



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de São José do Rio Preto

FERNANDO NOGUEIRA BARBOSA

**Avaliação da degradação de tinta imobiliária e de seus
componentes por fungos mesofílicos**

**São José do Rio Preto - SP
Novembro/2014**

FERNANDO NOGUEIRA BARBOSA

**Avaliação da degradação de tinta imobiliária e de seus
componentes por fungos mesofílicos**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Área de Concentração – Microbiologia ambiental, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto, SP, Brasil.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Eleni Gomes

São José do Rio Preto - SP
Novembro/2014

Barbosa, Fernando Nogueira.

Avaliação da degradação de tinta imobiliária e de seus componentes por fungos mesofílicos / Fernando Nogueira Barbosa. -- São José do Rio Preto, 2014
97 f. : il., tabs.

Orientador: Eleni Gomes

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Microbiologia. 2. Ecologia microbiana. 3. Fungos filamentosos. 4. Tintas - Deterioração. 5. Cromatografia líquida de alta eficiência. I. Gomes, Eleni. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 576.8.095.1

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

FERNANDO NOGUEIRA BARBOSA

**Avaliação da degradação de tinta imobiliária e de seus
componentes por fungos mesofílicos**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Área de Concentração – Microbiologia ambiental, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto, SP, Brasil.

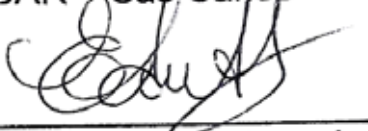
Comissão Examinadora



Prof^a. Dr^a. Eleni Gomes
UNESP- São José do Rio Preto
Orientadora



Prof^a Dr^a Cristina Paiva de Sousa
UFSCAR – São Carlos



Prof^o Dr. Eduardo Alves de Almeida
UNESP- São José do Rio Preto

São José do Rio Preto
27 de Novembro de 2014

AGRADECIMENTOS

Durante todo o período do mestrado, tive o privilégio de aprender muito. Um dos maiores pontos deste aprendizado foi perceber que o trabalho acadêmico e a pesquisa não são construídos por uma única mão. Pois bem, gostaria de deixar aqui os meus sinceros agradecimentos aos meus "alicerces" que constituíram a construção dessa pesquisa.

Agradeço a Deus por ter me concedido a oportunidade de concluir mais essa etapa da minha vida e por ter me amparado nos momentos mais difíceis.

Agradeço a Prof^a Dr. Eleni Gomes pela orientação, paciência e confiança em meu trabalho.

A Tássia, agradeço por ter me ensinado boa parte de tudo que sei, pelo amparado nos momentos difíceis da pesquisa, ao carinho e acima de tudo a amizade sincera e verdadeira que construímos ao longo desses dois anos. Tássia, você sempre foi e sempre será o meu espelho.

Aos meus companheiros, amigos e irmãos, Bruna Perissini, Érik, Isabel, Isabela e George que sempre me ajudaram quando precisei. Vocês sempre foram meus amigos que eu pude contar em todos os momentos dessa jornada.

Aos companheiros de laboratório, Diego, Josiane, Pedro, Gisele, Ariane, Priscila, Sidney, Angélica, Carolina, Débora, Janaína, Rafaela, Bruna Lima, Olavo, Cecília, Christiane, Guillermo, Tatiana, pelo carinho e ajuda nas horas de trabalho.

Ao Prof. Dr. André Rodrigues e o Tássio Brito de Oliveira, da Unesp de Rio Claro pela ajuda na parte de identificação taxonômica e molecular dos fungos deste trabalho.

A Nossa Técnica Daniela Correa e o Prof. Maurício Boscolo pela ajuda com as análises e com os equipamentos HPLC, GC/MS, GC-FID.

A minha linda família pelo amor, incentivo e apoio para concretizar mais esse sonho.

A FAPESP, pela concessão da bolsa de estudos.

Muito Obrigado!

RESUMO

As tintas imobiliárias compreendem misturas de materiais orgânicos e inorgânicos formando uma mistura líquida, viscosa e homogênea e, devido à variedade de compostos utilizados em sua fabricação, as tintas são susceptíveis a contaminação por microrganismos, tanto nas fases de produção e armazenamento, como após aplicação. Os fungos e as bactérias podem crescer nas tintas provocando a deterioração das mesmas e prejuízos ao fabricante e consumidores. Desta forma, o presente trabalho consistiu no isolamento e identificação de fungos filamentosos a partir de amostras de tintas deterioradas e de efluentes da indústria de produção, além de avaliar o potencial dos mesmos em crescer em presença da tinta e nos seus componentes quando adicionados ao meios de cultura. Foram isolados 32 linhagens de fungos, os quais foram identificados como pertencentes a 10 gêneros distintos. Esses fungos foram cultivados meio de cultura, em placas de Petri, acrescido de: 1) Tinta, 2) Resina (metilmetacrilato), 3) Carbendazim (fungicida), 4) metil isotiazolinona (MIT) (bactericida), 5) Atrazina (algicida). Os fungos que apresentaram os maiores crescimentos em presença desses compostos foram selecionados para teste de degradação em meio de cultivo submerso. Os fungos *Aspergillus niger* FB14, *Trichoderma longibrachiatum* FB01, *Fusarium solani* FB07, selecionados para os testes de degradação do MIT, foram capazes de degradar esse composto em 24 h. Os Fungos *Syncephalastrum racemosum* FB24 e *Fusarium solani* FB19 foram os únicos capazes de crescer na presença de carbendazim no teste de placa e em cultivo submerso, sendo estes capazes de degradar 56% do carbendazim em 7 dias. Os fungos que cresceram na presença da resina em placa de Petri não apresentaram potencial de degradação desse composto em meio submerso. Esses dados confirmaram que o crescimento dos fungos nas tintas é sustentado pelos componentes da mesma o que leva a degradação do material. Dentro dos resultados obtidos, destaca-se a capacidade de espécies fúngicas em degradar os compostos bactericida e fungicida.

Palavras-chave: Fungo. Tinta. HPLC. Degradação. Isolamento.

ABSTRACT

*The paints are mixtures of organic and inorganic materials, forming a viscous and homogeneous liquid. Due to the variety of compounds used in their manufacture, these materials are susceptible to contamination by microorganisms during the production process, storage and after application. Fungi and bacteria that are able to grow in paint cause the deterioration of the product and losses for manufacturer and consumer. The present work aimed to isolate and identify filamentous fungi from deteriorated paint and industry effluents samples, to evaluate the potential of them to grow in the presence of the paint and its components, when added to the medium culture. It was isolated 32 fungi strains, which were identified belonging to 10 different genera. These fungi were cultured on medium which were added: 1) paint, 2) Resin (methylmethacrylate), 3) carbendazim (fungicide), 4) Methyl isothiazolinone (MIT) (bactericidal), 5) Atrazine (algicide). The fungi that grew in the presence of these compounds were selected for degradation test in submerged cultivation. The fungi *Aspergillus niger* FB14, *Trichoderma longibrachiatum* FB01 and *Fusarium solani* FB07, selected for degradation MIT tests, were able to degrade this compound in 24 h. *Syncephalastrum racemosum* FB19 and *Fusarium solani* FB24 that were able to grow in the presence of carbendazim in solid medium, were able to degrade of 56% of the carbendazim, in 7 days, in submerged culture. The fungi that had grown in presence of the resin in solid medium, were not able to degrade this compound when in submerge cultivation. These data confirmed the growth of fungi in the paint is supported by its components which leads to degradation of the material. Within the results, it is highlight the ability of fungal species to degrade bactericidal and antifungal compounds.*

Keywords: *Fungus. Paints. HPLC. Degradation. Isolation*

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Produção de tintas por segmento.....	2
Figura 2. Reação química para a obtenção do ácido acrílico.....	7
Figura 3. Polímeros acrílicos empregados como resinas.....	8
Figura 4. Estrutura química dos biocidas derivados de 3(2H)-isotiazolinona ...	11
Figura 5. Estrutura química do carbendazim.....	11
Figura 6. Estrutura química da atrazina	13
Figura 7. Principais componentes das tintas imobiliárias	13
Figura 8. Esquema geral de Microcultivo em Lâmina.....	22
Figura 9. Preparo das placas para o teste de avaliação do crescimento/inibição e utilização da tinta e seus componentes como fonte de carbono	25
Figura 10. – Distribuição dos fungos isolados por gênero de amostras de tinta, de seus componentes e do resíduo do processo produtivo das tintas.	31
Figura 11. Frequência de isolamento de fungos das amostras/locais da fábrica de tinta	32
Figura 12. Teste de crescimento/inibição com fungo o <i>Fusarium solani</i> FB23 em diferentes concentrações de tinta.....	37
Figura 13. Teste de crescimento/inibição com o fungo <i>T. longibrachiatum</i> (FB01), em diferentes concentrações na presença de resina	39
Figura 14. Teste de crescimento/inibição com o fungo <i>Paecilomyces saturatus</i> (FB30) em diferentes concentrações na presença de metil isotiazolinona.....	42
Figura 15. Teste de crescimento/inibição do <i>fungo F. solani</i> (FB19) em diferentes concentrações de carbendazim.....	42
Figura 16. Teste de crescimento/inibição com adição de atrazina e formação de halo	46
Figura 17. Perfil cromatográfico da solução padrão de MIT. a) cromatograma do padrão analítico de MIT de 10ppm; b) meio de cultura acrescido de 10ppm de padrão de MIT	48
Figura 18. Perfis cromatográficos do MIT após o cultivo dos fungos por 48 horas (a, b, c) e do controle abiótico (d).....	49

Figura 19. Perfis de crescimento dos fungos e degradação do MIT: (a) <i>T.longibrachiatum</i> . FB01; (b) <i>F.solani</i> FB07; (c) <i>A. niger</i> . FB14.....	50
Figura 20. Overlay dos cromatogramas de amostras de dos meios de cultivo dos fungos <i>T. longibrachiatum</i> FB01, <i>F. solani</i> FB07 e meio de cultura no tempo zero de fermentação.....	51
Figura 21. Crescimento fúngico em meio líquido na presença de MIT.....	53
Figura 22. pH das amostras de cultivo em meio líquido.....	54
Figura 23. Crescimento fúngico em meio líquido na presença de MIT a) <i>T. longibrachiatum</i> (FB01), b) <i>F. solani</i> (FB07), c) <i>A. niger</i> (FB014)..	56
Figura 24. Metabólitos identificados por GC-MS após a degradação do MIT ..	57
Figura 25. Perfil cromatográfico do carbendazim e do 2-AB. a).....	59
Figura 26. Crescimento dos fungos na presença de carbendazim. a) <i>S. racemosum</i> , b) <i>F. solani</i> FB19.	60
Figura 27. Perfis cromatográficos do carbendazim após o cultivo dos fungos.	61
Figura 28. Produção do metabólito 2-AB a partir da degradação do carbendazim pelos fungos <i>S. racemosum</i> FB24 e <i>F. solani</i> FB19.....	62
Figura 29. Proposta de rota metabólica de degradação do carbendazim pela cepa de <i>R. jialingiae jialingiae</i> djl-6-2	63
Figura 30. Espectro de massas de solução padrão de carbendazim e 2-AB... ..	64
Figura 31. Perfil cromatográfico da solução padrão de MMA em GC-FID..	66
Figura 32. Cultivo submerso dos fungos na presença de MMA..	67
Figura 33. Perfil cromatográfico do efluente da tinta.....	69

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Resultados da identificação molecular e filogenética dos fungos isolados	33
Tabela 2. Perfil de crescimento/inibição dos isolados na presença de tinta....	37
Tabela 3. Perfil de crescimento/inibição dos isolados na presença de resina. .	39
Tabela 4. Perfil de crescimento/inibição dos isolados na presença de metil isotiazolinona.....	41
Tabela 5. Perfil de crescimento/inibição dos isolados na presença carbendazim	44
Tabela 6. Perfil de crescimento/inibição dos isolados na presença atrazina	45
Tabela 7. Fungos selecionados para o teste de biodegradação em meio líquido	47
Tabela 8. Caracterização do efluente da fábrica de tintas	69

LISTA DE ABREVIATURAS

MIT	Metil isotiazolinona
MBC	Carbendazim
MMA	Metilmetacrilato
2-AB	2-aminobenzimidazol
HPLC	Cromatografia Líquida de alta eficiência (do inglês - <i>High-performance liquid chromatography</i>)
GC	Cromatografia em fase gasosa (do inglês - <i>Gas Chromatography</i>)
GC-FID	Cromatografia em fase gasosa com detector de ionização de chama (do inglês – <i>Gas Chromatography with Flame Ionization Detector</i>)
pppm	Parte por milhão.
Split	injeção cromatográfica com divisão de fluxo.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
2.1. TINTAS NO BRASIL	2
2.2. COMPOSIÇÃO DAS TINTAS	4
2.3. PIGMENTOS	5
2.4. RESINAS	6
2.5. SOLVENTES	8
2.6. ADITIVOS	9
2.7. GERAÇÃO DE RESÍDUOS PELA INDÚSTRIA DE TINTAS	14
2.8. BIODEGRADAÇÃO FÚNGICA DOS COMPONENTES DAS TINTAS IMOBILIÁRIAS	16
3. OBJETIVOS	18
3.1. OBJETIVOS GERAIS	18
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
4. MATERIAIS E MÉTODOS	19
4.1. MEIO DE CULTURA.....	19
4.1.1. MEIO SÓLIDO PARA O ISOLAMENTO DAS LINHAGENS FÚNGICAS.....	19
4.1.2. MEIOS PARA OBTENÇÃO, MANUTENÇÃO E ARMAZENAMENTO DAS CULTURAS MONOSPÓRICAS	19
4.1.3. MEIO LÍQUIDO PARA CULTIVO SUBMERSO	19
4.2. COLETA DAS AMOSTRAS PARA ISOLAMENTO DOS FUNGOS.....	20
4.3. ISOLAMENTO, PURIFICAÇÃO E ESTOCAGEM DOS FUNGOS.....	20
4.4. IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS	21
4.5. IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS POR TÉCNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR.....	23
4.6. AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO/INIBIÇÃO DOS ISOLADOS NA PRESENÇA DA TINTA E DE SEUS COMPONENTES EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES	24
4.7. CULTIVO EM MEIO LÍQUIDO	25

4.8. AVALIAÇÃO DA DEGRADAÇÃO DOS COMPONENTES DA TINTA POR MÉTODOS ANALÍTICOS	26
4.9. USO DE EFLUENTES GERADOS DURANTE O PROCESSO DE PRODUÇÃO DAS TINTAS COMO MEIO DE CULTIVO DOS FUNGOS.....	28
4.10. UTILIZAÇÃO DOS FUNGOS COMO INÓCULO NO TRATAMENTO DOS RESÍDUOS.....	29
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
5.1. ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS	31
5.2. AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO/INIBIÇÃO DOS ISOLADOS NA PRESENÇA DA TINTA E DE SEUS COMPONENTES.	36
5.2.1. TESTE DE CRESCIMENTO/INIBIÇÃO COM MEIO DE CULTURA ACRESCIDO DE TINTA.....	36
5.2.2. TESTE DE CRESCIMENTO/INIBIÇÃO COM MEIO DE CULTURA ACRESCIDO DE RESINA (metil metacrilato).	38
5.2.3. TESTE DE CRESCIMENTO/INIBIÇÃO COM MEIO DE CULTURA ACRESCIDO DO BIOCIDA METIL ISOTIAZOLINONA (MIT).	40
5.2.4. TESTE DE CRESCIMENTO/INIBIÇÃO COM MEIO DE CULTURA ACRESCIDO DO BIOCIDA CARBENDAZIM.	42
5.2.5. TESTE DE CRESCIMENTO/INIBIÇÃO COM MEIO DE CULTURA ACRESCIDO DE ATRAZINA.	44
5.3. BIODEGRADAÇÃO DOS COMPONENTES DA TINTAS EM MEIO LÍQUIDO.....	46
5.4. BIODEGRADAÇÃO DO METIL ISOTIAZOLINONA (MIT) EM MEIO LÍQUIDO.....	47
5.5. BIODEGRADAÇÃO DO CARBENDAZIM EM MEIO LÍQUIDO.....	59
5.6. BIODEGRADAÇÃO DO METIL METACRILATO (MMA) EM MEIO LÍQUIDO.....	65
5.7. UTILIZAÇÃO DOS FUNGOS COMO INÓCULO NO TRATAMENTO DOS RESÍDUOS.....	68
6. CONCLUSÕES	71
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72

1. INTRODUÇÃO

A indústria de tintas imobiliárias do Brasil vem crescendo a cada ano em virtude do aumento do setor de construção civil, sendo o nosso país o quinto maior produtor mundial de tintas. De acordo com a Associação Brasileira dos Fabricantes de tintas (ABRAFATI), em 2013 esse setor atingiu um faturamento de cerca de US\$ 4,18 bilhões, com produção aproximada de 1,42 bilhão de litros, sendo o segmento de tintas imobiliárias representando 80% desse total.

De modo geral, as tintas são utilizadas como material de acabamento, sendo aplicadas às superfícies (metal, madeira, paredes). Além da função decorativa e de acabamento estético, tem função protetora das superfícies e materiais por promover a vedação, evitando a ação direta da umidade, corrosão e de altas temperaturas.

As tintas à base de água são constituídas principalmente por resinas, pigmentos, solventes e aditivos, formando uma mistura homogênea e, devido a diversidade de sua composição, as tintas, são susceptíveis à contaminação e deterioração microbianas, nas fases de produção, armazenamento ou depois de aplicadas. Embora fungos e bactérias tenham sido identificados na contaminação das tintas, os fungos filamentosos, tem sido mais frequentes nesses materiais. Esse crescimento fúngico tem trazido prejuízos as indústrias produtoras e aos consumidores.

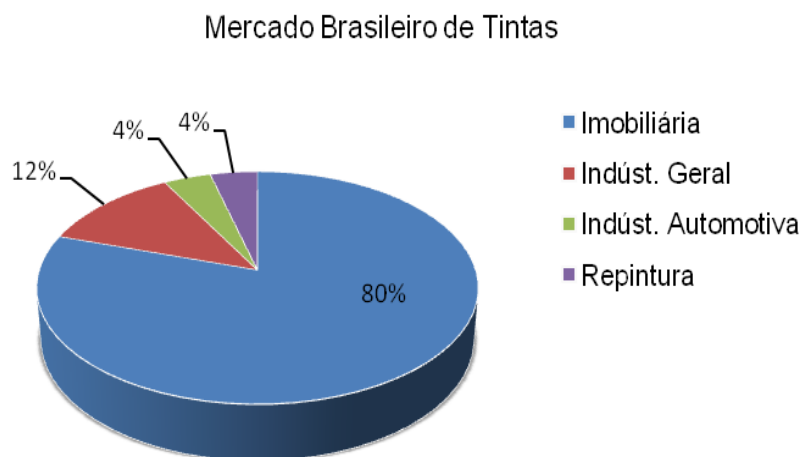
Além das tintas, os resíduos de sua produção, que supostamente contém todos os componentes do produto pronto, representam um risco do ponto de vista ambiental. Como alternativa aos tratamentos químicos dos resíduos, a biodegradação microbiana pode ser utilizada como agente biorremediador ou preventivo da poluição ambiental. Entretanto, é necessário conhecer, além da tolerância desse organismos aos diferentes componentes das tintas, a capacidade de degradação dos mesmos. Desta forma, o presente trabalho teve como objetivos o isolamento e identificação de fungos mesofílicos presentes em tintas deterioradas e nos resíduos da indústria produtora, assim como estudar suas capacidades de degradar os compostos constituintes de tintas imobiliária a base de água.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. TINTAS NO BRASIL

Com uma ampla diversidade de aplicação, as tintas podem ser direcionadas às indústrias automotiva, alimentícia, naval e moveleira, à construção civil e outras áreas, constituindo um produto industrial de enorme aplicabilidade no mundo moderno (ANGHINETTI; JUNIOR, 2012). No país, existem centenas de fabricantes de tintas de grande, médio e pequeno porte, empregando 19,4 mil trabalhadores de forma direta (ABRAFATI, 2012). O segmento de tintas imobiliárias é o mais conhecido, representando 80% do volume total de produção e 63% do faturamento do setor no país (Figura 1). Tal porcentagem corresponde à produção de 1.119 milhões de litros e 2.728 milhões de dólares de faturamento (ABRAFATI, 2013).

Figura 1. Produção de tintas por segmento



Fonte: Adaptado de ABRAFATI, (2013)

As tintas imobiliárias compreendem misturas de materiais orgânicos e inorgânicos como resina, pigmentos, solventes e aditivos, formando uma mistura líquida, viscosa e estável (LA ROSA, 2008). Devido à variedade de compostos em sua fabricação, as tintas quando expostas a microrganismos,

são susceptíveis à contaminação, tanto na fase de produção e armazenamento, como após sua aplicação (FAZENDA, 2008).

A exposição a alguns fatores, como altas temperaturas e umidade, também podem facilitar o ataque microbiano às tintas (LUCCHESI, 2003), mas, geralmente, a contaminação é proveniente de matérias-primas como água, resina, ou de equipamentos como tanques e tubulações quando não higienizados de maneira adequada (FAZENDA, 2009). O crescimento microbiano nas tintas pode provocar alterações em suas características tais como, perda da viscosidade, precipitação dos pigmentos, alteração do pH e coloração, mau cheiro, produção de gás e até mesmo a deformação de embalagens, tornando o produto impróprio para o comércio (DEY et al., 2004).

A biodeterioração de tintas é freqüentemente descrita na literatura (ARQUIAGA et al., 1995; DORNIEDEN et al., 2000; OBIDI et al., 2009) visto que as tintas contém componentes, como as resinas, que podem servir como fonte de carbono e energia para fungos e bactérias (DEUTSCH, CANABRAVA, 1993; KAIRALLA, 1993), caracterizando o processo como biodeterioração bioquímica assimilatória (KUMAR e KUMAR, 1999).

Os fungos e as bactérias podem biodegradar componentes das tintas por meio de ataque direto para obtenção de carbono ou outros nutrientes e subsequente assimilação. Esse ataque pode chegar a mineralização do composto ou apenas a um determinado nível de degradação. Podem também apenas biotransformar o composto sem chegar a níveis consideráveis de degradação ou até mesmo aumentar a complexidade da substância por ataque enzimático direto ou indireto (co-metabolismo).

O co-metabolismo é um processo no qual o microrganismo se desenvolve utilizando um composto principal como fonte de carbono, porém, secreta enzimas que, por reação cruzada, modificam a estrutura química de um composto presente no meio, sem, contudo utilizá-lo como fonte de carbono ou nutriente. No processo de mineralização, uma molécula complexa é degradada à CO₂, água e sais inorgânicos, que podem ser assimilados pelo microrganismo (ALEXANDER, 1996).

Segundo Ciferri et al. (1999), as bactérias são os principais agentes responsáveis pela deterioração e modificação das características das tintas embaladas, sendo estas identificadas e descritas na literatura como

pertencentes aos gêneros *Pseudomonas* sp., *Flavobacterium* sp., *Bacillus* sp. e *Escherichia* sp. Estes gêneros de bactérias possuem capacidade de crescer e se desenvolver em pH alcalino (7 a 8) produzindo compostos intermediários que diminuem o pH da tinta, favorecendo o desenvolvimento de outros microrganismos (PRESCOTT et al., 2002).

Os fungos também têm sido isolados de tintas embaladas, no entanto, estão mais associados com biodegradação das tintas após sua aplicação em paredes, sendo muitas vezes detectados como manchas escuras decorrentes da produção de pigmentos ou esporos. Os fungos mesofílicos isolados a partir de fragmentos de tinta retirados de paredes têm sido identificados como *Aspergillus versicolor*, *A. niger*, *Cladosporium herbarum*, *Penicillium aurantiogriseum*, *P. chrysogenum*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Rhodotorula mucilaginosa* (CAPPITELLI et al., 2007).

A biodeterioração de tintas por fungos e bactérias gera grandes prejuízos econômicos aos fabricantes, consumidores, além dos problemas de saúde como pneumonias e alergias resultantes dos esporos que crescem nas tintas aplicadas às paredes (ARQUIAGA et al., 1995; DORNIEDEN et al., 2000). De acordo com Obidi et al. (2009) e Adeleye e Adeleye (1999), a maioria dos fungos isolados de paredes residenciais pertence ao gênero *Aspergillus* sp., sendo espécie como *A. flavus* e *A. japonicum* a causadoras da aspergilose que afeta os pulmões e podem causar micoses sistêmicas.

2.2. COMPOSIÇÃO DAS TINTAS

Segundo Fazenda (1993), tinta é uma mistura líquida, geralmente viscosa, constituída de um ou mais pigmentos dispersos em um aglomerante líquido que, quando aplicadas em uma camada fina sobre uma superfície apropriada, após a secagem forma um filme opaco e aderente ao substrato que protege e impermeabiliza.

Com base em Gentil et al. (2003), todas as tintas são compostas basicamente por 4 elementos principais: pigmentos, resina, solvente e aditivos. Esses componentes são descritos a seguir.

2.3. PIGMENTOS

Um dos principais constituintes das tintas imobiliárias são os pigmentos, que são utilizados com finalidade de conferir cor, opacidade, consistência e durabilidade, protegendo os elementos estruturais contra os raios solares, absorvendo seletivamente algumas faixas do espectro eletromagnético e refletindo outras, prolongando a vida útil das tintas, além de promover à estética e luminosidade (CNECCO, 1993).

Os pigmentos, orgânicos ou inorgânicos, apresentam-se como partículas sólidas em um pó fino, totalmente insolúvel no veículo no qual permanecem em suspensão (FAZENDA, 2009). Os pigmentos orgânicos (ftalocianinas verde e azul, pirilenos vermelhos) possuem maior facilidade de desbotamento quando expostos aos raios solares. Seu preço é mais alto quando comparados os pigmentos inorgânicos, pois apresentam alto poder de coloração. Os pigmentos inorgânicos são classificados como ativos e inertes. Os inertes (carbonato de cálcio, talco) são responsáveis pelo enchimento, textura e resistência à abrasão e os ativos promovem a cor. Um dos pigmentos ativos mais empregados é o dióxido de titânio (TiO_2), pois é capaz de melhorar a qualidade da tinta, garantindo maior poder de cobertura, alvura, durabilidade, brilho e opacidade (ABRAFATI, 2012; UEMOTO, 2005; SINDUSCON, 2010).

A produção mundial de dióxido de titânio está em torno de 2,5 milhões de toneladas por ano, sendo utilizado em tintas imobiliárias, industriais de impressão, plástico, borrachas, papéis alimentícios, dentre outras (ANGHINETTI, 2012).

Existem também os pigmentos conhecidos como cargas. Esses são minerais que possuem características adequadas de brancura e granulometria, proporcionam volume, maior poder de cobertura, resistência às intempéries, elasticidade, impermeabilidade e propriedades isolantes (térmicas, acústicas, antiderrapantes e resistentes ao fogo), além de diminuir custos de fabricação da tinta. Tais pigmentos são: sílica e silicatos, argila, óxido de zinco, talco e carbonato de cálcio (LIMA, et al., 2012).

Os pigmentos são muitas vezes confundidos com os corantes. Estes últimos são compostos geralmente solúveis em água e são utilizados para conferir cor a um determinado produto ou superfície. Os corantes fixam-se na

superfície que vão colorir por adsorção ou ligações iônicas e covalentes, enquanto os pigmentos são dispersos no meio (tinta), formando uma dispersão relativamente estável. Os corantes são utilizados em alguns tipos de tintas e seu poder tintorial é maior que o dos pigmentos, sendo necessária uma quantidade maior de pigmento para atingir uma mesma cor proporcionada por um corante. Uma desvantagem que os corantes apresentam em relação aos pigmentos é o baixo poder de cobertura, pois eles promovem apenas o tingimento da superfície e não são resistentes a luminosidade. Os corantes são muito utilizados na indústria têxtil, em artefatos de couro, plástico, papel enquanto que os pigmentos são aplicados nas tintas, onde são fundamentais (YAMANAKA, et al., 2010).

Quando a mistura não contém pigmentos, recebe o nome de verniz. Por conter pigmentos a tinta recobre o substrato enquanto o verniz o deixa transparente, proporcionando brilho (FAZENDA, 1995).

2.4. RESINAS

Segundo Pessis et al. (2003), a utilização de polímeros como componentes de tintas é datada ainda da época egípcia e grega, quando estes povos utilizavam polímeros naturais como seiva, óleos e ceras vegetal, gorduras de animais, gema ou clara de ovo, leite e até mesmo sangue e excrementos de animais. Hoje, a grande maioria das resinas é produzida por indústrias químicas ou petroquímicas por meio de reações complexas de polimerização (ANGHINETTI, 2012).

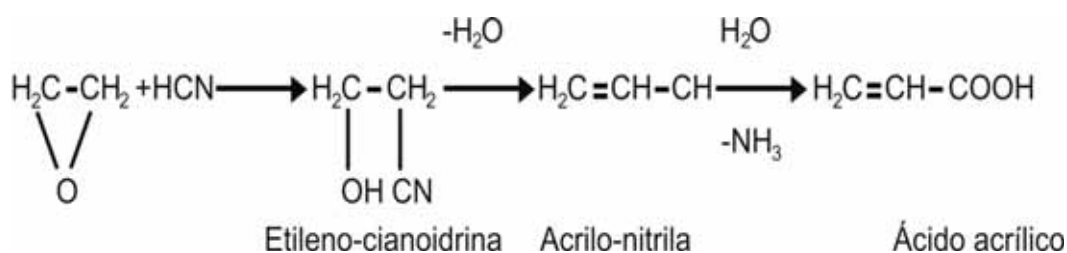
A resina é um componente de extrema importância nas tintas, conhecida também como ligante. É um veículo não volátil, com função aglutinante que se adere às partículas dos pigmentos formando uma película íntegra (FAZENDA, 2008). De acordo com Canto (2004), as resinas são responsáveis pelas principais propriedades físicas e químicas da tinta, como brilho, resistência, poder de aderência e cobertura do substrato.

Atualmente, com exceção de trabalhos artísticos, a maioria das resinas utilizadas pelas indústrias de tintas são as sintéticas, sendo as mais utilizadas as alquídicas, epóxi, poliuretânicas, acrílicas, poliéster, vinílicas e nitrocelulose

(ABRAFATI, 2006). O tipo de resina empregado é que define o tipo da tinta. Assim, tinta epóxi é composta pela resina epóxi, etc. (GENTIL, 2003).

As resinas acrílicas são as mais comumente usadas em tintas imobiliárias. São polímeros de alta massa molecular constituídos de dois ou três tipos de monômeros de ésteres dos ácidos acrílicos e metacrílicos formados pela reação do óxido de etileno com o ácido cianídrico (Figura 2).

