amostras de controle para os microrganismos (sem o polímero) e de controle dos plásticos (sem o microrganismo).

#### 4.5) Observação do crescimento microbiano nos polímeros sintéticos

Os ensaios realizados foram acompanhados semanalmente e os dados referentes ao crescimento das linhagens nos polímeros foram registrados em dias pré-determinados. A classificação foi feita conforme descrito pela ASTM e está representada na tabela abaixo.

**TABELA 3. Classificação em função do crescimento microbiano (ASTM G21-90, 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) Obtenção do caldo enzimático

Após os períodos de incubação, o meio de cultura foi filtrado em lã de vidro (Synth cód. 35460) para extração do caldo enzimático que continha todos os

produtos do metabolismo dos microrganismos e sub produtos da degradação dos polímeros. O armazenamento do extrato enzimático foi feito em frascos âmbar e a temperaturas de congelamento (-10°C). A amostra de plástico residual presente no meio de cultura no final dos períodos de crescimento foi retirada do meio com o auxílio de uma pinça e utilizada para determinação de perda de massa molecular e da massa celular crescida em contato com este substrato. Nesta etapa também foi medido o pH de todos os ensaios após a incubação, para comparação com o pH inicial fixado em 6,8.

#### **4.7) Determinação da perda de massa dos espécimes plásticos e da massa celular seca**

Este procedimento foi adaptado a partir de teste padrão estabelecido pela ASTM (D 5247-92, 1992), que consistiu das seguintes etapas:

- As amostras de polímeros com o microrganismo aderido foram retiradas do meio de cultura e colocadas em Placas de Petri em estufas de secagem a 50 °C por 24 horas para que a massa celular e o próprio plástico fossem secos;
- Após este período, as amostras foram pesadas em balança analítica e comparadas com a sua massa inicial que foi fixada em 0,25 g. Desse modo, ficou estabelecida a massa do plástico residual + a massa celular seca (ou:  $M_{pr} + M_c$ ).

- A remoção da massa celular do substrato plástico foi realizada utilizando-se solução de etanol 70 %. As amostras ficaram mergulhadas nesta solução, com agitações manuais freqüentes através de pipetas estéreis, por 30 minutos, sempre à temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram lavadas em água corrente para retirar resíduos da solução de etanol e retornaram às Placas de Petri para secagem à temperatura de 50 °C por 24 horas.
- Depois de obter o plástico seco, sem células microbianas, as amostras foram pesadas novamente e então a massa do plástico residual (Mpr) foi comparada com a inicial de 0,25 g para determinar se houve perda de massa ou não do polímero após o período de incubação com os microrganismos.
- A massa celular crescida nos substratos plásticos foi calculada da seguinte forma:  
massa celular seca = (massa do plástico residual + massa celular) – (massa do plástico residual), ou:  $M_{cseca} = (M_{pr} + M_c) - M_{pr}$ .

## **4.8) Preparação e análise das amostras para Microscopia Eletrônica de Varredura**

### **4.8.1) Preparação das amostras**

O protocolo utilizado foi uma adaptação feita a partir de dados de literatura para processamento de amostras biológicas (BAL-TEC, 1999). Como as células possuem uma fragilidade muito maior de superfície, necessitam de tratamento especial para que seus detalhes de morfologia sejam preservados. A metodologia de processamento das amostras de polímeros contendo células microbianas foi composta das seguintes etapas:

- Corte dos espécimes → com o auxílio de um bisturi e pinça, os plásticos foram cortados em dimensões bem reduzidas e pouca espessura;
- 1ª Fixação → os plásticos foram mergulhados em solução de glutaraldeído 2% preparado em tampão cacodilato de sódio ( $\text{Na}(\text{CH}_3)_2\text{AsO}_2$ ) 0,1 M e 0,2 % de ácido tânico, por 3 horas;
- 2ª Fixação → novamente os plásticos foram mergulhados em solução de glutaraldeído 2 % em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, porém com 2 % de ácido tânico, por 3 horas;
- 1ª Lavagem → realizada em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, por 10 minutos com 3 repetições;
- Pós-fixação → os plásticos foram imersos em solução de tetróxido de ósmio ( $\text{OsO}_4$ ) a 1 % diluído em tampão cacodilato de sódio 0,1 M por 1 hora. Cabe

ressaltar a necessidade de realizar esta etapa de pós-fixação em capela, inclusive para preparar a solução de tetróxido de ósmio, pois este reagente é altamente tóxico e carcinogênico. Outro procedimento de segurança foi a utilização de luvas e máscara para evitar qualquer tipo de contato com os componentes voláteis deste composto.

- 2ª Lavagem → realizada em água destilada por 10 minutos com 3 repetições;
- Desidratação → ocorreu em soluções com concentrações crescentes de etanol absoluto, nas concentrações de 30 %, 50 %, 70 %, 90 % e 100 %, durante 10 minutos em cada solução. As amostras foram passadas na solução a 100 % por 3 vezes.
- Secagem → foi realizada no equipamento denominado ponto crítico, que tem por finalidade retirar todo vestígio de etanol das amostras através da mistura deste com o dióxido de carbono ejetado da câmara de secagem. As amostras foram imersas na solução final de desidratação (etanol 100 %) e, aos poucos, esta solução foi retirada das amostras até a secagem completa. Após a realização deste procedimento foi indispensável a manutenção dos espécimes secos em containers dessecadores para impedir sua reidratação.
- Montagem dos espécimes → as amostras foram colocadas em suportes específicos denominados “stubs” e presas com uma cola de prata. Foram utilizadas luvas de nylon e pinças para a manipulação das amostras e “stubs”.
- Metalização ou “Sputtering” → este processo, utilizado para metalizar as amostras para visualização no MEV, ocorreu através da evaporação do metal (ouro) sob vácuo, com a finalidade de permitir a emissão de elétrons

secundários através da superfície varrida, que deve ser uma boa condutora de elétrons. Após a impregnação com ouro, as amostras foram acondicionadas novamente nos dessecadores para protegê-las da umidade.

#### **4.8.2) Análises morfológicas dos polímeros sintéticos**

Após todas as etapas de preparo relacionadas acima, os espécimes foram adaptados em um porta-amostras e levados ao Microscópio Eletrônico de Varredura modelo JSM – 5800LV, utilizando-se 10 KV de aceleração de corrente e distância de 15 mm entre as amostras e o filamento de tungstênio em todas as análises. Os procedimentos fotográficos foram realizados com filme de 120 mm T-max asa 100 da Kodak.

#### **4.9) Determinação da produção de biosurfactantes**

As atividades de emulsificação foram determinadas através da agitação vigorosa em agitador magnético de tubos (Tecnal) de 3,5 mL do caldo de cultura (previamente filtrado em lã de vidro) e 2,0 mL do hidrocarboneto tolueno. Após uma hora, a densidade óptica da emulsão óleo em água foi medida em espectrofotômetro (BAUSCH & LOMB, modelo Spectrometer 020) a 610 nm e relatada como atividade de emulsificação. Após 24 horas, as emulsões água em óleo foram expressas em centímetros relativos à altura do halo e compactação máxima das bolhas formadas (CARVALHO *et al.*, 1997).

#### **4.10) Atividades de enzimas lignocelulolíticas produzidas**

Todas as enzimas analisadas neste estudo foram mensuradas através da atividade enzimática, que representa a quantidade de substrato perdido (ou produto ganho) por unidade de tempo. As atividades enzimáticas obtidas foram expressas em UI/L, onde UI é a quantidade de enzima necessária para causar perda de 1  $\mu$ mol de substrato por minuto sob condições específicas.

##### **4.10.1) Lignina Peroxidase (LiP)**

Esta atividade foi determinada pela oxidação do álcool veratrílico ( $\epsilon_{310} = 9.300 \text{ l/M x cm}$ ) seguindo a metodologia citada por TIEN & KIRK (1984). A mistura da reação foi composta de 0,6 mL de caldo filtrado, 0,2 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  2,0 mM e 0,2 mL de uma 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 a 310 nm, após 10 minutos de reação ( $T_0$  e  $T_{10}$ ).

##### **4.10.2) Álcool Veratrílico Oxidase (AVO)**

Esta atividade foi determinada da mesma forma que a da LiP, exceto que o peróxido de hidrogênio foi omitido do meio de reação, sendo substituído por 0,2 mL de água destilada. A atividade foi medida a 310 nm (TIEN & KIRK, 1984).

#### 4.10.3) Manganês Peroxidase (MnP)

Esta atividade foi determinada pela oxidação do vermelho de fenol ( $\epsilon_{610} = 4.460 \text{ 1/M x cm}$ ) na presença de manganês e peróxido de hidrogênio, segundo descrito por KUWAHARA *et al.* (1984). A mistura da reação foi composta de 0,5 mL de caldo filtrado; 0,1 mL de lactato de sódio 0,25 M; 0,05 mL de  $\text{MnSO}_4$  2,0 mM; 0,2 mL de albumina bovina 0,5 %; 0,1 mL de vermelho de fenol 0,1 %; 0,05 mL de peróxido de hidrogênio 2,0 mM em tampão succinato 0,2 M (pH 4,5). Após incubação por 5 minutos à  $30^\circ\text{C}$ , a reação foi detida por adição de 0,04 mL de NaOH 2,0 N e a leitura realizada a 610 nm ( $T_0$  e  $T_5$ ).

#### 4.10.4) Lacase

A atividade de lacase foi determinada pela oxidação de dois substratos: siringaldazine e o-dianisidina, de acordo com SZKLARK *et al.* (1989). A mistura de reação foi constituída de 0,6 mL de caldo de cultura; 0,2 mL de tampão citrato-fosfato 0,05 M (pH 5,0); 0,1 mL de água destilada; 0,1 mL de o-dianisidina 1,0 mM ( $\epsilon_{460} = 29.400 \text{ 1/M x cm}$ ) ou de siringaldazine 1,0 mM ( $\epsilon_{525} = 65.000 \text{ 1/M x cm}$ ). As leituras foram realizadas em 460 nm (para a o-dianisidina) ou 525 nm (para a siringaldazine), durante 10 minutos ( $T_0$  e  $T_{10}$ ). A forma de preparo para os dois substratos foi a mesma, exceto que a solução de 1,0 mM de siringaldazine foi preparada em etanol.

#### **4.10.5) Peroxidase**

Esta atividade foi determinada da mesma forma que a lacase, exceto pela introdução de 0,1 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 2,0 mM exógeno no meio de reação no lugar da água destilada. Foram também utilizados como substrato a siringaldazine e a o-dianisidina (SZKLARK *et al*, 1989).

#### **4.10.6) Carboximetilcelulase (CMCase)**

O extrato enzimático (1,0 mL) foi adicionado a 1,0 mL de solução de carboximetilcelulose a 1 % (CMCose) em tampão acetato 0,05 M, pH 5,0, previamente incubado a 50 °C por 10 minutos, misturado e deixado em repouso por 30 minutos a 50 °C. Os açúcares redutores liberados (glicose) foram determinados pelo método do ácido dinitrosalicílico (DNS), que constituiu-se na adição de 2,0 mL de DNS aos tubos contendo o extrato enzimático e o substrato, e incubação em banho-maria fervente por 5 minutos. Em seguida, a leitura da absorbância foi medida a 550 nm (modificado de WOOD, 1988). Os resultados de atividade enzimática foram produzidos através dos coeficientes de uma regressão linear obtidos com a construção de uma curva padrão de glicose (Anexo 1).

#### **4.10.7) Avicelase**

Esta atividade foi realizada da mesma maneira que para CMCase. Apenas substituiu-se a solução de CMCose pela suspensão de avicel 1 % (celulose

- A caracterização do polipropileno e poliestireno por índice de fluidez (MFI) foi realizada através do método de ensaio ASTM D 1238-94 (1995). Para o polipropileno<sup>1</sup> a fusão ocorreu à 230 °C, e para o poliestireno<sup>2</sup> a fusão ocorreu à 200 °C. Esta norma estabelece a definição do tipo de aparelho empregado, com as dimensões do orifício para a extrusão do polímero, temperatura ideal do cilindro e condições do ensaio em termos da massa do pistão (2.160g<sup>1</sup>/ 5.000g<sup>2</sup>) que força a extrusão de cada polímero. Os valores obtidos foram expressos em g/10 min.
- A caracterização do polietileno tereftalato foi realizada em função da viscosidade intrínseca  $[\eta]$  da solução polimérica baseada no método de ensaio ASTM D 4603 (1996) utilizando-se concentração de 0,5 g/100 mL ou 0,5 % do polímero e uma mistura de solventes de fenol/1,1,2,2 tetracloroetano (60/40) a 30 °C. Os valores foram expressos em dL/g, conforme as equações a seguir:

$$\eta_{\text{inerente}}^T = \frac{\ln \eta_r}{C}$$

onde:  $\eta_{\text{inerente}}^T$  → viscosidade inerente na temperatura T (30 °C) para a concentração C do polímero em g/100 mL (ou dL/g);

ln → logaritmo neperiano (ou logaritmo natural);

$\eta_r$  → viscosidade relativa =  $t/t_0$ ;

t → tempo médio de escoamento da solução;

$t_0$  → tempo médio de escoamento do solvente;

C → concentração do polímero (dL/g).

A viscosidade intrínseca  $[\eta]$  é definida como:

$$[\eta] = \lim_{C \rightarrow 0} \eta_{\text{inerente}}$$

onde:  $\lim \rightarrow$  limite da viscosidade inerente com diluição infinita, ou seja, quando a concentração tende a zero.

- A caracterização do policloreto de vinila foi realizada através do valor  $K$ , que representa a viscosidade relativa do PVC, com base no método de ensaio DIN 53726 utilizando-se concentração de 0,5 g/100 mL ou 0,5 % do polímero e ciclohexanona a 25 °C como solvente. As medidas do valor  $K$  são expressas em valores absolutos, sem unidades específicas, e calculadas a partir de:

$$\log \eta_r = \left( \frac{75 K^2}{1 + 1,5 K \cdot c} + K \right) \cdot c,$$

onde:  $\eta_r \rightarrow$  viscosidade relativa

$c \rightarrow$  concentração da solução em g/100 mL

#### 4.13) Análises de Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)

Um equipamento de GPC da Waters foi utilizado para determinar mudanças na distribuição de peso molecular para os polímeros residuais de PVC e PS. Três colunas acopladas em série, lineares, Styragel (American Polymer) abrangendo uma faixa de 2.000-4.000.000 de peso molecular funcional foram utilizadas à temperatura de 40 °C. A fase móvel utilizada foi o tetrahydrofurano (THF), que

também funcionou como solvente para solubilizar as amostras de polímeros. A taxa de fluxo da fase móvel foi de 1 mL/min e o volume de injeção de 300  $\mu$  L, totalizando 50 minutos de corrida por injeção de amostra. O detector utilizado foi um refratômetro diferencial (Waters, 410-Differential Refractometer) e os resultados obtidos foram analisados pelo software Waters Millennium, baseados em uma curva de calibração com 4 padrões de poliestireno que produziram os coeficientes da equação de 3<sup>a</sup> ordem para conversão dos valores de pesos moleculares no cromatograma (ASTM D 3536-91, 1992).

## V. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1) Observação do crescimento microbiano nos polímeros sintéticos

Com relação à degradação microbiana de polímeros comerciais relatada na literatura (tabela 1, pág. 9), foi observado um aumento nas taxas de crescimento microbiano na maioria dos ensaios realizados, atingindo faixas mais elevadas com diversas linhagens utilizadas neste estudo, conforme destacado na tabela 4.

De acordo com a tabela de graus de crescimento microbiano proposta pela ASTM (tabela 3, pág.33), podemos observar que os níveis de crescimento mais relevantes são os de classificação 3 e 4, pois revelam taxas acima de 30 % que pode ser muito importante se considerar que o tempo máximo de análise é de 40 dias, e os dados de literatura relatam que o tempo necessário para processos de biodegradação é longo (MUSTAFA, 1993; ALBERTSSON & HUANG, 1995). Na tabela 4, pode-se observar que os resultados obtidos para a espuma poliuretana foram relevantes para a maioria das linhagens, como já era esperado, com exceção do fungo A15 que não se desenvolveu bem em nenhum polímero e do *Pleurotus* 98/37 que apresentou crescimento abaixo de 30 % neste polímero. Os destaques no PU foram o *P. chrysosporium*, *P. sajor caju* e levedura L7A, com crescimento acima de 60 % em 40 dias. De fato, este polímero foi incluído neste trabalho para comparação como uma amostra de controle positivo na biodegradação de polímeros sintéticos. Com relação ao polipropileno, destacaram-se: *Pleurotus* 98/37 em 30 e 40 dias de incubação, o *P. sajor caju* e a levedura L7A em 40 dias, todas com crescimentos superiores a 30 %. No PVC destacaram-

se: *Pleurotus* 001, P1 e Levedura tolu com crescimento > 30 % em 40 dias, PSC 94/03 que também alcançou a mesma faixa em 30 dias e a levedura L7A em 20 dias. Em contraste com os dados de literatura que relatam crescimento de até 10 % no PS e PET, a linhagem *Pleurotus* 98/37 revelou taxas de crescimento máximo no Poliestireno com 20, 30 e 40 dias de incubação, e também obteve muito sucesso no PET com taxas de até 60 % de crescimento.

TABELA 4. Graus de crescimento observados semanalmente - ASTM

Culturas fúngicas	Graus de Crescimento - ASTM (0-4) *														
	20 dias de incubação (~2 semanas)					30 dias de incubação (~4 semanas)					40 dias de incubação (~5 semanas)				
	PVC	PP	PET	PU	PS	PVC	PP	PET	PU	PS	PVC	PP	PET	PU	PS
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1
						1	1	1	3	1	1	2	1	3	1
						1	1	1	3	1	1	2	1	4	1
											2	2	1	4	1
<i>Pleurotus 001</i>	1	1	1	2	1	1	2	1	2	1	1	1	1	2	1
	1	1	1	3	1	1	2	1	3	1	1	2	1	3	1
						2	2	1	3	1	2	2	1	3	1
						2	2	1	3	1	2	2	1	3	1
											3	2	1	3	1
<i>Pleurotus 98/33</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	1	1	1	2	2
	1	2	1	2	1	1	1	1	3	2	1	1	2	3	2
						1	2	1	3	2	1	1	2	3	2
						2	2	1	3	2	2	2	2	3	2
											2	2	2	3	2
<i>Pleurotus 98/36</i>	1	1	1	2	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1
	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
						2	2	1	1	1	1	2	1	2	1
						2	2	1	1	1	1	2	1	3	1
											1	3	1	3	1
<i>Pleurotus 98/37</i>	2	2	2	1	2	1	1	2	1	3	1	1	2	1	3
	2	2	3	2	4	2	2	3	2	4	1	2	3	2	4
						2	2	3	2	4	2	2	3	2	4
						2	3	3	2	4	2	3	3	2	4
											2	3	3	2	4
<i>PSC 94/03</i>	1	1	1	1	2	1	1	1	2	2	1	1	1	2	2
	2	1	1	2	2	1	2	1	2	2	1	1	1	2	2
						2	2	1	2	3	2	2	1	3	3
						3	2	1	2	3	3	2	1	3	3
											3	2	1	3	3

Cont.

Culturas fúngicas	Graus de Crescimento - ASTM (0-4) *														
	20 dias de incubação (~2 semanas)					30 dias de incubação (~4 semanas)					40 dias de incubação (~5 semanas)				
	PVC	PP	PET	PU	PS	PVC	PP	PET	PU	PS	PVC	PP	PET	PU	PS
<i>Pleurotus tailandia</i>	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	2	1	2	1
	1	1	1	2	1	2	2	1	2	2	1	2	1	3	2
						2	2	1	2	2	1	2	1	3	2
						2	2	1	2	2	1	2	1	3	2
											2	2	1	3	2
<i>Fungo A15</i>	1	1	0	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1	0
	1	1	0	1	0	1	1	0	2	0	1	1	0	2	0
						1	2	0	2	0	1	1	0	2	0
						1	2	1	2	0	1	2	1	2	0
											1	2	1	2	0
<i>Levedura tolu</i>	1	1	2	1	1	1	1	2	1	1	1	1	2	1	1
	1	1	3	1	2	2	2	2	3	2	2	2	2	2	2
						2	2	2	3	2	2	2	2	3	2
						2	2	2	3	2	2	2	2	3	2
											3	2	2	3	2
<i>Levedura L7A</i>	2	1	2	0	1	2	1	2	0	1	2	1	2	0	1
	3	2	3	1	2	3	1	2	2	2	3	2	3	2	2
						3	2	3	2	2	3	3	3	3	2
						3	2	3	2	2	3	3	3	4	2
											3	3	4	4	2
<i>Pleurotus sajor caju</i>	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	1
	1	2	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	4	1
						1	2	1	2	1	2	2	1	4	1
						1	2	1	2	1	2	2	1	4	1
											2	3	1	4	1
<i>PI</i>	2	2	1	2	1	2	2	1	2	1	2	2	1	2	1
	2	2	1	2	1	2	2	1	2	1	2	2	1	2	1
						2	2	1	2	1	3	2	1	2	1
						2	2	1	2	1	3	2	1	2	1
											3	2	1	3	1

**Legenda.** PVC: policloreto de vinila; PP: polipropileno; PET: polietileno tereftalato; PU: poliuretano; PS: poliestireno ou isopor.