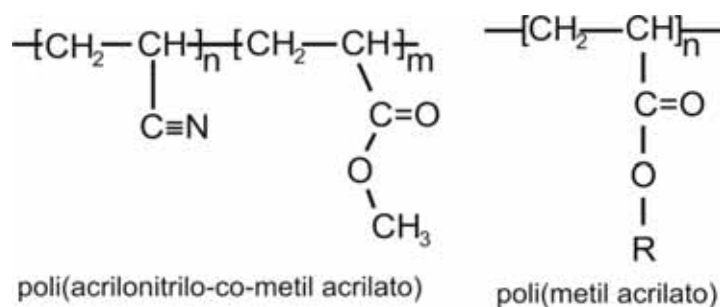
Figura 2. Reação química para a obtenção do ácido acrílico



Fonte: Adaptado de Fazenda e Filho, (2009)

As resinas acrílicas são apreciadas por suas propriedades ópticas, transparência, brilho, translucidez, além de serem resistentes ao tempo e ao amarelamento. Em função dessas propriedades, as resinas acrílicas são utilizadas em uma grande variedade de produtos como em tintas de veículos, tintas para faces internas e externas de eletrodomésticos, na construção civil, em peças de veículos, dentre outras utilidades. No entanto, as resinas acrílicas geralmente apresentam algumas desvantagens como pouca flexibilidade e baixa resistência ao impacto. Atualmente, os polímeros acrílicos mais utilizados nas indústrias de tintas são os poliácrlatos e polimetacrlatos como mostra a Figura 3 (FINKLER, 2005).

Figura 3. Polímeros acrílicos empregados como resinas



Fonte: Elaborado pelo próprio autor, (2014)

2.5. SOLVENTES

Os solventes das tintas são compostos orgânicos ou água utilizados para dissolver a resina, dando o aspecto líquido da tinta e viscosidade adequada. Como características típicas, os solventes são incolores e neutros, apresentam baixa volatilidade e baixo ponto de ebulição. Os solventes orgânicos são constituídos principalmente por hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos, alcoóis, cetonas e ésteres. Em alguns tipos de tintas a água é utilizada como solvente, como por exemplo, em tintas acrílicas e tintas de emulsão (látex).

Após a aplicação da tinta, o solvente evapora rapidamente formando uma camada de pigmento estruturada com a resina sobre o substrato (GIÚDUCE, BENÍTEZ, 1999).

As tintas podem ser classificadas em dois grandes grupos de acordo com o solvente utilizado, as tintas à base de solvente orgânico e as tintas à base de água (CUNHA, 2011).

Os solventes também são classificados como verdadeiros, auxiliares e falsos. Os solventes verdadeiros são aqueles que possuem capacidade de solubilizar a resina, como por exemplo, ésteres e cetonas. Os auxiliares, são aqueles que não possuem capacidade de solubilizar a resina, entretanto, são capazes de aumentar o poder de solubilização dos solventes verdadeiros. E por fim, os solventes falsos conhecidos também como diluentes, são compostos que apesar de não serem solventes da resina, contribuem para diminuir a viscosidade da tinta (VILLAS, 2006).

Hoje em dia existe uma preocupação mundial no sentido de diminuir o uso de solventes orgânicos nas tintas, pois estes liberam compostos orgânicos voláteis (COV) na atmosfera (FAZENDA, 2009). De acordo com Villas (2006), os COV são definidos como substância ou misturas com pressão de vapor suficiente nas condições normais de temperatura e pressão para vaporizar e contaminar a atmosfera, como por exemplo, aldeídos, cetonas e hidrocarbonetos e outros derivados de petróleo. Além disso, esses compostos são capazes de reagir entre si e produzir compostos oxidantes fotoquímicos, principalmente ozônio formado na troposfera (BAIRD, 2002). Este composto, quando em contato com outros gases presentes na estratosfera, forma uma fumaça ou neblina escura de cor marrom conhecida como fumaça fotoquímica (*smog*) que, ultimamente tornou-se um problema mundial, acarretando sérios problemas de saúde (WAYNE, 2000). Atualmente, a idéia principal é a substituição de solventes orgânicos por água, aumentando o teor de sólidos nas tintas e investindo em novas tecnologias para o desenvolvimento de tintas em pó, desenvolvimento do sistema de cura por ultravioleta, dentre outras técnicas (LIMA et al., 2012).

A principal vantagem da utilização da água como solvente é proporcionar melhores condições de salubridade ao pintor uma vez que ela é inodora e não é inflamável. Além disso, tintas à base água apresentam maior resistência ao craqueamento, amarelamento e, podem ser limpas com água além de oferecer maior variedade de cores. Entretanto, as tintas à base de solvente proporcionam maior poder de cobertura já na primeira demão, pois apresentam melhor aderência ao substrato e maior resistência à abrasão (ABRAFATI, 2006).

2.6. ADITIVOS

De acordo com Uemoto (2005) e Lima et al. (2012) os aditivos são produtos químicos com alto grau de eficiência, adicionados nas formulações das tintas em baixas concentrações (< 5%). Estes produtos são utilizados para auxiliar nas diversas fases de fabricação e proporcionar características especiais às tintas ou melhorias em suas propriedades ou características físico-

químicas. Os principais aditivos são os secantes, plastificantes, umectantes, dispersantes, antiespumantes, espessantes, anti-escorrimento, biocidas e surfactantes. O nome dos aditivos é dado em função do emprego de cada um nas tintas.

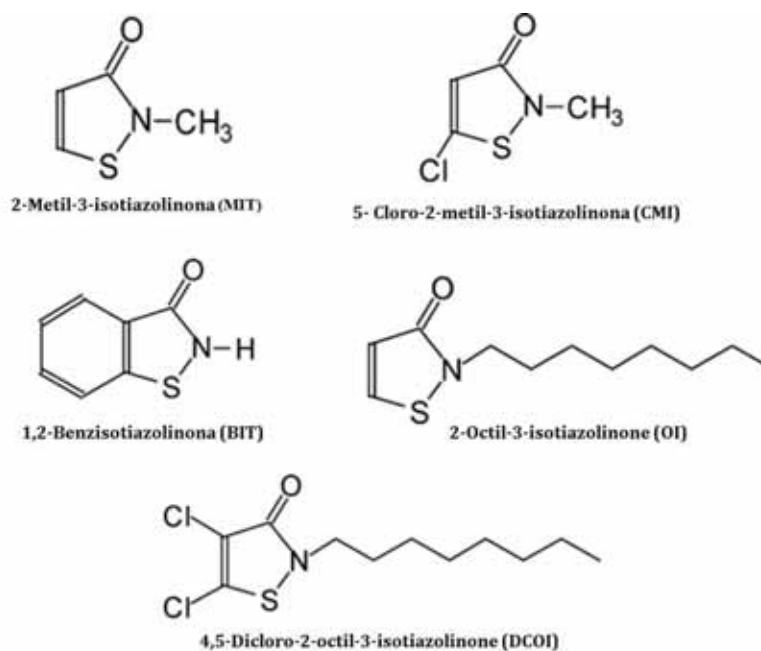
Dentre os aditivos, os biocidas são compostos de grande importância na fabricação das tintas e, segundo o E.U. Biocidal Products Directive 98/8/EC, são definidos como substâncias ativas ou preparações contendo uma ou mais moléculas, com função de eliminar ou inibir o crescimento microbiano, designados como bactericidas, fungicidas e algicidas (DIAS, 1998). Devem ser substância com níveis de segurança para não provocarem efeitos indesejáveis no produto e nas instalações e não oferecer riscos aos operadores, usuários e ao meio ambiente.

Vários são os compostos com atividade antimicrobiana que podem ser empregadas como biocidas em tintas.

Os agentes biocidas pertencentes à classe dos isotiazolinonas, ou seja, derivados de 3(2H)-isotiazolinona (Figura 6) apresentam amplo espectro de ação atuando contra bactérias, fungos filamentosos e leveduras. Os representantes mais comuns desse grupo de biocidas são 2-metil-3-isotiazolinona (MIT), 5-cloro-2-metil-3-isotiazolinona (CMI), 1,2-benzisotiazolinona (BIT), 2-octil-3-isotiazolinona (OI). São principalmente utilizados no controle do crescimento microbiano em diversos produtos industrializados como agentes de limpeza, formulações de tintas, emulsões de resina e em cosméticos em geral (FEWINGS e MENNÉ, 1999).

A proteção da tinta embalada (lata) é usualmente feita através da mistura de isotiazolinonas (a dupla clorometil e metil, a chamada CMI/MIT) com formaldeído ou produtos liberadores de formol. A isotiazolinona é eficiente em reduzir bactérias nas linhas de produção, entretanto, tem sua ação diminuída num período de dois a três meses, reduzindo a proteção da tinta na lata (RAFOTH et al., 2007).

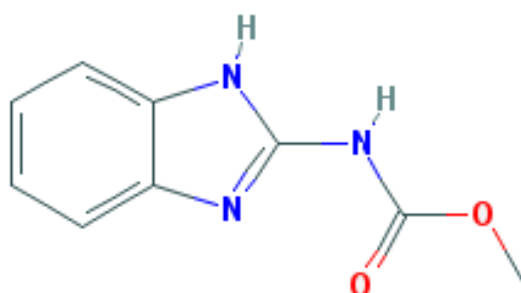
Figura 4. Estrutura química dos biocidas derivados de 3(2H)-isotiazolinona



Fonte: Modificado de BESTER et al., (2010)

Outro biocida muito utilizado na preservação das tintas é o fungicida carbendazim (MCB), cujo nome científico é ácido carbâmico, (Methyl 2-benzimidazole carbamate N° CAS: 10605-21-7). Apresenta-se como material sólido cristalino branco, possui fórmula molecular ($C_9H_9N_3O_2$), massa molar $191,2 \text{ g.mol}^{-1}$ (Figura 5). É o composto ativo do grupo dos fungicidas benzimidazóis mais utilizado (BOUDINA et al., 2000), indicado para o tratamento de doenças provocadas por fungos em culturas de citros (folhas), feijão (sementes e folhas), trigo (folhas), soja (semente e folhas) e, também muito utilizado como biocida em formulações de tintas, mostrando boa eficiência na inibição do crescimento dos fungos (BUCHELI et al., 2004).

Figura 5. Estrutura química do carbendazim



Fonte: EPA, (2012)

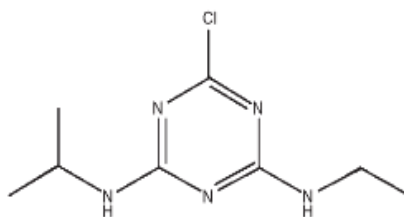
O Carbendazim (MCB) e seus metabólitos, assim como todos os outros benzimidazóis, atuam nos fungos interferindo na divisão celular inibindo a formação de fuso mitótico paralisando a mitose na metáfase. Atuam também interrompendo a formação e o funcionamento dos microtúbulos (KISO et al., 2004). Quando o fungicida entra em contato com as subunidades protéicas, chamadas de α e β tubulinas que são as subunidades dos microtúbulos, inibem a polimerização e comprometem o citoesqueleto dos eucariotos (DAVIDSE, 1982; LEUROUX, 2003). A ausência dos microtúbulos citoplasmáticos interfere diretamente no transporte de material secretório para a periferia da célula e inibe a síntese da parede celular dos fungos (KISO et al., 2004).

Segundo Osmani, Oakle, (2003) a intensidade da atividade do fungicida nos organismos é determinada pela afinidade do benzimidazol pela tubulina, assim, quanto maior essa ligação do benzimidazol com a tubulina, mais sensível será o organismo ao fungicida.

Outro tipo de biocida utilizado nas tintas são os algicidas sendo a atrazina (6-cloro-N-etil-N"-isopropil-1,3,5-triazina-2,4-diamina) (IUPAC) e o diuron (N-(3,4-diclorofenil)-N,N-dimetiluréia) os mais empregados em formulações de tintas imobiliárias e navais (tintas anti-incrustantes) (CASTRO et al., 2011).

A atrazina é um herbicida muito utilizado na Argentina, Estados Unidos e no Brasil no controle pré e pós-emergente de ervas daninhas, principalmente nas culturas de milho, cana-de-açúcar e soja, sendo classificado como herbicida sistêmico (OCHI et al., 2012). Atua inibindo o fotossistema II das plantas, mais especificamente sobre a membrana do cloroplasto, onde ocorre a fase luminosa da fotossíntese e o transporte de elétrons (CHRISTOFFOLETI, 1997). Incluída na classe toxicológica III, apresenta baixa solubilidade em água (30 mg/L^{-1}) e meia vida média no solo de cerca de 146 dias. Sendo assim, a atrazina tornou-se um pesticida de grande preocupação ambiental por possuir uma baixa biodegradabilidade e alta persistência no ambiente podendo resultar em contaminação de águas superficiais e subterrâneas (DOMBECK et al., 2004). A estrutura da atrazina é apresentada na Figura 6.

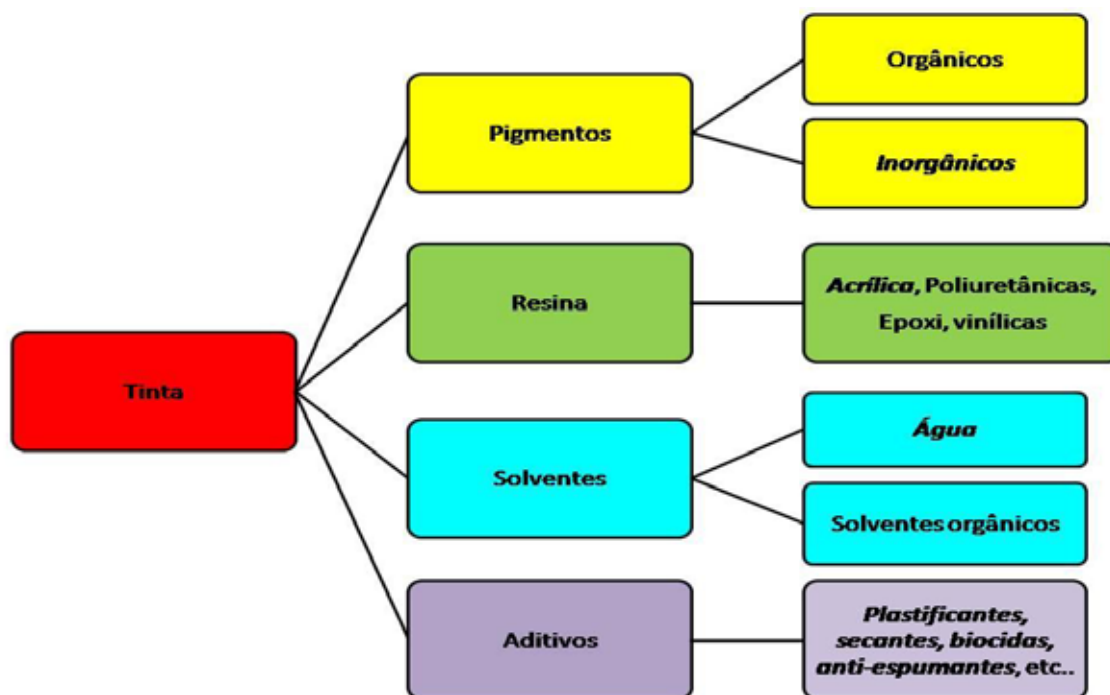
Figura 6. Estrutura química da atrazina



Fonte: Elaborado pelo próprio autor, (2014)

Embora todas as tintas imobiliárias sejam compostas basicamente por pigmentos, solventes, aditivos e resina, cada empresa possui sua própria formulação podendo variar o tipo de componente dentro de cada grupo, assim como, a concentração dos mesmos. Quanto maior a quantidade de resina e aditivos em uma tinta, mais nobre ela se torna. A Figura 7 demonstra a composição de uma tinta imobiliária, sendo destacados em itálico alguns componentes utilizados para a fabricação da tinta utilizada nesse presente trabalho.

Figura 7. Principais componentes das tintas imobiliárias



Fonte: Elaborado pelo próprio autor, (2014)

2.7. GERAÇÃO DE RESÍDUOS PELA INDÚSTRIA DE TINTAS

Devido à grande e crescente produção de tintas no mundo, atualmente há uma grande preocupação com a disposição dos resíduos gerados durante o processo de fabricação deste produto. A cada dia mais a política de desenvolvimento sustentável é incentivado dentro das grandes empresas e, segundo autores como Dias (1998) e Capra (1982) estes programas de sustentabilidade proporcionam crescimento econômico contínuo por meio de estratégias mais racionais de utilização dos recursos naturais, tecnologias e ferramentas mais eficientes e menos poluentes.

No contexto industrial, a minimização de produção de resíduos é um fator importante para o Desenvolvimento Sustentável, pois se preocupa com a proteção ambiental e com a redução dos custos de produção e também incentiva a reciclagem (CRITTENDEN e KOLACZKOWSKI, 1995).

De acordo com Silva et al., (2003), os resíduos são matérias primas que, no decorrer do processo de produção, foram perdidos ou negligenciados e também todo e qualquer tipo de material que não represente o produto final do sistema de produção industrial (FURTADO, 1998).

Nas indústrias de tintas os resíduos representam um risco do ponto de vista ambiental, particularmente os resíduos de tintas dispersos em solventes orgânicos voláteis. Devido ao risco envolvido no descarte deste material ativo, estudos vêm sendo realizados visando caracterizar, adequar à disposição e reaproveitar os resíduos. Além de buscar formas adequadas de disposição destes materiais, é possível a partir da identificação, quantificação e separação dos componentes da tinta o reaproveitamento dos resíduos (FAZENDA, 2009; CETESB, 2012).

Em virtude dos altos custos para o tratamento destes resíduos, as indústrias adotam medidas para reduzir a geração dos mesmos, como por exemplo, as mudanças tecnológicas da planta ou substituição de matérias-primas potencialmente tóxicas (DURSUN e SENGUL, 2006).

Os resíduos gerados no processo produtivo de tintas ou que emprega processos de pintura são classificados como classe I – perigoso: aqueles que apresentam periculosidade, inflamabilidade, corrosividade, reatividade,

toxicidade ou patogenicidade, podendo se tornar um sério problema ambiental, quando o descarte ocorrer em locais inapropriados (ABRAFATI, 2004). Segundo Fazenda (2009), outros componentes com elevado potencial de toxicidade são os metais pesados que possam aparecer nas composições das tintas. Em agosto de 2008 foi publicada a Lei nº 11.762 proibi o uso de pigmentos contendo metais pesados como o chumbo, tanto em produtos da linha imobiliária, quanto de uso infantil e escolar.

Inicialmente, os tratamentos de resíduos tóxicos foram realizados com base em métodos físicos e químicos como, sedimentação, filtração, flotação e separação por solventes e diálise (FREIRE et al., 2000). Posteriormente, novas técnicas foram desenvolvidas, como a utilização de processos oxidativos avançados, ultrafiltração e osmose reversa para conter ou degradar xenobióticos. Contudo, essas técnicas apresentam eficiência limitada na eliminação de resíduos, podendo gerar subprodutos com propriedades toxicológicas mais elevadas que o composto original (MORENO, BECERRA, SANTOS, 2004). Como alternativas aos tratamentos químicos e físicos, processos biotecnológicos envolvendo, conjuntamente, microrganismos, enzimas e surfactantes estão sendo cada vez mais utilizados, com o objetivo de solucionar ou minimizar problemas de poluição ambiental.

Dentre os processos biotecnológicos, a biorremediação é a mais utilizada e definida como um conjunto de tecnologias, que utilizam processos biológicos, aplicadas à recuperação ou remediação de áreas contaminadas, ou ao tratamento de compostos orgânicos voláteis tóxicos ou efluentes, contendo resíduo, que devam ser eliminados antes da descarga no ambiente (OLIVEIRA, 2008). Para isto, em geral, utilizam-se plantas, produtos biológicos e microrganismos ou seus sistemas enzimáticos (GIANFREDA, MORA, DIEZ, 2006).

O uso de microrganismos naturais, ou seja, provenientes do próprio local impactado para degradar compostos químicos é bastante descrito na literatura (ESPOSITO, PAULILLO, MANFIO, 1998) e, muitas vezes, o metabolismo desta microbiota local define a estratégia para o processo de biodegradação a ser utilizado.

Dentre as várias técnicas de biorremediação uma das mais utilizadas é conhecida como bio-estimulação, que consiste em utilizar microrganismos

metabolicamente ativos contra o xenobiótico presente no local e, com adequações das propriedades físico-químicas e nutricionais do meio, estimular sua atividade biológica e acelerar o processo de biotransformação do composto (HEAD, 1998).

2.8. BIODEGRADAÇÃO FÚNGICA DOS COMPONENTES DAS TINTAS IMOBILIÁRIAS

Na última década, com o avanço das pesquisas novas espécies de bactérias e fungos filamentosos foram identificadas e caracterizadas e muitas delas estão sendo utilizados nos processos de biorremediação.

Atualmente as tecnologias de biorremediação contam, comumente, com a participação das bactérias para descontaminar o ambiente. Entretanto, menos atenção tem sido dada a reparação de ambientes contaminados efetuada por fungos. Por outro lado, avaliações de fungos em escala de laboratório mostraram um potencial adequado desse grupo para degradar hidrocarbonetos aromáticos policíclicos de alto peso molecular (PAHs) e outros compostos orgânicos xenobióticos e recalcitrantes (ATAGANA, 2006).

Os fungos são conhecidos pela sua habilidade notável para degradar materiais naturais complexos como lignina, quitina, celulose microcristalina e outros polímeros. Além disso, os fungos são capazes de crescer sob condições ambientais de estresse como em meios com pH baixos, pobres em nutrientes e com baixa atividade de água, prevalecendo sobre outros microrganismos (MOLLEA et al., 2005; DAVIS e WESTLAKE, 1978 apud ATAGANA, 2006).

Além de enzimas que degradam polissacarídeos da biomassa, os fungos secretam grande quantidade de enzimas oxidativas, que podem degradar ou biotransformar xenobióticos desde compostos mais simples, de baixa massa molecular, até os mais complexos e recalcitrantes, incluindo estruturas aromáticas (COLOMBO, CABELLO, ARAMBARRI, 1996)

O processo de biodegradação das tintas imobiliárias e de seus componentes ou resíduos é ainda pouco conhecido, sendo alguns trabalhos pontuais, focando alguns componentes específicos, até agora publicados. Por exemplo, relatos na literatura sobre o tempo de permanência do carbendazim,

um dos biocidas utilizados nas formulações de tintas, no ambiente são bastante contraditórios, e dependem do substrato, condições experimentais e ambientais (SILVA et al., 1994).

Austin e Bruggs (1976), em estudos de campo, observaram que a redução de 50% da dose inicial de carbendazim variou de 26 meses em pH 5,5 a menos de três meses em pH 7,2 indicando que a permanência desse composto é dependente do pH do meio. Liu e Hsiang (1994) determinaram que a meia-vida de carbendazim *in vitro* foi ao redor de 4 dias, corroborando dados anteriores de que a meia-vida do carbendazim depende do microrganismo, substrato, condições ambientais, pH, além da exposição prévia do microrganismo ao fungicida ou a compostos estruturalmente relacionados. A fotodegradação de outro biocida, a isotiazolinona, foi estudada por Kazeminski et al., (1993) em função da temperatura e do pH os quais observaram que o tempo de meia-vida para a decomposição de primeira ordem de isotiazolinonas é 4,6 dias a 40°C e de 0,48 dias (11,5 horas) a 60°C. Em relação ao pH, as meias-vidas foram 46 dias a pH = 8,5, e 3,41 dias em pH = 9,62.

A degradação de isotiazolinonas, de acordo com Edge et al. (2001), ocorre pela abertura do anel a partir da ligação nitrogênio-enxofre, seguido de hidrólise e oxidação constante, produzindo enxofre elementar, cloridrato de metilamina, ácido malônico, ácidos carboxílicos de cadeia curta, e dióxido de carbono. O processo de degradação do ácido acrílico ainda não foi estudado suficientemente, mas sabe-se que o ácido láctico é um intermediário da via metabólica de consumo de ácido acrílico (IGNATOV et al., 1997).

Com base no exposto, e no pouco conhecimento existente acerca dos tipos de microrganismos que atacam as tintas e os mecanismos pelos quais atuam, o presente trabalho propõe um estudo sobre a microbiota contaminante e sua capacidade em degradar tintas imobiliárias e seus componentes. Visou também utilizar os microrganismos responsáveis pela deterioração na descontaminação dos resíduos gerados pelas fábricas de tinta. Tal conhecimento pode colaborar para o aumento da qualidade na produção das tintas imobiliárias, gerando um produto mais resistente à contaminação pelos microrganismos como também aumentar a eficiência no tratamento dos resíduos das fábricas de tinta.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVOS GERAIS

O presente estudo teve por objetivo avaliar o processo de degradação de tinta imobiliária e de seus componentes (resina, fungicida carbendazim, bactericida metil isotiazoliona) utilizando fungos mesofílicos isolados de diversas matérias primas, equipamentos, locais de produção e produtos finais da produção dessa tinta.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar, identificar e selecionar espécimes de fungos a partir de amostras de tinta de imobiliárias, de seus componentes e do resíduo de fabricação;
- avaliar a capacidade de crescimento/inibição dos fungos na presença da tinta ou de seus componentes separadamente;
- avaliar a degradação dos principais componentes da tinta e identificar metabólitos gerados;
- Os fungos que apresentaram maior potencial de degradação do MIT, MBC, MMA foram selecionados e utilizados como inóculo no tratamento de resíduos de indústrias de tintas.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. MEIO DE CULTURA

4.1.1. MEIO SÓLIDO PARA O ISOLAMENTO DAS LINHAGENS FÚNGICAS

O meio nutriente utilizado foi o descrito por Kirk et al., (1978), com algumas modificações, em pH 5,0 contendo em g.L⁻¹: 20 de Ágar, 5 de glicose, 2 de (NH₄)₂SO₄, 2 de KH₂PO₄, 0,4 de CaCl₂, 0,2 de MgSO₄.7H₂O, 0,1 de peptona, 5 mL de solução de elementos traços (g.L⁻¹): (22 de ZnSO₄.7H₂O; 11 de H₃BO₃; 5 de MnCl₂.4H₂O, 5 de FeSO₄.7H₂O; 1,6 de CoCl₂.5H₂O; 1,6 de CuSO₄.5H₂O; 1,1 de (NH₄)Mo₇O₂₄.4H₂O; 50 de EDTA) e 0,001 de Tween 80, acrescido de 2% de uma solução de antibiótico, contendo ampicilina e cloranfenicol na proporção de (1:1) para inibir o crescimento bacteriano.

4.1.2. MEIOS PARA OBTENÇÃO, MANUTENÇÃO E ARMAZENAMENTO DAS CULTURAS MONOSPÓRICAS

Para obtenção das culturas monospóricas foi utilizada uma suspensão Agar-água composta de 1,5 % Ágar e o meio de Malte 2%.

Para os repiques periódicos, conservação e armazenamento das culturas puras, foi utilizado o meio nutriente Ágar Saboraud Dextrose contendo em g.L⁻¹: 10 de peptona, 40 de dextrose e 15 de Ágar; pH 5,6, que foi preparado segundo as instruções do fabricante (Himedia Laboratórios PVT, LTD) e vertido em tubos e placas de acordo com a necessidade.

4.1.3. MEIO LÍQUIDO PARA CULTIVO SUBMERSO

Para o cultivo submerso foi utilizado o meio nutriente composto em g.L⁻¹: 0,5 de glicose, 2 de (NH₄)₂SO₄, 2 de KH₂PO₄, 0,4 de CaCl₂, 1 de MgSO₄.7H₂O, 0,1 de peptona, 3 (NH₄)H₂PO₃, 0,5 extrato de levedura, 5 mL de solução de elementos traços (g.L⁻¹): (22 de ZnSO₄.7H₂O; 11 de H₃BO₃; 5 de MnCl₂.4H₂O,

5 de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1,6 de $\text{CoCl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 1,6 de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 1,1 de $(\text{NH}_4)\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 50 de EDTA) e pH 5,0.

4.2. COLETA DAS AMOSTRAS PARA ISOLAMENTO DOS FUNGOS

As coletas foram realizadas em uma fábrica de tintas de São José do Rio Preto, SP. Foram coletados os principais componentes da tinta: resina, água, solvente, espessante e aditivos, durante as diferentes etapas de produção, assim como a tinta fresca e tinta deteriorada por microrganismos. Também foram coletadas amostras de águas do sistema de tratamento de efluentes da empresa gerado durante as etapas do processo produtivo.

4.3. ISOLAMENTO, PURIFICAÇÃO E ESTOCAGEM DOS FUNGOS

Foram coletados 100 mL de cada amostra em garrafas de vidro estéreis. Em laboratório as amostras foram homogeneizadas e, em seguida 1 mL de cada amostra foi transferido assepticamente para tubos de diluição contendo 9 mL de água destilada estéril para diluição 10^{-1} a partir da qual diluições mais altas foram feitas (10^{-2} a 10^{-5}). Alíquotas de 1000 μL da amostra com diluição e sem diluição foram plaqueadas em meio de sais descrito no item 4.1.1. As placas foram incubadas a $28\text{ }^\circ\text{C} \pm 2\text{ }^\circ\text{C}$ por 72 horas e as colônias crescidas foram isoladas e diferenciadas com base no aspecto do micélio e cor dos esporos (quando presentes). Em seguida foram re-inoculadas, através de estrias de esgotamento, até a obtenção de culturas puras.

A pureza total foi obtida mediante o cultivo dos isolados de colônias originadas de um único esporo (cultura monospórica). Para obtenção da cultura monospórica, esporos foram coletados de uma cultura pura com o auxílio de agulha de inoculação e transferidos para um tubo de ensaio contendo água destilada estéril e 0,05% de tween 80. Esta suspensão de esporos foi agitada e 100 μL desta, foram transferidos para uma placa de Petri contendo meio de cultura Agar-água. Com o auxílio de uma alça de Drigalski a suspensão foi espalhada sobre a superfície do meio de cultura. Após esse procedimento as

placas foram mantidas em B.O.D. a $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 12-24 horas dependendo da velocidade de crescimento do fungo. Depois de transcorrido tempo, as placas foram examinadas com auxílio de uma lupa e os conídios isolados que apresentam emissão de tubos germinativos foram recortados com auxílio de bisturi sendo então transferidos para o centro placa de Petri contendo meio de malte a 2% para o desenvolvimento da cultura.

Para o armazenamento da coleção foi utilizado o Ágar Saboraud Dextrose (10 g.L de peptona, 40 g.L de dextrose e 15 g.L de Ágar; pH 5,6 a 25°C) foi preparado segundo as instruções do fabricante (Himedia Laboratóries PVT, LTD) e vertido em tubos de ensaio. Para cada cepa isolada foram preparados 9 tubos, sendo 3 com água destilada estéril, 3 com mistura de água destilada estéril e óleo mineral e 3 somente com óleo mineral, sendo estocados em geladeira à $4^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. As culturas monospóricas também foram estocadas em criotubos com 2,0 mL de solução de glicerol á 15% em freezer -80°C .

4.4. IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS

As identificações realizadas neste estudo seguiram os critérios clássicos descritos na literatura (DOMSCH et al., 1993; HAWKSWORTH et al., 1995; BARNETT; SAMSON, 2000). Para a identificação dos fungos, os isolados foram cultivados em meio de malte a 2%, durante 7 dias a $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Após este período, as características macro (cor, aparência do micélio e reverso da colônia) e microscópica (e produção de esporos, hifas e corpo de frutificação) foram avaliados e catalogados (características morfológicas e origem de isolamento). Para observação microscópica, foram preparadas lâminas a fresco utilizando-se glicerol 20% ou KOH - 3M como líquido de montagem, dependendo do isolado.

No caso dos gêneros mais comuns, foram utilizados os métodos de identificação segundo Klich e Pitt (1998) para espécies de *Aspergillus*, o método de Nelson et al., (1983) para as espécies de *Fusarium* e o método de Pitt (1988) para as espécies de *Penicillium*.

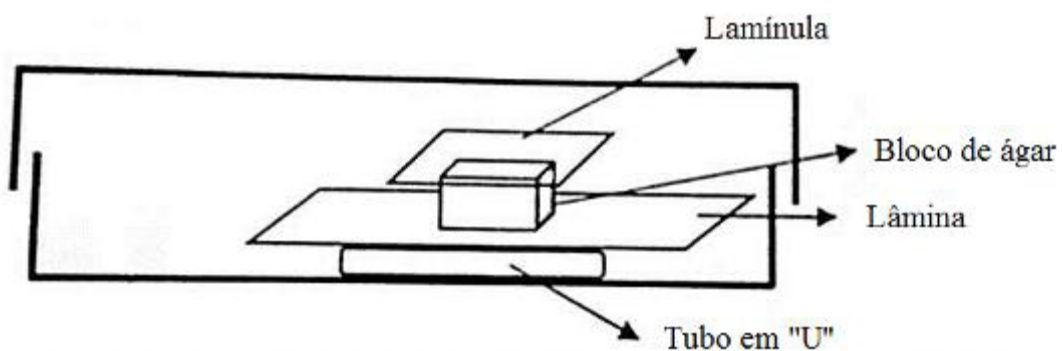
Para separar os isolados pertencentes a outros gêneros, chaves de identificação consideradas clássicas na literatura foram utilizadas como:

- *Trichoderma* sp. (RIFAI, 1965);
- *Syncephalastrum racemosum* (MISRA, 1975; SCHIPPER).
- *Demais gêneros encontrados* nesta pesquisa (Samson et. al; (2000), Domsch et. al; (1980) e Gams e.t al; (1998).

Outra técnica também utilizada neste trabalho para a identificação dos isolados foi o microcultivo em lâmina. Esta técnica é fundamentada na cultura do fungo em pequenos pedaços de meio de cultura, entre lâmina e lamínula, onde o crescimento do fungo se expande e fixa na porção inferior da lamínula, que quando retirada com cuidado mantém as estruturas que formam esporos (corpo de frutificação) intactas, além de estimular a pigmentação dos fungos, o que facilita identificar melhor as características dos fungos.

Para a realização do microcultivo em lâmina foi recortado um pequeno quadrado de aproximadamente 1cm² de meio de malte a 2% e colocado sobre uma lâmina estéril. Com auxílio de uma agulha de inoculação o fungo foi inoculado nos quatro cantos do quadrado e em seguida foi adicionado uma lamínula sobre a sementeira. Todo o conjunto foi colocado no interior de uma placa de Petri sobre um suporte de vidro em forma de U e papel filtro embebido em água estéril (Figura 8). O microcultivo foi incubado em B.O.D com temperatura 28°C ± 2°C por sete dias.

Figura 8. Esquema geral de Microcultivo em Lâmina



Fonte: Rodrigues et al., (2009)

Após o período de incubação, a lamínula foi retirada cuidadosamente do bloco de ágar e disposta sobre outra lâmina contendo uma gota de água ou do corante azul de algodão. Na lâmina restante, o bloco de ágar foi removido e

sobre ela foi pingado uma gota de água ou azul de algodão e foi recoberta com uma lamínula. As lâminas e lamínulas foram seladas com esmalte e observadas em microscópio óptico modelo Leica ICC50 com câmera acoplada.

4.5. IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS POR TÉCNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR

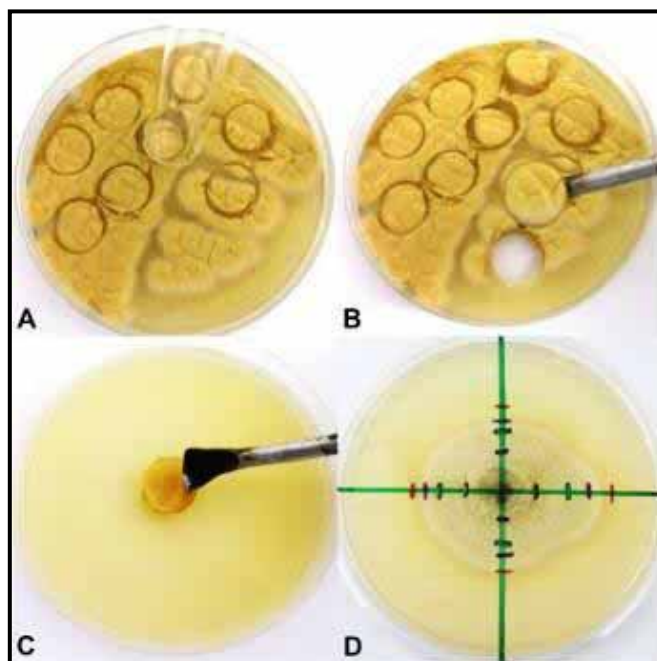
Todas as cepas fúngicas foram previamente identificadas utilizando características morfológicas das colônias e estruturas reprodutivas microscópicas. Tais marcadores morfológicos foram utilizados para identificar todos os isolados até nível de gênero. Após morfotipagem, todas as cepas fúngicas também foram identificadas por meio de marcadores moleculares. A extração do DNA, quantificação e seqüenciamento foi baseado em protocolos descritos na Arcuri et al. (2014). As cepas foram seqüenciadas utilizando o par de primers reconhecidos como os melhores marcadores para definir espécies em cada caso: ITS4 e ITS5 para a região espaçador interno transcrito do gene do DNA ribossomal (WHITE et al, 1990), TEF1R e EF1-986 para o fator de alongamento gene 1- α (BISSETT et al., 2009) ou β t2a e Bt2b para o gene β -tubulina (De VIDRO e DONALDSON, 1995).

As seqüências Forward e reverse foram utilizadas para montar os contigs no BioEdit v.7.1.3 (SALÃO, 1999). Os contigs foram usados para consultar seqüências homólogas no banco de dados NCBI-GenBank utilizando a ferramenta BLASTn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). O alinhamento foi construído em MAFFT v. 7158 (KATO e STANDLEY, 2013) e a árvore filogenética foi inferida em MEGA v.5.05 (Tamura et al., 2011) utilizando o algoritmo de neighbor-joining sob os parâmetros Kimura-2 como o modelo de substituição de lacunas e foram excluídos da análise.

4.6. AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO/INIBIÇÃO DOS ISOLADOS NA PRESENÇA DA TINTA E DE SEUS COMPONENTES EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES

Para analisar o grau de tolerância dos isolados na presença da tinta e seus componentes, os fungos foram previamente cultivados em placa de Petri contendo meio de cultura descrito no item 4.1.1. Após miceliação, foram cortados discos de 10 mm de diâmetro com auxílio de tubos de ensaio estéreis (Figura 9.a), que foram usados para inocular o centro das placas Petri (Figura 9.b e c) contendo meio de cultura acrescido separadamente de 1) tinta, 2) resina nas concentrações de 10%, 20%, 30% e 40% e 3) carbendazim, 4) Triazina, 5) isotiazolinona e 6) dióxido de titânio (TiO₂) separadamente nas concentrações de 0,1%, 0,2%, 0,4% e 0,8% respectivamente. As concentrações utilizadas no teste para cada componente foram definidas com base nas utilizadas na fabricação da tinta, considerando-se pontos abaixo e um acima dessa concentração. As placas foram incubadas em B.O.D a 28°C ± 2°C e, em períodos de 24, 48, 96 e 144 horas o diâmetro das colônias foram mensurados com régua em duas direções perpendiculares (Figura 9.d) a partir do limite do círculo do inóculo observando-se a taxa incremento diário do diâmetro de extensão da colônia ou inibição do crescimento em relação ao controle para calcular a velocidade média do crescimento.

Figura 9. Preparo das placas para o teste de avaliação do crescimento/inibição e utilização da tinta e seus componentes como fonte de carbono



Fonte: Elaborado pelo próprio autor, (2014)

4.7. CULTIVO EM MEIO LÍQUIDO

O pré-inóculo para o cultivo submerso foi feito em Erlenmeyer de 125 mL, contendo 30 mL de meio modificado de Kirk et al., (1978) como descrito no item 4.1.1.

Após 120 horas de incubação a $28 \pm 2^\circ\text{C}$, acrescentou-se 60 mL de uma solução estéril de Tween 80 a 0,05% para a suspensão dos esporos.

O cultivo submerso foi realizado em Erlenmeyers de 125 mL em duplicata, contendo 30 mL de meio descrito no item 4.1.3. A esse meio foram adicionadas soluções de 10 mg/L^{-1} de cada componente da tinta separadamente (carbendazim, isotiazolinona, metil metacrilato) e um volume de suspensão de esporos correspondente a 10^7 esporos/mL. Os Erlenmeyer foram incubados a $28 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2$ com agitação de 120 rpm. Foi feito também controle biótico e controle abiótico para o cultivo em duplicata. No controle biótico foi adicionado o meio de cultura sem o composto teste, apenas o volume suspensão de esporos do fungo correspondente a 10^7 esporos/mL.

Esse tipo de controle é importante para avaliar a taxa crescimento do fungo em meio líquido e comparar posteriormente o comportamento de crescimento ou inibição do fungo durante a fermentação onde temos a presença do composto a ser degradado. No controle abiótico, foi adicionada água estéril no lugar na suspensão de esporos. O controle abiótico é importante para avaliar a taxa de degradação espontânea que pode ocorre durante o período da fermentação.

Em períodos de 0, 24, 96, 192, 384 horas, dois Erlenmeyer do controle biótico (meio de cultivo + fungo), abiótico (meio de cultivo + composto) e do cultivo do fungo na presença do composto foram retirados da B.O.D. e o material fermentado foi filtrado a vácuo em papel de filtro Whatman nº1 previamente tarado e em seguida foi seco em estufa a temperatura de 105°C por 24 horas e calculado pela equação:

$$\text{Biomassa seca (mg/mL)} = \frac{(\text{psMF} - \text{psF})}{X}$$

Onde:

psMF: peso seco do material

psF: peso seco do papel de filtro

X = volume do meio de cultura (30 mL)

O filtrado foi acondicionado em frasco de vidro estéril e congelado em freezer - 20°C.

4.8. AVALIAÇÃO DA DEGRADAÇÃO DOS COMPONENTES DA TINTA POR MÉTODOS ANALÍTICOS

A degradação dos compostos estudados do meio de cultivo, assim como, a quantificação e identificação dos compostos foram feitos utilizando um cromatógrafo da marca Agilent Technologies, modelo 1220 Infinity LC, equipado com um detector UV/VIS, bomba binária e amostrador automático. Antes de injetadas, as amostras foram filtradas em filtros Millex em polietileno de 0,22µm de poro, 13 mm não estéril.

Para as análises cromatográficas do carbendazim (MBC) e de seu metabólito principal 2-aminobenzimidazol (2-AB), foi utilizada uma coluna de separação Brownlee Validated C18 (5 μ m 150 x 4,6 mm, Perkin Elmer), forno da coluna em 40°C, fase binária composta por, (A) água com 0,05% de ácido trifluoracético (TFA), (B) metanol: acetonitrila (60:40 v/v) adicionado 0,05 % de ácido trifluoracético; curva gradiente, 15% B em 0 min, 30% B em 9.5 min, 50% B em 12 min, 15% B em 13 min, e um fluxo de 1 mL.min⁻¹, 30 μ L de amostra injetada e detector ajustado a 225 nm.

Para as análises do 2-metil-3-isotiazolinona (MIT) foi utilizada a coluna ZORBAX Eclipse Plus C18 Analytical (4.6 x 250 mm partícula de 5 μ m, Agilent Technologies), detector ajustado a 275 nm, forno da coluna em 25°C, fase móvel Binária composta por, (A) água com 0,05% de ácido trifluoracético (TFA), (B) metanol: acetonitrila (60:40 v/v) adicionado 0,05 % de ácido trifluoracético, taxa de fluxo de 1 mL.min⁻¹ and 30 μ L de amostra foram injetados.

Para a obtenção da concentração dos componentes da tinta, foram comparados os valores obtidos através das áreas dos picos dos padrões analíticos e das amostras e posteriormente uma curva padrão. Foram preparadas soluções de concentração 0.5, 2, 4, 6, 8,10, 12 mg/L⁻¹ dos padrões analíticos dos componentes da tinta e em seguida foram analisados em HPLC, nas mesmas condições das amostras.

O controle da fermentação foi feito como descrito para a fermentação submersa e permitiu verificar a degradação espontânea dos componentes da tinta durante o tempo da fermentação como também a conservação da concentração do mesmo no meio. Aliquotas de início do cultivo foram retiradas para comparação da taxa de degradação e verificação do perfil do cromatograma gerado na ausência de qualquer produto de degradação.

A identificação dos metabólitos derivados da degradação do MIT foi feita por cromatografia gasosa utilizando um cromatógrafo da marca Perkin Elmer modelo 680, acoplado a um detector de massas Perkin Elmer, modelo Clarus 600T, software turbo mass. A coluna cromatográfica utilizada foi a Elite 5-MS da Perkin Elmer (30x0.25mm, 1 μ m), temperatura de forno ajustado para 50°C (mantido por 3.5 minutos) acréscimo de 20°C/min até 80°C (mantido por 6 minutos), acréscimo de 15°C/min até 250°C (mantido por 10 minutos),

temperatura do injetor a 250°C, temperatura da linha de transferência (transferliner) 280°C, temperatura da fonte de ionização 250°C, solvente delay (do espectrômetro de massas): 3,5 minutos.

Como gás de arraste foi utilizado o hélio, 12 psi/min, modo de injeção splitless e o volume de amostras injetado foi de 1µL. As mostras foram analisadas no modo Scan (50 a 200 m/z) e modo SIR para o monitoramento do íon molecular e de seus fragmentos.

- primeiro canal: 3.50 – 3.99 minutos (ácido propiônico);
- segundo canal: 3.50-4.20 minutos (ácido acético);
- terceiro canal: 3.50- 4.70 minutos (ácido malônico);
- quarto canal: 5.00- 6.40 minutos (ácido butírico).

O composto metil metacrilato foi analisado por cromatografia gasosa utilizando um equipamento da marca Perkin Elmer, modelo Clarus 480 equipado com um detector de ionização de chama (FID) e software Total ChromNavigator. Foi utilizada uma coluna de fase estacionária Agilent J&W - BD-EN 14103 (30mx0.320mmx0.25µm.), 1µL de amostra foi injetada; programação do forno 50°C (mantido por 3 minutos) acréscimo de 8°C/min até 150°C (mantido por 3 minutos), temperatura do injetor em 250°C, temperatura do detector a 300°C, tempo de corrida de 18,5 minutos. O nitrogênio foi utilizado como gás de arraste com a pressão ajustada para 6,0psi e o split foi de 1/20.

4.9. USO DE EFLUENTES GERADOS DURANTE O PROCESSO DE PRODUÇÃO DAS TINTAS COMO MEIO DE CULTIVO DOS FUNGOS

As amostras de efluentes da fábrica de tintas, provenientes de quatro tanques de tratamento que são ligados entre si por uma conexão (ladrão) por onde a água passa de um tanque para outro, foram coletadas em frascos de vidro estéreis. Esses tanques são os reservatórios por onde toda água utilizada na limpeza dos equipamentos passam e ficam em repouso para sedimentação dos pigmentos e de outros componentes e, posteriormente, é encaminhada a

outros pontos de tratamentos. As amostras de efluentes coletadas continham águas residuais de sete dias, sendo que estes tanques são esvaziados completamente a cada 20 dias e o sedimento (borra) do fundo é removido e destinado a uma empresa que realiza a incineração.

Para analisar essas amostras em HPLC e detectar quais compostos estariam presentes nas amostras de resíduos, um tratamento prévio foi feito, a fim de remover toda a matéria orgânica e outras sujidades presentes nas amostras.

Em laboratório, 30 mL das amostras foram centrifugadas a 15.000(g) à 5°C por 15 minutos, em seguida o sobrenadante foi coletado e transferido para um novo tubo e centrifugado novamente nas mesmas condições. Depois de percorrido o tempo, o sobrenadante foi filtrado em membrana de 0.42 µm e depois em filtro de seringa de 0.22 µm. Essas amostras foram injetadas no HPLC Agilent Technologies, modelo 1220 Infinity LC acoplado a um detector de massas Ion Trape da marca Agilent Technologies a fim de detectar, quantificar e confirmar a presença do carbendazim, 2-AB, MIT e do MMA no massas.

4.10. UTILIZAÇÃO DOS FUNGOS COMO INÓCULO NO TRATAMENTO DOS RESÍDUOS

Os fungos que apresentaram maior potencial de degradação de todos os compostos foram selecionados para o cultivo submerso na presença do resíduo. O cultivo submerso foi realizado em Erlenmeyers de 125 mL em duplicata, contendo 30 mL do resíduo com pH ajustado para 5,0. A esse resíduo foram adicionadas um volume de suspensão de esporos correspondente a 10^7 esporos/mL. Os Erlenmeyers foram incubados a 28 °C ± 2 com agitação de 120 rpm por 8 dias. Foi feito também controle abiótico em duplicata, para avaliar a degradação espontânea dos compostos presentes nos resíduos.

A cada dois dias, dois Erlenmeyers do cultivo (resíduo + fungo), dois do controle abiótico (apenas resíduo) foram retirados da B.O.D. e o material fermentado foi filtrado à vácuo em papel de filtro Whatman nº1 previamente

tarado e em seguida foi seco em estufa a temperatura de 105°C por 24 horas e calculado pela equação:

$$\text{Biomassa seca (mg/mL)} = \frac{(\text{psMF} - \text{psF})}{X}$$

Onde:

psMF: peso seco do material

psF: peso seco do papel de filtro

X = volume do meio de cultura (30 mL)

O filtrado foi acondicionado em frasco de vidro estéril e congelado em freezer - 20°C e, posteriormente as amostras foram injetadas em HPLC/MS para análises da degradação dos compostos.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

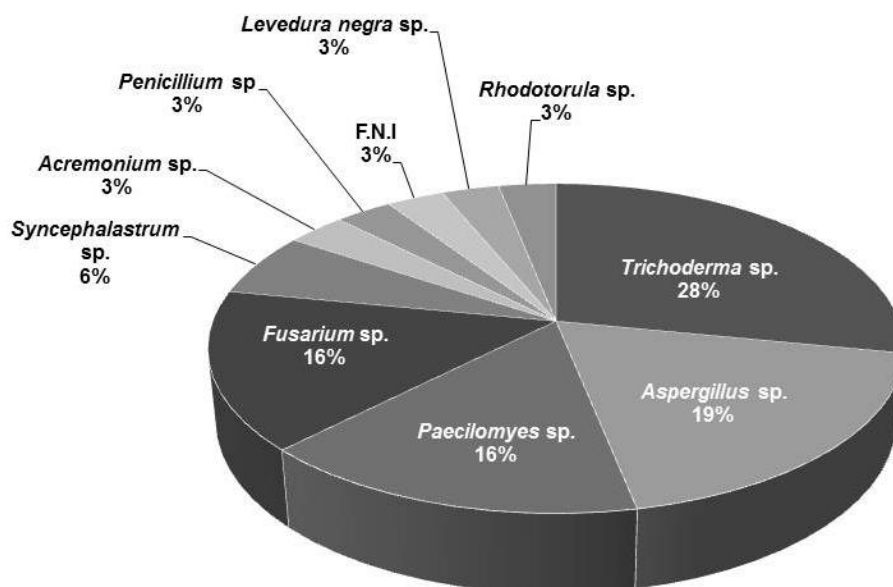
5.1. ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS

Foram coletadas 20 amostras, sendo isolados em cultura pura 30 fungos filamentosos e duas leveduras, pertencentes a 10 gêneros distintos.

Inicialmente, a identificação dos isolados foi realizada em nível de gênero com base em características morfológicas. Após os testes de crescimento/inibição pela tinta e derivados, todos os fungos foram identificados por técnicas de biologia molecular.

Foram isolados, em média, 1,6 fungos por amostra, com um mínimo de 1 e um máximo 6 cepas. Fungos do mesmo gênero, porém isolados de locais e amostras diferentes, foram consideradas cepas distintas. A distribuição detalhada dos fungos isolados neste trabalho encontra-se na Tabela 1 e a porcentagem de cada gênero isolado encontra-se esquematizado na Figura 10.

Figura 10. – Distribuição dos fungos isolados por gênero de amostras de tinta, de seus componentes e do resíduo do processo produtivo das tintas.



De acordo com a literatura, os gêneros encontrados nesse isolamento são representativos de fungos envolvidos na biodeterioração de tintas a base

de água, como observado por Saad et al., (2003); Adeleye et al., (1999), Grant et al., (1993), entre outros.

Os gêneros *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Paecilomyces*, *Fusarium*, *Syncephalastrum* e *Penicillium* foram os mais frequentes e os mesmos foram encontrados por Aina et al., (2011) com exceção do *Paecilomyces* e *Syncephalastrum*, e a prevalência dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* foi maior quando comparada com a do presente trabalho. A mesma frequência do gênero *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp. também foi encontrado por Obidi et al., (2009), que isolou 19 fungos de amostras de tintas e seus componentes e identificou como *A. niger*, *A. flavus* e *Penicillium* mostrando que esses dois gêneros são os principais envolvidos e relatados na biodeterioração das tintas.

A diferença entre os tipos de microrganismos e espécies isoladas das tintas deve-se aos diferentes biocidas empregados nas formulações, além do tempo de exposição do microrganismo a esses compostos, concentração, o tipo de assepsia e tipo de ambiente das fábricas. Na tinta utilizada no presente trabalho, dois biocidas carbendazim e isotiazolinona (fungicida e bactericida, respectivamente) são utilizados na formulação deste produto, podendo um potencializar o efeito do outro.

As amostras de tinta deteriorada possibilitaram um maior número de fungos isolados (35%), seguido das amostras de resíduos (31%), sendo o gênero *Aspergillus* o mais freqüente nas amostras de tinta deteriorada (Figura 11).

Figura 11. Frequência de isolamento de fungos das amostras/locais da fábrica de tinta

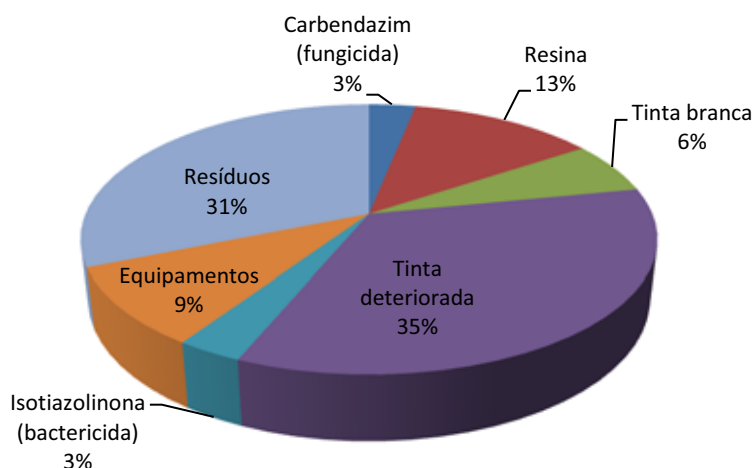


Tabela 1. Resultados da identificação molecular e filogenética dos fungos isolados

Código	Identificação Morfológica	Identificação estabelecida no estudo ¹	Resultado do sequenciamento			Obs ⁵
			Região ²	Id (%) ³	Bases de dados ⁴	
FB01	<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	TEF	99	<i>Trichoderma longibrachiatum</i> GJS 08-198 (JN175565)	
FB02	<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	TEF	100	<i>Trichoderma longibrachiatum</i> GJS 08-198 (JN175565)	
FB03	<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	TEF	99	<i>Trichoderma longibrachiatum</i> GJS 08-198 (JN175565)	
FB04	<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	TEF	99	<i>Trichoderma longibrachiatum</i> GJS 08-198 (JN175565)	
FB05	<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Trichoderma</i> sp.	-	-	-	FNS
FB06	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Fusarium</i> sp.	ITS	100	<i>Fusarium keratoplasticum</i> CBS 132904 (KF255446)	
FB07	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Fusarium solani</i> species complex	ITS	99	<i>Fusarium falciforme</i> ATCC 28173 (FJ545247) <i>Fusarium</i> cf. <i>solani</i> CBS 124631 (JX435176)	
FB08	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Fusarium</i> sp.	-	-	-	FNS
FB09	<i>Aspergillus</i> sp.	<i>Aspergillus fresenii</i> .	TUB	99	<i>Aspergillus persii</i> CBS 112795 (AY819988)	
FB10	Levedura negra	Levedura negra	-	-	<i>Aspergillus sclerotiorum</i> CBS 54965 (AY819986)	FNS

Código	Identificação Morfológica	Identificação estabelecida no estudo ¹	Resultado do sequenciamento				Obs ⁵
			Região ²	Id (%) ³	Bases de dados ⁴		
FB11	<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	TEF	100	<i>Trichoderma longibrachiatum</i> GJS 07-21 (JN175569)		
FB12	<i>Aspergillus</i> sp.	<i>Aspergillus</i> sp.	-	-	-		FNS
FB13	<i>Aspergillus</i> sp.	<i>Aspergillus</i> sect. <i>Flavi</i>	TUB	99	<i>Aspergillus flavus</i> NRRL 1957 (AY017536)		
FB14	<i>Aspergillus</i> sp.	<i>Aspergillus niger</i>	TUB	99	<i>Aspergillus niger</i> ATCC 1015 (JX535496)		
FB15	<i>Talaromyces</i> sp.	<i>Talaromyces</i> sp.	ITS	99	<i>Talaromyces amestolkiae</i> CBS 626.93 (JX965329)		
FB16	<i>Acremonium</i> sp.	<i>Acremonium</i> sp.	-	-	-		FNS
FB17	<i>Mortierella</i> sp.	<i>Mortierella alpina</i>	ITS	100	<i>Mortierella alpina</i> CBS 110518 (JX975906)		
FB18	<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	TEF	99	<i>Trichoderma longibrachiatum</i> GJS 08-198 (JN175565)		
FB19	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Fusarium solani</i> species complex	ITS	99	<i>Fusarium</i> cf. <i>solani</i> CBS 124631 (JX435176)		
FB20	<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Trichoderma</i> sp.	-	-	-		FNS
FB21	<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Trichoderma harzianum</i> species complex	ITS	99	<i>Trichoderma harzianum</i> G.J.S. 92-61 (AF443925)		

Código	Identificação Morfológica	Identificação estabelecida no estudo ¹	Resultado do sequenciamento				Obs ⁵
			Região ²	Id (%) ³	Bases de dados ⁴		
FB23	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Fusarium solani</i> species complex	ITS	99	<i>Fusarium</i> cf. <i>solani</i> CBS 124631 (JX435176)		
FB24	<i>Syncephalastrum</i> sp.	<i>Syncephalastrum</i> sp.	-	-	-		FNS
FB25	<i>Aspergillus</i> sp.	<i>Aspergillus flavipes</i>	TUB	99	<i>Aspergillus flavipes</i> NRRL 4578 ()		
FB26	<i>Aspergillus</i> sp.	<i>Aspergillus terreus</i>	TUB	99	<i>Aspergillus terreus</i> NRRL 274 (FJ491706)		
FB27	<i>Syncephalastrum</i> sp.	<i>Syncephalastrum</i> sp.	-	-	-		FNS
FB28	<i>Paecilomyces</i> sp.	<i>Paecilomyces</i> sp.	-	-	-		FNS
FB29	<i>Paecilomyces</i> sp.	<i>Paecilomyces saturatus</i>	TUB	99	<i>Paecilomyces saturatus</i> IFM 57199 (AB539868)		
FB30	<i>Paecilomyces</i> sp.	<i>Paecilomyces saturatus</i>	TUB	99	<i>Paecilomyces saturatus</i> IFM 57199 (AB539868)		
FB31	<i>Paecilomyces</i> sp.	<i>Paecilomyces saturatus</i>	TUB	99	<i>Paecilomyces saturatus</i> IFM 57199 (AB539868)		
FB32	Levedura	Levedura	-	-	-		FNS

*A análise filogenética foi realizada com o algoritmo de *neighbor-joining*, utilizando o modelo de substituição de Kimura 2-parâmetros. Os valores de *bootstrap* foram calculados utilizando 1000 pseudo-réplicas. Sequências de linhagens de referências depositadas em coleções de cultura internacionais ou linhagens tipos (quando possível) foram utilizadas para a montagem das filogenias.

¹Nome atual da espécie de acordo com o *Index Fungorum*.

²Região do genoma utilizada no presente trabalho: ITS: *internal transcribed spacer*; TUB: beta tubulina; TEF: fator de alongação alfa.

³Identidade (em %) da sequência com relação à sequência depositada na base de dados do NCBI – GenBank .

⁴Resultado das buscas na base de dados do NCBI – GenBank. Nome do fungo seguido do código do isolado e do número de acesso da sequência na base de dados (em parênteses).

⁵Fungos com identificação não finalizada. FNS: fungos não sequenciados devidos a problemas na extração ou na amplificação dos genes.

5.2. AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO/INIBIÇÃO DOS ISOLADOS NA PRESENÇA DA TINTA E DE SEUS COMPONENTES.