**ASTM (0-4) \*.** 0: nenhum crescimento; 1: crescimento < 10 %; 2: crescimento de 10 a 30 %; 3: crescimento de 30 a 60 %; 4: crescimento > 60 %.

## 5.2) Perda de massa dos espécimes plásticos e massa celular seca

As análises realizadas para determinar perda de massa dos polímeros e da massa celular crescida no substrato plástico, representadas na Tabela 5, não revelaram taxas muito elevadas em relação à perda de massa dos espécimes plásticos (até 6 %), em concordância com os relatos de outros autores (SCHNABEL, 1981; KELEN, 1983; SCOTT & GILEAD, 1995; KIRBAS *et al.*, 1999), com exceção das amostras de PVC que tiveram sua massa fortemente reduzida em até 20 % da massa total em todos os períodos de crescimento. Isto pode ser devido ao fato dos filmes flexíveis de PVC serem constituídos de grandes quantidades de carbonato de cálcio como material de preenchimento (~ 28 %) e plastificantes (~ 24 %), aderidos à cadeia de PVC (totalizando cerca de 52 % da estrutura do polímero) e ainda outros aditivos que também podem estar presentes na estrutura comercial, que representam compostos mais simples, de menor massa molar e, conseqüentemente, mais suscetíveis à atuação microbiana. Os resultados obtidos com amostras de PVC contrastam com aqueles observados por KIRBAS *et al.* (1999) que não detectou perdas de massa relevantes, onde somente poucos filmes de PVC apresentaram uma taxa muito baixa de redução de massa. Nos nossos experimentos, todos os polímeros controle (incubados no meio de cultura sem o fungo) conservaram a mesma massa molar inicial ao final dos períodos de incubação. Os resultados que mais se destacaram encontram-se destacados na tabela 5.

Os experimentos com PET e PS revelaram algumas alterações na sua massa e pelo fato destes polímeros apresentarem boa estabilidade aos processos

degradativos (tabela 2, pág.20), principalmente à temperatura ambiente, torna-se clara a capacidade de degradação dos fungos filamentosos analisados nestes polímeros.

As amostras de PP e PU apresentaram taxas de reduções de peso maiores e com mais freqüência do que PET e PS, mas não necessariamente com valores elevados de massa celular. O destaque foi o *P. sajor caju* no PU, que provocou perda de 6 % da massa deste polímero.

Os maiores valores observados para a massa celular seca, estão em concordância com a tabela de crescimento macroscópico (tabela 3, pág.33), ou seja, quanto maior o grau de crescimento, maior a massa celular obtida. Na verdade, é difícil estabelecer o quanto de massa celular seria necessário para produzir perda significativa de massa dos polímeros, pois a degradação pode ocorrer sem necessariamente suceder perda de massa, mas sim, alterações na molécula do polímero (SCHNABEL, 1981; SCOTT & GILEAD, 1995). A metodologia de pesagem pode ser considerada útil para triagem inicial dos ensaios, porém necessita ser analisada em conjunto com outras ferramentas de maior precisão e sensibilidade conforme sugerido por KIRBAS *et al.* (1999).

TABELA 5. Percentagem de perda de massa molar dos polímeros e crescimento microbiano em função do tipo de polímero e tempo de cultivo.

Culturas Fúngicas	P L Á S T I C O S	Perda de massa molar do polímero (%)			Massa celular (mg)		
		20 dias	30 dias	40 dias	20 dias	30 dias	40 dias
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	PVC	17,2	11,6	15,2	28,0	17,0	28,0
	PET	0	0	0	0	0	0
	PP	0	2,4	2,8	10,0	16,0	37,0
	PU	2,0	2,8	2,4	20,0	32,0	25,0
	PS	0	0	0	3,0	3,0	0
P1	PVC	14,4	10,4	16,0	35,0	36,0	44,0
	PET	0	0	0	8,0	10,0	10,0
	PP	0	3,2	0,8	32,0	10,0	36,0
	PU	1,6	0,8	1,6	68,0	60,0	25,0
	PS	0	0	0	20,0	0	4,0
<i>Pleurotus sajor caju</i>	PVC	17,2	17,6	18,0	19,0	23,0	19,0
	PET	0	0	0	2,0	5,0	5,0
	PP	0	2,4	0,6	5,0	<b>56,0</b>	42,0
	PU	0,4	1,2	<b>6,0</b>	15,0	28,0	93,0
	PS	0	0	0	11,0	5,0	8,0
<i>Pleurotus</i> 98/33	PVC	16,0	12,4	15,2	28,0	9,0	25,0
	PET	1,2	1,6	1,6	3,0	4,0	2,0
	PP	0	2,4	0	5,0	42,0	6,0
	PU	0,4	1,2	6,0	15,0	28,0	93,0
	PS	0	0	0	11,0	5,0	8,0
<i>Pleurotus</i> 98/36	PVC	18,0	12,8	16,8	28,0	7,0	20,0
	PET	0,8	0,8	0,8	1,0	1,0	2,0
	PP	<b>5,0</b>	4,0	<b>5,0</b>	20,0	14,0	8,4
	PU	1,2	4,0	0	22,0	16,0	13,0
	PS	0,1	0	0	15,0	11,0	12,0
<i>Pleurotus</i> 98/37	PVC	14,8	13,2	14,0	64,0	23,0	15,0
	PET	<b>1,6</b>	<b>2,0</b>	<b>2,2</b>	17,0	<b>58,0</b>	<b>69,0</b>
	PP	0	2,4	2,0	14,0	39,0	36,0
	PU	2,0	2,4	2,0	87,0	25,0	28,0
	PS	0	<b>0,5</b>	<b>0,8</b>	31,0	<b>68,0</b>	<b>88,0</b>

Cont.

Culturas Fúngicas	P L Á S T I C O S	Perda de massa molar do Polímero (%)			Massa Celular (mg)		
		20 dias	30 dias	40 dias	20 dias	30 dias	40 dias
<i>Pleurotus</i> 001	PVC	16,0	18,0	<b>20,0</b>	20,0	21,0	17,0
	PET	0,8	<b>1,6</b>	<b>2,6</b>	4,0	4,0	12,0
	PP	0,8	0	0	30,0	27,0	26,0
	PU	2,0	2,4	1,6	<b>113,0</b>	<b>93,0</b>	<b>82,0</b>
	PS	0,2	<b>0,5</b>	<b>1,0</b>	3,0	14,0	22,0
<i>Pleurotus tailandia</i>	PVC	10,8	14,0	18,0	11,0	14,0	37,0
	PET	0	0	0	8,0	6,0	8,0
	PP	0	2,4	0	3,0	36,0	8,0
	PU	1,6	1,6	1,8	46,0	24,0	50,0
	PS	0	0	0	25,0	32,0	26,0
PSC 94/03	PVC	17,2	18,0	16,0	<b>76,0</b>	<b>65,0</b>	<b>66,0</b>
	PET	0	0	0	9,0	10,0	9,0
	PP	0	0	0	10,0	18,0	37,0
	PU	0,8	0	0	45,0	10,0	26,0
	PS	0	0	0	25,0	32,0	26,0
Fungo A15	PVC	12,0	12,0	14,0	13,0	20,0	30,0
	PET	0	0	0	0	0	0
	PP	0	1,0	1,6	2,5	20,0	35,0
	PU	0	0	0	25,0	26,0	34,0
	PS	0	0	0	0	0	0
L7A	PVC	16,0	14,0	15,2	13,0	27,0	24,0
	PET	<b>2,0</b>	0	0	3,0	1,0	0
	PP	<b>2,4</b>	0	0	18,0	0	6,0
	PU	0	0	0,8	9,0	20,0	<b>66,0</b>
	PS	0	0	0	5,0	3,0	0
Levedura tolu	PVC	17,2	12,0	16,8	26,0	6,0	22,0
	PET	0	0	0	4,0	4,0	4,3
	PP	0	0	0	10,0	4,0	14,0
	PU	0	0	0	22,0	20,0	13,0
	PS	0	0	0	21,0	28,0	25,0

**Legenda.** PVC: Policloreto de vinila; PP: Polipropileno; PET: Polietileno tereftalato;  
PU: Poliuretano; PS: Poliestireno ou Isopor.

### 5.3) Outras alterações observadas nos polímeros sintéticos

Um fato interessante relacionado com o PVC foi que a maioria dos ensaios apresentou uma coloração amarelada no polímero e no caldo de cultura, evidenciando o processo de amarelecimento decorrente da desidrocloração do polímero. A decomposição dos compostos aditivos e plastificantes se inicia em estágios precoces de reação e sua degradação é mais rápida do que a desidrocloração. De fato, GUMARGALIEVA *et al.* (1999) relataram a ocorrência de desorção de plastificantes ftalatos que são prontamente acumulados pelos microrganismos e podem favorecer a biodegradação dos materiais de PVC, o que justifica a percentagem elevada de perda de massa que ocorreu neste polímero.

As alterações observadas no pH dos ensaios com PVC, que atingiram faixas um pouco mais ácidas em torno de 5,7 a 6,0, quando comparadas com o meio controle de PVC sem o microrganismo com pH 6,8, constituiu uma evidência de que realmente houve formação de ácido, provavelmente de HCl, provocando diminuição do pH no meio de cultura, em função da biodegradação e amarelecimento das amostras com o processo de desidrocloração (Anexo 3). Em relação aos outros polímeros estudados, a faixa de pH alcançou níveis um pouco mais alcalinos, variando de 7,6 a 11,0.

#### 5.4) Análises morfológicas dos polímeros sintéticos

Com base nos graus de crescimento observados na tabela 4 (págs. 49 e 51), foram submetidos às análises microscópicas alguns fungos que melhor se desenvolveram nestes polímeros: *P. 001*, *P. sajour caju* e *P. 98/37*. As análises de Microscopia Eletrônica de Varredura revelaram uma grande variabilidade na morfologia dos polímeros estudados.

As amostras de controle do PVC, revelaram uma morfologia lisa e pontos altamente brilhantes que provavelmente representam os aditivos impregnados pela superfície do filme, conforme observado nas figuras 2a e 2b, respectivamente. As amostras de PVC incubadas com *Pleurotus 001* apresentaram alterações nítidas neste filme, onde se observou uma vasta escamação do polímero por baixo de uma densa rede celular produtora de uma mucilagem que facilita a adesão da hifa e promove uma interação mais eficiente com a superfície do plástico (figuras 2c e 2d, respectivamente). A morfologia do fungo *P. sajour caju* pode ser observada na figura 2e, assim como o aspecto do PVC incubado com este fungo e após retirada das células (figura 2f) que revela a ruptura da superfície polimérica, provocando fendas no polímero. Nesta figura também podemos perceber em relação ao controle (figura 2b) que houve uma redução muito ampla na “pigmentação”, sugerindo que estes componentes presentes na superfície do controle devem ter sido retirados pelos fungos, por estarem mais acessíveis e provavelmente utilizados no metabolismo fúngico.

No PP com crescimento de *P. sajour caju*, ocorreu um severo desgaste na superfície do filme ao redor da massa micelial, formando escavações no polímero

(figuras 3c e 3d, respectivamente), gerando um aspecto quebradiço no polímero residual (figura 3e).

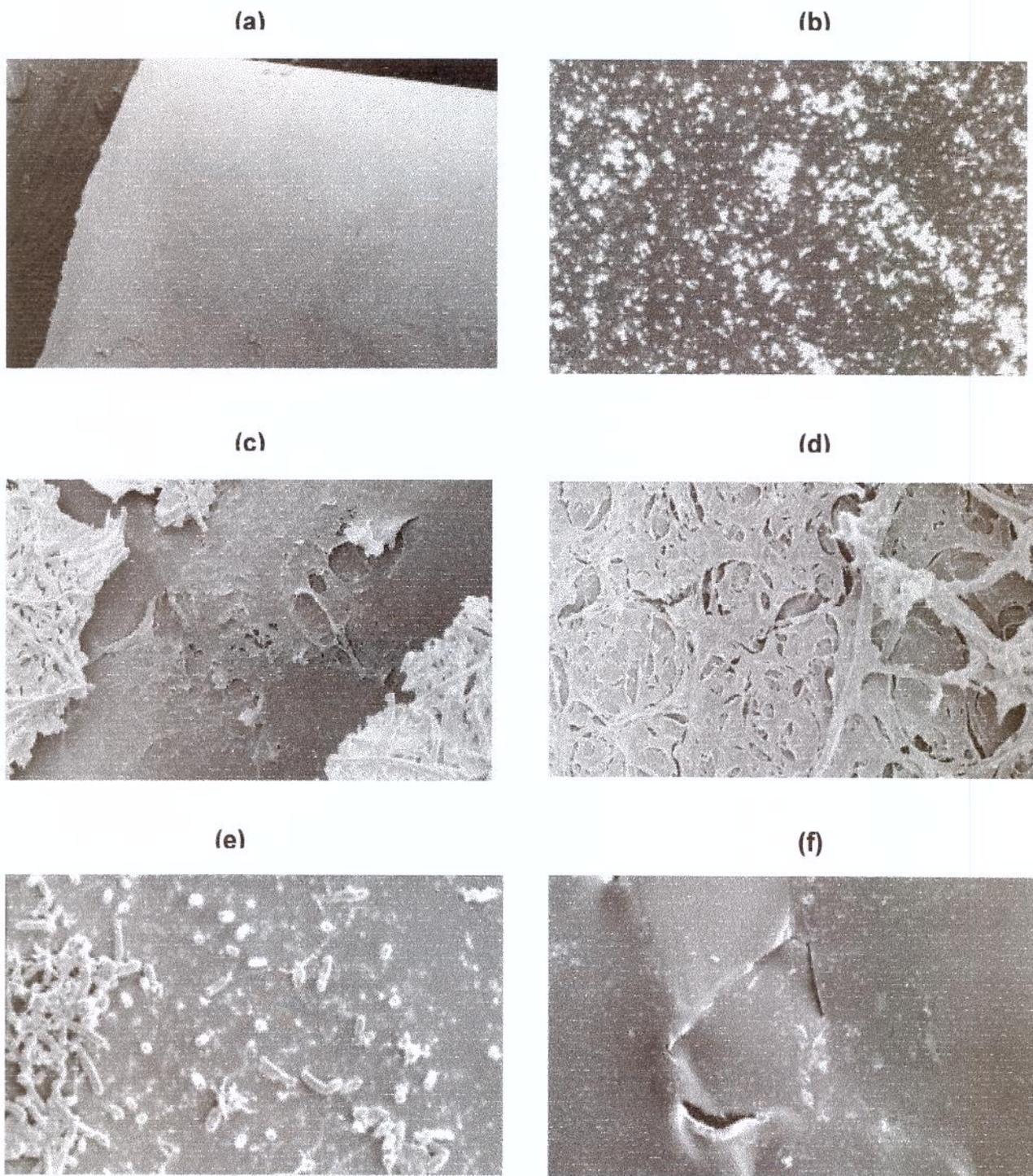
O mesmo desgaste avaliado no PP foi observado no PET com *Pleurotus* 98/37 que cresceu formando uma rede micelial muito espessa recobrando a superfície do filme com uma camada de muco, demonstrando a formação de ranhuras no polímero com grande detalhamento (figuras 4c e 4d, respectivamente). Segundo o estudo de MILSTEIN *et al.* (1999), o material capsular extracelular produzido pelos fungos, que aumenta a adesão das hifas à superfície dos plásticos, intensifica o potencial oxidativo microbiano e pode influenciar a atuação de certas enzimas microbianas no polímero. As figuras 4e e 4f apresentam a riqueza de detalhes do micélio fúngico no PET, identificando-se estruturas semelhantes aos basídios e basidiósporos. Contudo, esta morfologia revelou características diferenciadas das demais espécies do gênero *Pleurotus*, sugerindo estudos mais amplos na caracterização e identificação desta linhagem.

No PS ficou clara a diferença morfológica do polímero controle (figuras 5a e 5b) em relação à amostra após incubação com *P.001* com a presença dos filamentos do fungo permeando os alvéolos do Poliestireno provocando desorganização das estruturas alveolares (figuras 5c, 5d) e a perda da camada externa lisa e visualização dos alvéolos internos na superfície (figura 5e). A figura 5e, mostra uma massa micelial do *P.001* na extremidade do polímero sugerindo escamação da sua camada mais externa.

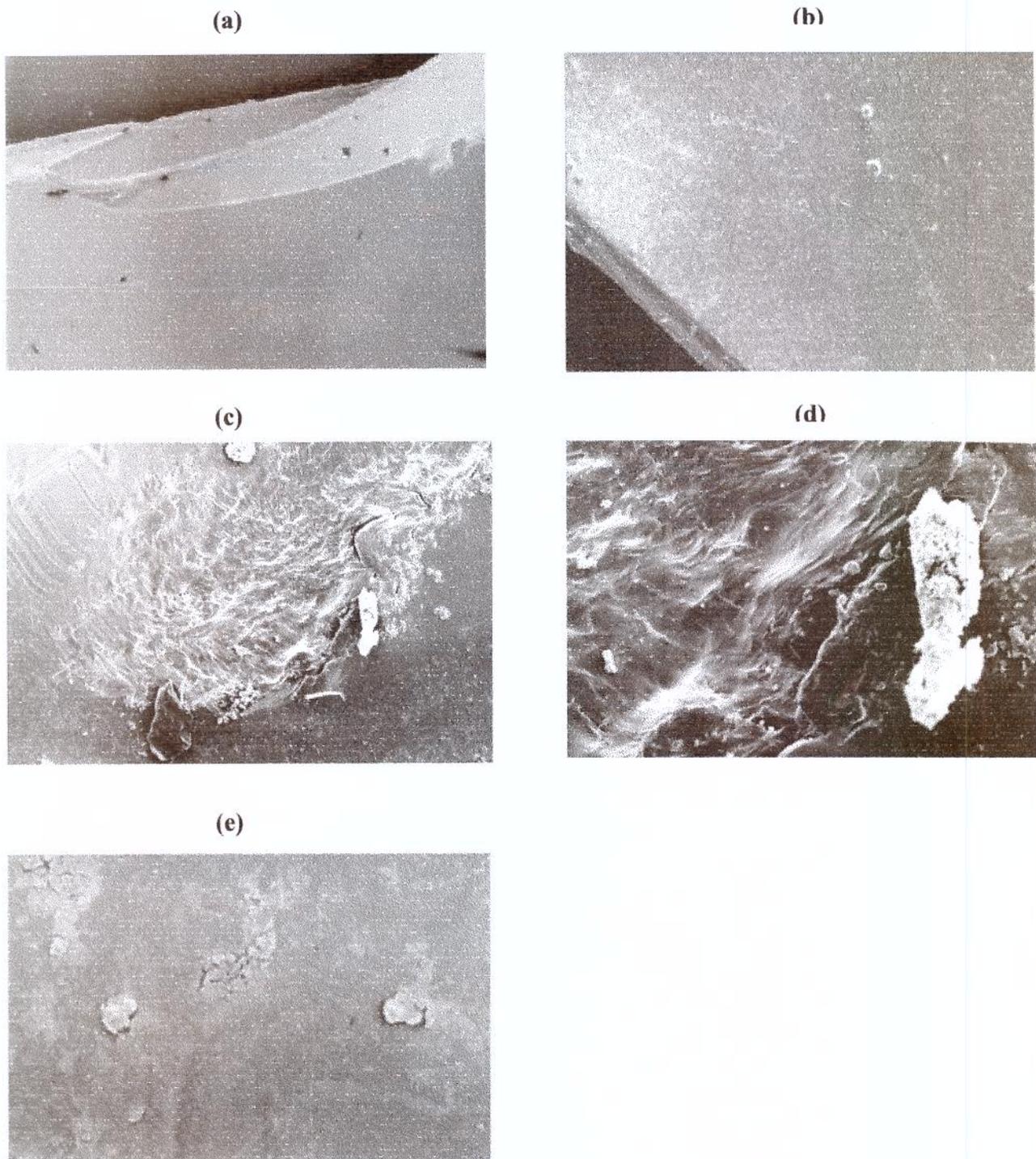
No PU ficou evidenciado o potencial do micélio fúngico em destruir a rede polimérica, podendo-se observar uma ampla diferença do polímero após incubação com *P.001* quando comparado à estrutura do seu controle (figuras 6a,

6c e 6d, respectivamente). A figura 6e apresenta uma massa micelial mais densa e fortemente aderida ao polímero e a figura 6f revela o aspecto final do polímero após incubação e retirada das células do *P. 001*, para comparação com seu aspecto inicial (figuras 6a e 6b).