A velocidade de crescimento em presença do xenobiótico é uma das características desejáveis na aplicação dos fungos em processos de biorremediação, pois permite estudar a tolerância dos fungos aos xenobióticos a serem degradados. Embora a tolerância do fungo ao xenobiótico não seja garantia de sua degradação, ela é uma das condições necessárias para que o fungo possa atuar na presença do composto a ser degradado. Esses testes foram realizados utilizando os isolados e o meio de cultura contendo a tinta e os derivados.

5.2.1. TESTE DE CRESCIMENTO/INIBIÇÃO COM MEIO DE CULTURA ACRESCIDO DE TINTA

Dos 32 fungos testados quanto a capacidade de crescimento/inibição na presença de tinta como única fonte de carbono, apenas 3 fungos destacaram-se, sendo essas cepas de *Fusarium solani* (FB07, FB08, FB23) (Tabela 1). Os fungos que apresentaram maior tolerância cresceram até a concentração de 20% e a partir desta, o crescimento começou a ser inibido (Figura 12). Os fungos *Trichoderma* sp. (FB02), *F. solani*. (FB06, FB19), *Aspergillus* sp. (FB25) e *Syncephalastrum racemosum* (FB24, FB27) não apresentaram crescimento em concentrações superiores a 10% e, os demais fungos foram totalmente inibidos como mostra a Tabela 2.

Figura 12. Teste de crescimento/inibição com fungo o *Fusarium solani* FB23 em diferentes concentrações de tinta

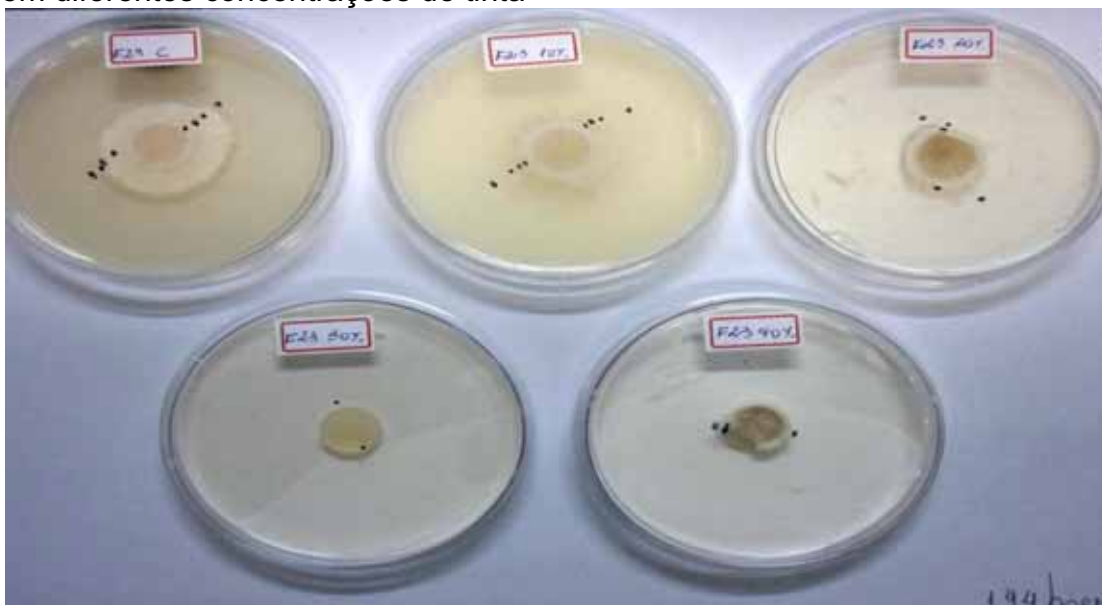


Tabela 2 - Perfil de crescimento/inibição dos isolados na presença de tinta

Código	Identificação	Concentração de Tinta			
		10%	20%	30%	40%
FB01	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	-	-	-	-
FB02	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	++	-	-	-
FB03	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	-	-	-	-
FB04	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	-	-	-	-
FB05	<i>Trichoderma</i> sp.	++	-	-	-
FB06	<i>Fusarium</i> sp.	+++	+++	-	-
FB07	<i>Fusarium solani</i> species complex	+++	+++	-	-
FB08	<i>Fusarium</i> sp.	-	-	-	-
FB09	<i>Aspergillus fresenii</i> .	-	-	-	-
FB10	Levedura negra	-	-	-	-
FB11	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	-	-	-	-
FB12	<i>Aspergillus</i> sp.	-	-	-	-
FB13	<i>Aspergillus</i> sect. Flavi	-	-	-	-
FB14	<i>Aspergillus niger</i>	-	-	-	-
FB15	<i>Talaromyces</i> sp.	-	-	-	-
FB16	<i>Acremonium</i> sp.	-	-	-	-
FB17	<i>Mortierella alpina</i>	-	-	-	-
FB18	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	-	-	-	-
FB19	<i>Fusarium solani</i> species complex	++	-	-	-
FB20	<i>Trichoderma</i> sp.	-	-	-	-
FB21	<i>Trichoderma harzianum</i>	-	-	-	-
FB22	<i>Paecilomyces</i>	-	-	-	-
FB23	<i>Fusarium solani</i> species complex	+++	+++	-	-
FB24	<i>Syncephalastrum</i> sp.	-	-	-	-
FB25	<i>Aspergillus flavipes</i>	++	-	-	-
FB26	<i>Aspergillus terreus</i>	-	-	-	-
FB27	<i>Syncephalastrum</i> sp.	++	-	-	-
FB28	<i>Paecilomyces</i> sp.	-	-	-	-
FB29	<i>Paecilomyces saturatus</i>	-	-	-	-
FB30	<i>Paecilomyces saturatus</i>	-	-	-	-
FB31	<i>Paecilomyces saturatus</i>	+	-	-	-
FB32	Levedura	-	-	-	-

(+++) crescimento bom, crescimento médio (++) e (-) ausência de crescimento.

Os dados de crescimento/inibição do presente trabalho diferem dos encontrados por Bach e Rangel, (2005), que isolaram fungos do gênero *Aspergillus* a partir de fragmentos de filmes de tintas de superfícies internas e externas de diferentes ambientes residenciais e relataram que os fungos apresentaram um bom crescimento em meio de cultura suplementado com 40% de tinta, sugerindo que os organismos fossem capazes de utilizar a tinta como fonte de nutrientes. No entanto, como pode ser observado, os fungos identificados como *F. solani* foram os mais resistentes à tinta e essa diferença no perfil de crescimento/inibição desses microrganismos pode ser explicada, como já citado, pelo tempo de exposição à tinta, as diferentes espécies de fungos, os tipos de biocidas que foram empregados na formulação, e também a resistência aos componentes da tinta.

Com base nos resultados dos testes de crescimento em superfície de meio sólido, foram selecionadas as duas cepas que apresentaram melhor crescimento, a *F. solani* FB07 e *F. solani* FB23, para testes de degradação da tinta por cultivo submerso.

5.2.2. TESTE DE CRESCIMENTO/INIBIÇÃO COM MEIO DE CULTURA ACRESCIDO DE RESINA (metil metacrilato).

Os fungos *Trichoderma* sp. (FB01, 02, 03, 04, 05, 11, 18, 20, 21), *F. solani* (FB06, 07, 19), *S. racemosum* (FB24), *Paecilomyces* sp. (FB28), apresentaram um ótimo crescimento radial (+++) em todas as quatro concentrações testadas tomando toda a placa no período de 144 horas (Tabela 3, Figura 13). Os fungos FB08, FB15, FB17, FB23, FB27, FB29, FB30, foram inibidos parcialmente (++) apresentando crescimento em todas as concentrações, porém o diâmetro de crescimento não atingiu a placa toda. Os demais fungos FB09, FB10, FB12, FB13, FB14, FB16, FB22, FB25, FB26, FB31 e FB32 toleraram até a concentração de 30% e os diâmetros das colônias também não atingiram a placa toda (+) no período de 144 horas (Tabela 3; Figura 13).

Figura 13. Teste de crescimento/inibição com o fungo *T. longibrachiatum* (FB01), em diferentes concentrações na presença de resina

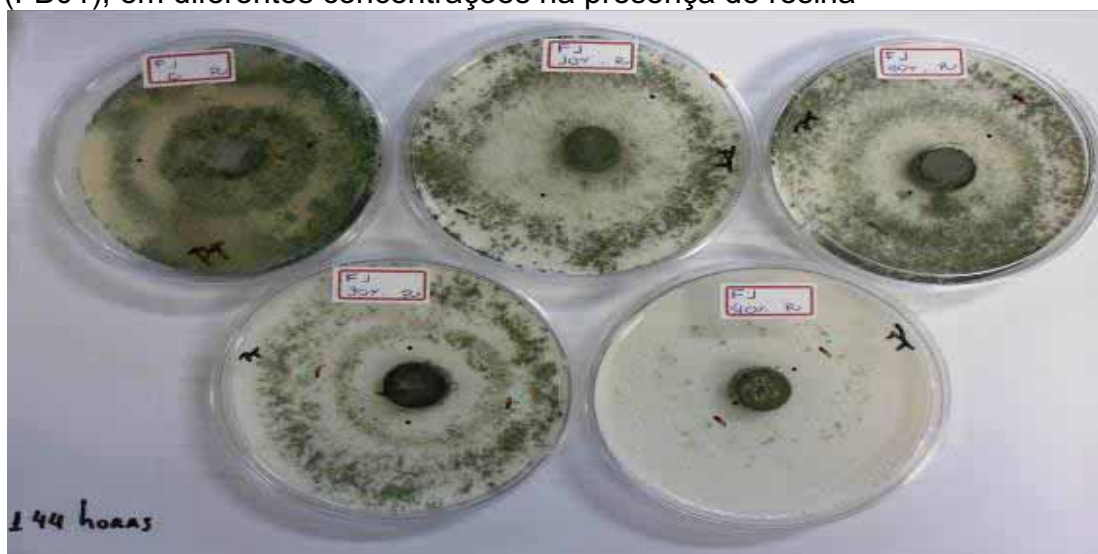


Tabela 3 - Perfil de crescimento/inibição dos isolados na presença de resina

Código	Identificação	Concentração de Resina			
		10%	20%	30%	40%
FB01	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	+++	+++	+++	+++
FB02	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	+++	+++	+++	+++
FB03	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	+++	+++	+++	+++
FB04	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	+++	+++	+++	+++
FB05	<i>Trichoderma</i> sp.	+++	+++	+++	+++
FB06	<i>Fusarium</i> sp.	+++	+++	+++	+++
FB07	<i>Fusarium solani</i> species complex	+++	+++	+++	+++
FB08	<i>Fusarium</i> sp.	++	++	++	++
FB09	<i>Aspergillus fresenii</i> .	+	+	+	-
FB10	Levedura negra	+	+	+	-
FB11	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	+++	+++	+++	+++
FB12	<i>Aspergillus</i> sp.	+	+	+	-
FB13	<i>Aspergillus</i> sect. Flavi	+	+	+	-
FB14	<i>Aspergillus niger</i>	+	+	+	-
FB15	<i>Talaromyces</i> sp.	++	++	++	++
FB16	<i>Acremonium</i> sp.	+	+	+	-
FB17	<i>Mortierella alpina</i>	++	++	++	++
FB18	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	+++	+++	+++	+++
FB19	<i>Fusarium solani</i> species complex	+++	+++	+++	+++
FB20	<i>Trichoderma</i> sp.	+++	+++	+++	+++
FB21	<i>Trichoderma harzianum</i>	+++	+++	+++	+++
FB22	<i>Paecilomyces</i>	+	+	+	-
FB23	<i>Fusarium solani</i> species complex	++	++	++	++
FB24	<i>Syncephalastrum</i> sp.	+++	+++	+++	+++
FB25	<i>Aspergillus flavipes</i>	+	+	+	+
FB26	<i>Aspergillus terreus</i>	+	+	+	-
FB27	<i>Syncephalastrum</i> sp.	++	++	++	++
FB28	<i>Paecilomyces</i> sp.	+++	+++	+++	+++
FB29	<i>Paecilomyces saturatus</i>	++	++	++	++
FB30	<i>Paecilomyces saturatus</i>	++	++	++	++
FB31	<i>Paecilomyces saturatus</i>	+	+	+	-
FB32	Levedura	+	+	+	+

(+++) crescimento ótimo, crescimento médio (++) e (+) pouco crescimento e (-) ausência de crescimento.

Foi observado que a maioria das cepas isoladas foi capaz de utilizar o metil metacrilato como fonte de carbono em todas as concentrações.

Dentre as cepas que apresentaram maior velocidade de crescimento em presença da resina, cinco foram selecionadas para o teste de degradação da por de cultivo submerso, sendo elas *T. longibrachiatum* (FB01), *Fusarium solani* (FB07), *A. niger* (FB14), *S. racemosum* (FB24), *P. saturatus* (FB30).

5.2.3. TESTE DE CRESCIMENTO/INIBIÇÃO COM MEIO DE CULTURA ACRESCIDO DO BIOCIDA METIL ISOTIAZOLINONA (MIT).

Os fungos pertencentes *Trichoderma* sp. (FB01, FB02, FB03, FB04, FB05, FB20, FB21), *Paecilomyces* sp. (FB28, FB29, FB30), *F. solani* (FB06, FB07, FB08), *A. niger* (FB14) foram os que apresentaram maior tolerância (+++) ao metil isotiazolinona e maior velocidade de crescimento radial nas diferentes concentrações testadas (0,1%; 0,2%; 0,4% e 0,8%). Já as cepas FB09, FB10, FB15, FB18, FB22, FB23, FB31, foram parcialmente inibidas (++) e as demais cepas foram totalmente inibidas (-).

De acordo com Block et al., (2001) as isotiazolinonas atuam inibindo o mecanismo de transporte ativo da glicose através das membranas citoplasmática e o metabolismo da glicose (via glicolítica) por oxidação dos grupos tiólicos das proteínas envolvidas nesses processos como a ATPase e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase.

A concentração máxima de metil isotiazolinona permitida para uso em tintas na Europa e no Brasil é de 15 ppm, sendo considerada suficiente para inibir o crescimento microbiano nas tintas (FAIRBANKS, 2008; ANVISA, 2013). Na indústria de tintas, onde as amostras foram coletadas, são utilizados 10 ppm (0,2%) de metil isotiazolinona na formulação das tintas. Nos testes de placa foram testadas concentrações de 5 ppm (0,1%), 10 ppm (0,2%), 20 ppm (0,4%), 40 ppm (0,8%) sendo que os fungos que apresentaram maior tolerância na presença de metil isotiazolinona, foram capazes de crescer até a concentração de 20 ppm (0,4%) (Tabela 4, Figura 14) sendo observada inibição somente em concentração de 40 ppm (0,8%). Isso sugere que as cepas fúngicas resistentes ao metil isotiazolinona foram selecionadas, o que poderia justificar o elevado grau de contaminação e deterioração observadas

nos produtos finais. Devido a não permissão de maiores concentrações de metil isotiazolinona na formulação da tinta, as empresas optam por acrescentar o carbendazim, um fungicida de amplo espectro de ação, que potencializa o efeito do metil isotiazolinona.

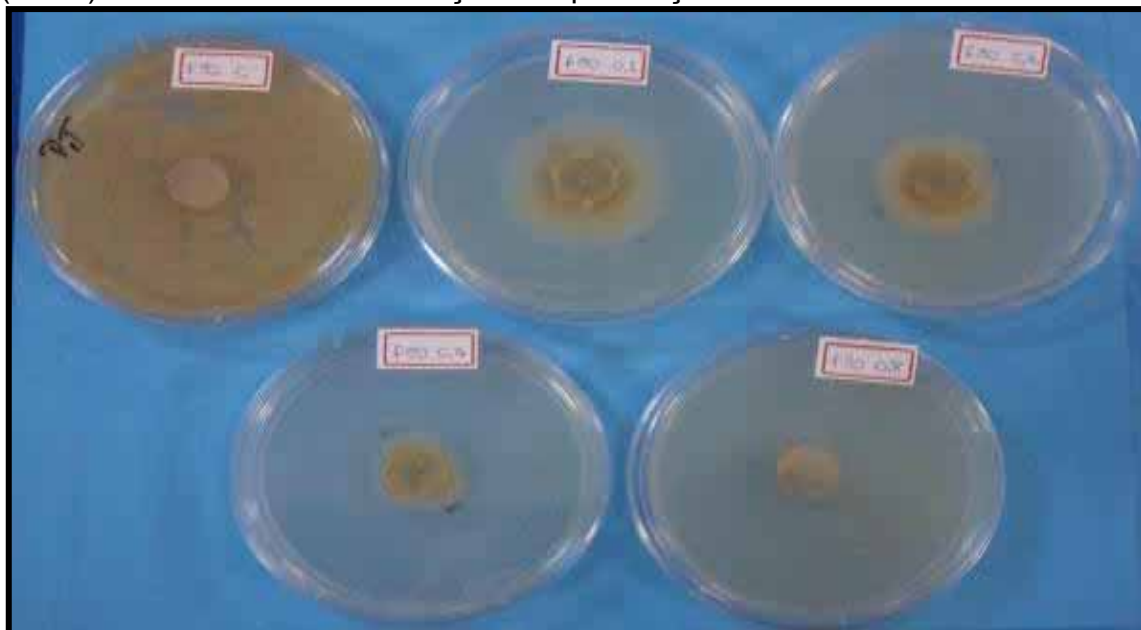
Para os testes de cultivo submerso, foram selecionados 4 fungos, sendo eles: *T. longibrachiatum* (FB01), *F. solani* (FB07), *A. niger* (FB14), *P. saturatus* (FB30).

Tabela 4 - Perfil de crescimento/inibição dos isolados na presença de metil isotiazolinona

Código	Identificação	Concentração de MIT			
		0,1%	0,2%	0,3%	0,4%
FB01	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	+++	+++	+++	-
FB02	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	+++	+++	+++	-
FB03	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	+++	+++	+++	-
FB04	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	+++	+++	+++	-
FB05	<i>Trichoderma</i> sp.	+++	+++	+++	-
FB06	<i>Fusarium</i> sp.	+++	+++	+++	-
FB07	<i>Fusarium solani</i> species complex	+++	+++	+++	-
FB08	<i>Fusarium</i> sp.	+++	+++	+++	-
FB09	<i>Aspergillus fresenii</i> .	++	++	-	-
FB10	Levedura negra	++	++	-	-
FB11	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	+++	+++	+++	-
FB12	<i>Aspergillus</i> sp.	-	-	-	-
FB13	<i>Aspergillus</i> sect. Flavi	-	-	-	-
FB14	<i>Aspergillus niger</i>	+++	+++	+++	+++
FB15	<i>Talaromyces</i> sp.	++	++	-	-
FB16	<i>Acremonium</i> sp.	-	-	-	-
FB17	<i>Mortierella alpina</i>	-	-	-	-
FB18	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	++	-	-	-
FB19	<i>Fusarium solani</i> species complex	-	-	-	-
FB20	<i>Trichoderma</i> sp.	+++	+++	+++	-
FB21	<i>Trichoderma harzianum</i>	+++	+++	+++	-
FB22	<i>Paecilomyces</i>	++	++	-	-
FB23	<i>Fusarium solani</i> species complex	++	++	++	-
FB24	<i>Syncephalastrum</i> sp.	-	-	-	-
FB25	<i>Aspergillus flavipes</i>	-	-	-	-
FB26	<i>Aspergillus terreus</i>	-	-	-	-
FB27	<i>Syncephalastrum</i> sp.	-	-	-	-
FB28	<i>Paecilomyces</i> sp.	+++	+++	+++	-
FB29	<i>Paecilomyces saturatus</i>	+++	+++	+++	-
FB30	<i>Paecilomyces saturatus</i>	+++	+++	+++	-
FB31	<i>Paecilomyces saturatus</i>	++	++	-	-
FB32	Levedura	-	-	-	-

(+++) crescimento bom, crescimento médio (++) e (-) ausência de crescimento.

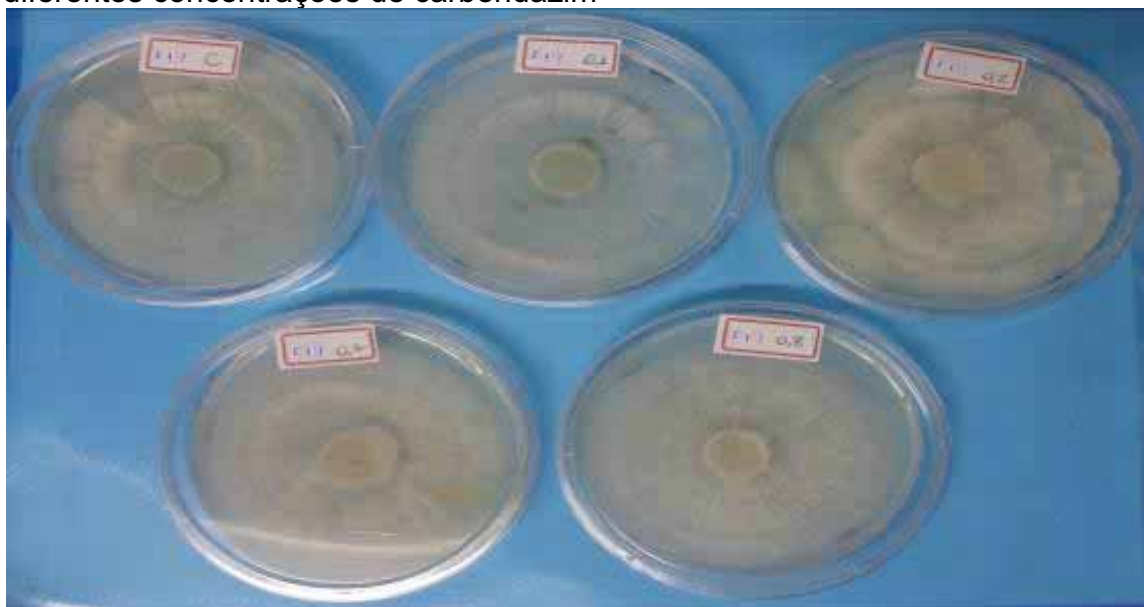
Figura 14. Teste de crescimento/inibição com o fungo *Paecilomyces saturatus* (FB30) em diferentes concentrações na presença de metil isotiazolinona



5.2.4. TESTE DE CRESCIMENTO/INIBIÇÃO COM MEIO DE CULTURA ACRESCIDO DO BIOCIDA CARBENDAZIM.

Dentre os fungos testados quanto à capacidade de crescer na presença de carbendazim, apenas as cepas *S. racemosium* (FB24) e *F. Solani* (FB19) (Tabela 5, Figura 15) apresentaram crescimento, sendo os demais fungos totalmente inibidos.

Figura 15. Teste de crescimento/inibição do fungo *F. solani* (FB19) em diferentes concentrações de carbendazim



O fato dos isolados apresentarem grande sensibilidade ao fungicida carbendazim pode ser explicado pelo seu mecanismo de ação. O carbendazim, assim como todos os outros benzimidazóis, atuam nos fungos interferindo na divisão celular inibindo a formação de fuso mitótico paralisando a mitose na metáfase. Atuam também interrompendo a formação e o funcionamento dos microtúbulos (KISO et al., 2004). Quando o fungicida entra em contato com as subunidades proteicas, chamadas de α e β tubulinas que são as subunidades dos microtubulos, inibem a polimerização e comprometem o citoesqueleto dos eucariotos (DAVIDSE, 1982; LEUROUX, 2003). A ausência dos microtúbulos citoplasmáticos interfere diretamente no transporte de material secretório para a periferia da célula e inibe a síntese da parede celular dos fungos (KISO et al., 2004).

Segundo Osmani e Oakle, (1991) a intensidade da atividade do fungicida nos organismos é determinada pela afinidade do benzimidazol pela tubulina, assim, quanto maior essa ligação do benzimidazol com a tubulina, mais sensível será o organismo ao fungicida.

Com base no exposto, duas cepas que apresentaram crescimento, *S. racemosium* (FB24) e *Fusarium solani* (FB19) foram selecionadas para realizar teste de degradação do carbendazim por cultivo submerso.

Tabela 5 - Perfil de crescimento/inibição dos isolados na presença carbendazim

Código	Identificação	Concentração de carbendazim			
		0,1%	0,2%	0,3%	0,4%
FB01	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	-	-	-	-
FB02	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	-	-	-	-
FB03	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	-	-	-	-
FB04	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	-	-	-	-
FB05	<i>Trichoderma</i> sp.	-	-	-	-
FB06	<i>Fusarium</i> sp.	-	-	-	-
FB07	<i>Fusarium solani</i> species complex	-	-	-	-
FB08	<i>Fusarium</i> sp.	-	-	-	-
FB09	<i>Aspergillus fresenii</i> .	-	-	-	-
FB10	Levedura negra	-	-	-	-
FB11	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	-	-	-	-
FB12	<i>Aspergillus</i> sp.	-	-	-	-
FB13	<i>Aspergillus</i> sect. Flavi	-	-	-	-
FB14	<i>Aspergillus niger</i>	-	-	-	-
FB15	<i>Talaromyces</i> sp.	-	-	-	-
FB16	<i>Acremonium</i> sp.	-	-	-	-
FB17	<i>Mortierella alpina</i>	-	-	-	-
FB18	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	-	-	-	-
FB19	<i>Fusarium solani</i> species complex	+++	+++	+++	+++
FB20	<i>Trichoderma</i> sp.	-	-	-	-
FB21	<i>Trichoderma harzianum</i>	-	-	-	-
FB22	<i>Paecilomyces</i>	-	-	-	-
FB23	<i>Fusarium solani</i> species complex	-	-	-	-
FB24	<i>Syncephalastrum</i> sp.	+++	+++	+++	+++
FB25	<i>Aspergillus flavipes</i>	-	-	-	-
FB26	<i>Aspergillus terreus</i>	-	-	-	-
FB27	<i>Syncephalastrum</i> sp.	-	-	-	-
FB28	<i>Paecilomyces</i> sp.	-	-	-	-
FB29	<i>Paecilomyces saturatus</i>	-	-	-	-
FB30	<i>Paecilomyces saturatus</i>	-	-	-	-
FB31	<i>Paecilomyces saturatus</i>	-	-	-	-
FB32	Levedura	-	-	-	-

(+++) crescimento bom, crescimento médio (++) e (-) ausência de crescimento.

A baixa quantidade de fungos com resistência ao carbendazim pode estar relacionada ao fato de que a tinta deteriorada utilizada para o isolamento continha atrazina como biocida e não carbendazim como seria indicado.

5.2.5. TESTE DE CRESCIMENTO/INIBIÇÃO COM MEIO DE CULTURA ACRESCIDO DE ATRAZINA.

A atrazina é um herbicida que inibe a fotossíntese e tem sido usada em tintas com o intuito de inibir a proliferação de algas nas superfícies externas. No teste de crescimento/inibição com adição de atrazina ao meio de cultura, os fungos *F. solani* (FB06, FB07, FB08, FB19, FB23), *Trichoderma* sp. (FB01, FB02, FB03, FB04, FB05, FB11, FB18, FB20, FB21), *Aspergillus* sp. (FB12, FB13, FB25, FB26), *P. variotii* (FB22, FB28, FB29, FB30), foram os que apresentaram maior tolerância (+++) e maior velocidade de crescimento radial

nas diferentes concentrações testadas (0,1%; 0,2%; 0,4% e 0,8%), mostrando que essas cepas conseguem utilizar a atrazina como fonte de carbono e nitrogênio (Tabela 6). Esses dados se assemelham aos encontrados por Colla et al., (2007) que isolou 15 cepas pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Trichoderma* a partir de solo contaminado com atrazina utilizando meio PDA acrescido de 50 ppm de atrazina. Entretanto, esses os dados diferem dos encontrados por Bordjiba et al. (2001) que mostram a inibição do crescimento de fungos do gênero *Trichoderma* com apenas 5 ppm de atrazina, enquanto que o crescimento dos gêneros *Absidia* e *Fusarium* foram estimulados. Esses dados sugerem uma variação na sensibilidade ao herbicida em função da espécie do fungo, pois nesse trabalho algumas cepas isoladas pertencentes aos gêneros *Aspergillus* (FB09, FB14), *Syncephalastrum* (FB24, FB27), *Penicillium* (FB15), *Acremonium* (FB16) e um fungo ainda não identificado (FB17) foram parcialmente inibidos (++) pela atrazina, sendo capazes de crescer apenas em baixas concentrações do composto (10ppm). As leveduras *Rhodotorula* e *Negra* foram totalmente inibidas (-) na presença de atrazina.