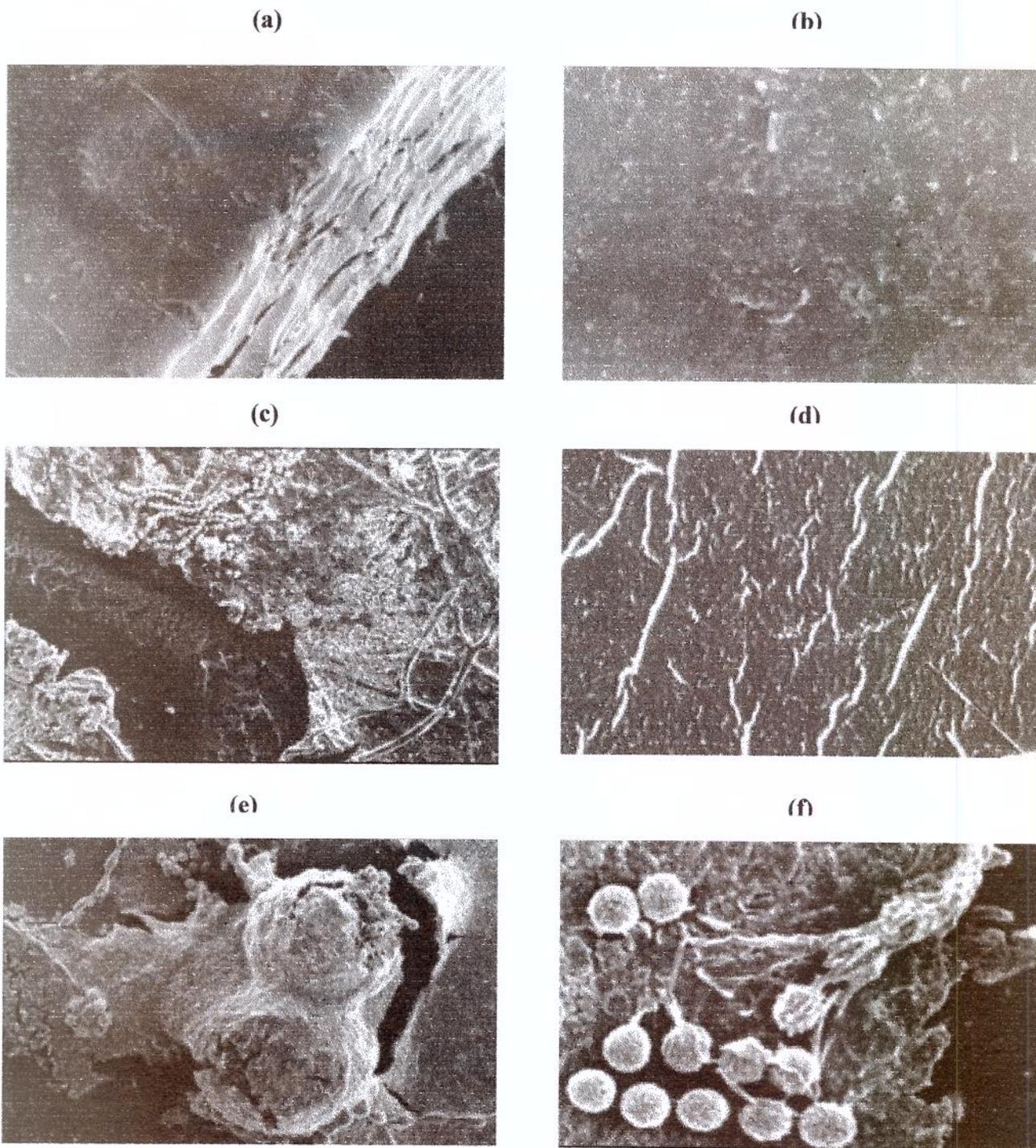
Deste modo, com as análises microscópicas realizadas foi possível estabelecer a metodologia de Microscopia Eletrônica de Varredura como ferramenta eficaz no estudo de superfícies e morfologia de polímeros e de grande importância como ferramenta complementar para avaliação de degradação (BASSET, 1981; ALLEN & BEVINGTON, 1989; SCOTT & GILEAD, 1995).



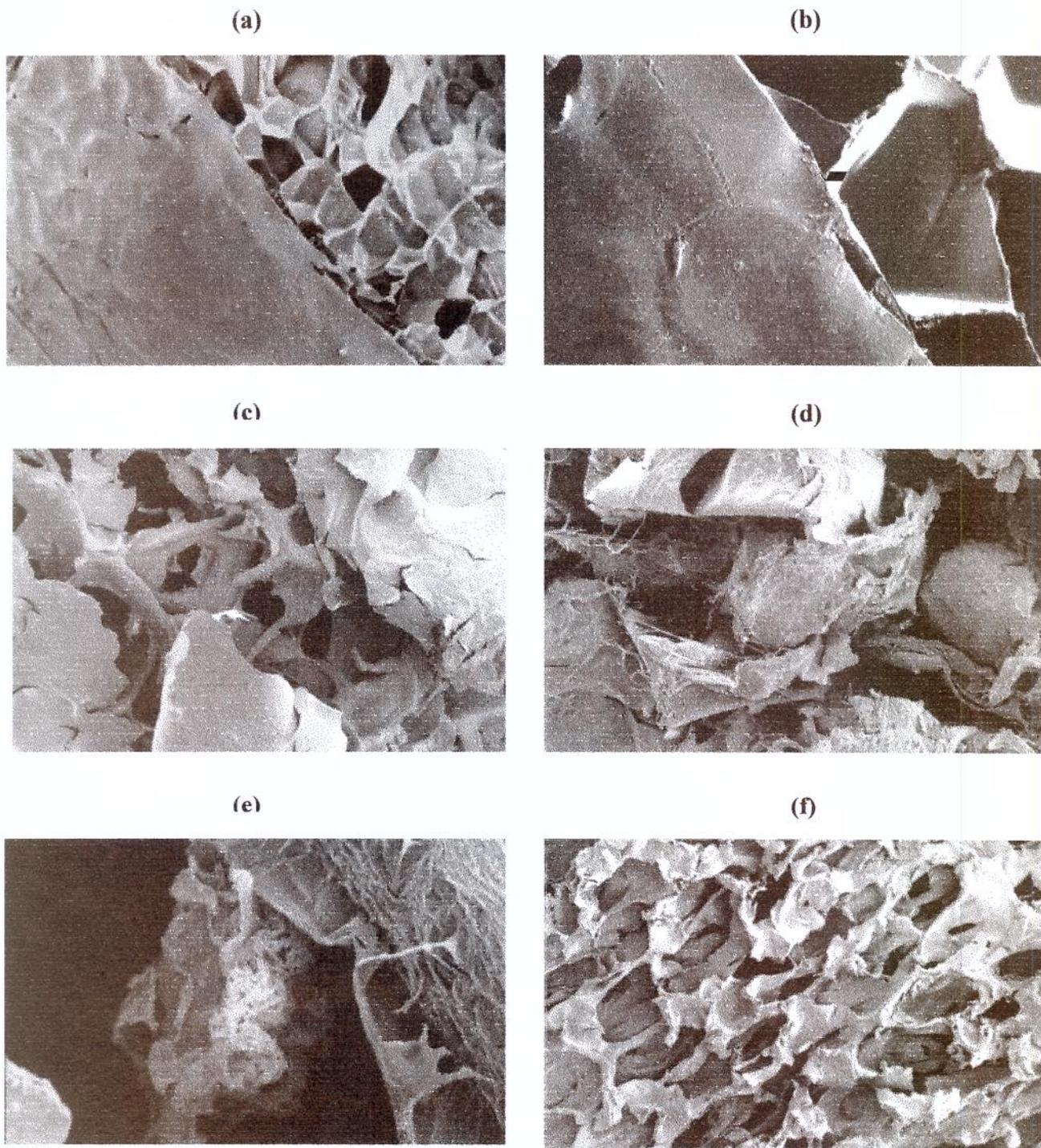
**FIGURA 2. Fotomicrografias do polímero PVC no MEV. (a) Controle-900x; (b) Controle-2000x; (c) PVC com *P. 001*-300x; (d) PVC com *P. 001*-1500x; (e) PVC com *P. sajor caju*-4000x; (f) PVC após retirada das células de *P. sajor caju*-4500x.**



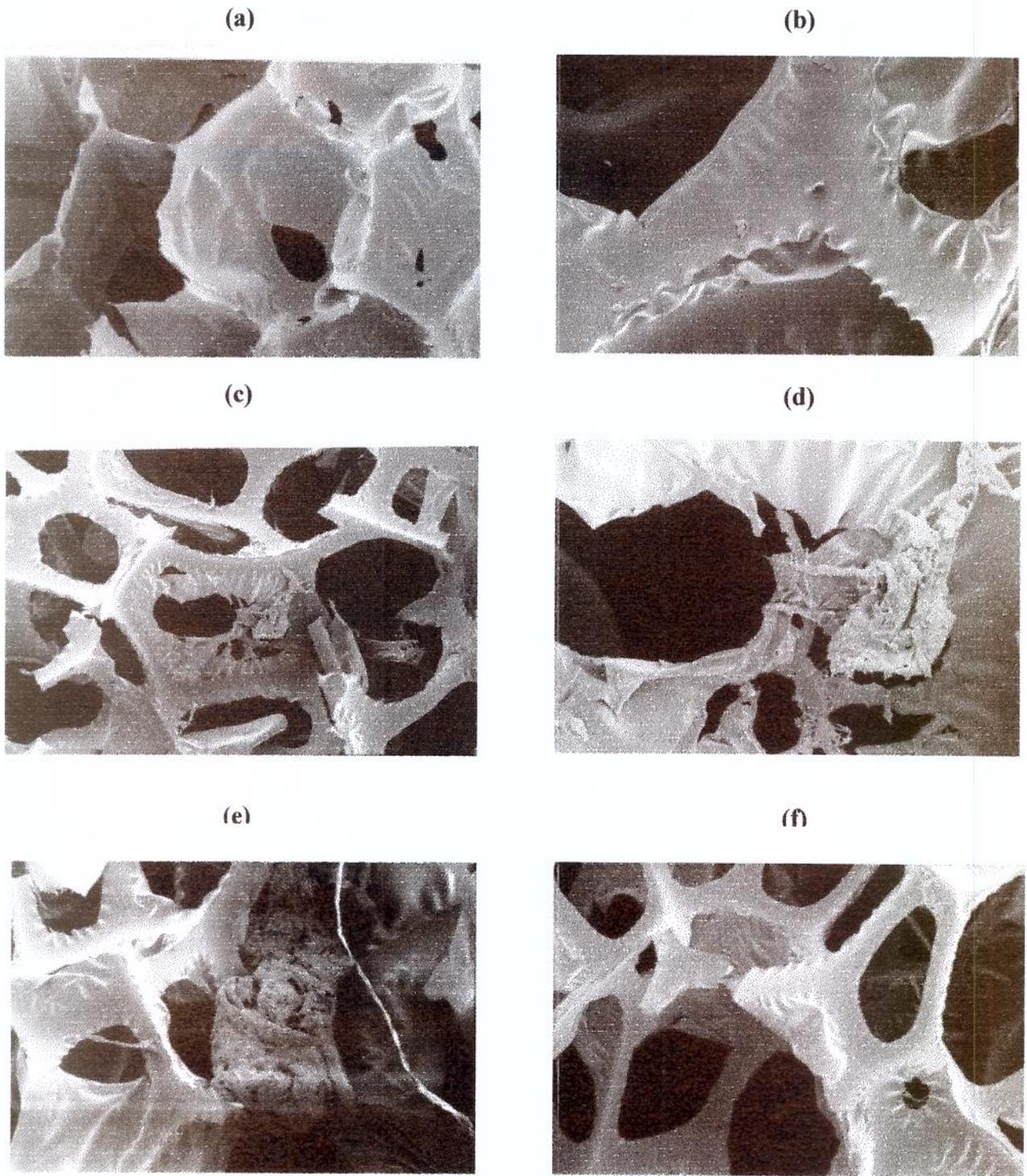
**FIGURA 3. Fotomicrografias do polímero PP no MEV. (a) Controle-400x; (b) Controle-350x; (c) PP com *P. sajor caju*-430x; (d) PP com *P. sajor caju*-1600x; (e) PP após retirada das células de *P. sajor caju*- 400x.**



**FIGURA 4. Fotomicrografias do polímero PET no MEV. (a) Controle-900x; (b) Controle-2000x; (c) PET com *P. 98/37*-900x; (d) PET após retirada das células de *P. 98/37*-2000x; (e) Detalhes da morfologia do basídio do *P. 98/37* no PET-1500x; (f) Visualização de basidiósporos de *P.98/37* no PET-6500x.**



**FIGURA 5.** Fotomicrografias do polímero PS no MEV. (a) Controle-80x; (b) Controle-500x; (c) PS com *P.001*-90x; (d) PS com *P.001*-300x; (e) PS com *P.001*-900x; (f) Superfície do PS após retirada das células de *P.001*-85x.



**FIGURA 6.** Fotomicrografias do polímero PU no MEV. (a) Controle-70x; (b) Controle-250x; (c) PU com *P.001*-85x; (d) PU com *P.001*-300x; (e) PU com densa massa celular de *P.001*-150x; (f) PU após retirada das células de *P.001*-75x.

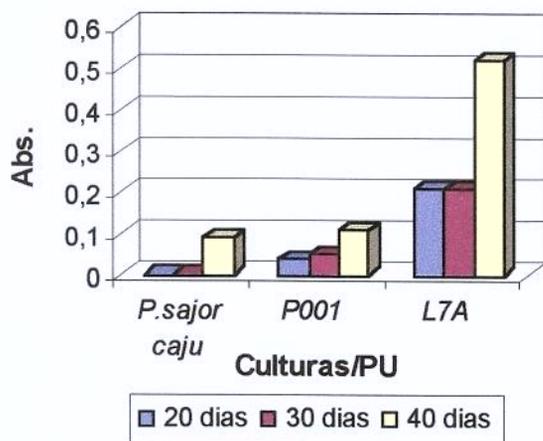
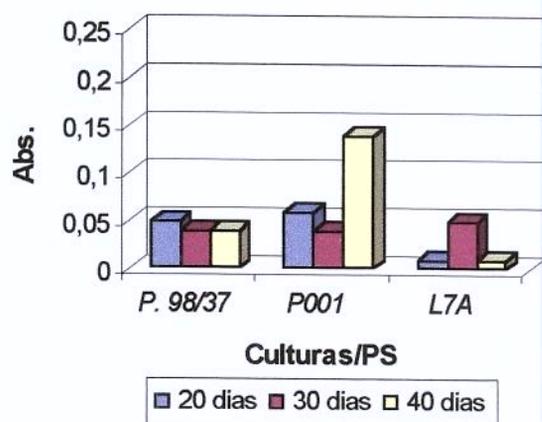
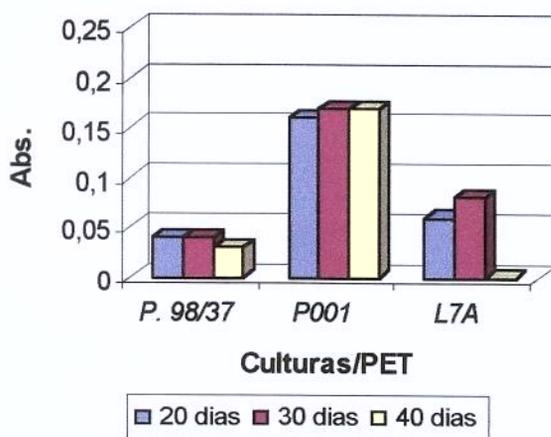
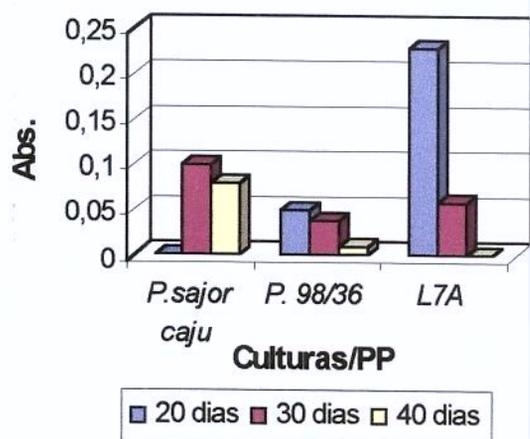
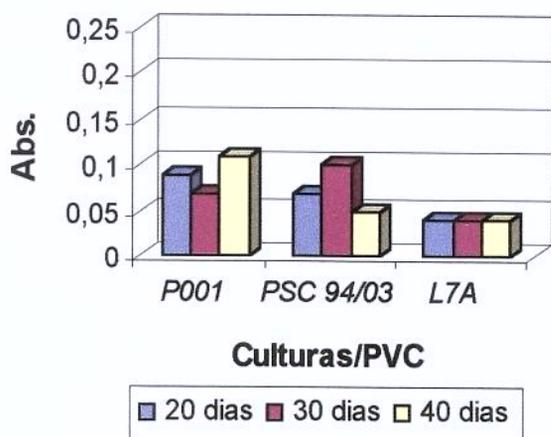
### **5.5) Seleção das linhagens capazes de degradar os polímeros**

Os parâmetros utilizados na seleção das linhagens para as etapas posteriores de produção de biosurfactantes, de enzimas lignocelulolíticas e de espectrofotometria, foram baseados na maior perda de massa do polímero e maior massa celular. Desta forma, consideramos significativos os seguintes valores para perda de massa dos polímeros: PVC = 20,0 %, PP = 5,0 %, PET = 2,6 %, PS = 0,8 %, PU = 6,0 %; e para a massa celular foram significativos os seguintes valores: PVC = 76,0 mg, PP = 56,0 mg, PET = 69,0 mg, PS = 88,0 mg, PU = 113,0 mg. De acordo com estes dois critérios, os resultados foram respectivamente, no PVC: *P.001* e *PSC 94/03*; no PP: *P. 98/36* e *P. sajour caju*; no PET: *P.001* e *P.98/37*; no PS: *P.001* e *P.98/37*; e no PU: *P. sajour caju* e *P.001*. A linhagem de levedura L7A também foi incluída nas análises de produção de biosurfactantes e de enzimas por ter apresentado resultados relevantes para os parâmetros em questão.

### **5.6) Verificação da produção de biosurfactantes**

A produção de biosurfactantes foi observada em todas as amostras de crescimento fúngico nos polímeros, apresentando diferentes níveis de atividades de emulsificação óleo em água entre os três períodos de incubação (Figura 7). Os destaques foram para a levedura L7A no PU e no PP (com 40 dias e 20 dias de incubação respectivamente) e *P.001* no PET em todos os períodos de crescimento e também no PS (com 40 dias). Com relação à emulsificação água em óleo, os halos formados na emulsão que apresentaram as maiores medidas e densidade

das bolhas foram para *P. 98/37* no PS com 2,2 cm, L7A no PET com 2,5 cm, e *PSC 94/03* no PVC com 2,2 cm. A presença dos biosurfactantes no meio de cultura pode estar favorecendo a utilização dos substratos plásticos como fonte de energia para os microrganismos, tornando-os mais acessíveis através da redução do caráter hidrofóbico destes hidrocarbonetos, ou seja, aumentando as interações hidrofílicas que são essenciais para que ocorra a atuação enzimática (ROUSE *et al.* 1994).



**FIGURA 7. Atividades de emulsificação óleo em água de biosurfactantes produzidos pelas culturas fúngicas nos polímeros sintéticos.**

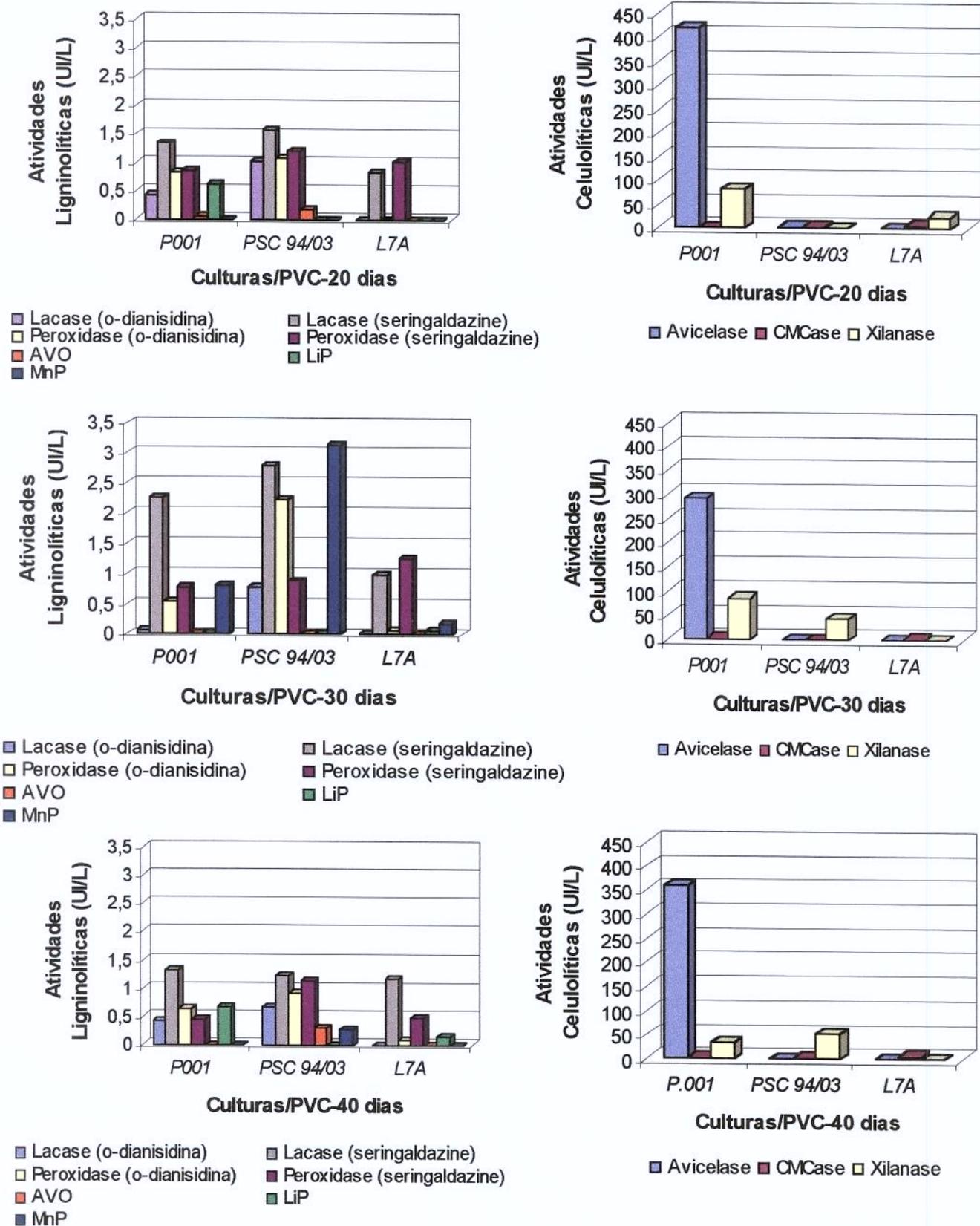
## 5.7) Atividades de enzimas lignocelulolíticas produzidas

De um modo geral, as enzimas celulolíticas atingiram atividades enzimáticas muito elevadas sendo a avicelase de maior importância em todos os polímeros, seguida da xilanase, quando comparadas às enzimas ligninolíticas produzidas pelos microrganismos. A maior atividade lignocelulolítica observada foi em *P. 001* no PVC que produziu cerca de 400 UI/L da enzima avicelase (figura 8). As enzimas lacase, peroxidase, manganês peroxidase, avicelase e xilanase foram produzidas por pelo menos um dos microrganismos testados e em todos os polímeros, em proporções variáveis. Os níveis de MnP foram elevados no PP com *P. sajour caju* e *P.98/36* (figura 9), a produção de AVO e LiP foi marcante no PET com as linhagens *P.001* e *P.98/37* (figura 10), a enzima xilanase destacou-se no PS com 200 UI/L praticamente alcançando o nível da avicelase em 40 dias (figura 11) e as atividades mais relevantes de CMCase foram observadas no PU com levedura L7A que produziu 200 UI/L em 40 dias (figura 12). Dentre todas as linhagens testadas, podemos destacar a alta capacidade de produção enzimática do fungo *P. 98/37* (no PET e PS), como pode ser observado nas figuras 10 e 11 respectivamente, que apresentou um perfil de enzimas muito amplo, somente sendo negativo para MnP e ainda produziu atividades muito elevadas para a maioria das enzimas analisadas. O fungo *P.001* pareceu ter um papel potencial na produção de enzimas celulolíticas, embora também tenha se destacado com ligninases. O fato de se observar altos níveis de produção de enzimas celulolíticas está relacionado à fonte de nitrogênio presente no meio de cultura (extrato de levedura) que favorece a síntese destas enzimas. Já as ligninases são produzidas

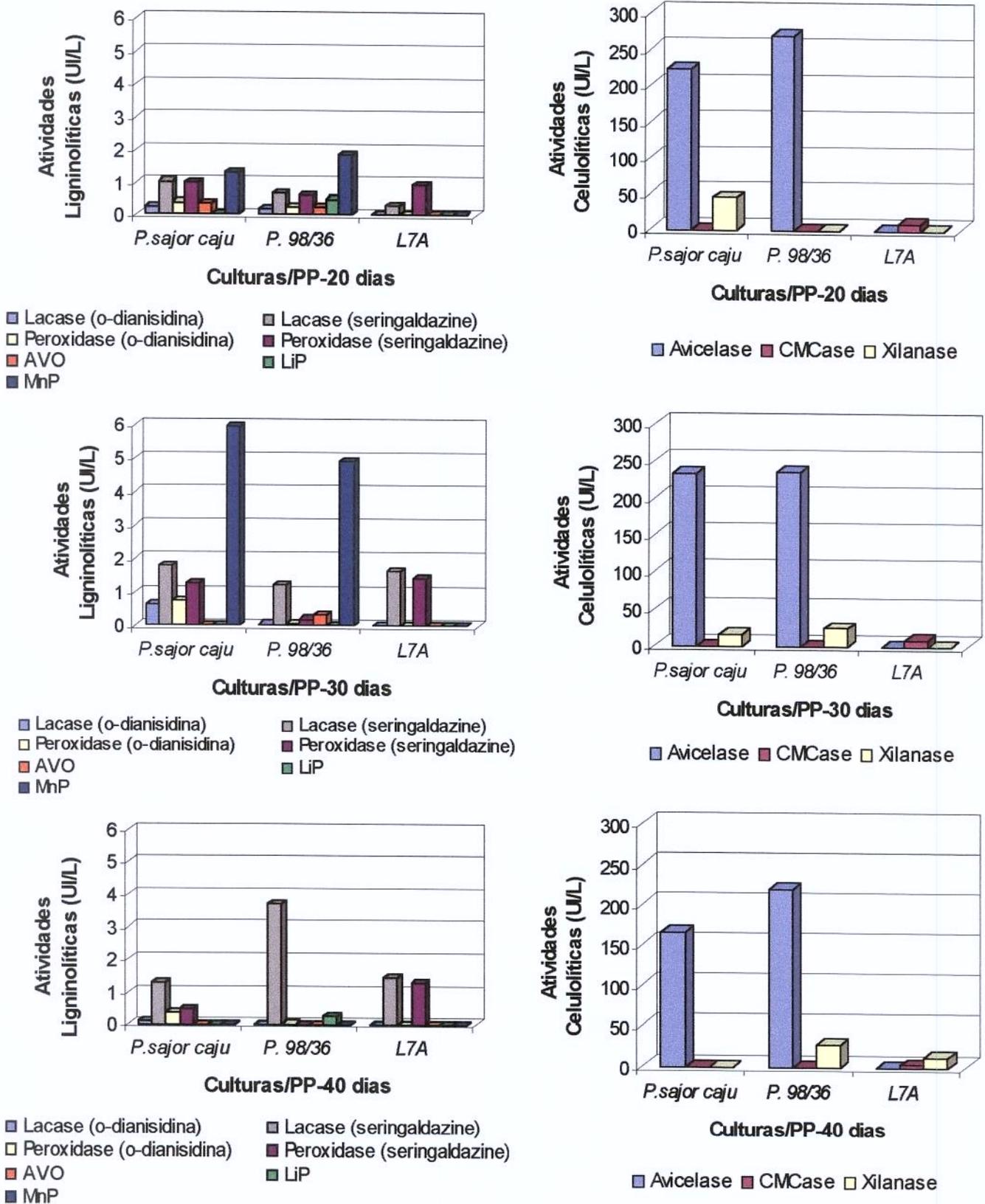
posteriormente quando o meio se encontra em condições esgotadas deste nutriente.

O padrão de atividade oxidativa produzida por fungos de degradação branca demonstrou uma combinação destas enzimas que variaram entre as linhagens e de acordo com o substrato introduzido no meio de cultura (MILSTEIN *et al.*, 1992). De fato, a eficiência de enzimas extracelulares secretadas pelas hifas fúngicas foi também observada por ONODERA *et al.* (2001), na degradação acelerada do polietileno. A expectativa na biodegradação de polímeros sintéticos por fungos de degradação branca está relacionada à produção de enzimas ligninolíticas devido ao seu potencial oxidativo capaz de decompor componentes aromáticos muito complexos, como é o caso da lignina, que podem ser correlacionados à estrutura dos polímeros sintéticos estudados. Nesta mesma linha de raciocínio, muitos pesquisadores vêm estudando o papel destas enzimas na degradação de vários organopolutentes recalcitrantes, como LANG *et al.* (1998) que investigaram a influência de enzimas ligninolíticas produzidas por *Pleurotus sp.* na degradação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) no solo.

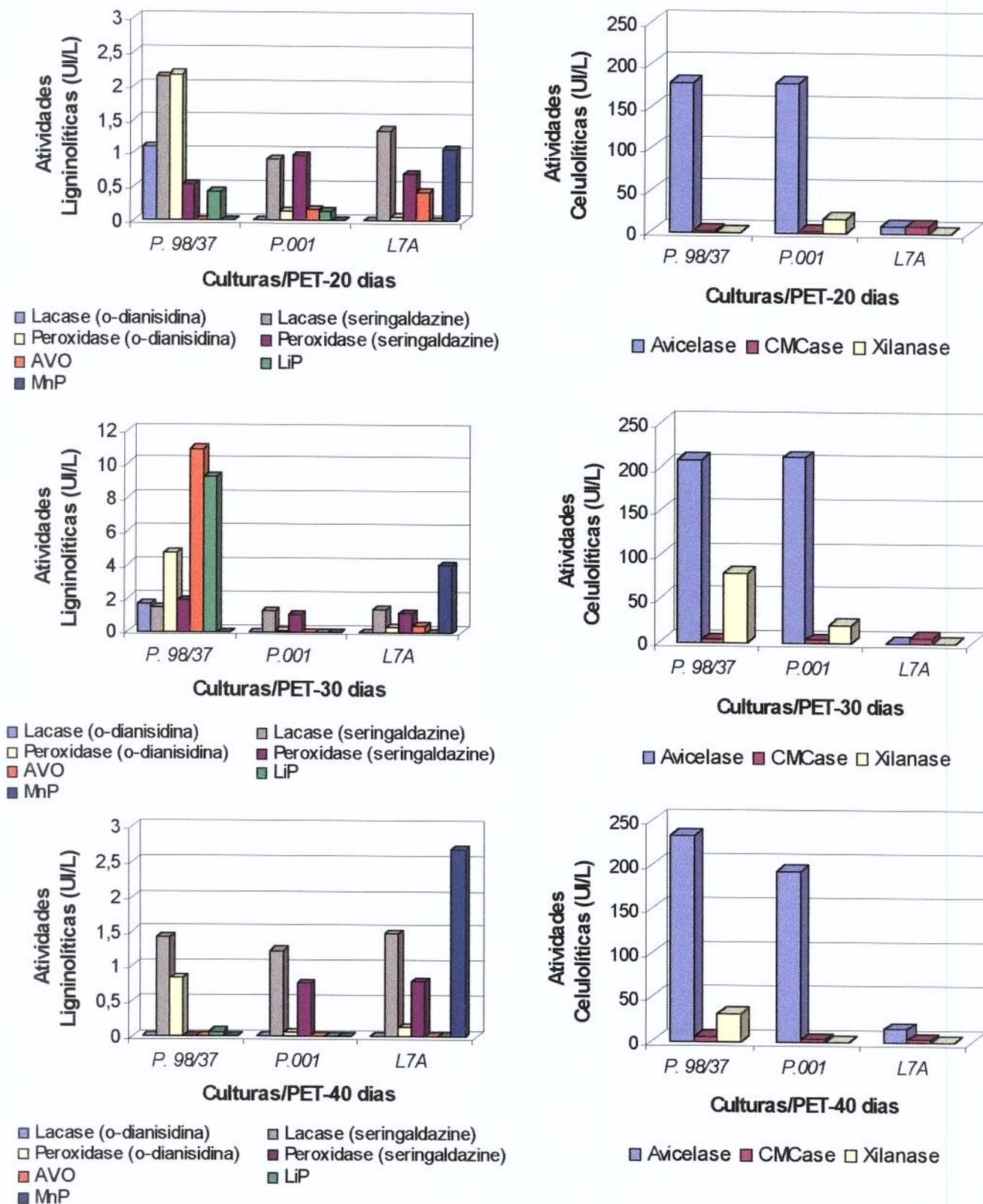
De um modo geral, as atividades de enzimas produzidas pelos microrganismos foram muito variadas com relação aos três períodos de crescimento testados, fato justificado pelo alto metabolismo das linhagens com o tempo que pode provocar uma oscilação muito brusca nos níveis de metabólitos do meio de acordo com sua fase de crescimento e requerimentos nutricionais e energéticos.



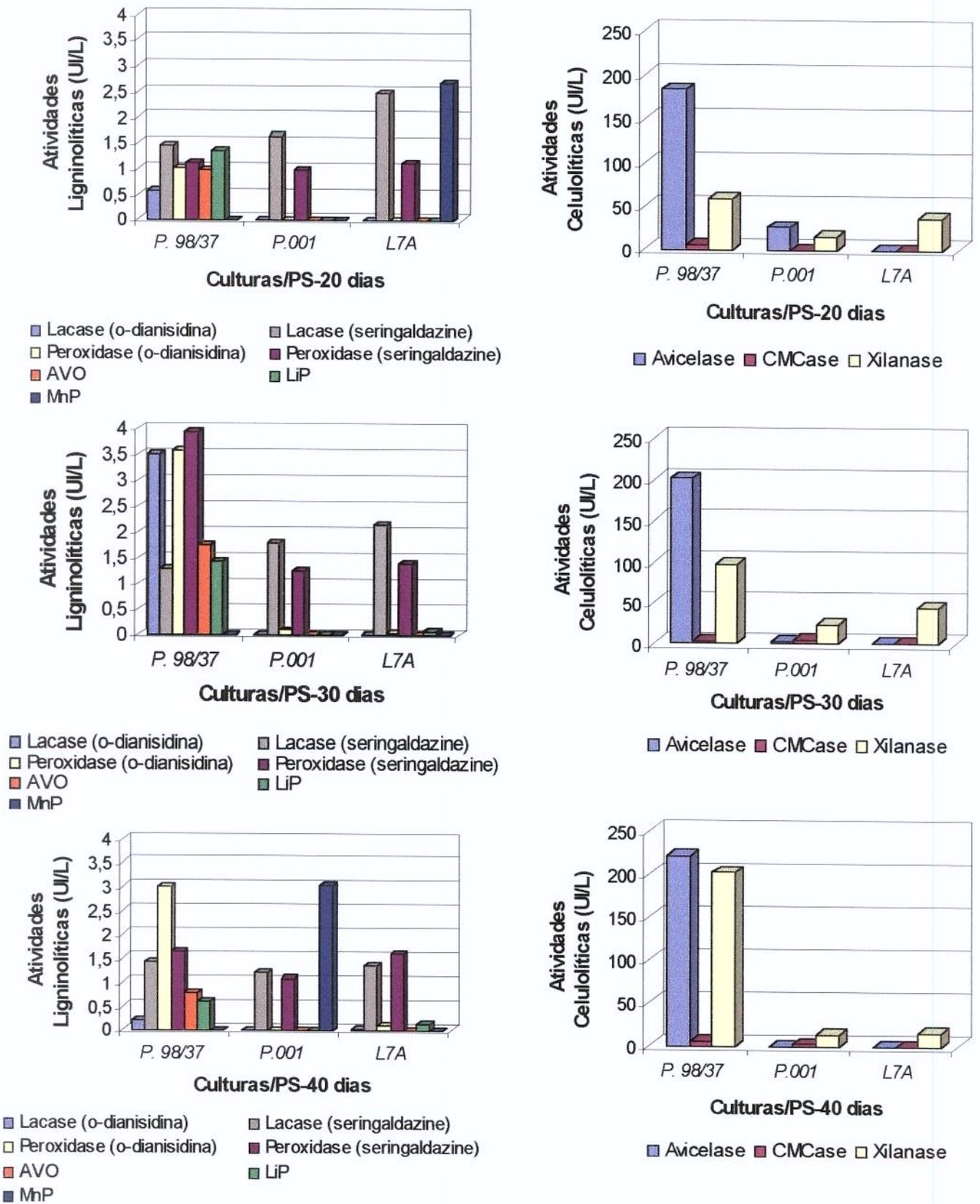
**FIGURA 8. Atividades enzimáticas produzidas pelas culturas fúngicas em PVC nos três períodos de incubação (20, 30 e 40 dias).**



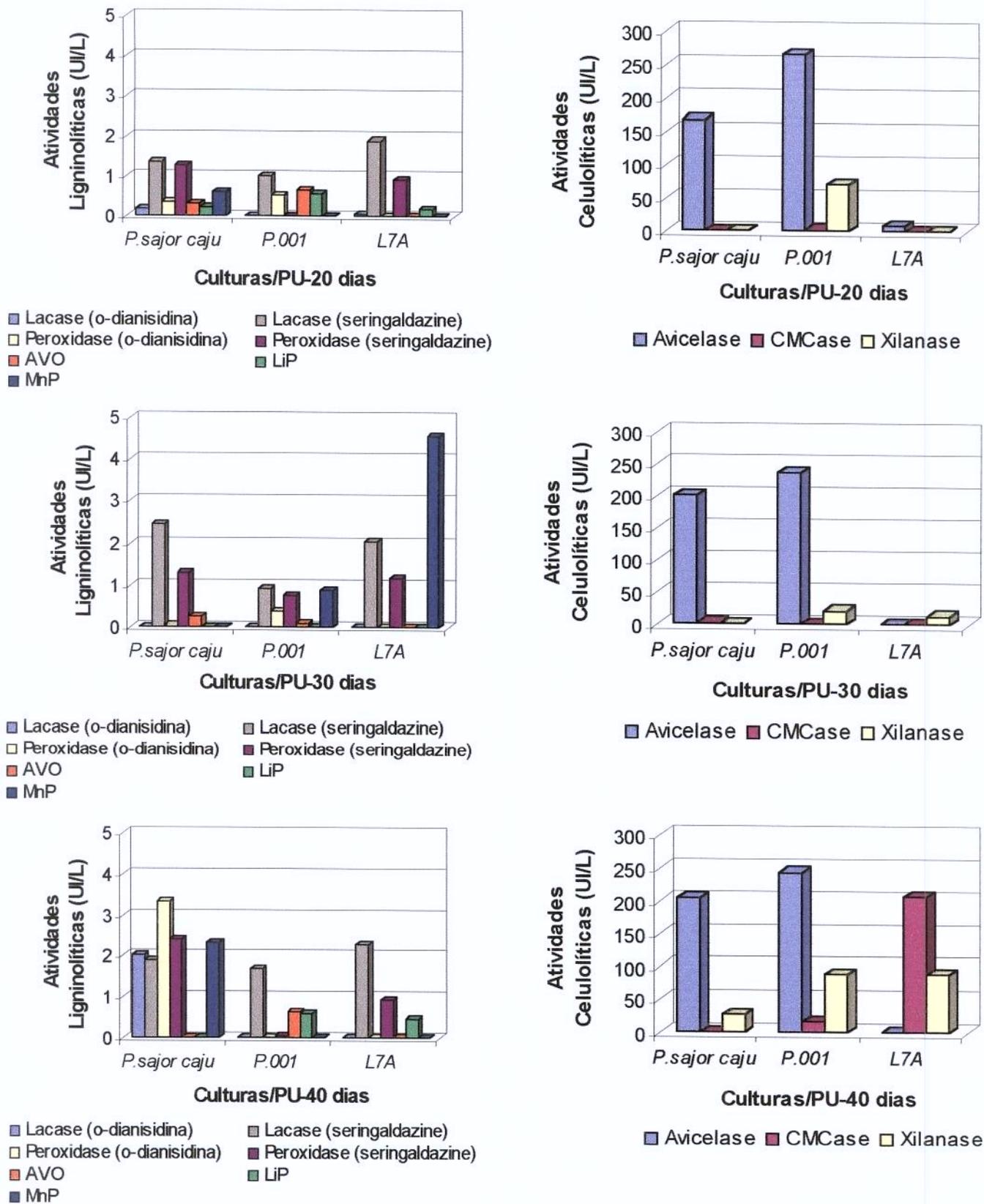
**FIGURA 9. Atividades enzimáticas produzidas pelas culturas fúngicas em polipropileno nos três períodos de incubação (20, 30 e 40 dias).**