Tabela 6 - Perfil de crescimento/inibição dos isolados na presença atrazina

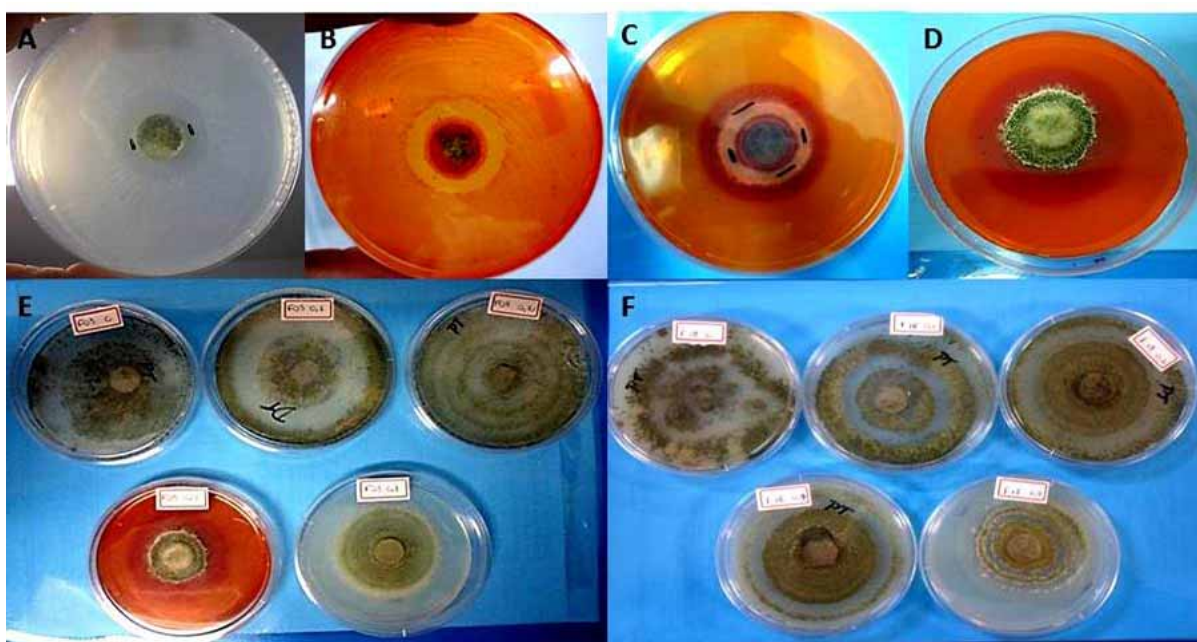
Código	Identificação	Concentração de atrazina			
		0,1%	0,2%	0,3%	0,4%
FB01	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	+++	+++	+++	+++
FB02	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	+++	+++	+++	+++
FB03	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	+++	+++	+++	+++
FB04	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	+++	+++	+++	+++
FB05	<i>Trichoderma</i> sp.	+++	+++	+++	+++
FB06	<i>Fusarium</i> sp.	+++	+++	+++	+++
FB07	<i>Fusarium solani</i> species complex	+++	+++	+++	+++
FB08	<i>Fusarium</i> sp.	+++	+++	+++	+++
FB09	<i>Aspergillus fresenii</i> .	++	++	-	-
FB10	Levedura negra	-	-	-	-
FB11	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	+++	+++	+++	+++
FB12	<i>Aspergillus</i> sp.	+++	+++	+++	+++
FB13	<i>Aspergillus</i> sect. Flavi	+++	+++	+++	+++
FB14	<i>Aspergillus niger</i>	+++	+++	+++	+++
FB15	<i>Talaromyces</i> sp.	+++	+++	+++	+++
FB16	<i>Acremonium</i> sp.	+++	+++	+++	+++
FB17	<i>Mortierella alpina</i>	+++	+++	+++	+++
FB18	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	+++	+++	+++	+++
FB19	<i>Fusarium solani</i> species complex	+++	+++	+++	+++
FB20	<i>Trichoderma</i> sp.	+++	+++	+++	+++
FB21	<i>Trichoderma harzianum</i>	+++	+++	+++	+++
FB22	<i>Paecilomyces</i>	+++	+++	+++	+++
FB23	<i>Fusarium solani</i> species complex	+++	+++	+++	+++
FB24	<i>Syncephalastrum</i> sp.	+++	+++	+++	+++
FB25	<i>Aspergillus flavipes</i>	+++	+++	+++	+++
FB26	<i>Aspergillus terreus</i>	+++	+++	+++	+++
FB27	<i>Syncephalastrum</i> sp.	-	-	-	-
FB28	<i>Paecilomyces</i> sp.	+++	+++	+++	+++
FB29	<i>Paecilomyces saturatus</i>	+++	+++	+++	+++
FB30	<i>Paecilomyces saturatus</i>	+++	+++	+++	+++
FB31	<i>Paecilomyces saturatus</i>	+++	+++	+++	+++
FB32	Levedura	-	-	-	-

(+++) crescimento bom, crescimento médio (+ +) e (-) ausência de crescimento

Foi observado nas primeiras 24h de crescimento de todos os fungos em meio contendo 0,4% atrazina, o aparecimento de um halo ao redor das colônias (Figura 16.a). Para avaliar se o halo era resultante de acidificação do meio, o indicador de pH vermelho-metila, foi gotejado sobre o meio de cultura (Figura 16. b) e a placa mantida em B.O.D a 28°C por 24 h.

A coloração vermelha escuro do halo após a incubação, de acordo com a figura 16 c (48h de incubação;) e 16 d (72h de incubação) confirmou que o halo era resultante da acidificação do meio.

Figura 16. Teste de crescimento/inibição com adição de atrazina e formação de halo



O vermelho-metila, em pH ácido (4,2) apresenta uma coloração vermelha e, em pH 6,3, amarelo. Desse modo, foi possível constatar que a substância liberada pelo fungo durante seu crescimento acidificava o meio.

5.3. BIODEGRADAÇÃO DOS COMPONENTES DA TINTAS EM MEIO LÍQUIDO

Após o teste de crescimento/inibição dos fungos na presença dos componentes da tinta em meio sólido, os fungos que apresentaram maior

crescimento em um menor tempo e na maior concentração do composto testado, foram selecionados para os testes de biodegradação em meio líquido.

Outro fator que foi levado em consideração na seleção dos fungos foi o perfil de resistência que eles apresentaram frente aos diferentes compostos testados. Dessa forma, procurou-se selecionar os fungos que apresentaram alta resistência a mais de um composto estudado (Tabela 7).

Tabela 7. Fungos selecionados para o teste de biodegradação em meio líquido

Compostos Avaliados	Fungos Selecionados
Carbendazim (MBC)	<i>Syncephalastrum racemosum</i> FB24, <i>Fusarium solani</i> FB19
Metil isotiazolinona (MIT)	<i>Trichoderma longibrachiatum</i> FB01, <i>Fusarium solani</i> FB07, <i>Aspergillus nigre</i> FB14, <i>Paecilomyces variotii</i> FB30
Metil metacrilato (MMA)	<i>Trichoderma longibrachiatum</i> FB01, <i>Fusarium solani</i> FB07, <i>Aspergillus nigre</i> FB14, <i>Paecilomyces saturatus</i> FB30, <i>Syncephalastrum racemosum</i> FB24

5.4. BIODEGRADAÇÃO DO METIL ISOTIAZOLINONA (MIT) EM MEIO LÍQUIDO

Para os testes de biodegradação de MIT foram selecionados *T. longibrachiatum* FB01, *F. solani* FB07, *A. niger* FB14, *P. saturatus* FB30 dentre os 32 previamente estudados, sendo esses, os que apresentaram maior crescimento na presença de MIT no teste crescimento/inibição em meio sólido em placa de Petri. Para cada isolado, realizou-se cultivo submerso durante 336h (14 dias), retirando amostras em intervalos de 0, 48, 168 e 336 horas. A quantificação do biocida no meio de cultivo foi feita por HPLC, tomando por referência o cromatograma padrão para o composto puro (Figura 17 a) e de amostras do meio de cultura contendo padrão (Figura 17 b). Foi utilizado como controle abiótico o meio de cultivo sem o inóculo do fungo (Figura 17 b). O

crescimento dos fungos foi avaliado pela biomassa seca, tendo como controle a biomassa produzida no meio sem o biocida.

Dos quatro fungos estudados em cultivo em meio líquido na presença do MIT, o *T. longibrachiatum* FB01, *F. solani* FB07, *A. niger* FB14 apresentaram crescimento, enquanto que o fungo *P. saturatus* FB30 não foi capaz de crescer nesse meio, apesar de ter se desenvolvido no meio sólido na presença do biocida (Figuras 18 a, b, c).

Figura 17. Perfil cromatográfico da solução padrão de MIT. a) cromatograma do padrão analítico de MIT de 10ppm; b) meio de cultura acrescido de 10ppm de padrão de MIT

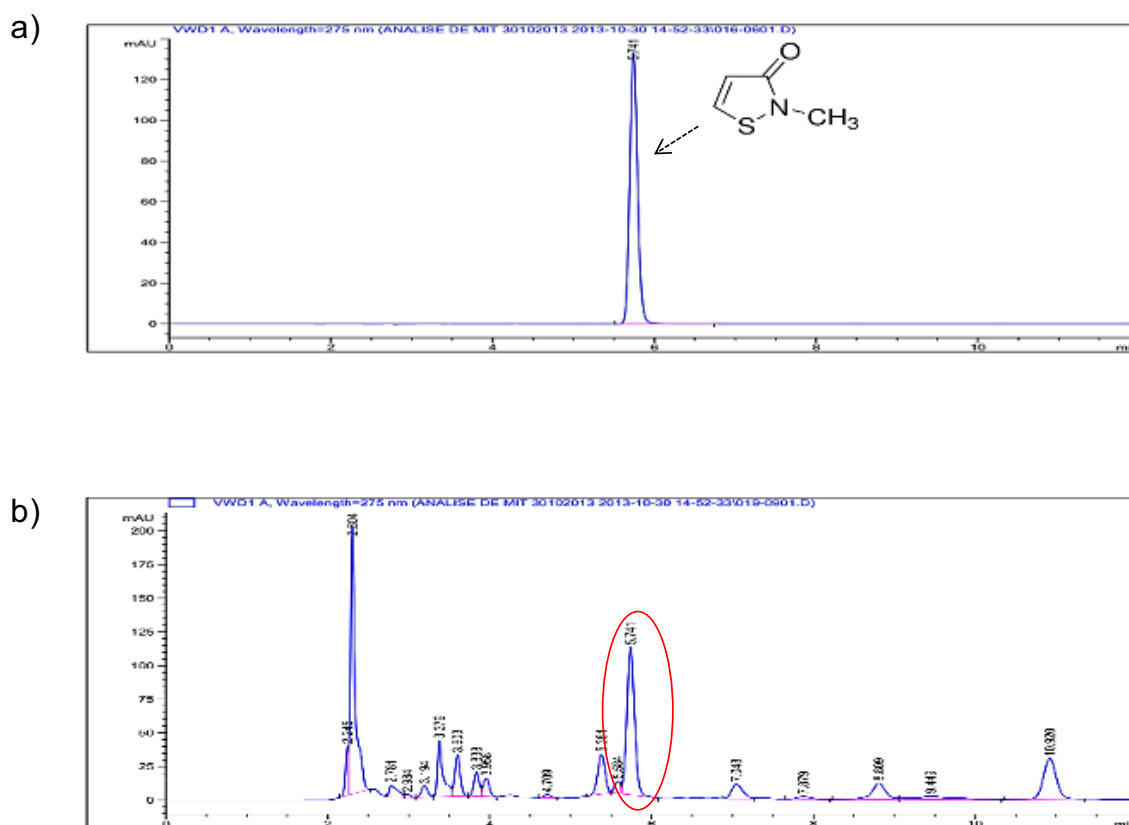


Figura 18. Perfis cromatográficos do MIT após o cultivo dos fungos por 48 horas (a, b, c) e do controle abiótico (d)

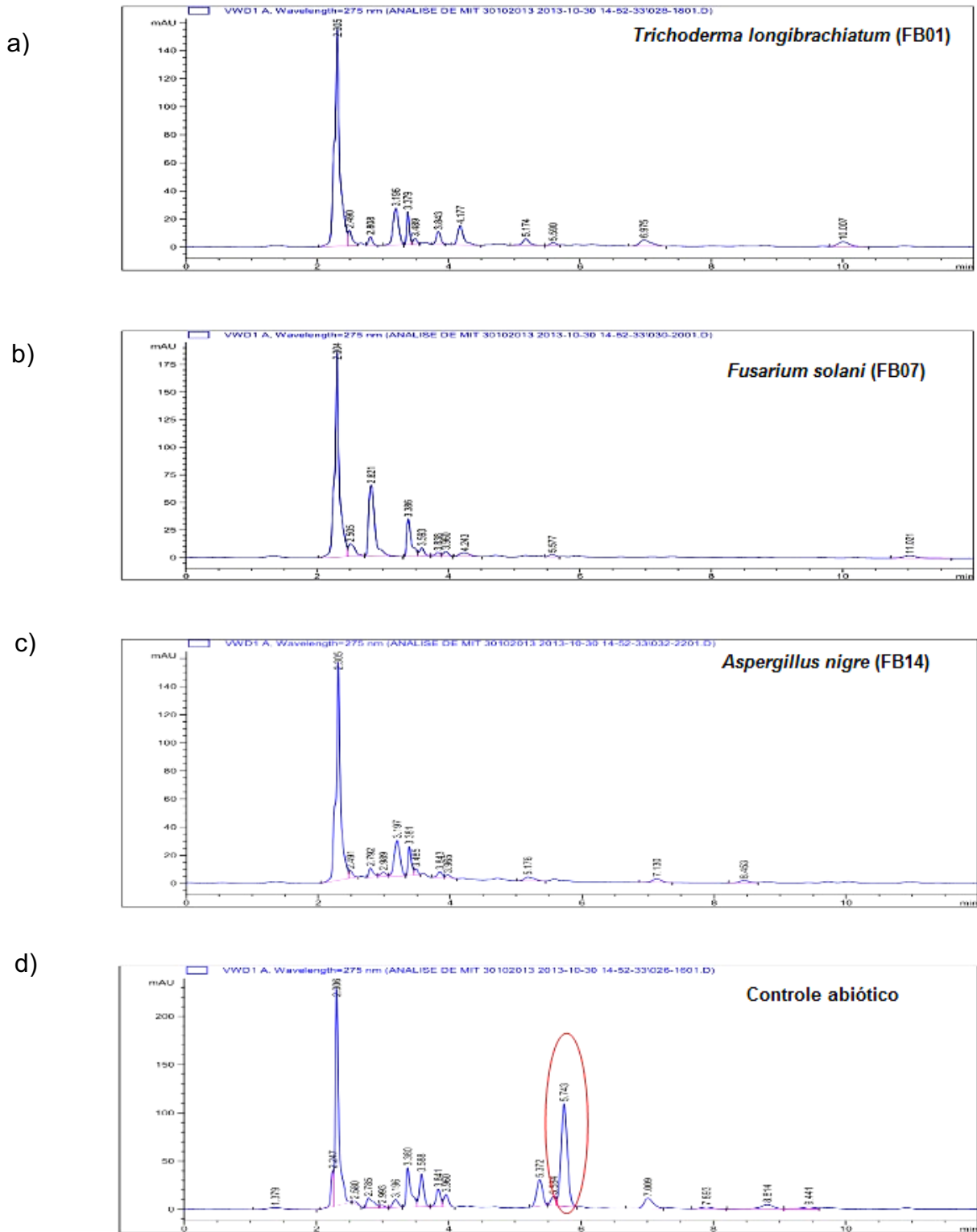
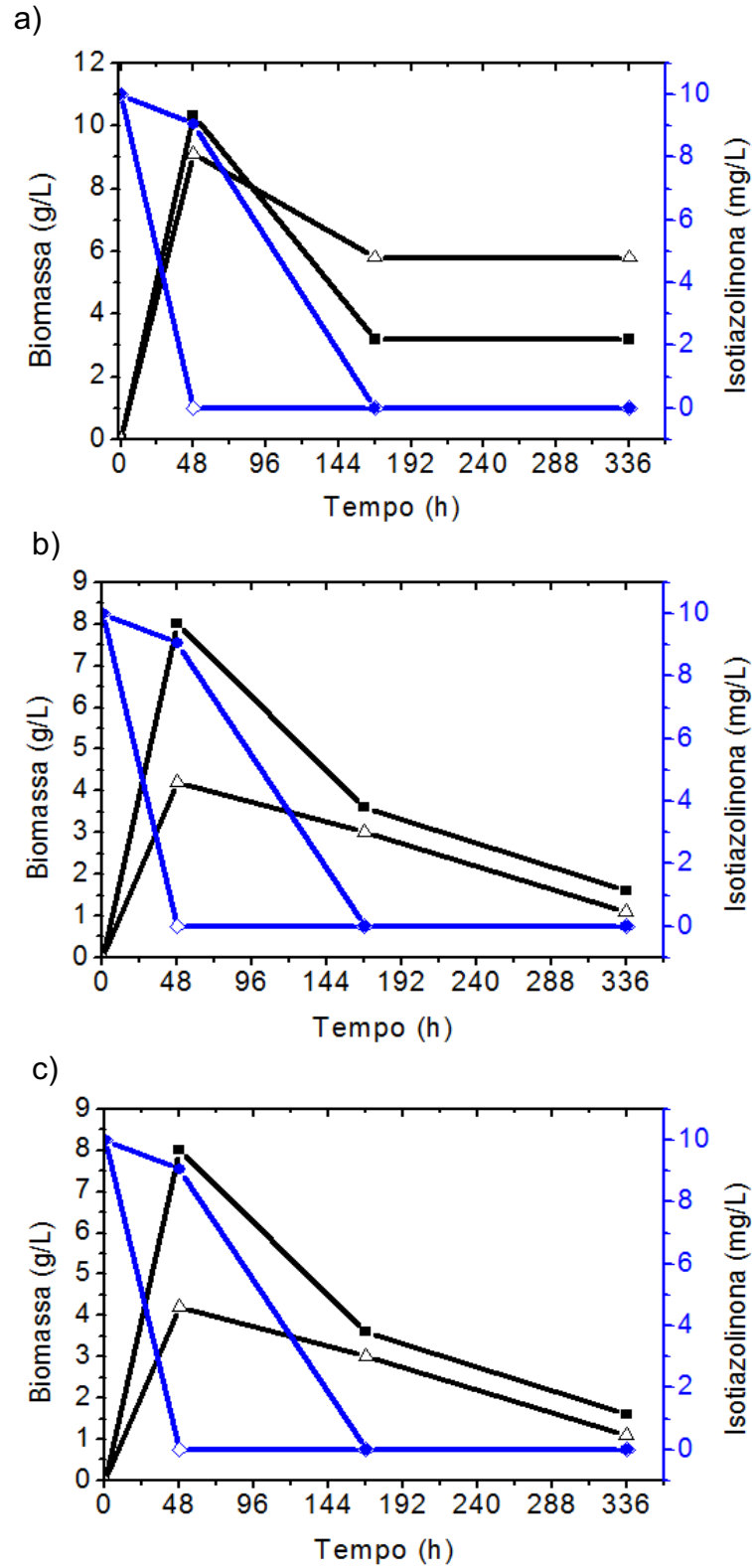


Figura 19. Perfis de crescimento dos fungos e degradação do MIT: (a) *T.longibrachiatum*. FB01; (b) *F.solani* FB07; (c) *A. niger*. FB14. ■=biomassa no meio controle sem o MIT, Δ= biomassa no meio contendo 10ppm de MIT; ●= concentração de MIT no meio controle abiótico; ◇= concentração de MIT no meio inoculado com o fungo.

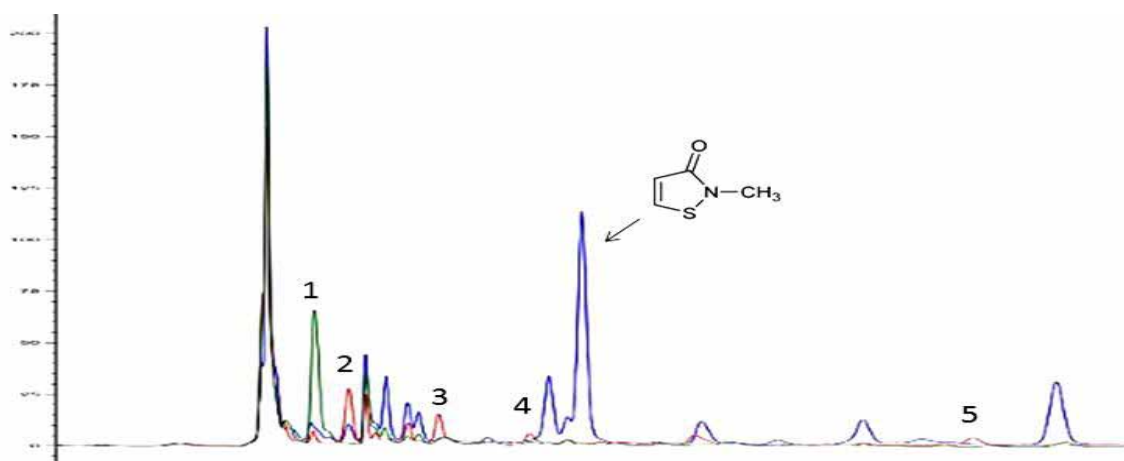


Todos os fungos foram capazes de crescer na presença do MIT, embora, quando comparado com os controles bióticos (meio contendo glicose + fungo), o crescimento das cepas *F. solani* FB07 e *A. niger* FB14 foi menor, mas não houve diferença para o fungo *T. Longibrachiatum* FB01.

Com base nos dados cromatográficos (Figuras 17, 18 e 19) o MIT foi 100% degradado pelos fungos em 48 horas, correspondendo ao período em que os fungos apresentaram a fase de aceleração do crescimento micelial. Os cromatogramas das amostras dos meios abióticos mostram que nesse período o MIT sofreu degradação espontânea de somente 3,5%. Essa degradação espontânea atingiu 100% somente após 168 h (pico referente o MIT no tempo de retenção 5,74 minutos, Figura 19).

Nos cromatogramas das amostras dos meios de cultivo dos fungos *T. longibrachiatum* FB01 e *F. solani* FB07 (Figura 18, a, b, c), foram observados picos referentes a possíveis metabólitos, derivados da degradação do MIT. No cromatograma do *F. solani* FB07 um pico (Nº 1) no tempo eluição de 2,82 minutos representado em linha verde. No cromatograma referente ao meio de cultivo de *T. longibrachiatum* FB01, apareceram quatro picos (Nº 2, 3, 4 e 5) representados em linha vermelha. Foi feita uma sobreposição dos cromatogramas (overlay) dos meios de cultivo dos fungos com o meio de cultura no tempo zero (não inoculado) evidenciando a degradação do MIT e o surgimento de picos como prováveis metabólitos (Figura 20).

Figura 20. Overlay dos cromatogramas de amostras de dos meios de cultivo dos fungos *T. longibrachiatum* FB01, *F. solani* FB07 e meio de cultura no tempo zero de fermentação. azul= meio de cultura no tempo zero contendo MIT, verde= meios de cultivo de *F. solani* FB07, vermelho = *T. longibrachiatum* FB01



Para confirmar o tempo de degradação do MIT e verificar o tempo de formação dos supostos metabólitos, os fungos foram submetidos novamente ao cultivo em meio líquido na presença do MIT, nas mesmas condições do experimento anterior, entretanto o período de incubação foi de sete dias, realizando-se retiradas de amostras a cada 24 horas. Neste experimento também foi monitorado a biomassa fúngica e o pH das amostras e a degradação do MIT.

A Figura 21 (a, b, c) demonstra o perfil de crescimento dos fungos na presença do composto, assim como a taxa de degradação e o pH das amostras de cada fungo.

Como pode-se observar na Figura 21 (a, b, c) o MIT foi 100% degradado quando na presença dos fungos em 24 horas, enquanto que no meio de cultivo controle contendo apenas MIT (controle abiótico) houve degradação espontânea de somente 0,5%, sendo esta taxa menor do que a encontrada no experimento anterior.

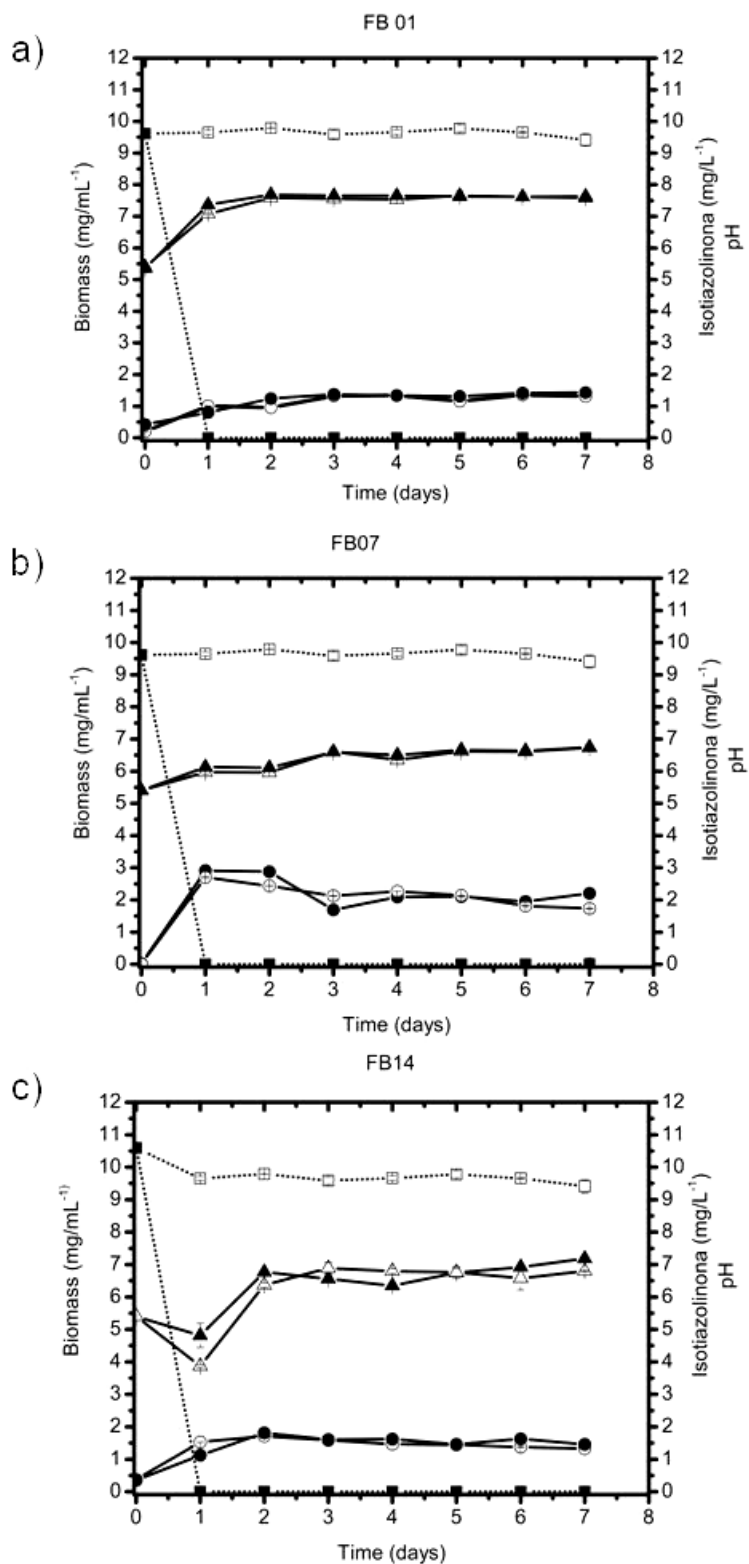
De acordo com Edge et al., (2001), a degradação do MIT por reações fotoquímicas ocorre pela abertura do anel a partir da ligação nitrogênio-enxofre, seguido de hidrólise e oxidação constante, produzindo enxofre elementar, cloridrato de metilamina, ácido malônico, ácidos carboxílicos de cadeia curta, e dióxido de carbono. Até o presente momento não se tem relatos na literatura sobre rotas metabólicas de degradação deste composto por microrganismos, mas baseando-se na sua estrutura, sugere-se que os principais metabólitos sejam ácidos orgânicos de cadeias curtas.

Os extratos obtidos do cultivo em meio líquido foram analisados em HPLC e, observou-se o aparecimento de picos cromatográficos que sugeriram novamente serem possíveis metabólitos derivados da degradação do MIT. Entretanto, esses picos apresentaram baixa intensidade, podendo esta ser justificada pelo comprimento de onda utilizado no método analítico (275 nm) que é o ideal para a detecção do MIT, mas não para análise e identificação de ácidos orgânicos.

De acordo com Meyer, (2010) os ácidos orgânicos são detectáveis em HPLC com detector UV - VIS no comprimento de onda 200 a 210 nm, entretanto nesse comprimento de onda vários compostos são absorvidos, diminuindo assim a eficiência do método.

Figura 21. Crescimento fúngico em meio líquido na presença de MIT.

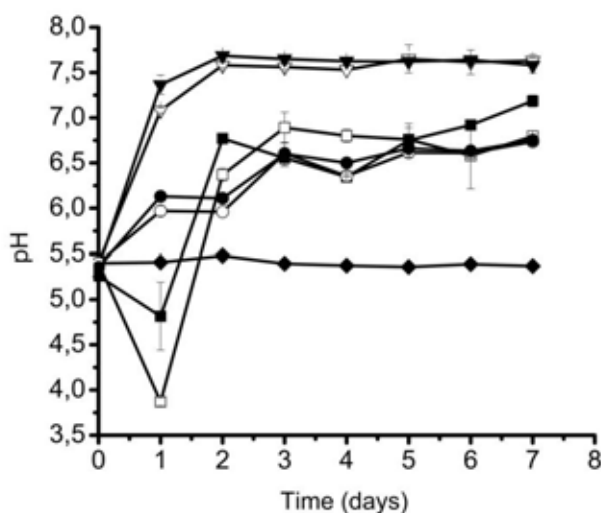
a) *T. longibrachiatum* (FB01), b) *F. solani* (FB07), c) *A. niger* (FB014). □= concentração de MIT no meio (controle abiótico); ■= concentração de MIT no meio inoculado com o fungo; Δ= pH do meio contendo MIT inoculado com fungo; ▲= pH do controle abiótico; ●= biomassa no meio controle sem MIT; ○= biomassa no meio contendo 10 ppm de MIT.



Com base na biomassa, observou-se que todos os fungos apresentaram maior crescimento linear até 48h de cultivo (Figura 21) que coincidiu com a degradação completa do MIT, sugerindo que esses fungos possam estar utilizando os metabólitos da degradação como fonte de carbono ou nitrogênio no seu metabolismo, pois neste período poucos picos cromatográficos (metabólitos) foram observados.

No estudo do pH das amostras cada fungo apresentou um perfil muito diferente, isso já era esperado uma vez que todos são pertencentes a gêneros e espécies distintos. No pH das amostras dos fungos *T. longibrachiatum* FB01, *F. solani* FB07 após a degradação do MIT houve uma pequena acidificação, quando comparados com seus controles bióticos. Uma diferença maior de pH foi encontrada nas amostras do fungo *A. niger* FB14 na presença do composto nas primeiras 24h e, quando comparado com seu controle biótico, essa diferença chegou a 1,22 unidades de pH (Figura 21 c, Figura 22). Essa acidificação pode ser explicada pela presença de metabólitos de caráter ácido, oriundos da degradação do MIT. O pH do meio contendo MIT sem inóculo fúngico (controle abiótico) manteve-se estável ao longo do período de cultivo.

Figura 22. pH das amostras de cultivo em meio líquido. □= pH do meio de cultivo do fungo *A. niger* FB14 na presença de MIT, ■= pH do meio de cultivo do fungo *A. niger* FB14 na ausência de MIT, △= pH do meio de cultivo do fungo *T. Longibrachiatum* FB01 na presença de MIT, ▲= pH do meio de cultivo do fungo *A. niger* FB14 na ausência de MIT, ○= pH do meio de cultivo do fungo *F. solani* FB07 na presença de MIT, ●= pH do meio de cultivo do fungo *F. solani* FB07 na ausência de MIT, ◆= pH do meio de cultivo contendo MIT (abiótico).



Para identificar quais ácidos foram produzidos após a degradação do MIT, um novo cultivo em meio líquido foi feito. Os fungos foram cultivados durante 24 horas nas mesmas condições dos experimentos anteriores, entretanto a cada duas horas amostras foram retiradas, processadas e analisadas imediatamente em HPLC para verificar a porcentagem de degradação e posteriormente essas amostras foram injetadas em um cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massas para identificação dos metabólitos.

A cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) é a primeira escolha para análise de metabólitos de moléculas pequenas em particular de metabólitos primários, tais como ácidos orgânicos e aminoácidos. Essa preferência decorre das significativas vantagens oferecidas por GC-MS, como a alta sensibilidade de análise de identificação de compostos sem a necessidade de ser ter um padrão analítico, pois estes são equipados com bibliotecas espectrais, que permite à comparação direta dos resultados obtidos com os dados da biblioteca, facilitando assim a identificação de compostos desconhecidos (WAJNER et al., 2009).

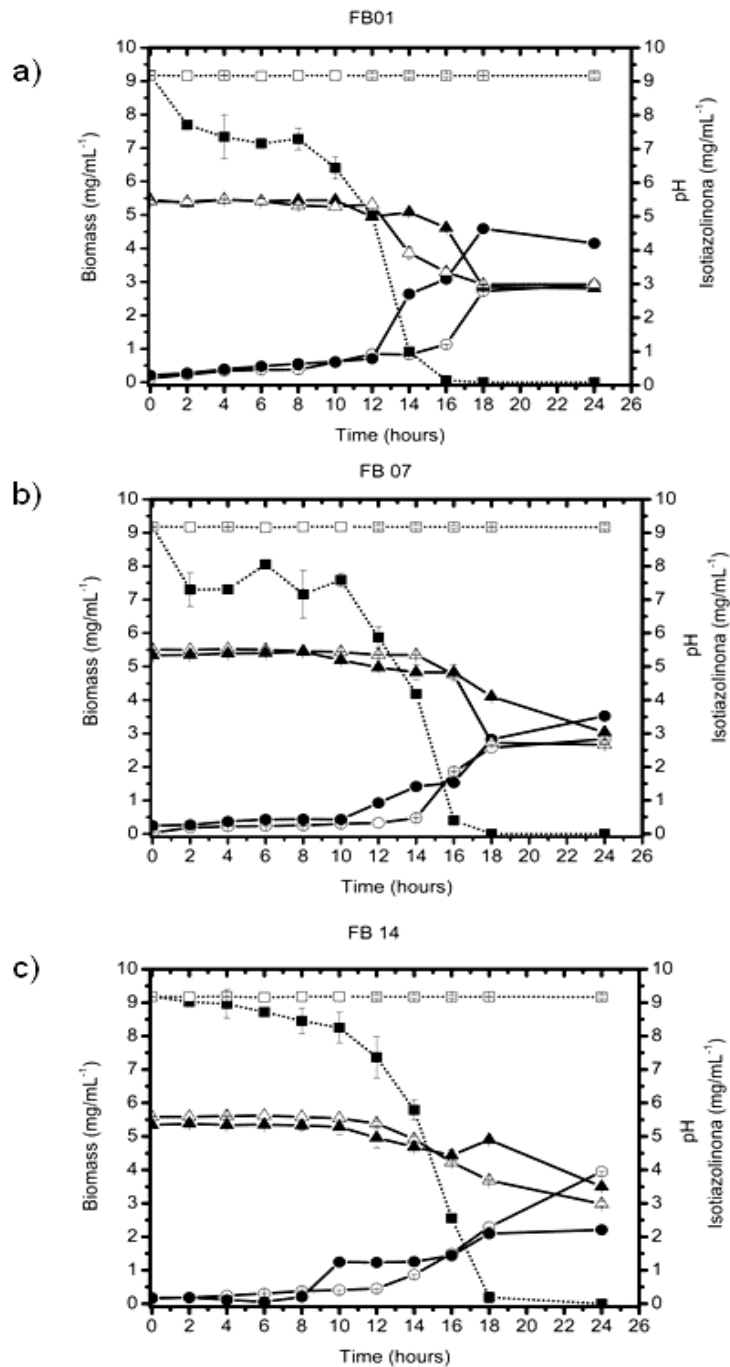
Devido a disponibilidade de alguns padrões analíticos de ácidos orgânicos disponíveis no laboratório, soluções padrão de ácidos acético, butírico, malônico, propiônico e láctico foram preparadas na concentração de 10 mg/L^{-1} e injetadas no GC-MS para monitorar o tempo de retenção, o íon molecular (m/z) de cada composto e os fragmentos gerados que, posteriormente foram comparados com a biblioteca espectral afim de confirmar a identidade desses compostos.

Como pode ser observado na Figura 23 (a, b) a degradação do MIT na presença dos fungos *T. longibrachiatum* FB01, *F. solani* FB07 iniciou-se na décima segunda hora de cultivo enquanto que a degradação na presença do fungo *A. niger* FB14 iniciou-se na décima hora.

Nas amostras do fungo *A. niger* FB14 durante a degradação do MIT foram identificados os seguintes ácidos: ácido malônico, láctico, acético, ácido 2-oxobutírico, ácido metoxiacético. Nas amostras do controle biótico, foi detectado apenas o ácido acético, ou seja, o fungo *A. niger* FB14 pode ter produzido esse ácido em seu metabolismo. Como não foi feita a quantificação destes metabólitos, não é possível saber se o ácido acético presente na

amostra após a degradação do MIT é proveniente do metabolismo fúngico, da degradação ou de ambos.

Figura 23. Crescimento fúngico em meio líquido na presença de MIT a) *T. longibrachiatum* (FB01), b) *F. solani* (FB07), c) *A. niger* (FB014). □= concentração de MIT no meio (controle abiótico); ■= concentração de MIT no meio inoculado com o fungo; △= pH do meio contendo MIT inoculado com fungo; ▲= pH do controle abiótico; ●= biomassa no meio controle sem MIT; ○= biomassa no meio contendo 10 ppm de MIT.



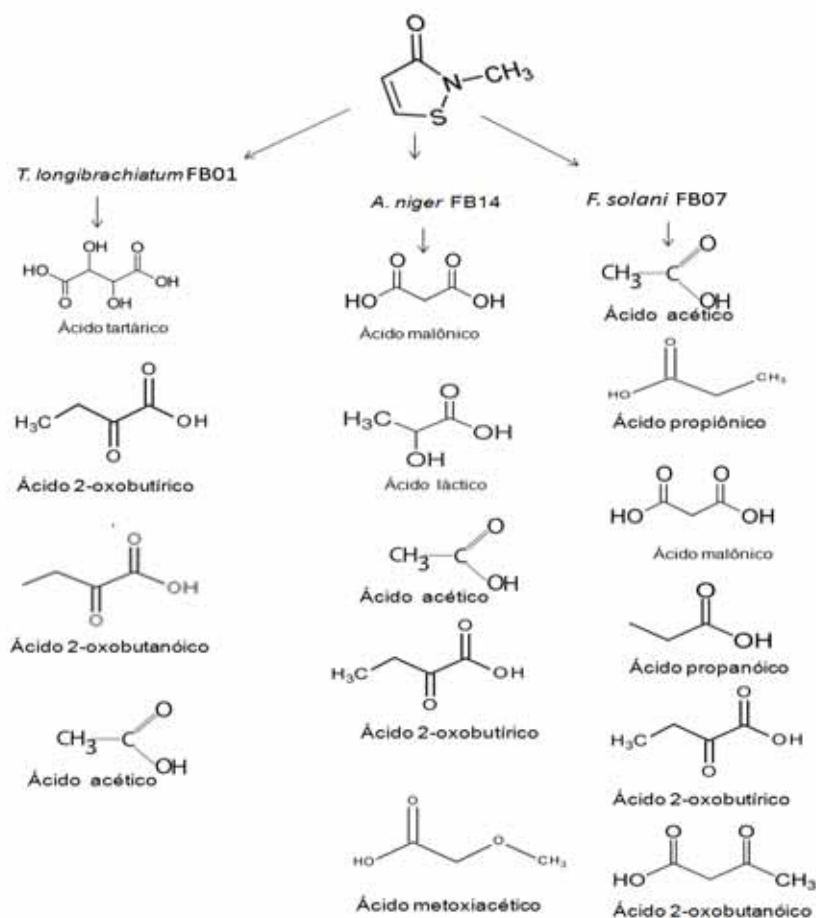
De acordo com Pastore et al., (2011) o fungo *A. niger* FB14 é um bom produtor de ácido orgânicos, dentre eles destaca-se a produção do ácido cítrico, entretanto este não foi detectado nas amostras analisadas.

Nas amostras do cultivo do fungo *F.solani* FB07 durante a degradação do MIT foi observado e identificado o ácido acético, ácido propiônico, ácido malônico, ácido propanóico, ácido 2-oxobutírico, ácido 2-oxobutanóico e no controle biótico foi detectado a presença de álcool isopropílico e ácido acético.

Os metabólitos identificados a partir da degradação do MIT na presença do fungo *T. Longibrachiatum* FB01 foram os ácidos tartárico, acético, 2-oxobutírico, 2-oxobutanóico e nos controles bióticos foram detectados o ácido acético e álcool isopropílico.

Como pode ser observado na Figura 24, cada fungo apresentou diferentes metabólitos após a degradação do MIT, entretanto, os ácidos acético e 2-oxobutírico foram comuns para todos os fungos testados.

Figura 24. Metabólitos identificados por GC-MS após a degradação do MIT



Tem sido reportado na literatura que, embora o custo de tratamento biológico para degradação de xenobióticos seja menor comparado às técnicas fotoquímicas, oxidativas, incineração e adsorção em resina, a alta toxicidade de alguns desses compostos para fungos e bactérias é um fator limitante do processo (JERSCHOW et al., 2001; TORÉN et al., 2001; HAN et al., 2011). Sendo assim, os poucos trabalhos presentes na literatura sobre a degradação de MIT são focados em técnicas oxidativas, fotoquímicas, não tendo sido encontrados trabalhos de biodegradação desse composto por fungos e bactérias. No entanto, os fungos utilizados neste trabalho pertencentes aos gêneros *Trichoderma*, *Fusarium* e *Aspergillus*, foram capazes de degradar o MIT em 24 horas. Estes mesmos gêneros são citados na literatura como tendo grande potencial para biodegradação ou biotransformação de vários outros xenobióticos (SILVA et al., 2003).

Krzeminski et al. (1975), estudaram a degradação fotolítica de isotiazolinona em meio aquoso e concluíram que a degradação do composto é dependente da temperatura e do pH. Em pH 8,5 e temperatura de 40°C, o tempo de meia vida encontrado foi em torno de 4,6 dias, e diminuindo apenas a temperatura para 24°C, o tempo aumentou para 46 dias. Em pH 7, utilizando tampão fosfato, sob a luz solar natural, a meia-vida foi de 158 horas.

Com base nos resultados obtidos, a via de degradação fúngica proposta neste trabalho não se diferencia muito da via fotoquímica descrita por Edge et al. (2010), na qual vários ácidos orgânicos são originados da degradação do MIT. Entretanto a técnica de degradação biológica utilizada neste trabalho mostrou ser cerca de 7 vezes mais rápida que a fotoquímica. Os metabólitos encontrados são de baixa toxicidade para o ambiente podendo ser rapidamente mineralizados pela microbiota geral do solo.

5.5. BIODEGRADAÇÃO DO CARBENDAZIM EM MEIO LÍQUIDO

Para as análises de degradação do carbendazim em meio líquido os fungos *S. racemosum* FB24 e *F. solani* FB19 foram selecionados, dentre os 32 previamente estudados, sendo esses, os únicos que foram capazes de crescer na presença desse composto no teste crescimento/inibição em meio sólido em placa de Petri. Para cada fungo, realizou-se cultivo submerso durante 7 dias, retirando-se amostras a cada 24 h. A quantificação do carbendazim e de seu principal metabólito o 2-amino benzimidazol (2-AB) no meio de cultivo foi feita por HPLC, tomando-se por referência o cromatograma do padrão analítico obtido por solubilização das substâncias padrão em meio de cultura a fim de evitar o efeito matriz (Figura 25 a). O tempo de retenção dos padrões analíticos de carbendazim e 2-AB foram respectivamente, 6,47 e 5,51 minutos. Como controle abiótico foi utilizado o meio de cultivo sem o inóculo do fungo. O crescimento dos fungos foi avaliado pela biomassa seca, tendo como controle a biomassa produzida no meio sem o biocida.

Figura 25. Perfil cromatográfico do carbendazim e do 2-AB. a) meio de cultivo acrescido de uma solução padrão de 10 ppm de carbendazim e 2-AB.

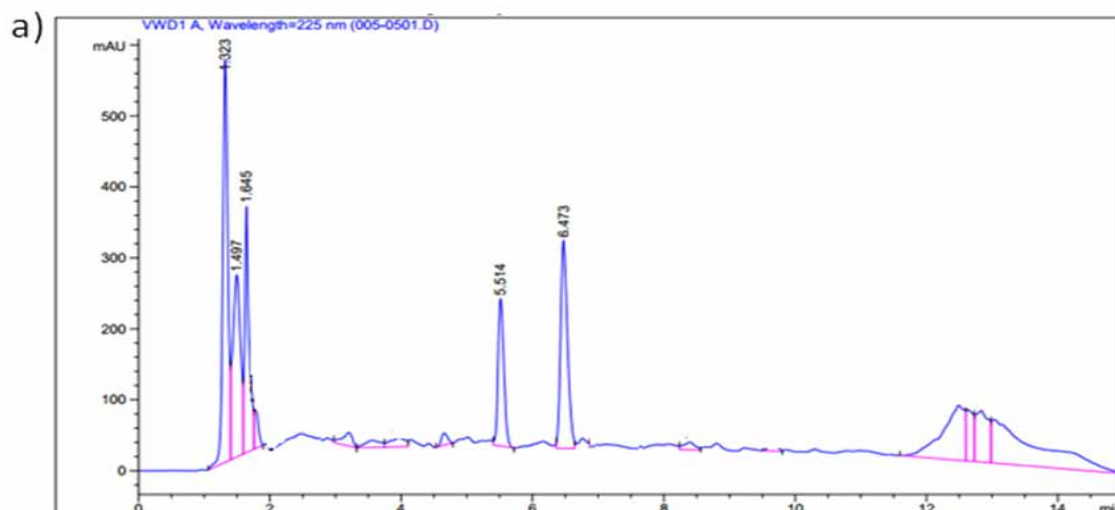
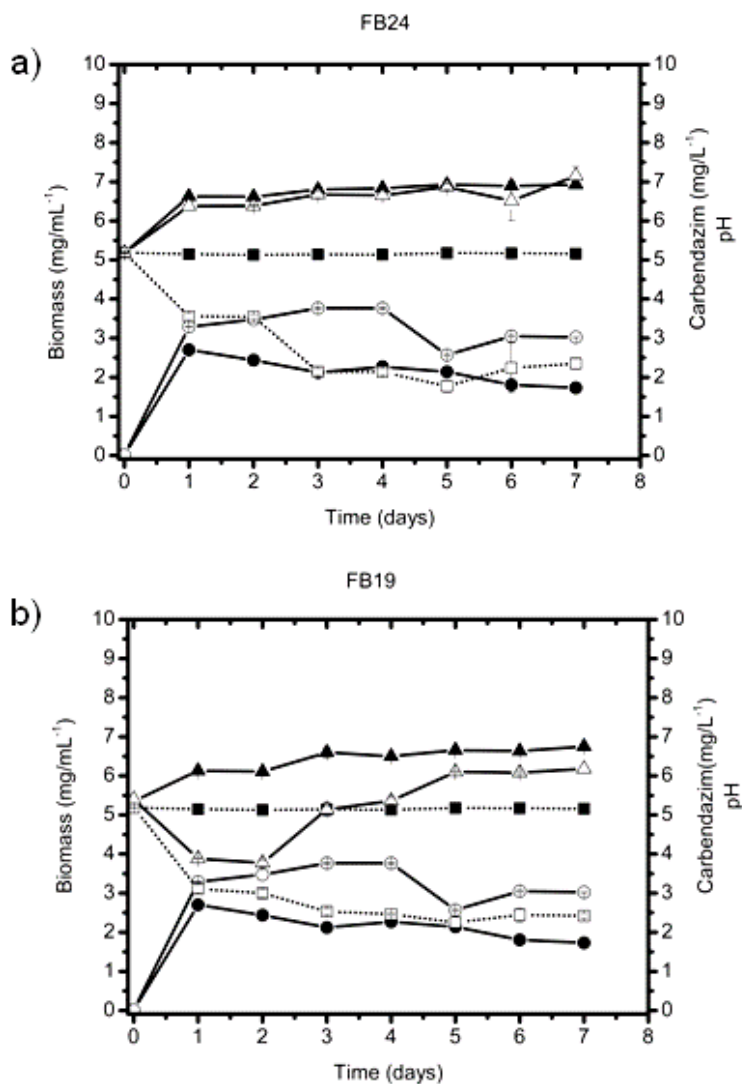


Figura 26. Crescimento dos fungos na presença de carbendazim. a) *S. racemosum*, b) *F. solani* FB19 □= concentração de carbendazim no meio inoculado com o fungo, ■= concentração de carbendazim no meio (controle abiótico), Δ= pH do meio contendo carbendazim inoculado com fungo; ▲= pH do meio inoculado com fungo (controle biótico); ●= biomassa no meio controle sem carbendazim; ○= biomassa no meio contendo carbendazim.

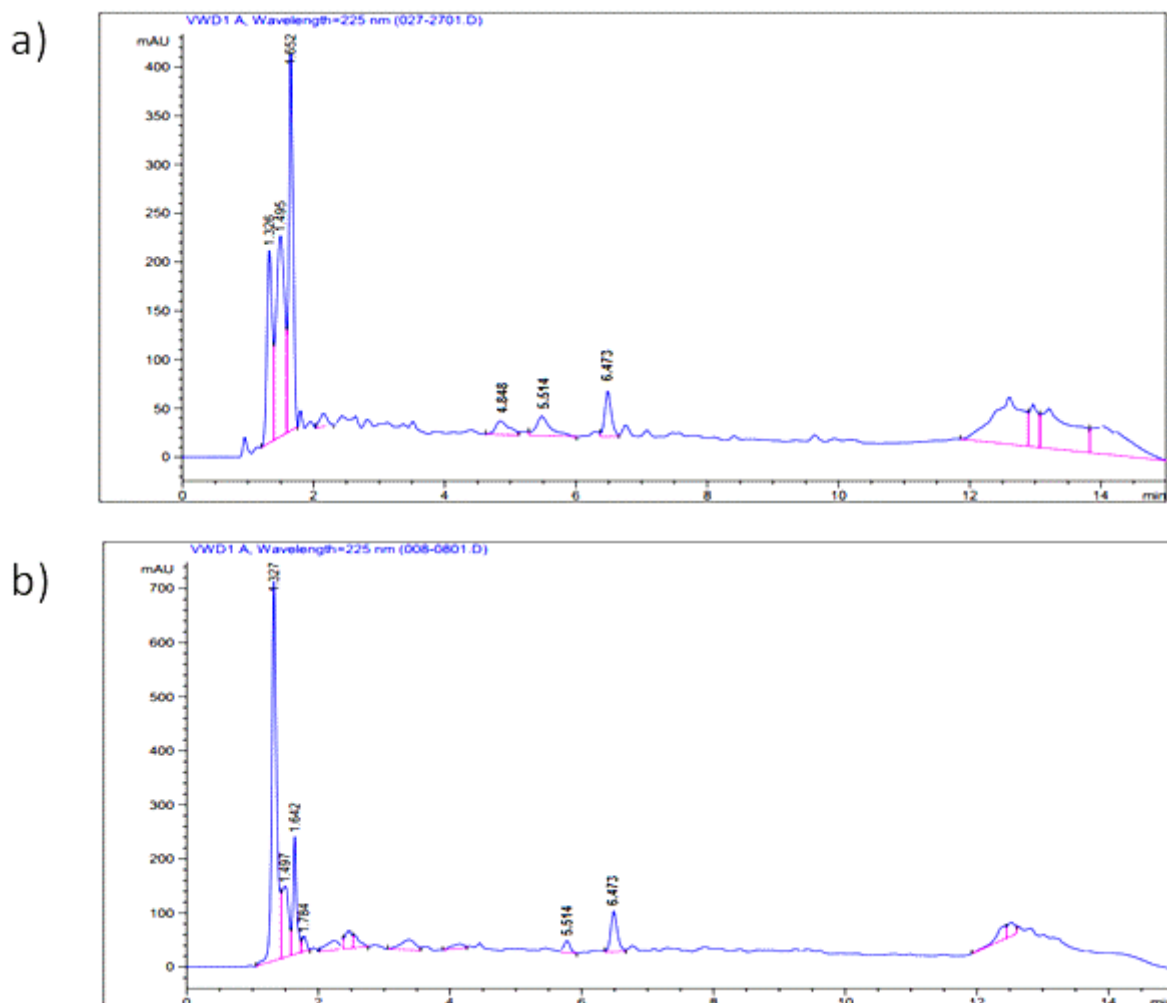


Como se pode observar na Figura 26. (a, b) os fungos testados foram capazes de degradar o carbendazim. O fungo *S. racemosum* apresentou maior potencial de degradação quando comparado com o fungo *F. solani* FB19, o primeiro, alcançando uma taxa de degradação de 65%, enquanto o segundo atingiu 56% em relação à concentração inicial em 7 dias. O meio de cultivo contendo apenas carbendazim (controle abiótico) foi analisado em HPLC e uma taxa de degradação espontânea de 1% foi encontrada durante os sete dias de cultivo.

Também foi possível observar que os fungos apresentaram um maior incremento de biomassa na presença do carbendazim, quando comparado com a biomassa do meio de cultivo controle, sugerindo que os fungos possam estar utilizando o carbendazim e seus metabólitos como fonte de carbono.

Nos cromatogramas das amostras do fungo *S. racemosum* FB24 foi observado o aparecimento do metabólito 2 aminobenzimidazol 2-AB (pico 5,51 min.) e outro pico desconhecido tendo como tempo de retenção 4,84 minutos e o carbendazim no tempo 6,47 min. Figura 27 (a). Entretanto nas amostras do *F. solani* FB19 foi detectado apenas a presença do 2-AB (Figura 27. b.)

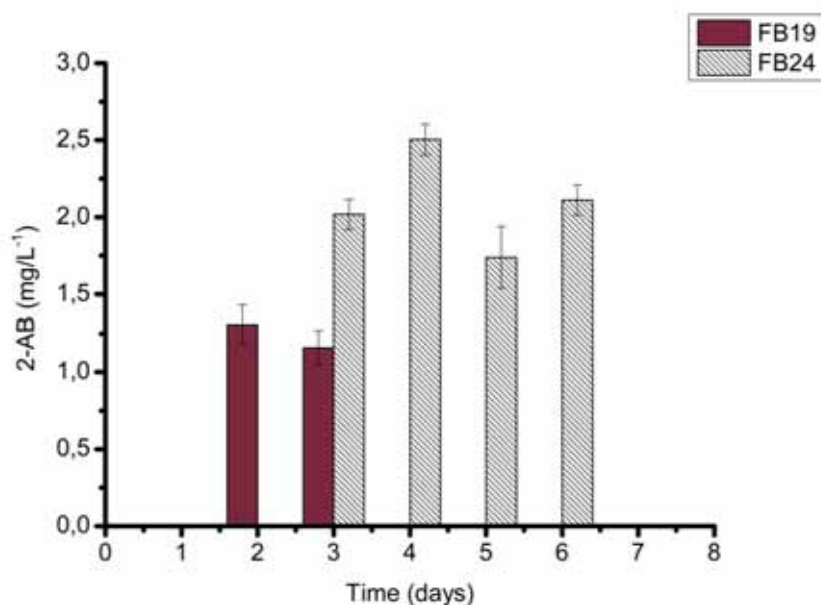
Figura 27. Perfis cromatográficos do carbendazim após o cultivo dos fungos; a) meio de cultivo contendo carbendazim inoculado com o fungo *S. racemosum* FB24 no quarto dia de cultivo; b) meio de cultivo contendo carbendazim na presença do fungo *F. solani* FB19 no segundo dia de cultivo.



Comparando-se a produção do metabólito 2-AB entre os fungos, pode-se observar na Figura 28, que houve uma maior produção desse metabólito pelo fungo *S. racemosum* FB24. Isso já era esperado, uma vez que esse apresentou maior taxa de degradação do carbendazim. A produção de 2-AB nas amostras do fungo *F. solani* FB19 foi detectada no segundo e terceiro dias de cultivo, não sendo mais detectada nos dias consecutivos, sugerindo mais uma vez a utilização desse composto como fonte de carbono. Dados semelhantes foi encontrado por Silva et al., (1999), que relata em seu trabalho a degradação do carbendazim pelo fungo *Alternaria alternata* que atingiu 66% nos dois primeiros dias de cultivo, entretanto, a presença de pico equivalente ao 2-AB não foi detectado nas amostras.

Nas amostras do meio de cultivo do fungo *S. racemosum* FB24 o 2-AB foi detectado a partir do terceiro dia e desaparecido no sétimo dia de cultivo.

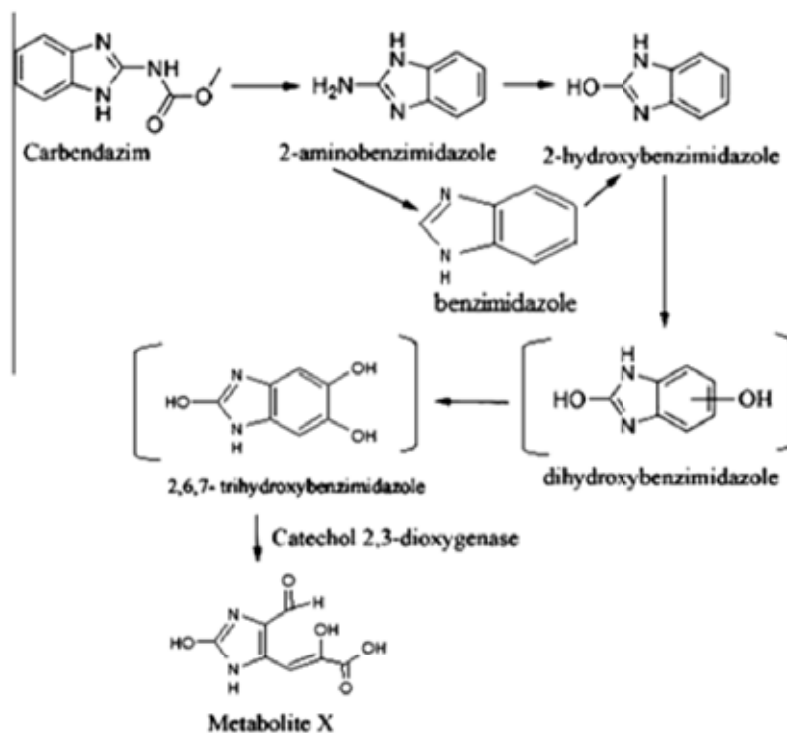
Figura 28. Produção do metabólito 2-AB a partir da degradação do carbendazim pelos fungos *S. racemosum* FB24 e *F. solani* FB19



Wang et al., (2010) propõe em seu estudo uma nova rota de degradação para o carbendazim pela cepa de actinobacteria *Rhodococcus jialingiae* djl-6-2 (Figura 29). Esta, inicia-se com a hidrólise do carbendazim em 2-AB, consecutivamente convertido em benzimidazol (BZ) ou em 2 hidroxibenzimidazol (2-HB). O 2-HB por sua vez, sofre reações consecutivas de hidroxilação, sendo convertido em dihidroxibenzimidazol, 2,6,7

trihidrobenzimidazol, que por da ação da enzima catechol 2,3 dioxigenase, sofre a ruptura do anel benzimidazol formando um novo metabólito X.

Figura 29. Proposta de rota metabólica de degradação do carbendazim pela cepa de *R. jialingiae jialingiae* djl-6-2

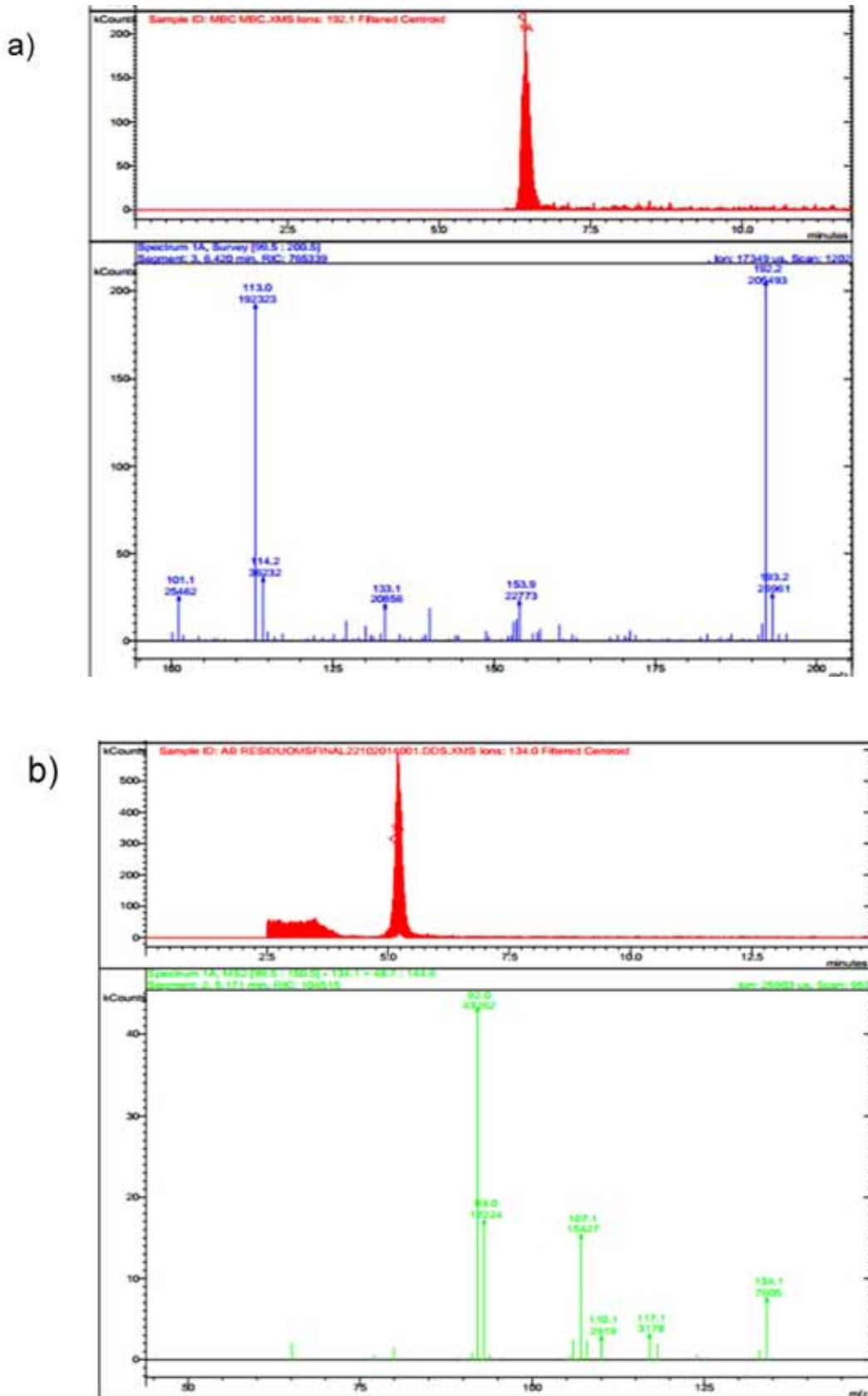


Fonte: Adaptado de Wang et al., (2010)

As amostras dos fungos *S. racemosum* FB24 e do *F. solani* FB19 que apresentaram o 2-AB foram analisadas em HPLC/MS para identificação do metabólito, assim como , tentar identificar o pico desconhecido, cujo tempo de retenção foi de 4,84 min. nas amostras do *S. racemosum* FB24, utilizando a metodologia descrita no item 4.8.