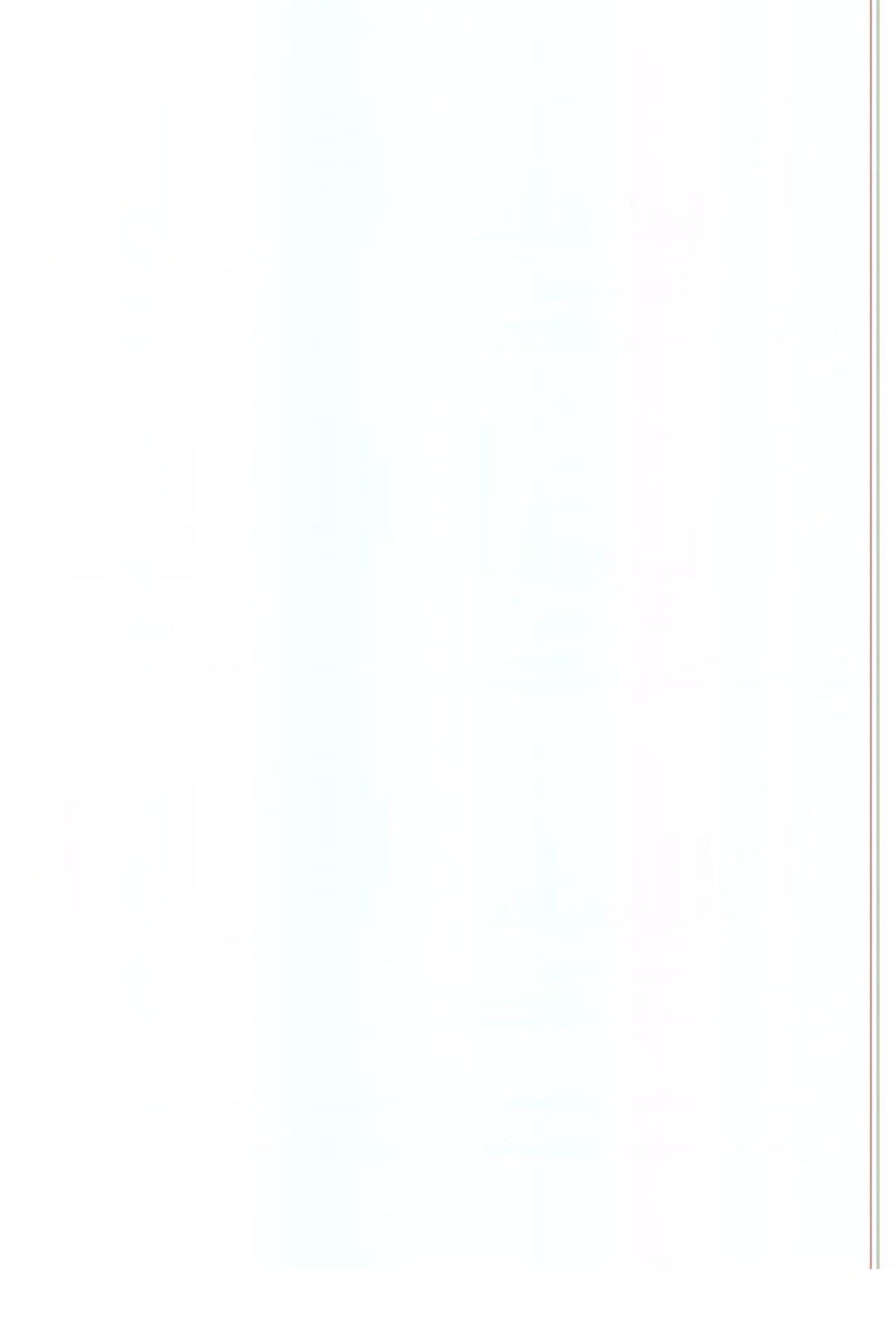
**FIGURA 10. Atividades enzimáticas produzidas pelas culturas fúngicas em polietileno tereftalato nos três períodos de incubação (20, 30 e 40 dias).**



**FIGURA 11. Atividades enzimáticas produzidas pelas culturas fúngicas em poliestireno nos três períodos de incubação (20, 30 e 40 dias).**



**FIGURA 12. Atividades enzimáticas produzidas pelas culturas fúngicas em poliuretano nos três períodos de incubação (20, 30 e 40 dias).**



## **5.8) Avaliação de componentes de degradação no meio de cultura**

Os picos observados na varredura em espectrofotômetro UV/Visível podem ser relativos às absorções de diversos componentes presentes no caldo de cultura como: metabólitos secundários produzidos pelo crescimento microbiano, produtos oriundos da degradação dos componentes do meio de cultura ou produtos de degradação dos polímeros. As amostras de controles são referentes aos ensaios do meio de cultura com o polímero e sem o microrganismo. Quando a concentração (absorbância) de determinado composto que absorve em certo comprimento de onda diminui no meio de cultivo com os fungos em relação ao seu controle, significa que aquela substância está sendo consumida pelas células microbianas (nutrientes do meio). Se o contrário ocorre, ou seja, a concentração de um composto na amostra aumenta em relação ao seu controle, isto significa que esta substância está sendo detectada em maiores concentrações, o que deve estar relacionado com fatores interferentes, como por exemplo a diluição no meio de cultura. Porém, se um novo pico é formado na amostra, ou seja, se surgir um composto que absorve na amostra mas não no seu controle, significa que algo está sendo gerado no meio de cultura em decorrência do metabolismo fúngico (metabólitos secundários ou sub produtos de degradação dos polímeros).

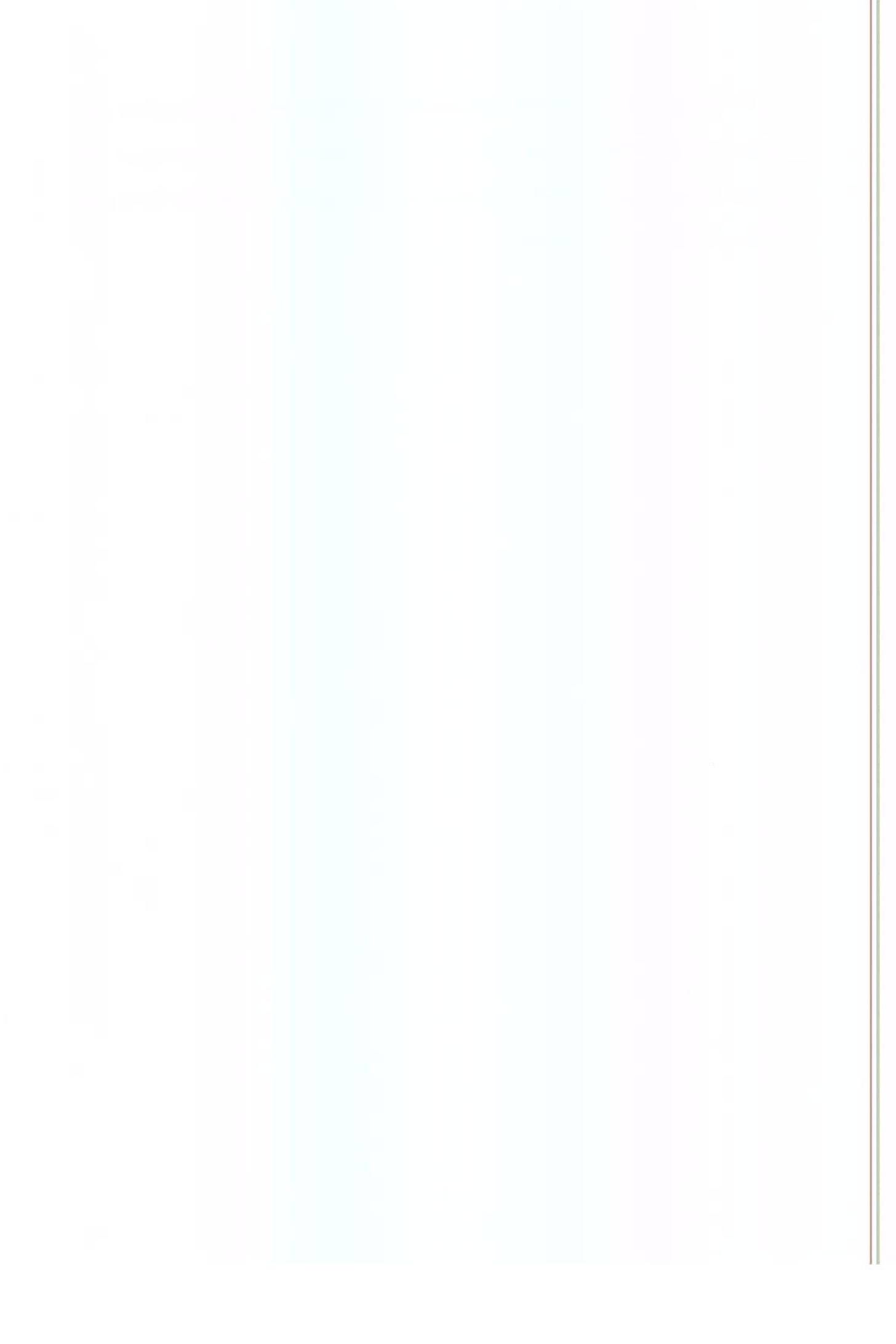
De uma forma geral, os meios controle incubados com os polímeros sintéticos apresentaram dois picos principais de absorção, o primeiro situado na faixa de 200 a 210 nm com grande intensidade, e o outro com menor intensidade na faixa de 260 nm (figuras 13, 14, 15, 16 e 17). As amostras contendo os polímeros e os fungos apresentaram picos de absorções similares aos dos

controles, com exceção do espectro do meio com PVC e P.001 que revelou absorção somente na região de 260 nm indicando o consumo total de algum componente do meio de cultura que absorve na faixa de 200 a 215 nm (figura 13).

Considerando que não foi detectada degradação dos polímeros controle nas etapas anteriores, podemos sugerir que o espectro do meio contendo os polímeros controle que foi obtido reflete a absorção dos componentes do meio de cultura. A ocorrência de variações nas intensidades das absorções entre controle e amostras onde estas apresentaram concentrações maiores que as do controle, observadas principalmente no meio com PET e PS (figuras 15 e 17, respectivamente), deve estar relacionada a alguma variação na concentração dos componentes do meio de cultura visto que foram preparadas várias partidas de meio para a realização dos experimentos. Além disso, as amostras que foram submetidas às análises (1,0 mL) representaram apenas uma pequena fração do volume total do caldo de cultura, o que pode estar influenciando nos resultados devido a uma ampla diluição dos compostos presentes no meio.

Contudo, foi observado um fato curioso nos polímeros analisados com relação à absorção de determinado composto na região de 300 a 350 nm nas amostras de meio com os polímeros incubados com os fungos, principalmente de PET e PS que apresentaram as maiores absorções (figuras 15 e 17), que não foram detectados nas amostras de controle. Isto sugere a produção de alguma substância no meio pelos fungos, que pode ser tanto metabólitos secundários decorrentes do crescimento fúngico como de algum produto de degradação dos polímeros sintéticos.

Portanto, não foi possível estabelecer com precisão a presença de subprodutos de degradação dos polímeros sintéticos com a metodologia de espectrofotometria UV/ visível utilizando o caldo de cultura obtido nos finais dos tempos de incubação para análise.



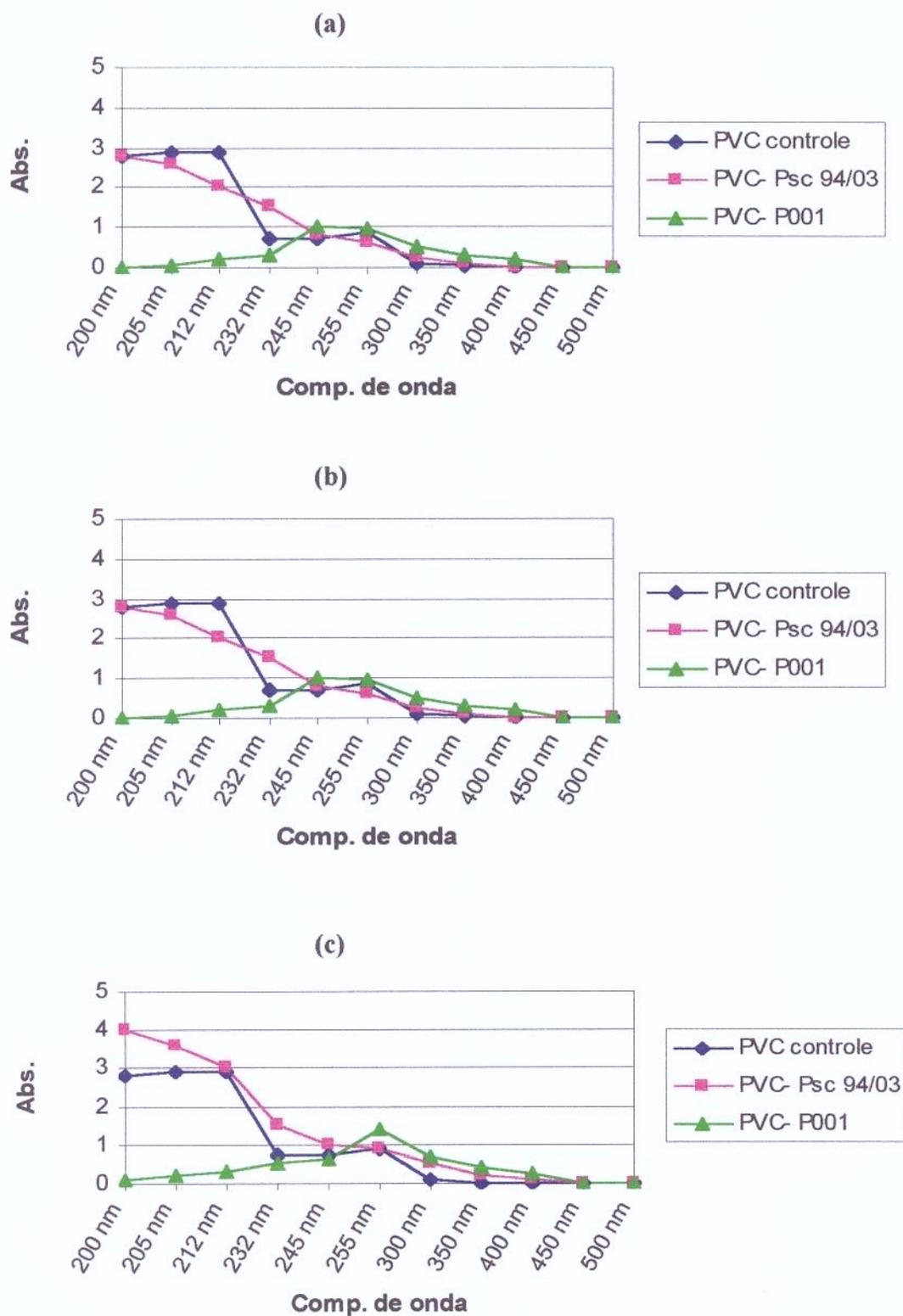


FIGURA 13. Espectro UV/Visível do PVC. (a) 20 dias; (b) 30 dias; (c) 40 dias.



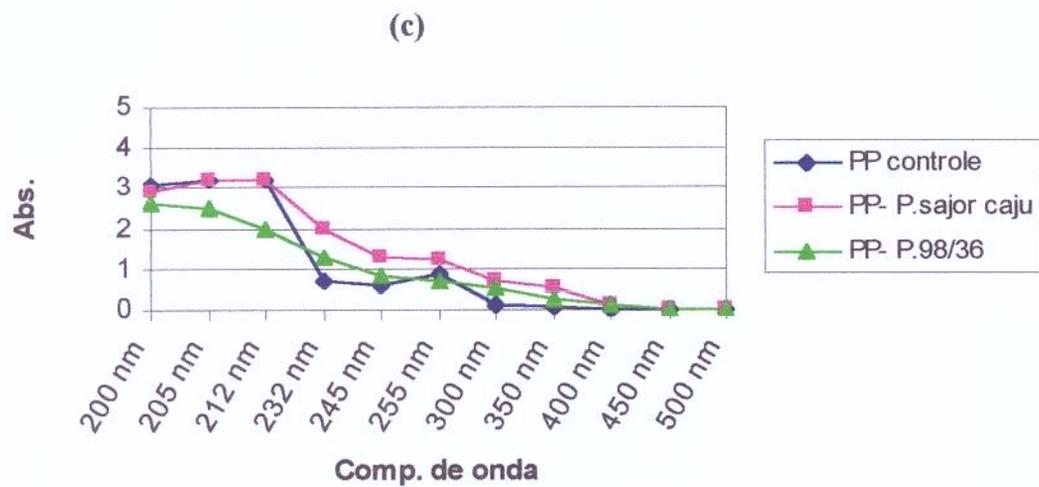
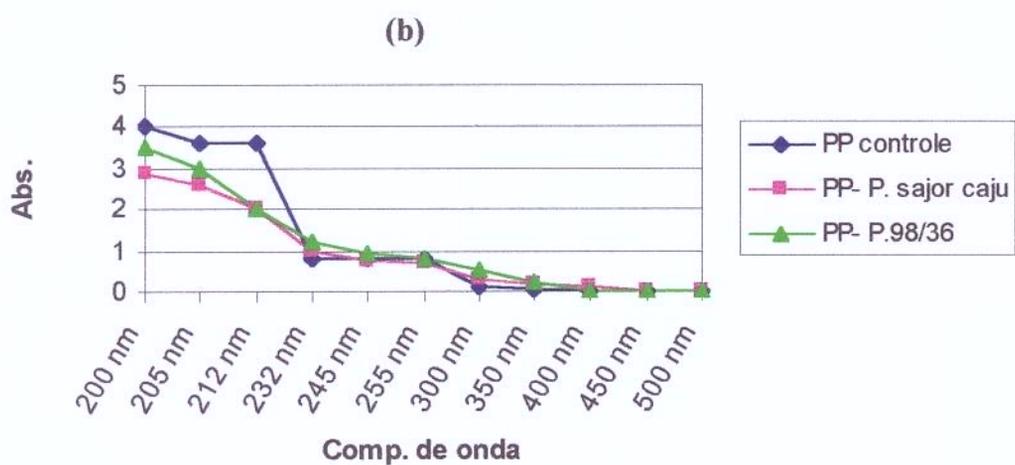
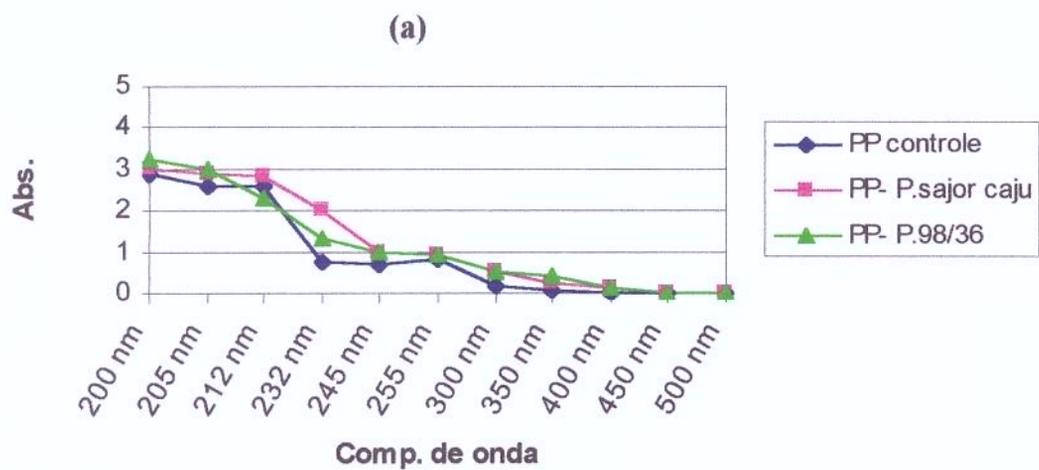


FIGURA 14. Espectro UV/Visível do PP: (a) 20 dias; (b) 30 dias; (c) 40 dias.