Soluções padrão de 10 mg/L⁻¹ de carbendazim e 2-AB foram injetadas para o monitoramento do tempo de retenção e formação dos íons moleculares (*m/z*) e fragmentos a partir das moléculas dos compostos, pois com essas informações é possível monitorar apenas os íons e fragmentos de interesse, aumentando assim, a sensibilidade do método. As soluções padrão analisadas em MS/MS apresentaram o íons molecular *m/z* de 192 [M+H]⁺ para o carbendazim e o fragmento de maior intensidade foi o 113 [M+H]⁺, para o 2-AB o íon molecular (*m/z*) foi 134 [M+H]⁺ e o fragmento de maior intensidade foi 92 [M+H]⁺.

Figura 30. Espectro de massas de solução padrão de carbendazim e 2-AB. a) espectro de massas do carbendazim; b) espectro de massas do 2-AB - em vermelho tempo de retenção dos padrões analisado e azul e verde a fragmentação dos compostos.



Os resultados das análises em HPLC-MS das amostras mostraram que o composto 2-AB apesar de detectado nas amostras das análises cromatográficas em altas concentrações após a degradação do carbendazim, não foi confirmado pela espectrometria de massas. Entretanto um pico de alta intensidade com tempo de retenção de 3,95 que apresenta íon molecular m/z de 120 $[M+H]^+$ com dois fragmentos de maior intensidade (103,1 e 93,1) foi detectado, podendo este ser um novo metabólito não descrito até o presente momento na literatura. Novos testes serão necessários para identificar essa molécula.

5.6. BIODEGRADAÇÃO DO METIL METACRILATO (MMA) EM MEIO LÍQUIDO

Para as análises de degradação do metil metacrilato 5 fungos foram selecionados, *T. longibrachiatum* FB01, *F. solani* FB07, *A. niger* FB14, *P. saturatus* FB30, *S. racemosum*, dentre os 32 previamente estudados, sendo esses, os fungos que apresentaram maior capacidade de se desenvolver na presença de MMA no teste crescimento/inibição em meio sólido em placa de Petri. Para cada isolado, realizou-se cultivo submerso durante 7 dias, retirando amostras a cada 24 horas. A quantificação do MMA no meio de cultivo foi feita por GC-FID, tomando por referência o cromatograma do padrão analítico em meio de cultura a fim de evitar o efeito matriz (Figura 31). O tempo de retenção do padrão analítico de MMA foi 5,51 minutos. Como controle abiótico foi utilizado o meio de cultivo sem o inóculo do fungo. O crescimento dos fungos foi avaliado pela biomassa seca, tendo como controle a biomassa produzida no meio sem o biocida.

Figura 31. Perfil cromatográfico da solução padrão de MMA em GC-FID. Pico MMA no tempo retenção 5,51.

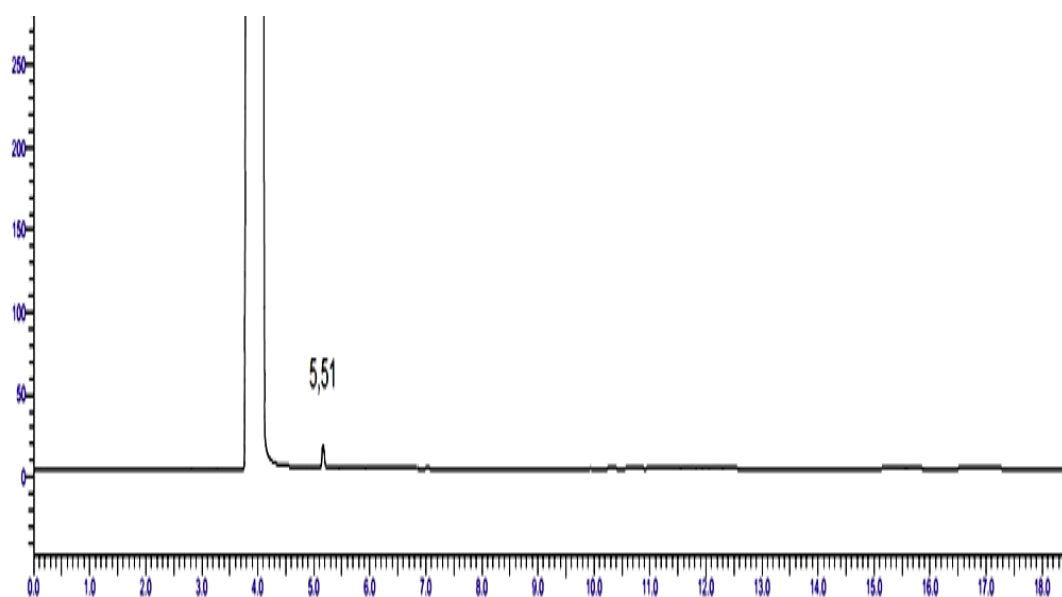
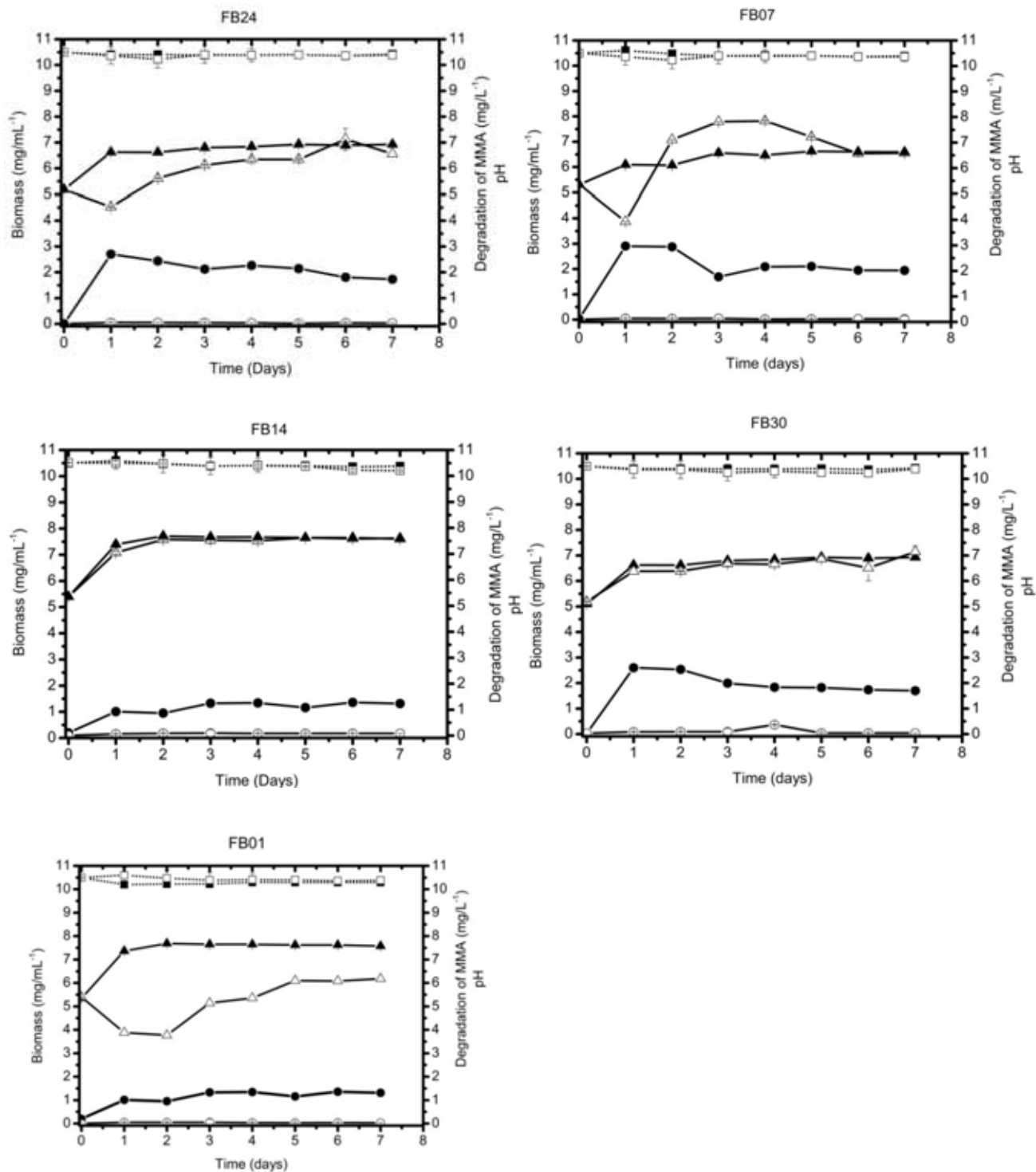


Figura 32. Cultivo submerso dos fungos na presença de MMA. a) *S. racemosum* FB24, b) *F. solani* FB07, *A. niger* FB14, *P. saturatus* FB30, *T longibrachiatum* FB01 □= concentração de MMA no meio inoculado com o fungo, ■= concentração de MMA no meio (controle abiótico), Δ= pH do meio contendo MMA inoculado com fungo; ▲= pH do meio inoculado com fungo (controle biótico); ●= biomassa no meio controle sem MMA; ○= biomassa no meio contendo MMA.



Os fungos não foram capazes de crescer na presença de metil metacrilato (Figura 32) e não foi observada nenhuma degradação desse composto nas amostras analisadas.

Há relatos na literatura da toxicidade deste composto para a bactéria *Pseudomonas putida* e a concentração tóxica pra esta bactéria foi de 100 mg/L^{-1} (VETTA QUÍMICA, 2014). Entretanto, até o presente momento não se tem relatos na literatura da toxicidade deste composto para fungos, mas com base nos testes realizados os fungos testados não suportaram a concentração de 10 ppm (10 mg.L^{-1}).

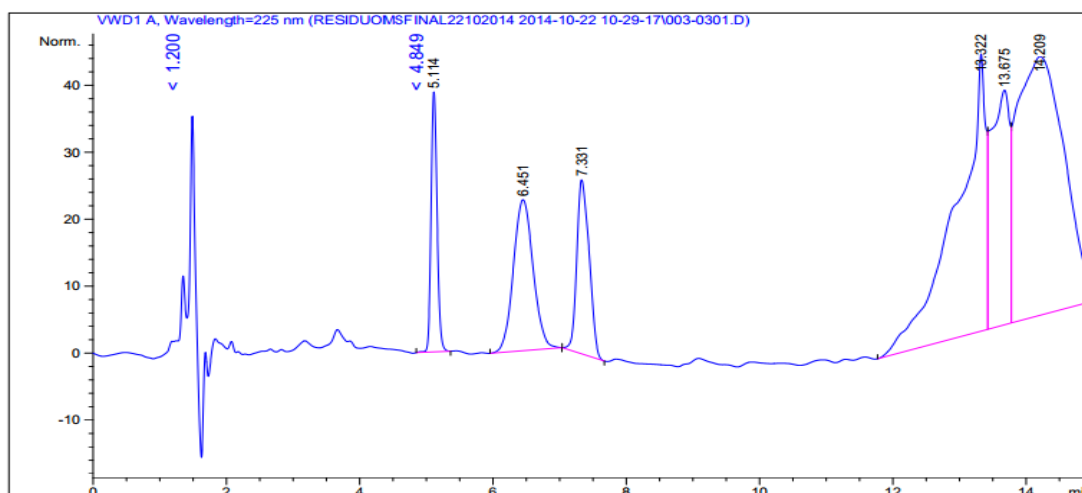
5.7. UTILIZAÇÃO DOS FUNGOS COMO INÓCULO NO TRATAMENTO DOS RESÍDUOS

Há uma grande demanda de uso de água na fabricação das tintas, seja na incorporação do produto ou na lavagem dos equipamentos das máquinas, tubulações e pisos gerando um grande volume de efluentes com potencial poluidor (SINDUSCON, 2010).

Há uma variação no uso de compostos químicos muito grandes entre as diferentes empresas desse segmento, devido à diversidade de matérias primas utilizadas na fabricação das tintas e, conseqüentemente, geram água residuais também diferentes quanto à composição. Na higienização dos equipamentos, grandes quantidades de ácidos e bases fortes e solventes orgânicos são utilizados na remoção das sujidades o que torna o efluente ainda mais perigoso para o meio ambiente.

Amostras de efluentes coletados do sistema de tratamentos da fábrica de tintas foram analisadas em HPLC/MS/MS e GC-FID, a fim de identificar e quantificar os componentes presentes nos resíduos e posteriormente inocular os melhores fungos para propor uma aceleração e melhoramento do tratamento e da qualidade do final do efluente. A Figura 33 demonstra o perfil cromatográfico do efluente injetado no HPLC.

Figura 33. Perfil cromatográfico do efluente da tinta. 2-AB: tempo de retenção 5,11 min.; carbendazim: 6,45 min.



Nas amostras dos tanques de efluentes foi detectada a presença do carbendazim em uma concentração de 3,73 ppm (pico tempo retenção 6,45 min.) e o 2-AB na concentração 4,73 ppm (pico tempo de retenção 5,11 min.), sendo o 2-AB confirmado por espectrometria de massas e o carbendazim não. A presença do MIT não foi detectada em nenhuma amostra (Tabela 8.). No GC-FID nas amostras foi detectado a presença do MMA em uma concentração próxima de 6 ppm.

Tabela 8. Caracterização do efluente da fábrica de tintas

Componentes	Concentração detectada
Sólidos Totais	0,7 mg/mL ⁻¹
pH	5,4 pH
carbendazim	3,73 mg/L ⁻¹
2-AB	5,73 mg/L ⁻¹
MMA	6 mg/L ⁻¹
MIT	0, 0 mg/L ⁻¹

Através das análises cromatográficas pode-se verificar que as amostras de efluentes contêm grandes quantidades de 2-AB, sendo essas suficientes para provocar a inibição do crescimento de microrganismos presentes nos tanques e também no ambiente. Também foi possível notar que o carbendazim nas condições ambientais da fábrica de tintas sofre transformação para 2-AB e, de acordo com Aharonson et al., (1990) e Silva et al., (1999) esse é muito mais fácil de ser mineralizado do que o carbendazim.

Visto que esses efluentes contêm uma grande quantidade de carbendazim e 2-AB ao final do processo, um cultivo submerso foi feito utilizando o resíduo como meio de cultivo e os fungos *S.racemosum* FB24 e *F. solani* FB19 como inócuos separadamente e em consórcio, para tentar melhorar a qualidade final dos efluentes.

Ao longo do cultivo foi possível observar que os fungos não apresentaram crescimento visível, sendo este fato devido à toxicidade deste efluente ou a falta de nutrientes como nitrogênio e fósforo para seu desenvolvimento. Estes poderiam ser adicionados ao efluente para ajudar no crescimento dos fungos, entretanto a proposta inicial deste trabalho foi de utilizar apenas o efluente como meio de cultivo sem adição de novos componentes visando custo no processo industrial.

As análises cromatográficas das amostras após o cultivo na presença dos fungos mostraram que os componentes detectados se mantiveram estável ao longo do cultivo e o mesmo padrão cromatográfico foi observado na ausência dos fungos (controle abiótico).

6. CONCLUSÕES

- 30 fungos filamentosos e 2 leveduras, pertencentes a dez gêneros distintos, foram isolados de amostras de tintas e de seus componentes, sendo a tinta deteriorada a amostra que proporcionou maior número de fungos isolados, sendo o gênero *Apergillus* o mais prevalente nessa amostra;
- Os fungos isolados apresentaram capacidades diferentes de degradar os componentes das tintas;
- Os fungos *T. longibrachiatum* (FB01), *F. solani* (FB07), *A. niger* (FB14), mostraram alto potencial de degradação de metil isotiazolinona (MIT) gerando metabólitos identificados como acético, malônico, propiônico, 2-oxibutírico, láctico, 2-oxobutanóico, metoxiacético e ácido tartárico.
- Os fungos *S. racemosum* FB24 e *F. solani* FB19 apresentaram um ótimo potencial de degradação do carbendazim gerando metabólitos não identificados, sendo um com evidências de ser o benzimidazol.
- Os fungos selecionados para o cultivo em meio líquido na presença do metil metacrilato não foram capazes de crescer na presença do composto e muito menos degradá-lo.
- Os fungos *S. racemosum* FB24 e *F. solani* FB 19 selecionados por apresentarem alto potencial de degradação para os componentes da tintas estudados, não foram capazes de utilizar os componentes do efluente como fonte carbono e melhorar a qualidade final dos efluentes da fábrica de tintas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAFATI, Associação Brasileira dos Fabricantes de Tintas. Disponível em: <<http://www.abrafati.com.br>> Acesso: 10 set. de 2012.

ABRAFATI, Associação Brasileira dos Fabricantes de Tintas. Disponível em: <<http://www.abrafati.com.br>> Acesso: 19 nov. de 2013.

ABRAFATI. Qualidade-Grande avanço na Produção de Normas. Ano XIX, accompanying tubulin loss, Antimicrob. Agents Chemo-ther. p.1739–1748, Acesso: 18 mar. de 2006.

ADELEYE, I. A.; ADELEYE O. A. Isolation and identification of microbes associated with paints and weathered painted walls. J. Sci. Res. Dev., n.4, p.71-76, 1999.

AHARONSON, N.; KATAN, J.; AVIDOV, E.; YARDEN, O. The role of fungi and bacteria in the enhanced degradation of fungicide carbendazim and the herbicide diphenamid. In: RACKE, K.D.; COATS, J.R. (Eds.). Enhanced biodegradation of pesticides in the environment. Washington, DC: American Chemical Society, 1990. p.113-127.

AINA, V. O.; ADEWUMI, A. A. J.; HARUNA, H.; ZAKARI, A. Isolation and identification of fungi associated with the deterioration of painted wall surfaces within Kaduna Polytechnic. Asian Journal of Medical Sciences, v.3, n.6, p. 250-253, 2011.

ALEXANDER, M. Biodegradation of chemical of environmental concern. *Science*, v.211, p.132-138, 1981. ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. Introductory mycology. New York, v.4, p.880, 1996.

ALMEIDA, E, ASSALIN, M. R., ROSA, M. A. Tratamento de efluentes industriais por processos oxidativos na presença de ozônio. *Química Nova*, v. 27, 2004.

ANGHINETTI, I.C.B.; JUNIOR, A. N. C; Tintas, suas propriedades e aplicações imobiliárias, 2012.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Reavaliação de produtos agrotóxicos. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/reavaliacao/index.htm>>. Acesso: 09, fev. 2013.

ARCURI, S. L.; PAGNOCCA, F. C.; MELO, W. G. P.; NAGAMOTO, N. S.; Komura, D. L.; Rodrigues, A. Yeasts found on an ephemeral reproductive caste of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2014.

ARQUIAGA, M.C.; CANTER, L.W.; ROBERTSON, J.M. Microbiological characterization of the biologic treatment of aircraft paint stripping wastewater. Barking, Environmental Pollution, p.189-195, 1995.

ATAGANA, H. I.; HAYNES, R. J. e WALLIS, F. M. (2006) Fungal *Aspergillus nidulans* and novel action of phenylalanine derivatives Bioremediation of Atlas, p. 196, 2006.

AUSTIN, D. J.; BRUGGS, G .G. A new extraction method for benomyl residues in soil and its application in movement and persistence studies. Pesticide Science, v.7, p.201-210, 1976.

BACH, E. E.; RANGEL, A. R. Biodeterioração de tintas à base de água por fungos. São Paulo, Exacta, v.3, p.79-84, 2005.

BAIRD, C. Química ambiental. Porto Alegre: Ed. Bookman, p.622, 2002.

BARNETT, H. L.; HUNTER, B. E. Illustrated genera of imperfect fungi. Saint Paul: American Phytopathological Society, 4 ed., 1998.

BESTER, K.; LAMANI, X.; Determination of biocides as well as some biocide metabolites from facade run-off waters by solid phase extraction and high performance liquid chromatographic separation and tandem mass spectrometry detection, Barking, Journal of chromatographic A, p. 5204-5214, 2010.

BISSETT, J.; SZAKACS, G.; NOLAN, C. A.; DRUZHININA, I.; KULLNIG-GRADINGER, C. M.; KUBICEK, C. P. Seven new taxa of *Trichoderma* from Asia. Canadian Journal of Botany, Canada, v. 81, n. 3, p.570-586. 2003.

BLOCK, S.S. Editor Disinfection, Sterilization and Preservation. Sth. ed. Philadelphia, Pa: Lippincott Williams and Wilkins; 2001.
bn_conteudo.asp?cod=237>acesso 24 de agosto 20012.

BORDJIBA, O.; STEIMAN, R.; KADRI, M.; SEMADI, A.; GUIRAUD, P. Removal of herbicides from liquid media by fungi isolated from a contaminated soil. Journal of Environmental Quality, v. 30, p. 418-426, 2001.

BOUDINA, A; EMMELIN, C.; BAALIOUAMER, A.; GRENIER-LOUSTALOT, M. F.; CHOVELON, J. M. Photochemical behavior of carbendazim in aqueous solution. Chemosphere, v. 50, p. 649-655, 2003.

BRANNAN, D.K. Editor Cosmetic Microbiology - a practical Handbook, CRS Press, Appendix 2, p.227 – 305, 2000.

BRIGGS, M.A. Emulsion paint preservation: factory practice and hygiene. Paint, Research Association Technical Report. TR/878. Teddington U.K. 1980.

BUCHELI, T. D.; MULLER, S. R.; HEBERLE, S.; SCHWARZENBACH, R. P. CANTO, L. B.; PESSAN, E. L.; AIN S. V.; CANEVAROLLO. J. R. Técnicas de Caracterização de Polímeros, São Paulo, Artliber Editora Ltda., p. 341 – 360, 2004.

CANTO, L.B.; PESSAN; L.A.; CANEVAROLLO Jr. S. V., "Técnicas de Caracterização de Polímeros", Artliber Editora Ltda., São Paulo, págs. 341 – 360, 2004.

CAPPITELLI, F.; NOSANCHUK, J. D.; CASADEVALL, A.; TONIOLO, L.; BRUSETTI, L.; FLORIO, S.; PRINCIPI, P.; BORIN S.; SORLINI, C. Synthetic Consolidants Attacked by Melanin-Producing Fungi: Case Study of the Biodeterioration of Milan (Italy) Cathedral Marble Treated with Acrylics. *Applied and Environmental Microbiology*, v.73, n.1, p. 271–277, 2007.

CAPRA, F. O ponto de mutação. São Paulo, *Cultrix*, p. 447, 1982.

CASTRO, I.B.; WESTPHAL, E.; FILLMANN, G.; Third generation antifouling paints: New biocides in the aquatic environment. *Química Nova*, v.34, n. 6, p.1021-1031, 2011.

CETESB. Tintas e Vernizes. Guia Técnico Ambiental Tintas e Vernizes. Série P+L, 2006. Disponível em:
<http://www.abrafati.com.br/bnews3/images/multimedia/Documentos/sbd.pdf>.
Acesso: 09 set. de 2012.

CIFERRI, O. Microbial degradation of paintings. Italy, *Applied and Environmental Microbiology*, v.65, n.3, p.879-885, 1999.

CNECCO, C.; Tintas e Vernizes Ciência e Tecnologia, ABRAFATI, v.2, p.652, 1993.

COLOMBO, J.; CABELLO, M.; ARAMBARRI, A. M. Biodegradation of aliphatic and aromatic hydrocarbons by natural soil microflora and pure cultures of imperfected and lignolytic fungi. *Environmental Pollution*, v.94, p.355-362, 1996.

CRITTENDEN, B., KOLACZKOWSKI, S. Waste minimization: a practical guide. Rugby: Institution of Chemical Engineers, p.81, 1995.

CUNHA, A. O. O estudo da tinta/textura como revestimento externo em substrato de argamassa. Belo Horizonte, Escola de engenharia UFMG, 2011.

DAVIDSE, L.C. Benzimidazole fungicides: Mechanism of action and biological impact. *Ann Rev. Phytopathol*, V.24, p.24-43, 1986.

DAVIS, J. S.; WESTLAKE, D. W. S. (1978) Crude oil utilization by fungi. *Can. J. Microbiol.* 25: 146-156 apud ATAGANA, H. I.; HAYNES, R. J. & WALLIS, F. M. Fungal Bioremediation of creosote contaminated soil: a laboratory scale bioremediation study using indigenous soil fungi. *Water, Air, and Soil Pollution*, p.201-219, 2006.

DEUSTSCH, P.; CANABRAVA, W. M. Tintas e vernizes aquosos. São Paulo, Manual de Tintas e Vernizes, v.1, n.1, p.941-952, 1993.

DEY, B. K.; HASHIM, M. A.; HASAN, S.; GUPT, B. S. Microfiltration of water-based paint effluents. New York, *Advances in Environmental Research*, v.8, n.3-4, p.455-466, 2004.

DIAS, A. E. X. O. Biorremediação de áreas afetadas por resíduos sólidos tóxicos. In: SISINNO, C. L. S.; OLIVEIRA, R. M. (Org.) Resíduos Sólidos, Ambiente e Saúde: uma visão multidisciplinar. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, p.142, 1998.

DIAS, R. Gestão ambiental: responsabilidade social e sustentabilidade. São Paulo: DIRECTIVE 98/8/EC of the European Parliament and of the council concerning the placing of biocide products on the market. European Union, Brussels, 1998.

DOMBEK, T., DAVIS, D., STINE, J., KLARUP, D., 2004, Degradation of terbutylazine (2-chloro-4-ethylamino-6-terbutylamino-1,3,5-triazine), deisopropyl atrazine (2-amino-4-chloro-6-ethylamino-1,3,5-triazine), and chlorinated dimethoxy triazine (2-chloro-4,6-dimethoxy-1,3,5-triazine) by zerovalent iron and electrochemical reduction. *Environmental Pollution*, v. 129, p.267–275, 2004.

DOMSCH, K. H.; GAMS, W.; ANDERSON, T.; Compendium of soil fungi. London: *Academic Press*, v.2, 1980.

DORNIEDEN, T.; GORBUSHINA, A.A.; KRUMBEIN, W. E. Biodecay of cultural heritage as a space/time-related ecological situation – an evaluation of a series of studies. *Barking, International Biodeterioration Biodegradation*, v. 46, n. 4, p. 261-270, 2000.

DURSUN, D.; SENGUL, F. Waste minimization study in a solvent-based paint manufacturing plant. *Resources Conservation and Recycling*, v.47, p.316-331, 2006.

EDGE, M.; ALLEN, N. S.; TURNER, D. J.; ROBINSON, J.; LIAUW, C. M.; MATER, J. The enhanced performance of biocidal additives in paints and coatings, v.36, p.1443-1450, 2001.

EPA – Environmental Protection Agency. Reregistration Eligibility Decision (RED) for carbenzadim, 2012.

ESPOSITO, E.; PAULILLO, S. M.; MANFIO, G. P. Biodegradation of the herbicide diuron in soil by indigenous actinomycetes. *Chemosphere*, v.37, p.541-548, 1998.

FAIRBANKS, M. Seleção pelo menor custo associada às restrições normativas inibem a inovação na proteção de tintas. Disponível em: <http://www.quimica.com.br/quimica/index.php?sessao=reportagem&id=161&c> Acesso em: 03 set. 2013

FAZENDA, J. M. R. Tintas e Vernizes Ciência e tecnologia. São Paulo, ABRAFATI, 4 ed., 2009.

FAZENDA, J. M. R.(Coord.) Tintas e Vernizes: ciência tecnologia - São Paulo, ABRAFATI, 2.ed., n.1, 1995.

- FAZENDA, J. M. R.; Tintas e Vernizes, Ciência e Tecnologia, São Paulo, ABRAFATI, 1.ed.,1993.
- FAZENDA, J. M. R.; Tintas imobiliárias de qualidade: O livro dos rótulos da ABRAFATI, São Paulo, 2008.
- FEWINGS, J.; MENNÉ, T. An update of the risk assessment for methylchloroisothiazolinone/methylisothiazolinone (MCI/MI), with focus on rinse-off products. *Contact Dermat*, v.41, p.13, 1999.
- FINKLER, L.; PINTO, J. C.; ALVES, T. L. M. Acrylic acid consumption by *Cupriavidus necator* D. S. M. 545 using resting cells system. Recife, XV Simpósio Nacional de Bioprocessos, 2005.
- FREIRE, R. S.; PELEGRINI, R.; KUBOTA, L. T.; DURÁN, N.; PERALTAZAMORA, P. Novas tendências para o tratamento de resíduos industriais contendo espécies organocloradas. *Química Nova*, v.23, p. 504-511, 2000.
- FURTADO, J. S (coordenador). Manual de prevenção de resíduos na fonte & economia de água e energia. São Paulo, Fundação Vanzolini, 1998.
- GAMS, W.; ROZSYPAL, J. *Metharizium flavoviride* n. sp. isolated from insects and from soil. *Acta Botanica Neerlandica*, Oxford, v. 22, n. 5, p. 518-521, 1973.
- GENTIL, V. Corrosão. Rio de Janeiro, química nova 4.ed., p.341, 2003.
- GIANFREDA, L.; MORA, M. L.; DIEZ, M. C. Restoration of polluted soils by means of microbial and enzymatic process. *Revista del ciencia del Suelo y Nutrición vegetal*, v.6, p. 20-40, 2006.
- GIÚDICE, C.A.; BENÍTEZ, J.C. Óxido de ferro mináceo em revestimentos anticorrosivos e seladores. São Paulo, Anais do 6º Congresso Internacional de Tintas, p. 493-502, 1999.
- GLASS N .L; DONALDSON, G. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Appl Environ Microbiol* 61:1323-1330, 1995.
- GOU, B.; HUANG, Z.; WANG, M.; XIAOYING, W.; ZHANG, Y.; CHEN, B.; LI, Y.; YAN, H.; YAO, S. Simultaneous direct analyses of benzimidazoles fungicides and relevant metabolites in agricultural products based on multifunction dispersive solid-phase extraction and liquid chromatography mass-spectrometry. *Jornal of Chromatography A*, v. 1217, p.4796- 4807, 2010.
- GRANT, C. Collaborative investigations of laboratory test methods for evaluation of the growth of pink yeast on paint films. *International Biodeterioration & biodegradation*, p. 279-288, 1993.
- Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* 41: 95-98.