1. The first part of the document discusses the importance of maintaining accurate records of all transactions and activities. It emphasizes that this is crucial for ensuring transparency and accountability in the organization's operations.

2. The second part outlines the various methods and tools used to collect and analyze data. This includes both traditional manual methods and modern digital technologies, highlighting the benefits of each approach.

3. The third part focuses on the challenges and risks associated with data management, such as data loss, security breaches, and compliance issues. It provides strategies to mitigate these risks and ensure the integrity of the data.

4. The fourth part discusses the role of data in decision-making and strategic planning. It explains how data-driven insights can help organizations identify trends, opportunities, and areas for improvement.

5. The fifth part covers the legal and ethical considerations surrounding data collection and use. It stresses the importance of obtaining proper consent and adhering to relevant regulations to protect individual privacy.

6. The sixth part addresses the future of data management, including emerging trends like artificial intelligence and big data. It offers perspectives on how these technologies will shape the way organizations handle their data in the coming years.

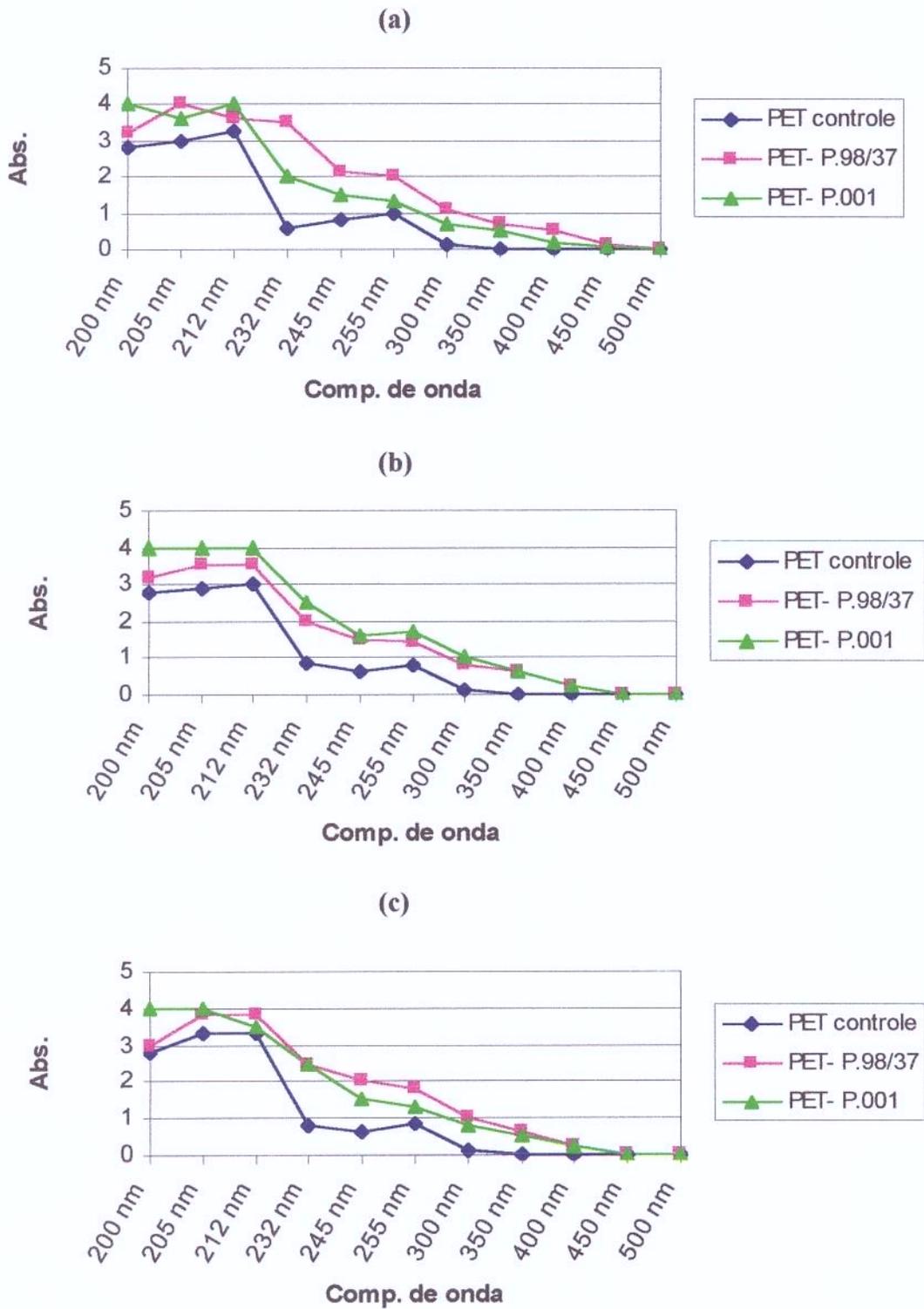


FIGURA 15. Espectro UV/Visível do PET: (a) 20 dias; (b) 30 dias; (c) 40 dias.

The first part of the document discusses the importance of maintaining accurate records of all transactions. It emphasizes that every entry, no matter how small, should be recorded to ensure the integrity of the financial data. This includes not only sales and purchases but also expenses and income. The document provides a detailed list of items that should be tracked, such as inventory levels, accounts payable, and accounts receivable. It also outlines the procedures for recording these transactions, including the use of double-entry bookkeeping to ensure that the books balance. The second part of the document focuses on the analysis of the recorded data. It describes various methods for identifying trends and anomalies, such as comparing current performance with historical data and industry benchmarks. The document also discusses the importance of regular audits to verify the accuracy of the records and to detect any potential errors or fraud. Finally, the document concludes with a summary of the key findings and recommendations for improving the financial management process. It stresses the need for ongoing monitoring and reporting to ensure that the organization remains financially sound and compliant with all applicable regulations.

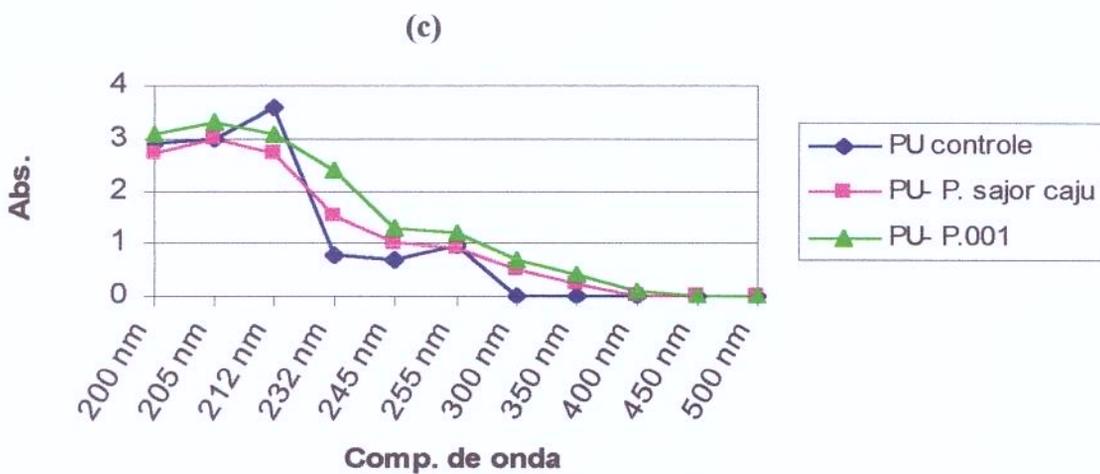
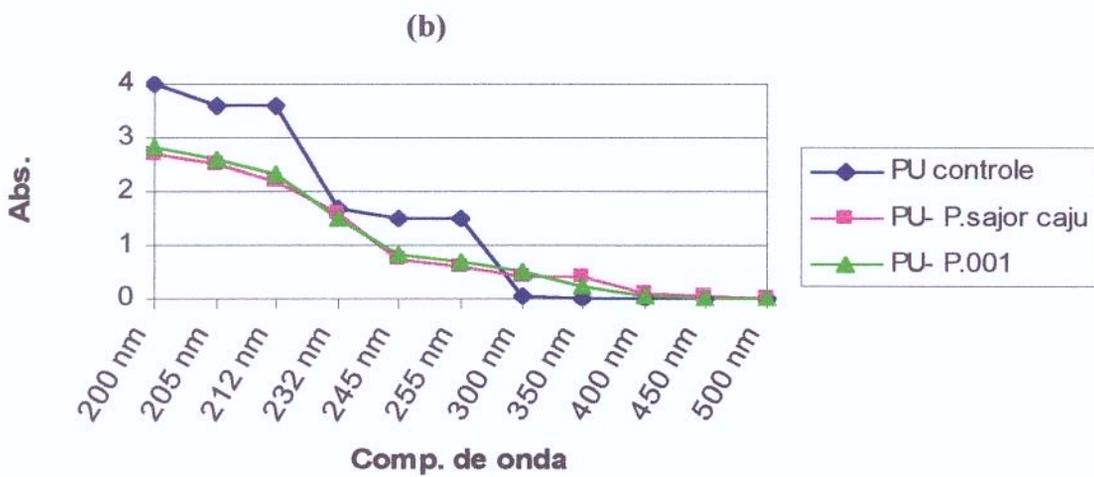
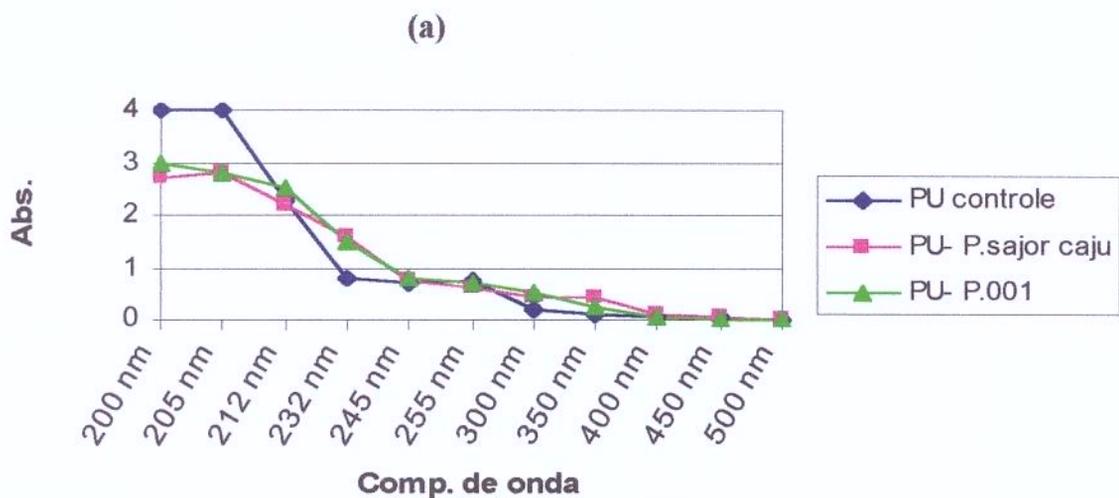


FIGURA 16. Espectro UV/Visível do PU: (a) 20 dias; (b) 30 dias; (c) 40 dias.

1. The first part of the document discusses the importance of maintaining accurate records of all transactions and activities. It emphasizes that this is crucial for ensuring transparency and accountability in the organization's operations.

2. The second part outlines the various methods and tools used to collect and analyze data. This includes both traditional manual methods and modern digital technologies, highlighting the benefits of each approach.

3. The third part focuses on the role of data in decision-making. It explains how data analysis can provide valuable insights into trends, patterns, and potential risks, enabling leaders to make more informed choices.

4. The fourth part addresses the challenges associated with data management, such as data quality, security, and privacy. It offers practical strategies to overcome these challenges and ensure that data is used responsibly and effectively.

5. Finally, the document concludes by emphasizing the ongoing nature of data analysis and the need for continuous improvement. It encourages organizations to stay up-to-date with the latest developments in the field and to foster a culture of data-driven innovation.

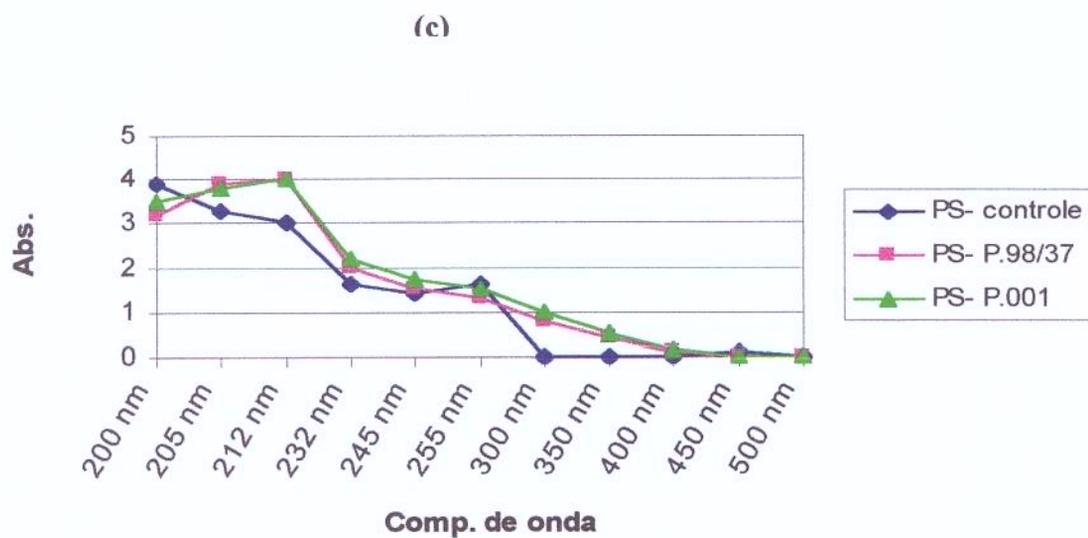
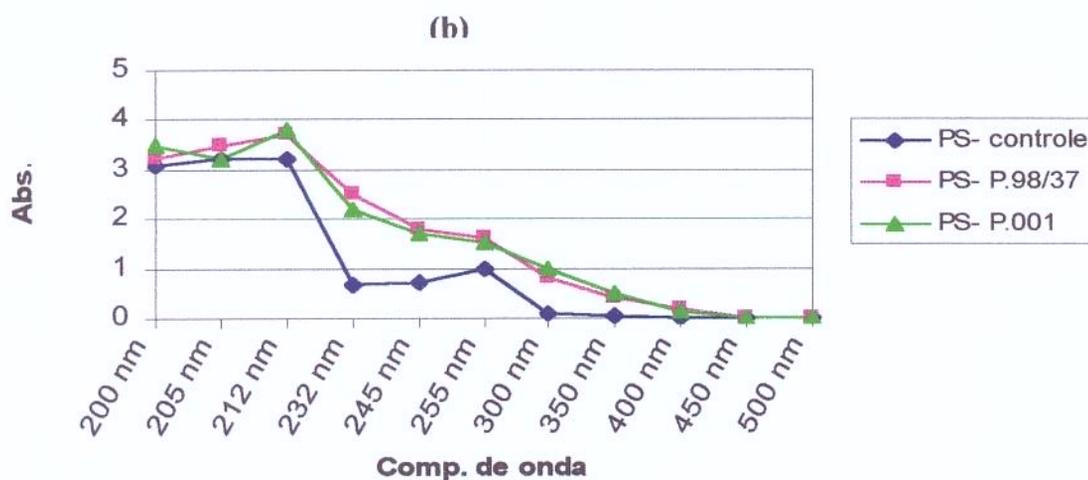
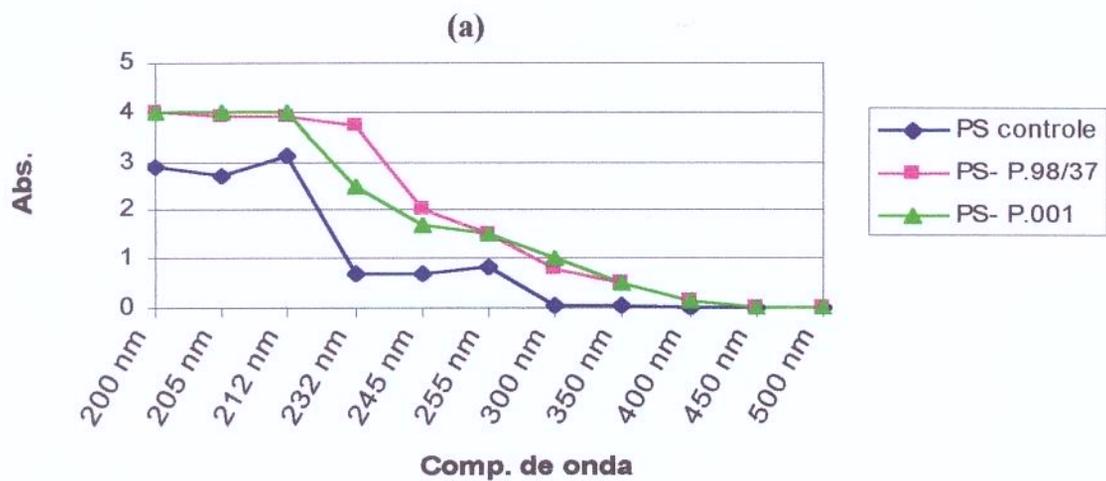


FIGURA 17. Espectro UV/Visível do PS: (a) 20 dias; (b) 30 dias; (c) 40 dias.

1. The first part of the document discusses the importance of maintaining accurate records of all transactions and activities. It emphasizes that this is crucial for ensuring transparency and accountability in the organization's operations.

2. The second part outlines the various methods and tools used to collect and analyze data. This includes the use of surveys, interviews, and data mining techniques to gather insights into customer behavior and market trends.

3. The third part focuses on the analysis of the collected data. It describes how statistical models and machine learning algorithms are applied to identify patterns and correlations within the data sets.

4. The fourth part discusses the implications of the findings and how they are used to inform strategic decision-making. It highlights the role of data in identifying opportunities for growth and areas for improvement.

5. The final part of the document provides a summary of the key points and offers recommendations for future research and implementation. It stresses the need for continuous monitoring and evaluation of the data-driven strategies.

## 5.9) Alterações estruturais nos polímeros

Vale a pena ressaltar que neste estudo todos os fatores físico-químicos causadores de degradação dos polímeros (alta temperatura, pH, radiações, solventes fortes, etc.) foram excluídos dos experimentos para que os resultados obtidos pudessem ser atribuídos unicamente à ação microbiana. As análises realizadas com as amostras de polímeros após o período de incubação com as culturas fúngicas utilizaram o mesmo procedimento de remoção das células microbianas para determinação da massa seca, com solução de etanol 70 %, conforme descrito no item 4.7 (pág. 34, 3<sup>o</sup> parágrafo).

Para a determinação das alterações estruturais dos plásticos, cada polímero que obteve maior perda de massa foi selecionado em três situações para os ensaios de viscosidade/ fluidez: a) polímero virgem, sem nenhum tratamento prévio; b) polímero controle, somente incubado com o meio de cultura; c) polímero amostra, incubado com o meio e a cultura fúngica. De acordo com a tabela 5 (págs.55 e 57), os maiores valores de redução de massa molar obtidos para cada polímero foram: PVC = 20 %; PP = 5 %; PET = 2,6 %; PS = 0,8 %.

Não foi possível realizar as análises de cromatografia com PET e PP pois estes polímeros necessitam de uma coluna de alta temperatura para sua efetiva solubilização no solvente e permeação pelos poros da coluna. Devido à falta de acesso a esta coluna específica, principalmente pelo seu altíssimo custo, as análises cromatográficas foram testadas somente para PVC e PS onde as corridas foram realizadas à temperatura ambiente. Para estes dois polímeros, foram escolhidas as amostras incubadas com os fungos que provocaram as maiores

taxas de redução de massa, já mencionadas acima, que foram: *Pleurotus* 001 (PVC) e *Pleurotus* 98/37 (PS).

O Poliuretano, por representar um polímero termofixo, não possui as mesmas propriedades químicas dos termoplásticos, principalmente com relação à solubilidade que é o processo pelo qual o polímero se dissolve pelo afastamento das cadeias e estas permanecem preservadas. Portanto, fica difícil estabelecer comparações neste âmbito de análise com o PU pois este não possui resistência aos solventes químicos, ocorrendo destruição do polímero, sendo desta forma eliminado das etapas a seguir.

#### **5.9.1) Análise de Fluidez dos polímeros fundidos PP e PS/ Viscosidade de soluções diluídas dos polímeros PET e PVC**

Os resultados obtidos revelaram que realmente ocorreram alterações na estrutura polimérica após incubação com microrganismos produzindo aumento da fluidez com redução da viscosidade dos polímeros, em relação aos seus controles (tabela 6), em concordância com os resultados de KIRBAS *et al.* (1999) que também detectaram diminuição na viscosidade do PVC pela atuação microbiana. Um fato curioso ocorrido foi o aumento de fluidez detectado no controle do PS em relação ao PS virgem, que pode ter ocorrido pela adsorção de algum componente do meio de cultura nas estruturas alveolares desta forma expandida do poliestireno, atuando como um interferente durante as medidas de fluidimétricas.

Estes resultados devem-se à presença de biosurfactantes produzidos pelas linhagens fúngicas no meio de cultura que certamente favoreceu o aumento da

fluidez/ solubilidade destes compostos sintéticos hidrofóbicos tornando-os menos viscosos. Daí a importância de se estudar a produção de biosurfactantes por microrganismos e desenvolver condições adequadas para otimizar e maximizar a produção destas substâncias pelas células microbianas, a fim de serem utilizadas em larga escala nos processos de biorremediação.

**TABELA 6: Valores de fluidez/ viscosidade obtidos de acordo com o método de ensaio específico para cada polímero sintético.**

AMOSTRAS DE POLÍMEROS	MÉTODOS DE ENSAIOS
PVC Virgem	Valor K = 71
PVC Controle	Valor K = 71
PVC com P.001	Valor K = 68
PVC com P1	Valor K = 67
PVC com PSC 94/03	Valor K = 67
PP Virgem	Índice de Fluidez = 2,5 g/10 min.
PP Controle	Índice de Fluidez = 2,5 g/10 min.
PP com P. 98/36	Índice de Fluidez = 2,8 g/10 min.
PET Virgem	Viscosidade Intrínseca = 0,78 dL/g
PET Controle	Viscosidade Intrínseca = 0,78 dL/g
PET com P.001	Viscosidade Intrínseca = 0,76 dL/g
PS Virgem	Índice de Fluidez = 10,0 g/10 min.
PS Controle	Índice de Fluidez = 12,5 g/10 min.
PS com P. 98/37	Índice de Fluidez = 15,7 g/10 min.

### 5.9.2) Análises de Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)

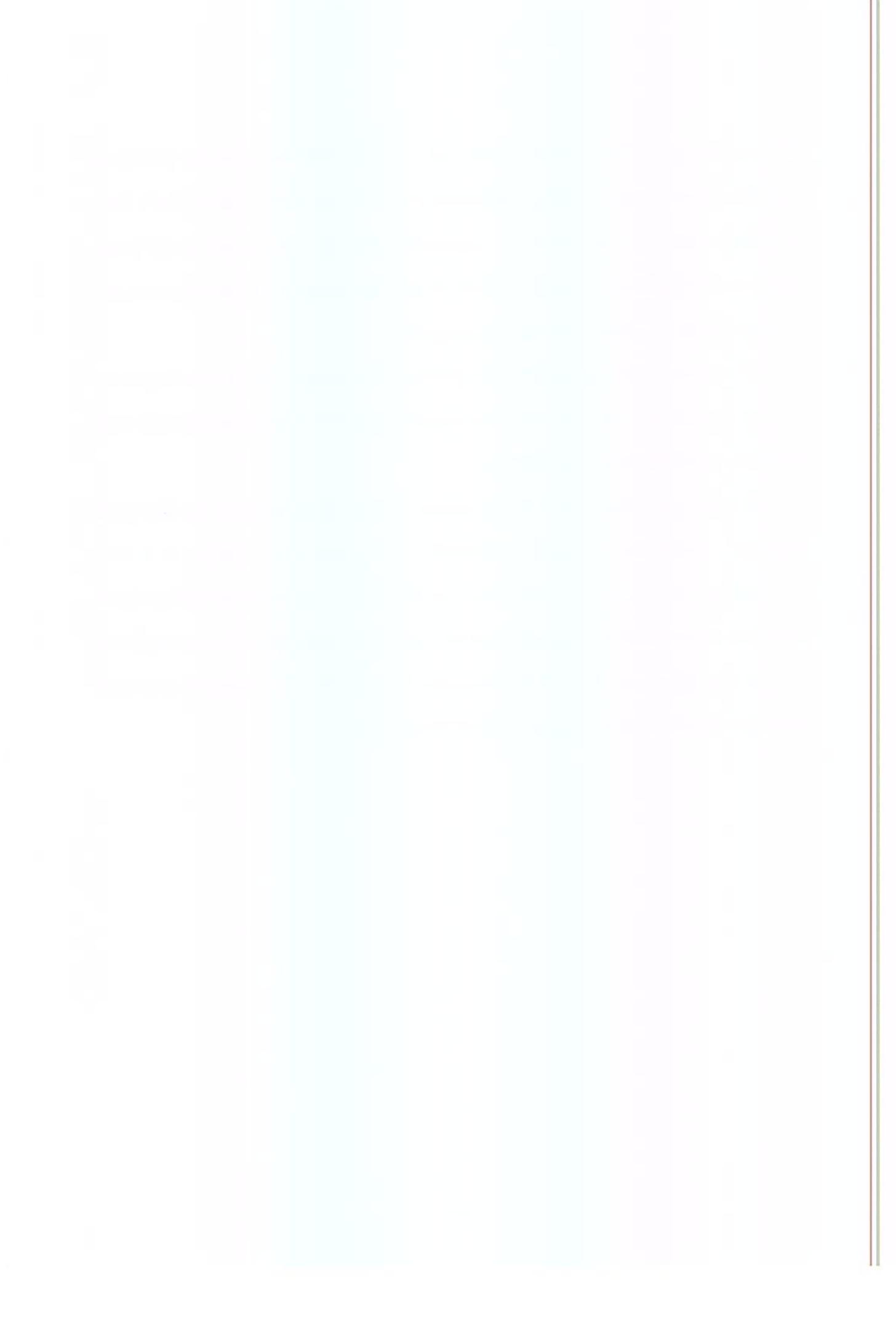
As análises de cromatografia de permeação em gel realizadas com PVC e PS não revelaram variações nas massas molares médias ( $\overline{M}_n$ ) dos polímeros controle em relação às amostras após incubação com as culturas fúngicas. Em ambos os polímeros, a cadeia polimérica foi eluída entre 15 e 25 minutos de corrida, alcançando o pico em 20 minutos conforme representado na curva de 3ª ordem demarcada entre pequenos ícones ( $\blacktriangle$ ↕). Os registros cromatográficos detectados após o 26º minuto correspondem aos oligômeros migrando no composto, que podem realmente apresentar variações no peso molecular e na sua distribuição por possuírem baixo peso molecular.

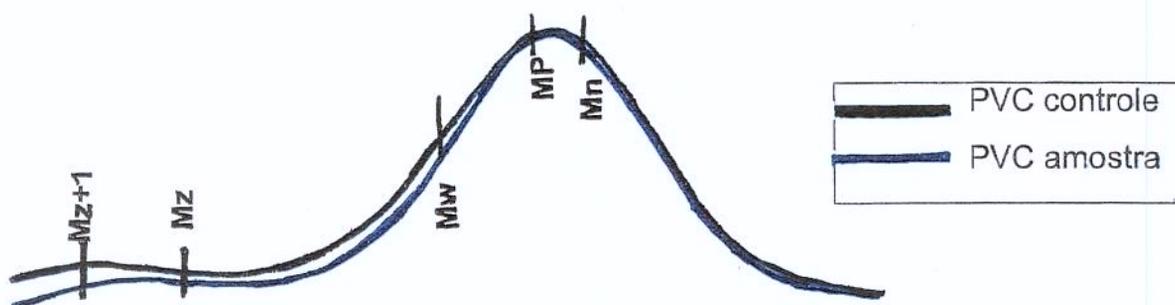
De uma forma geral, o pico principal relativo à cadeia polimérica do PVC e do PS não sofreu redução significativa na sua massa molar, porém foram detectadas alterações na distribuição das massas molares nas regiões correspondentes às cadeias mais pesadas ( $M_z$  e  $M_{z+1}$ ). A mudança observada na distribuição de massa molar foi mais intensa na amostra de PVC do que na amostra de PS, quando comparada com seus respectivos controles (figura 18). Estes resultados comprovam os achados de perda de massa e mudanças de viscosidade/ fluidez observada nos polímeros sintéticos neste estudo, confirmando a habilidade de degradação destes plásticos por fungos lignocelulolíticos. Contudo, a taxa elevada de perda de massa molar observada no PVC pode ser atribuída também à perda de aditivos através da degradação microbiana ou migração destes compostos para o meio de cultura. De acordo com OTAKE *et al.*

(1995), mudanças nítidas foram detectadas no policloreto de vinila em relação à perda de plastificantes, quando investigado no solo e em lodo ativado. Outro fator de grande relevância que pode ter provocado redução de massa molar mais intensa no PVC está relacionado à perda de átomos de cloro da cadeia polimérica em decorrência do processo de desidrocloração.

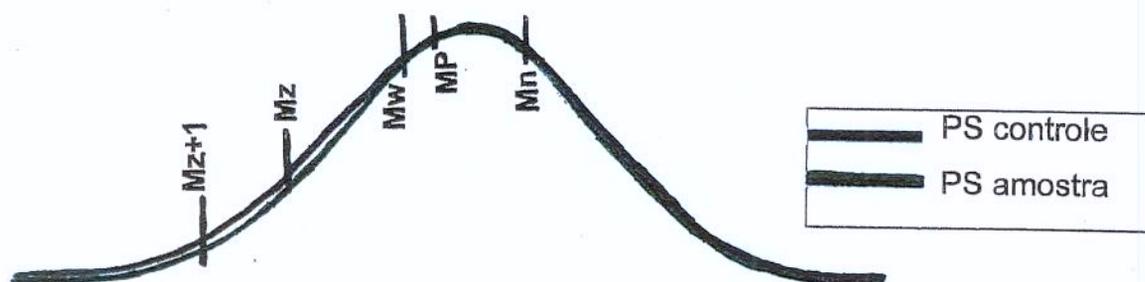
O processo de degradação dos polímeros sintéticos ocorre em função do tempo e de outras condições, podendo evoluir para uma degradação severa com ruptura da cadeia principal do polímero.

É importante ressaltar a sensibilidade da GPC a compostos de alto peso molecular, como os polímeros sintéticos, mas não em relação a outros componentes de baixo peso molecular. Portanto, seria interessante utilizar outra técnica de maior precisão para detectar ou quantificar reduções na composição de aditivos nos plásticos, através da extração dos aditivos do polímero e análise deste extrato por cromatografia de alta eficiência (CLAE).





Corrida	Mn (Daltons)	MP (Daltons)	Mw (Daltons)	Mz (Daltons)	Mz+1 (Daltons)
PVC controle	60153	90343	187408	1306075	2935108
PVC amostra	55432	83589	179286	1075409	2118014



Corrida	Mn (Daltons)	MP (Daltons)	Mw (Daltons)	Mz (Daltons)	Mz+1 (Daltons)
PS controle	90838	183572	234987	566612	1082599
PS amostra	89411	168843	221757	515009	1008957

FIGURA 18. Curvas e valores de distribuição de massa molar comparativos entre controle e amostra de PVC e PS após incubação com a cultura fúngica.

## VI- CONCLUSÕES

- As linhagens lignocelulolíticas utilizadas neste estudo demonstraram ser capazes de se desenvolver em meio com fonte de carbono sintética de difícil degradação para requerimentos nutricionais, apresentando graus de crescimento variáveis nos polímeros polipropileno, polietileno tereftalato, poliestireno expandido (isopor) e policloreto de vinila.
- Os fungos *Pleurotus* 001 e *Pleurotus* 98/37 demonstraram um grande potencial na biodegradação de polímeros sintéticos, apresentando excelente desempenho de crescimento assim como reduções de massa relevantes deste substrato sob as condições testadas. Outra linhagem que também se destacou em relação aos critérios mencionados foi a levedura L7A.
- As reduções de massa que foram observadas nos polímeros sintéticos devem ser atribuídas à atuação dos microrganismos em contato com tais substratos, conforme constatado pelas análises de microscopia eletrônica, através da síntese de compostos surfactantes, que aumentam a acessibilidade destes materiais plásticos hidrofóbicos no meio líquido, favorecendo a atuação de enzimas hidrolíticas e oxidativas na quebra de componentes do polímero que se tornam disponíveis para serem utilizados como fonte de energia.
- As perdas de massa ocorridas nos polímeros sintéticos e alterações morfológicas observadas por Microscopia Eletrônica de Varredura parecem estar relacionadas não somente à degradação dos polímeros, mas também

com compostos aditivos impregnados na cadeia polimérica, sendo de grande importância no policloreto de vinila (PVC). O processo de desidrocloração ocorrido no PVC constitui um fator importante que pode ter provocado perda de massa molar mais acentuada neste polímero.

- As análises cromatográficas não indicaram mudanças relevantes nas massas molares médias dos polímeros de poliestireno e policloreto de vinila, porém foram detectadas alterações nítidas nos perfis cromatográficos em regiões correspondentes às cadeias de maior massa molar sugerindo a ocorrência de mudanças estruturais que culminaram na diminuição da viscosidade dos polímeros, sem ruptura do esqueleto principal.
- Este estudo reflete a biodegradabilidade de plásticos sintéticos, em graus variados, estabelecendo o potencial dos processos de biodegradação como forma alternativa de redução da poluição ambiental por resíduos sólidos, e incentiva a necessidade dos estudos de plásticos biodegradáveis, contendo moléculas naturais ou biossintéticas nas cadeias poliméricas, a fim de favorecer o aumento da biodegradabilidade destes compostos sintéticos.
- Ficou comprovada a eficácia da utilização de microrganismos para degradar embalagens plásticas empregadas na indústria de alimentos, ou pelo menos parte delas, sendo de grande importância o estudo das condições ótimas de crescimento dos microrganismos aliado à combinação de outros fatores físico-químicos que podem auxiliar ou maximizar o processo de degradação (temperatura, pH, luz UV, etc.).
- Nossos resultados sugerem alguns pontos a serem verificados em trabalhos futuros como: a utilização de consórcio dos fungos, o estudo do

consórcio de polímeros, o emprego de biosurfactantes exógenos para potencializar a solubilização e a acessibilidade dos polímeros sintéticos aos microrganismos e o aumento dos tempos de incubação com o objetivo de monitorar a médio e longo prazo as alterações e fenômenos que possam ser decorrentes da ação microbiológica. Outra sugestão interessante seria testar outras culturas caracterizadas (conhecidas) ou isolar dos solos poluídos por estes resíduos sólidos uma gama muito maior de linhagens de fungos, bactérias e até leveduras para tentar encontrar outras espécies potencialmente degradadoras e talvez até utilizá-las em consórcio para o processo de biodegradação.

## VII- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGNELLI, J.A.M. "Introdução a Materiais Poliméricos". São Carlos, Universidade Federal de São Carlos (apostila do curso de aperfeiçoamento em Tecnologia de Polímeros – UFSCar), 2000.

ALBERTSSON, A. C. & HUANG, S.J. Degradable Polymers, Recycling, and Plastics Waste Management. New York (USA): Marcel Dekker Inc., 1995.

ALLEN, G. & BEVINGTON, J.C. Comprehensive Polymer Science, 1<sup>a</sup> ed, vol.1. Oxford: Pergamon Press plc, 1989.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS – ASTM. Standard Practice for Determining Resistance of Synthetic Polymeric Materials to Fungi, G21-90, 1990.

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 Test Method for determining the Anaerobic Biodegradation of Plastic Materials in the presence of Municipal Sewage Sludge, D 5210- 92, 1992.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS- ASTM. Standard Test Method for Aerobic Biodegradability of Degradable Plastics by Specific Microorganisms, D 5247-92, 1992.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS- ASTM. Standard Test Method for Flow Rates of Thermoplastics by Extrusion Plastometer, D 1238-94, 1995.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS- ASTM. Standard Test Method for Determining Inherent Viscosity of Poly (Ethylene Terephthalate) – PET, D 4603, 1996.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS- ASTM. Standard Test Method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution by Liquid Exclusion Chromatography (GEL Permeation Chromatography– GPC), D 3536-91, 1992.

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

BASSET, D. C. Principles of Polymer Morphology. Cambridge: Cambridge University Press, 1981.

- BLAKE, R. C., NORTON, W. N., HOWARD, G. T. Adherence and Growth of a *Bacillus* species on Insoluble Polyester Polyurethane. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 42: 63-73, 1998.
- BLANCHETTE, R. A. Degradation of Lignocellulose Complex in Wood. *Can. J. Bot.*, 73: 999-1010, 1995.
- CACCIARI, I., QUATRINI, P., ZIRLETTA, G., MINCIONE, E., VINCIGUERRA, V., LUPATTELLI, P., SERMANNI, G. G. Isotactic Polypropylene Biodegradation by a Microbial Community: Physicochemical Characterization of Metabolites Produced. *Applied and Environmental Microbiology*, 59 (11): 3695- 3700, 1993.
- CARVALHO, D. F., MARCHI, D. D., DURRANT, L. R. Production of Extracellular Surface-Active Compounds by Microorganisms Grown on Hydrocarbons. *In situ and On site Bioremediation*, 4: 91-96, 1997.
- CARVALHO, D. F., MARCHI, D. D., DURRANT, L. R. Surface Active Emulsifying Agents Produced by Microorganisms Isolated from Oil-Contaminated Soil. *Conference Proceedings of Environmental Strategies for the 21<sup>st</sup> Century* 564-569, 1998.
- CHANDRA, R. & RUSTGI, R. Biodegradable Polymers. *Prog. Polym. Sci.*, 23: 1273- 1335, 1998.

COLLINS, C. H., BRAGA, G.L., BONATO, P.S. Introdução a Métodos Cromatográficos. Campinas, São Paulo: Editora da UNICAMP, 1997.

DZIECIOL, M. & TRZESZCZYNSKI, J. Studies of Temperature Influence on Volatile Thermal Degradation Products of Poly (ethylene terephthalate). *Journal of Applied Polymer Science*, 69: 2377-2381, 1998.

FIECHTER, A. Biosurfactants: Moving Towards Industrial Application. *Trends in Food Science & Technology*, 3: 286-293, 1992.

GEORGIU, G., LIN, S. C., SHARMA, M. M. Surface- Active Compounds from Microorganisms. *Biotechnology*, 10: 60- 66, 1992.

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

GUMARGALIEVA, K. Z., ZAIKOV, G. E., SEMENOV, S. A, ZHDANOVA, O. A. The Influence of Biodegradation on the Loss of a Plasticiser from Poly (vinyl chloride). *Polymer Degradation and Stability*, 63: 111-112, 1999.

HARWELL, J. H., SABATINI, D. A., KNOX, R. C. Surfactants for Ground Water Remediation. *Colloids and Surfaces*, 151: 255-268, 1999.

- HATAKKA, A. Lignin-modifying Enzymes from Selected White-rot Fungi: Production and Role in Lignin Degradation. *FEMS Microbiol. Rev.*, 13: 125-135, 1994.
- HIGUCHI, T. Biodegradation Mechanism of Lignin by White-rot Basidiomycetes. *J. Biotechnol.*, 30: 1-8, 1993.
- HUMMEL, D. O. & SCHOLL, F. Atlas of Polymer and Plastics Analysis, 2<sup>a</sup> ed., 2 (b/I), Weinheim (Germany): VCH Publishers, 1988.
- KELEN, T. Polymer Degradation, 2<sup>a</sup> ed., New York (USA): Van Nostrand Reinhold Company Inc., 1983.
- KIM, M. N., LEE, A. R., YOON, J. S., CHIN, I. J. Biodegradation of poly (3-hydroxybutyrate), Sky-Green and Mater-Bi Fungi Isolated from Soils. *European Polymer Journal*, 36: 1677- 1685, 2000.
- KIRBAS, Z., KESKIN, N., GÜNER, A. Biodegradation of Polyvinyl chloride (PVC) by White Rot Fungi. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 63: 335-342, 1999.
- KROSCWITZ, J.I. Concise Encyclopedia of Polymer Science and Engineering, 2<sup>a</sup> ed., New York (USA): John Wiley & Sons Inc., 1990.

KUWAHARA, M., GLENN, J. K., MEREDITH, A. M., 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*. *FEBS Letters*, 169 (2): 247- 250, 1984.

LANG, E., NERUD, F., ZADRAZIL, F. Production of Ligninolytic Enzymes by *Pleurotus sp.* and *Dichomitus squalens* in Soil and Lignocellulose Substrate as Influenced by Soil Microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*, 167: 239- 244, 1998.

LEE, B., POMETTO, A. L., FRATZKE, A., BAILEY, T. B. Jr. Biodegradation of Degradable Plastic Polyethylene by *Phanerochaete* and *Streptomyces* species. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(3): 678&685, 1991.

LEONOWICZ, A., MATUSZEWSKA, A., LUTEREK, J., ZIEGENHAGEN, D., WASILEWSKA, M. W., CHO, N. S., HOFRICHTER, M., ROGALSKI, J. Review: Biodegradation of Lignin by White Rot Fungi. *Fungal Genetics and Biology*, 27: 175- 185, 1999.

LI, K., AZADI, P., COLLINS, R., TOLAN, J., KIM, J. S., ERIKSSON, K.E.L. Relationships between Activities of Xylanases and Xylan Structures. *Enzyme and Microbial Technology*, 27: 89-94, 2000.

- MACEDO, J. M. B., GOTTSCHALK, L. M. F., BON, E. P. S. Calcium Carbonate Mediates higher Lignin Peroxidase Activity in the Culture Supernatant of *Streptomyces Viridosporus* T7A. *Braz. J. Chem. Eng.*, 16 (2): 121- 131, 1999.
- MADIGAN, M. T., MARTINKO, J. M., PARKER, J. Brock Biology of Microorganisms, 9<sup>a</sup> ed. New Jersey (USA): Prentice Hall, Inc., 2000.
- MANUAL DE GERENCIAMENTO INTEGRADO - Município de São Paulo. Secretaria do Meio Ambiente. Volume 3: (2), 1996.
- MARK, H. F., BIKALES, N. M., OVERBERGER, C. G., MENGES, G. Encyclopedia of Polymer Science and Engineering, 2<sup>a</sup> ed., vol.4, New York (USA): John Wiley & Sons Inc., 1986.
- MILSTEIN, O., GERSONDE, R., HUTTERMANN, A., CHEN, M. J., MEISTER, J. J. Fungal Biodegradation of Lignopolystyrene Graft Copolymers *Applied and Environmental Microbiology*, 58 (10): 3225- 3232, 1992.
- MÜLLER, R. J., KLEEBERG, I., DECKWER, W. D. Biodegradation of polyesters containing aromatic constituents. *Journal of Biotechnology*, 86: 87-95, 2001.
- MUSTAFA, N. Plastics Waste Management: Disposal, Recycling and Reuse. New York (USA): Marcel Dekker Inc., 1993.

NAKAMIYA, K., SAKASITA, G., OOI, T., KINOSHITA, S. Enzymatic Degradation of Polystyrene by Hydroquinone Peroxidase of *Azotobacter beijerinckii* HM 121. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 84 (5): 480-482, 1997.

ONODERA, K. Y., MUKUMOTO, H., KATSUYAYA, Y., SAIGANJI, A., TANI, Y. Degradation of Polyethylene by a Fungus, *Penicillium simplicissimum* YK. *Polymer Degradation and Stability*, 72: 323-327, 2001.

OTAKE, Y., KOBAYASHI, T., ASABE, H., MURAKAMI, N., ONO, K. Biodegradation of Low-Density Polyethylene, Polystyrene, Polyvinyl Chloride, and Urea Formaldehyde Resin Buried Under Soil for over 32 Years. *Journal Applied Polymer Science*, 56: 1789-1796, 1995.

PENG, X. & SHEN, J. Preparation and Biodegradability of Polystyrene having Pyridinium Group in the Main Chain. *European Polymer Journal*, 35: 1599-1605, 1999.

PHUA, A. K., CASTILLO, E., ANDERSON, J. M., HILTNER, A. Biodegradation of a Polyurethane *in vitro*. *J. Biomed. Mat. Res.*, 21: 231-246, 1987.

RABELLO, M. S. Aditivos de Polímeros. São Paulo: Artliber Editora, 2000.

RATNER, B. D., GLADHILL, K. W., HORBETT, T. A. Analysis of *in vitro* Enzymatic and Oxidative Degradation of Polyurethanes. *J. Biomed. Mater. Res.*, 22: 509-527, 1988.

ROUSE, J. D., SABATINI, D. A., SUFLITA, J. M., HARWELL, J. H. Influence of Surfactants on Microbial Degradation of Organic Compounds. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.*, 24 (4): 325-370, 1994.

SANTERRE, J. P., LABOW, R. S., ADAMS, G. A. Enzyme-biomaterial Interactions: Effect of Biosystems on Degradations of Polyurethanes. *J. Biomed. Mat. Res.*, 27: 97-109, 1993.

SÁ-PEREIRA, P., DUARTE, J., COSTA-FERREIRA, M. Electroelution as a Simple and Fast Protein Purification Method: Isolation of an Extracellular Xylanase from *Bacillus sp.* CCMI 966. *Enzyme and Microbial Technology*, 27: 95-99, 2000.

SCHNABEL, W. Polymer Degradation: Principles and Practical Applications. New York (USA): Macmillan Publishing Co. Inc., 1981.

SCOTT, G. & GILEAD, D. Degradable Polymers. London: Chapman & Hall, 1995.

SEYMOUR, R. B. & CARRAHER, C. E. Jr. Polymer chemistry: An introduction, 2<sup>a</sup> ed., vol.8, New York (USA): Marcel Dekker Inc., 1987.

SHIN, S-M., YOSHIOKA, T., OKUWAKI, A. Dehydrochlorination Behavior of Flexible PVC Pellets in NaOH Solutions at Elevated Temperature. *Journal of Applied Polymer Science*, 67: 2171-2177, 1998.

SMITH, R., WILLIAMS, D. F., OLIVER, C. The Biodegradation of Poly (ether urethanes). *J. Biomed. Mater. Res.*, 21: 1149-1166, 1987.

SRINIVASAN, C., SOUZA, T. M. D., BOOMINATHAN, K. & REDDY, C. A. Demonstration of Laccase in the White-rot Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* BKM-F1767. *Applied and Environmental Microbiology*, 61 (12): 4274-4277, 1995.

SZKLARZ, G. D., ANTIBUS, R. K., SINSABAUGH, R. L., LINKINS, A. E. Production of Phenol Oxidases and Peroxidases by Wood-Rotting Fungi. *Mycologia*, 81(2): 234- 240, 1989.

TIEN, M. & KIRK, T. K. Lignin- Degrading Enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: Purification, Characterization, and Catalytic Properties of a Unique H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- requiring Oxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 2280-2284, 1984.

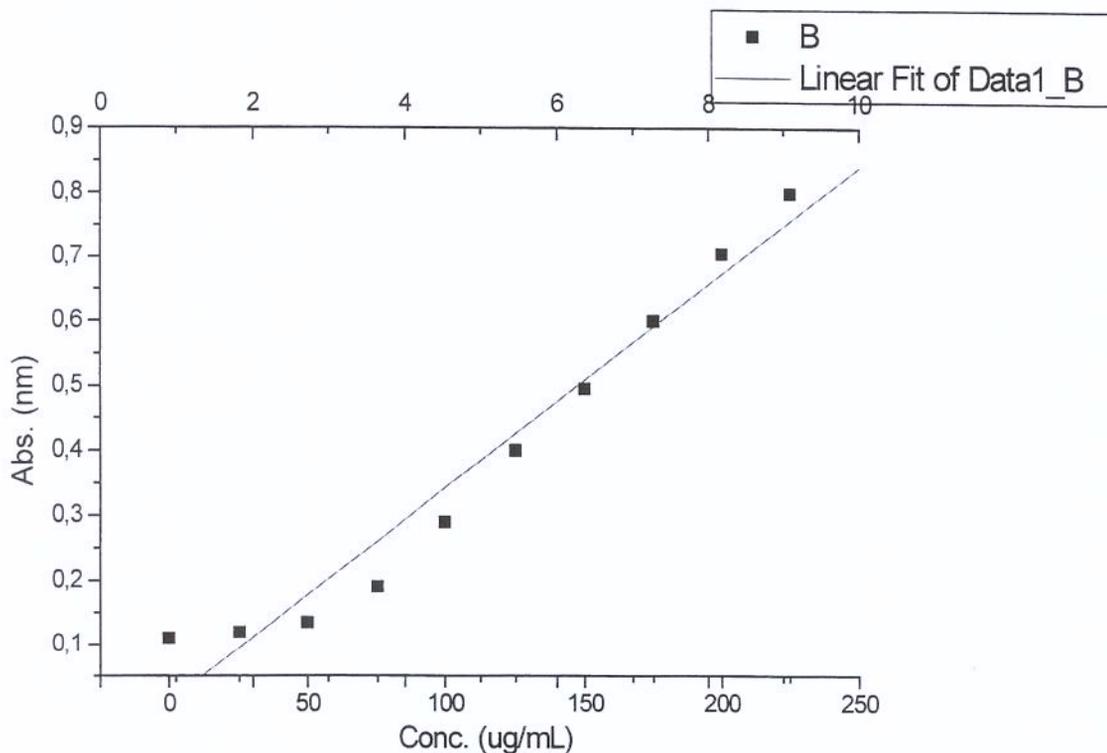
TUOMELA, M., VIKMAN, M., HATAKKA, A., ITÄVAARA, M. Biodegradation of Lignin in a compost environment: a review. *Bioresource Technology*, 72, 169-183, 2000.

VAN DYKE, M. I., LEE, H., TREVORS, J. T. Applications of microbial surfactants.  
*Biotechnology Advances*, 9 (2): 241- 252, 1991.

WOOD, T. M. *Methods in Enzymology*, vol. 160. New York (USA): Academic  
Press, Inc., 1988.

## VIII) ANEXOS

### I - Curva Padrão da glicose

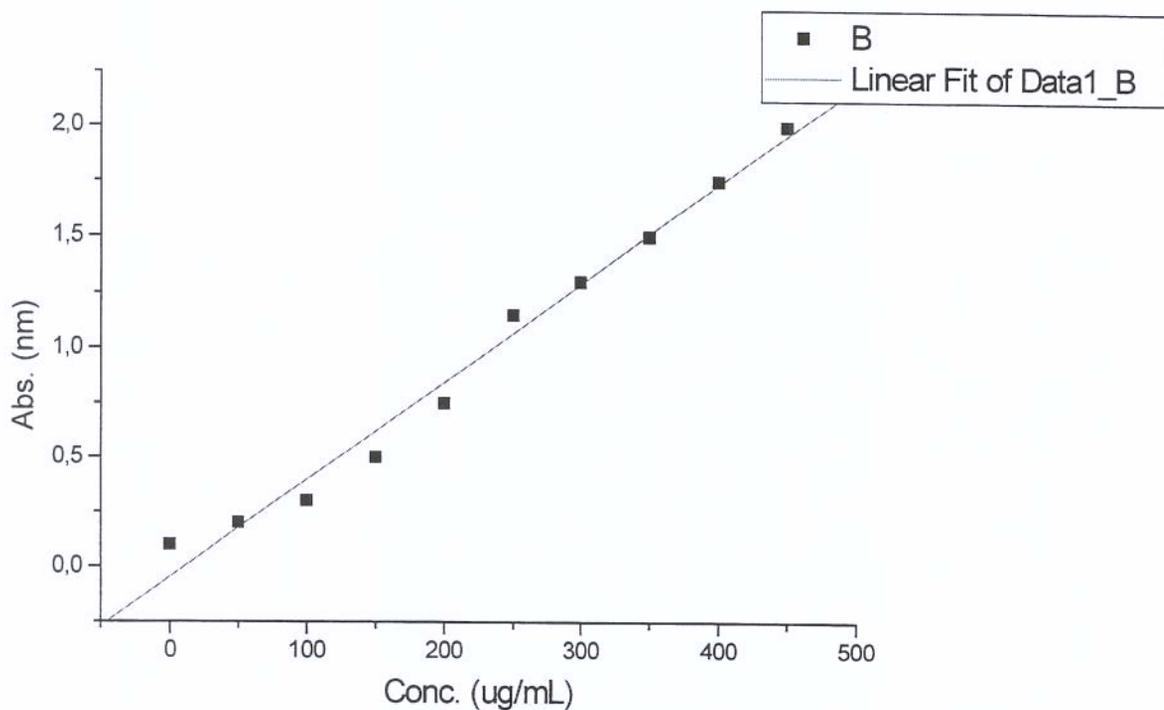


Linear Regression for Data1\_B:

$$Y = A + B * X$$

Parameter	Value	Error		
A	0,01209	0,03189		
B	0,00331	2,38912E-4		
R	SD	N	P	
0,97979	0,05425	10	<0.0001	

## II – Curva Padrão de Xilose



Linear Regression for Data1\_B:  
 $Y = A + B * X$

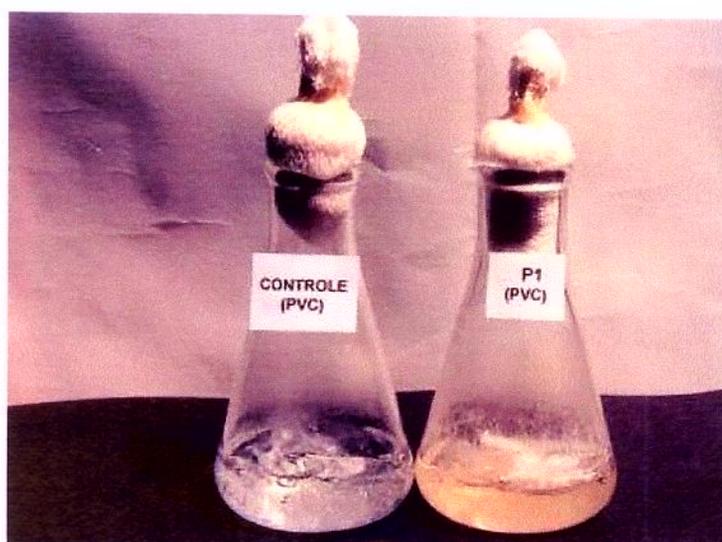
Parameter	Value	Error		
A	-0,04727	0,05283		
B	0,00445	1,97923E-4		
R	SD	N	P	
0,9922	0,08989	10	<0.0001	

### III- Fotos de experimentos com PVC

(a)

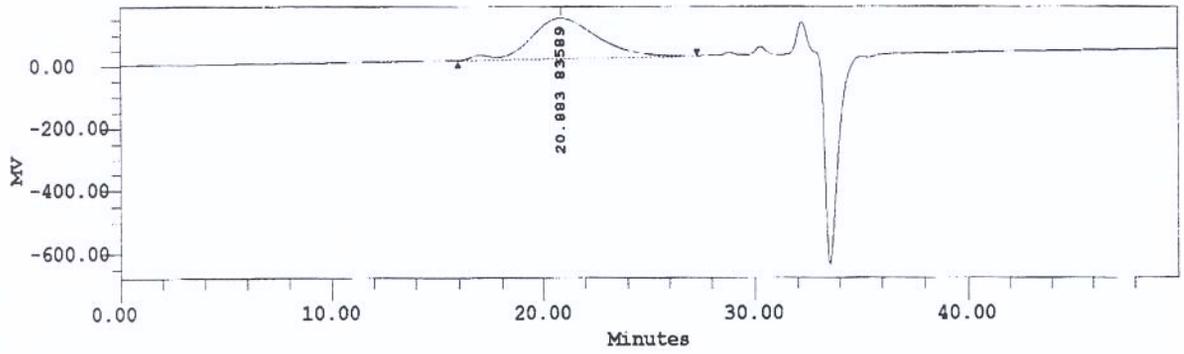


(b)

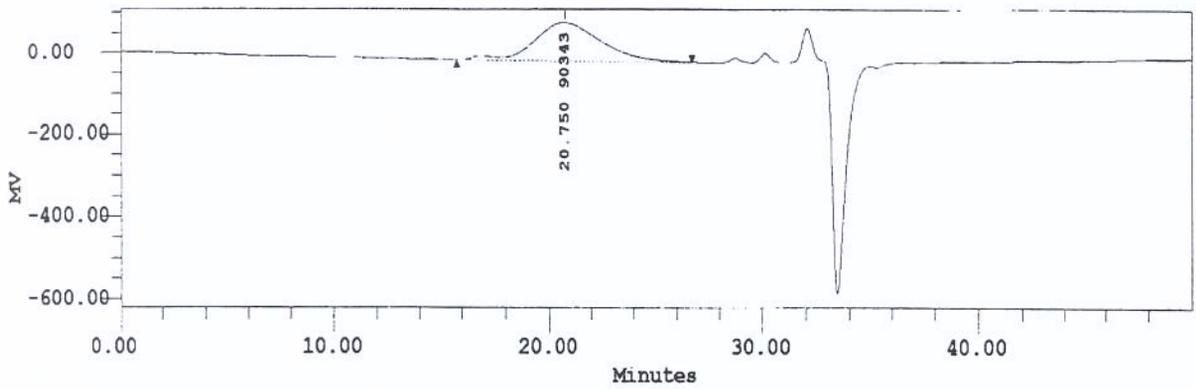


Legenda. Visualização do amarelecimento do meio de cultura e do PVC, decorrente do processo de desidrocloração, quando incubado com: (a) *Pleurotus* 001 ; (b) *Pleurotus* sp. (P1).

#### IV- Cromatogramas do PVC

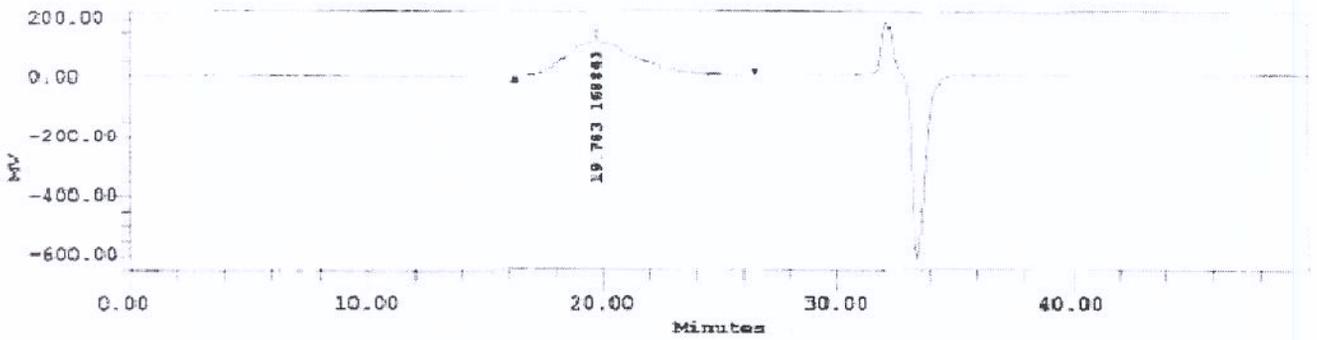


Legenda: PVC controle

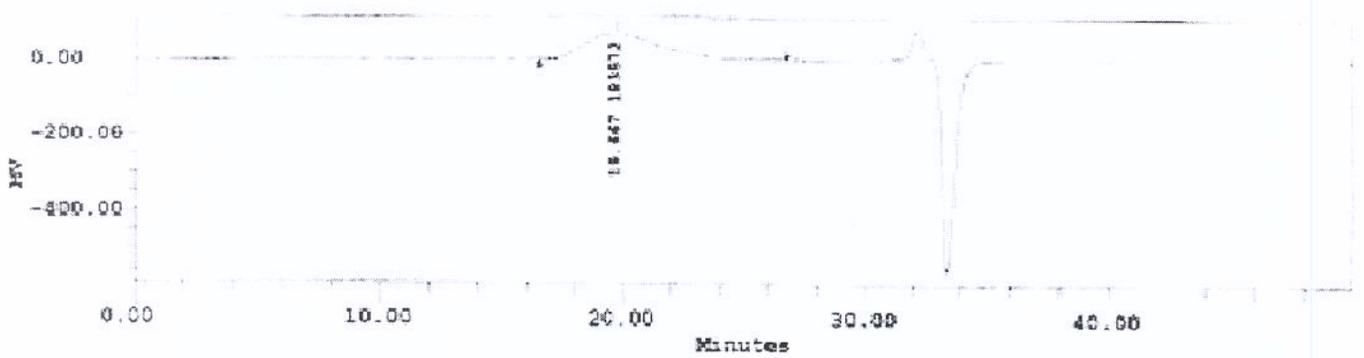


Legenda: PVC após incubação com *Pleurotus 001*.

## V- Cromatogramas do PS



Legenda: PS controle.



Legenda: PS após incubação com *Pleurotus* 98/37.

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL  
SEÇÃO CIRCULANTE