HAN, W.; CHEN, Y.; WANG, L.; SUN, X.; LI, J. Mechanism and kinetics of electrochemical degradation of isothiazolinones using Ti/SnO₂-Sb/PbO₂ anode. *International Biodeterioration & biodegradation*, p.234-236, 2011.

HAWKSWORTH, D.L. et al. *Ainsworth & Bisby's Dictionary of the fungi*. 8th ed. Wallingford: CAB International, 1995.

HEAD, I. M. *Biorremediation: Towards a credible technology*. Microbiology; v.144, p.599-608, 1998.

IANINO, A.; Polímeros – apostila. Disponível em:
<http://abcdopolimero.wordpress.com/2010/03/27/polimeros-definicao/>>

IGNATOV; ROGATCHEVA; KOZULIN; KHORKINA. Acrylamide and acrylic acid determination using respiratory activity of microbial cells. *Biosensors & Bioelectronics*, v. 12, p. 105-111, 1997.

JERSCHOW, E.; HOSTYNEK, J. J.; MAIBACH, H. I.; *Food Chem. Technol.* p.39, 2001.

KAIRALLA, R.B. Aditivos. *Tintas e vernizes, São Paulo*, v.1, p. 541-575, 1993.
Kato K; Standley DM. MAFFT Multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution*, 30, 772-780, 2013.

KAZEMINSKI, S. F.; BRACKETT, C. K.; FISHER, J. D.; SPINNLER, J. F. *Food Chemical, Journal Agricola*, v.23, p.1060-1068, 1993.

KIRK, T. K.; SCHULTZ, E.; CONNORS, W.J.; LORENZ, L. F.; ZEIKUS, J.G. Influence of culture parameters on lignin metabolism by *Phanerochaete Chrysosporium*. *Archives Microbiology*, v.117, p.277-285, 1978.

KISO, T.; FUJITA, k.; PING, X.; TANAKA, T.; TANIGUCHI, M.; Screening for KLISCH, M.A.; PITT, J. I. A laboratory guide to common *Aspergillus* species and their teleomorphs. North Ryde: Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, 1998, 116 p.

KUMAR, R; KUMAR, A.V. *Biodeterioration of Stone in Tropical Environments-An Overview*.1. ed. the J. Paul Getty Trust EUA, 1999.

LA ROSA, F. R.; GIESE, E. C.; DEKKER, R. F. H.; PELAYO, J. S.; BARBOSA, A.M. Microbiological contamination of water-based paints industry in the state of Paraná, Brazil. *Londrina, Ciências Exatas e da Terra*, v. 29, n.1, p.85-92, 2008.

LEROUX, P. Modes d'action des produits phytosanitaires sur les organismes pathogènes des plantes. *C. R. Biologies*, v. 326, p. 9-21, 2003.

LIMA, E.; REIS, E.; LIMA, F.; GAMA, I.; FELIPE, T.; MIRANDA, D. *Materiais de construção – Tintas*. Recife, Faculdade Boa Viagem, 2012.

LIU, L. X.; HSIANG, T. Bioassays for benomyl adsorption and persistence in soil. *Biology & Biochemistry*, v.26, p.317-324, 1994.

LOB, A.; YOUSEF, F.; TAWABINI, B. S.; MOHAMMED, A. I.; ABBAS, N. M. Simultaneous determination of benzotriazole copper inhibitor and microbiocidal isothiazolinone by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, v.661, p.245-248, 1994.

LUCCHESI, E. Resultados comparativos entre a câmara tropical de água e a câmara tropical de terra em 2003. São Paulo, Congresso internacional de tintas 2003, Anais ABRAFATI, p.683-692, São Paulo, 2003.

Meyer. V. R, *Practical High-Performance Liquid Chromatography*, Wiley, 5^o Edition, Padstow, Great Britain, 2010.

MISRA, P. C. A new species of *Syncephalastrum*. *Mycotaxon*, Ithaca, v. 3, n. 1, p. 51-54, 1975.

MOLLEA, C.; BOSCO, F.; RUGGERI, B. Fungal biodegradation of naphthalene: microcosms studies. *Chemosphere*, 2005.

MORENO, C. M.; BECERRA, A. G.; SANTOS, M. J. B. Tratamientos biológicos de suelos contaminados: Contaminación por hidrocarburos, aplicaciones de hongos en tratamientos de biorrecuperación. *Iberoamericana de micología*, v.21, p.103-120, 2004.

NELSON, P. E., TOUSSOUN, T. A.; MARASAS, W. F. O. *Fusarium species: an illustrated manual for identification*. University Park: Pennsylvania State University Press, 1983, 193 p.

OBIDI, O. F.; ABOABA, M. S.; MAKANJUOLA, M. S.; NWACHUKWU, S. C. U. Microbial evaluation and deterioration of paints and paint-products. *India, Journal of Environmental Biology*, v.30, n.1, p.835-840, 2009.

OCHI, B. C.; BRITO, V. F.; MEDEIROS, M. A. C.; 2006, Avaliação da contaminação, Occurrence and behavior of pesticides in Rainwater, roof runoff and artificial, 2012.

OLIVEIRA, S. D.; LEMOS, J. L. S.; BARROS, C. A.; LEITE, S. G. F. Emprego de fungos filamentosos na biorremediação de solos contaminados por petróleo; Estado da Arte, *Série Tecnologia Ambiental*, 2008.

OSMANI, S. A.; OAKLEY, B.R.; Identification of γ -tubulin, a new member of pathogènes des plantes. *C. R. Biologies*, v. 326, p. 9-21, 2003.

PAOLI, M. A.; *Degradação e Estabilização de Polímeros - Chemkeys*, v.2, 2008.

PESSIS, A. M.; *Imagens da pré-história: São Paulo, Parque Nacional Serra da Capivara, fundham/Petrobrás*, 2003.

PITT, J. I. *A laboratory guide to common Penicillium species*. 2nd ed. North Ryde: Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, 184 p., 1988.

PRESCOTT, L. M.; HARLEY, J. P.; KLEIN, D. A. The influence of environmental factors on microbial growth. New York, USA, Microbiology 6th ed. Mc Graw-Hill publication, p. 118-125, 2002.

RAFOTH. A.; GABRIEL, S.; SACHER.F.; BRAUCH, H. Journal Chromatography A, v.1164, p.74, 2007.

RIFAI, M. A. A revision of the genus *Trichoderma*. Mycological Papers, Great Britain, n. 116, p. 1-56, 1965.

SAAD, G. R.; KHALIL, T. M.; SABAA, M. W. Photo-and biodegradation characteristics of poly(ester-urethane) films based on poly[(R)-3-hydroxybutyrate] and poly(ϵ -caprolactone) blocks. J. Polym. Res., v.17, p.33-42, 2010.

SAMSON, R. A. Introduction to food-airborne fungi. 6th ed., Baarn: Central bureau voor Schimmelcultures, 389 p, 2000.

SAMSON, R. A.; HOEKSTRA, E. S.; FRISVAD, J. C. Introduction to food-airborne fungi. Baarn: Centraalbureau voor chimmelcultures, 6. ed., p.389, 2000.

SCHIPPER, M. A. A.; STALPERS, J. A. Spore ornamentation and species concept in *Syncephalastrum*. Persoonia, Leiden, v. 12, n. 1, p. 81-85, 1983.

SILVA, C. M. M. S.; MELO, I. S.; MAIA, A. M. N.; ABAKERLI, R. B. Isolamento de fungos degradadores de carbendazim. Brasília, Pesquisa Agropecuária Brasileira, v.34, p.1255-1264, 1994.

SILVA, M. M. S.; MELO, I. S.; MAIA, A. H. N. Isolamento de fungos degradadores de carbendazim. Pesquisa agropecuária brasileira, Brasília, 1999.

SILVA, P. F., RICELLY, L., MAIA, L., NAHON, S. Aplicação da metodologia da produção mais limpa na indústria moveleira Tramontina Belém S/A: estudo de caso cadeira Capri. Belém: Engenharia Ambiental da Universidade do Estado do Pará, 2003.

SINDUSCON – Sindicato da Indústria da Construção Civil no Estado de Minas Gerais. Tintas e Imobiliárias, (Programa QUALIMAT Sinduscon), Minas Gerais, 2010.

TAMURA, K., PETERSON, D., PETERSON, N., STECHER, G., NEI, M., KUMAR, S. (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Mol. Biol. Evol. 28: 2731-2739. doi: 10.1093/molbev/msr121 White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Skiksky JJ, White TJ (ed) PCR protocols: a guide to methods and applications. Academic Press, pp 315-322, 1990.

TORÉN, K.; BRISMAN, J.; MEDING, B.; Tubulin superfamily encoded by mip A gene of *Aspergillus nidulans*. Am. J. Ind. Med. Nature, v.30, p. 136-138, 2001.

UDDIN, M.; KIKUCHI, J. M.; TAKEDATSU, K.; FUJIMOTO. Isothiazolinones. Yamamoto, Synthesis, p. 365, 2000.

UEMOTO, K. L.; AGOPYAN, V.; Influência da formulação das tintas de base acrílica como barreira contra a penetração de agentes agressivos nos concretos. Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, 2005.

VETTA QUÍMICA. Ficha de informação de segurança do MMA, 2014.

VILLAS, M. R. A.; Processo de deposição de tintas catódicas por eletroforese e suas correlações com a qualidade, Niterói, Universidade federal Fluminense, p. 58-63, 2006.

WAJNER, M. D.; COELHO, R.; INGRASSIA, A. B.; BRANDT, E. N. BUSANELLO, K.; RAYMOND, R.F.; PIRES, C.; SOUZA, F. N.; GIUGLIANI, N. C.; VARGAS, R. Clin. Chim. Acta 400, 77–81 p. (2009).

WANG, Z.; WANG, Y. GONG, F.; ZHANG, J.; HONG, Q.; LI, S. Biodegradation of carbendazim by a novel actinobacterium *Rhodococcus jialingiae* djl-6-2. Chemosphere 81, 639-644 p., 2010.

YAMANAKA, H. T. Guia Técnico Ambiental de Tintas e Vernizes, ABRAFATI, p.08-10, 2006.

APÊNDICE 1A – Fixa de identificação

1-CÓDIGO DE COLEÇÃO: _____

2-ISOLAMENTO

2.1-Data: __/__/__

2.2-Local/amostra: _____

2.3-Temperatura de isolamento: 28°C

3-IDENTIFICAÇÃO

3.1-Macroscopia da colônia

3.2-Microscopia da colônia

3.3-Gênero

3.4-Observações

Gênero: *Trichoderma* sp.

No presente trabalho foram isoladas e identificadas nove cepas pertencentes a esse gênero. As características morfológicas e microscópicas das colônias estão descritas abaixo, e as fotos de cada cepa é apresentada na Figura 1.

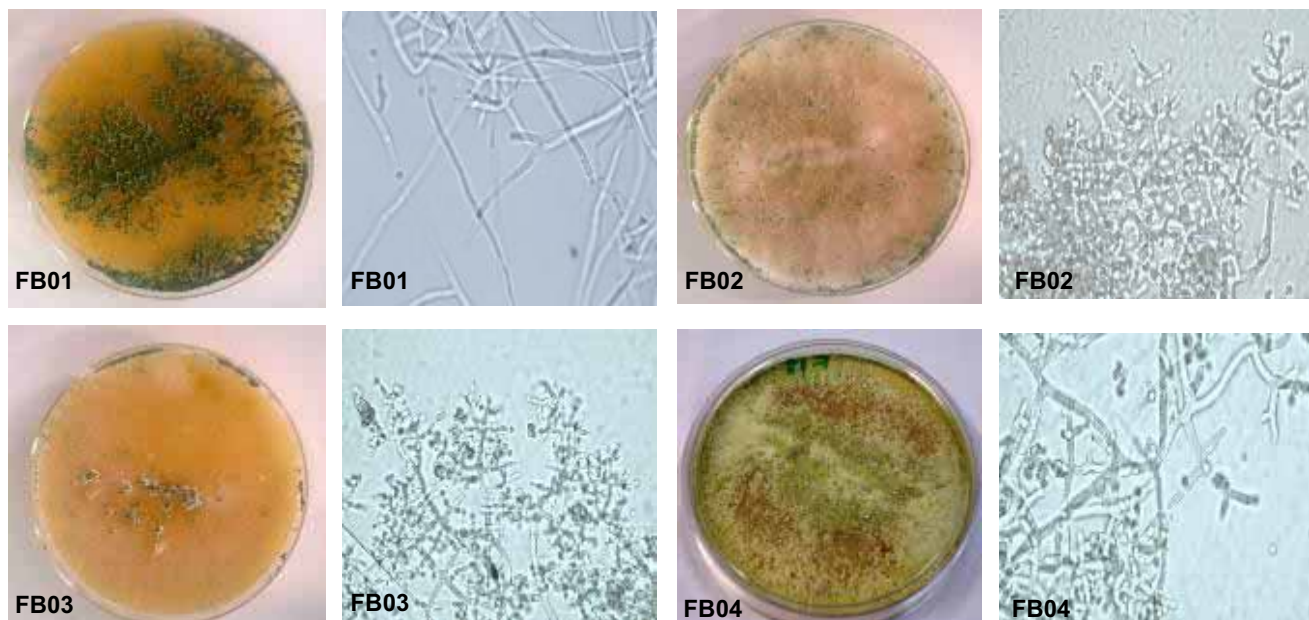
Características Macroscópicas das colônias:

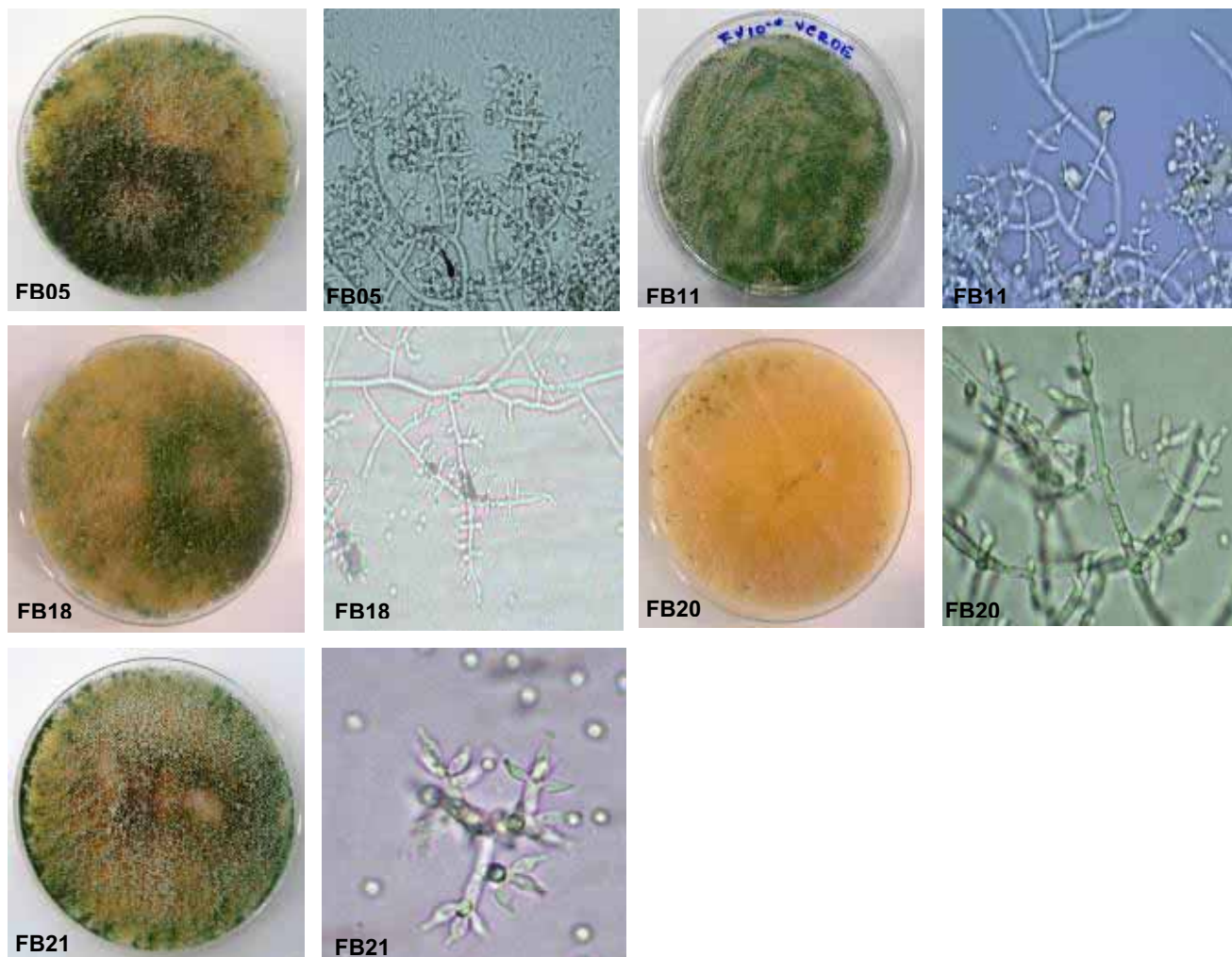
- Colônias de crescimento rápido;
- Micélio levemente aéreo;
- Apresenta cor inicialmente branca;
- Produz esporos de cor verde;
- Reverso da placa liso e incolor.

Características Microscopias das colônias:

- Esporos unicelulares de parede lisa, variando em formato de cilíndricos a subesféricos;
- São produzidos sucessivamente a partir das fiálides;
- Hifa septada e hialina;
- Conidióforos produzidos a partir de ramos laterais.

Figura 1. Fotos das características macroscópicas e microscópicas dos isolados pertencentes ao gênero *Trichoderma* sp.





Gênero: *Aspergillus* sp.

Foram isoladas seis cepas pertencentes ao gênero *Aspergillus* sp., suas características morfológicas e microscópicas estão descritas abaixo, e as fotos de cada cepa está representada na Figura 2.

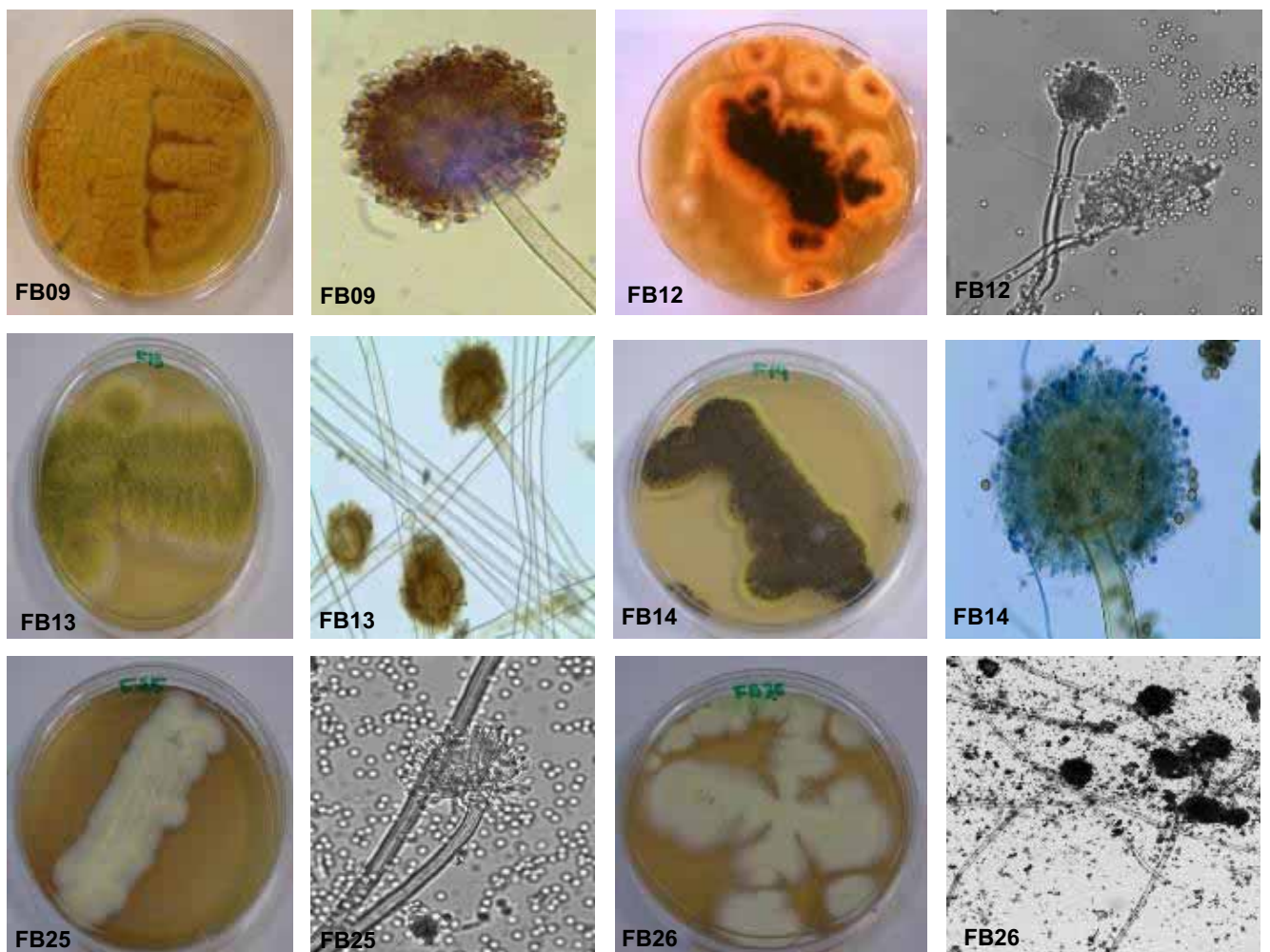
Características Macroscópicas das colônias:

- Micélio aéreo (FB09, FB13, FB14, FB25);
- Micélio moderadamente aéreo (FB12, FB26);
- Colônias de coloração amarela ou verde claro (FB13, FB09 – Sect. *Flavus*); coloração preta (FB14 – Sect. *Nigri*); cinza escuro (FB12 – Sect. *Fumigati*);
- A coloração dos esporos varia de acordo com cada espécie.

Características Microscopias das colônias:

- Esporos ovais rugosos (FB14 – Sect. Nigri);
- Hifas com vesículas terminais, recobertas de fiálides (FB13, FB09 – Sect. Flavus);
- Esporos saem da fiálide em cadeias (sect flavus);
- Esporos colunares, crescendo somente no topo da vesícula (sect flavus).
- Apresentam célula pé e parede dupla.

Figura 2. Fotos das características macroscópicas e microscópicas dos isolados pertencentes ao gênero *Aspergillus* sp.



Gênero: *Fusarium* sp.

Foram isoladas cinco cepas (FB06, FB07, FB19, FB23) pertencentes a esse gênero, sendo possível identificar em nível de espécie - *Fusarium solani*. Suas características macroscópicas e microscópicas estão descritas abaixo, e fotos de duas cepas estão representada na Figura 3.

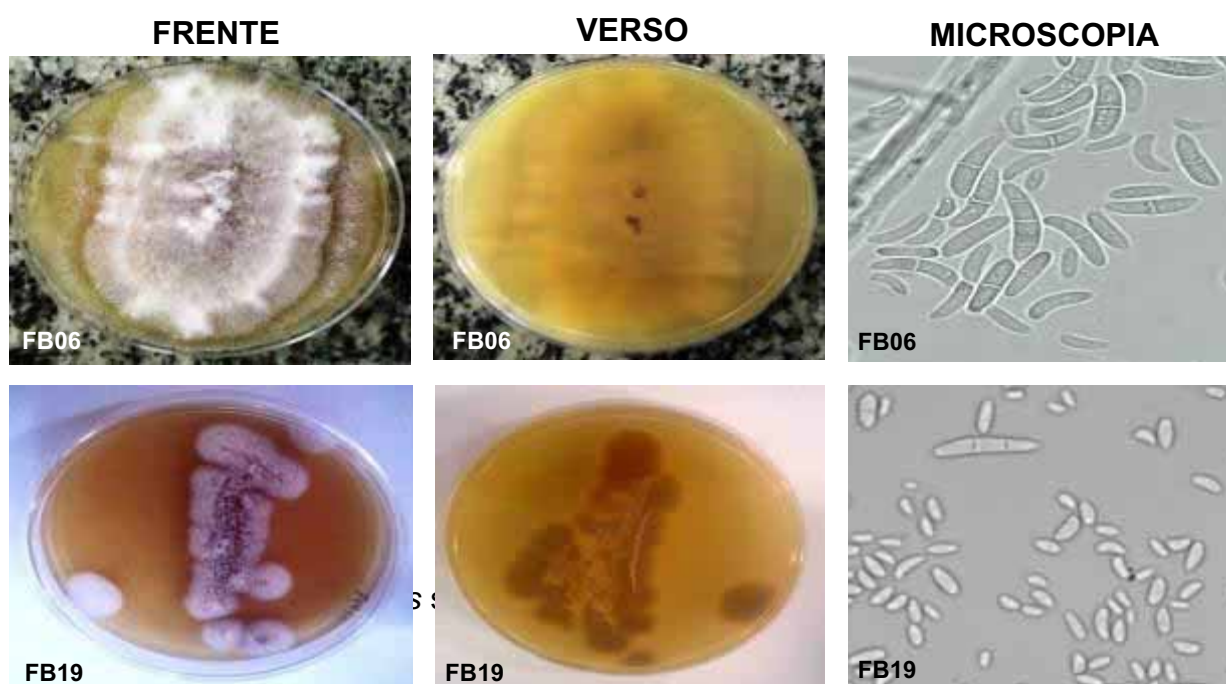
Características Macroscópicas das colônias:

- Micélio aéreo;
- Coloração varia de rosa a roxa;
- Reverso liso e escuro.

Características Microscopias das colônias:

- Apresentam os macroconídeos (FB16), esporos compridos em forma de foice com um septo ou mais;
- Microconídeos (FB19), esporos menores e ovalados sem a presença septo;
- Hifa levemente escura.

FIGURA 3. Fotos das características macroscópicas e microscópicas dos fungos *Fusarium Solani*.



Gênero : *Paecilomyces*

Foram isoladas cinco cepas (FB22, FB28, FB29, FB30, FB31) pertencentes a esse gênero. Suas características macroscópicas e microscópicas estão descritas abaixo, e fotos de uma cepa estão representadas na Figura 4.

Características Macroscópicas das colônias:

- Micélio levemente aéreo;
- Apresenta coloração beje;
- Reverso da placa liso e incolor;
- Crescimento rápido.

Características Microscopias das colônias:

- Fiálides mais abertas com longas formações de cadeias de esporos;
- Esporos esféricos e abundantes;
- Apresentam coloração escura.

FIGURA 4. Fotos das características macroscópicas e microscópicas do fungo *Paecilomyces* sp.



Gênero: *Penicillium* sp.

Apenas um fungo (FB15) foi identificado como pertencente a esse gênero. Suas características macroscópicas e microscópicas estão descritas abaixo, e as fotos da cepa estão representadas na Figura 5.

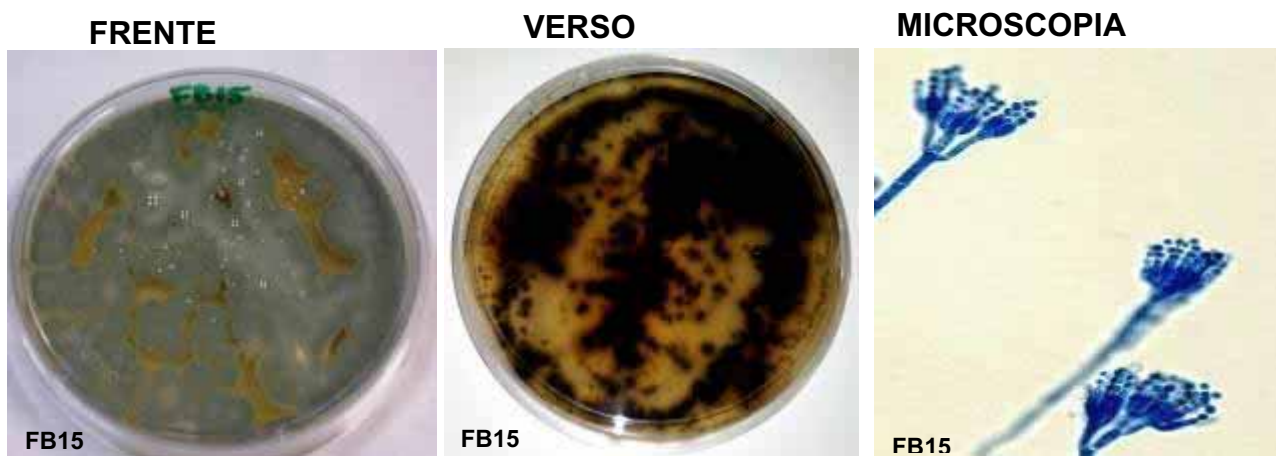
Características Macroscópicas das colônias:

- Crescimento rápido;
- Micélio rasteiro;
- Coloração verde a cinza escuro;
- Reverso da colônia liso e escuro.

Características Microscopias das colônias:

- Conidióforos assemelham-se com uma vassoura;
- Esporos subglobosos;
- Não apresentam vesículas;
- Os esporos são produzidos em cadeias nas extremidades das fiálides;
- Apresentam ramificações de hifas, característica importante para diferenciação de espécies.

FIGURA 5. Fotos das características macroscópicas e microscópicas do fungo *Penicillium* sp.



Gênero: *Syncephalastrum* sp.

Duas cepas (FB24, FB27) foram isoladas e identificadas como pertencentes ao gênero *Syncephalastrum* sp. Suas características macroscópicas e microscópicas estão descritas abaixo, e as fotos de uma cepa estão representadas na Figura 6.

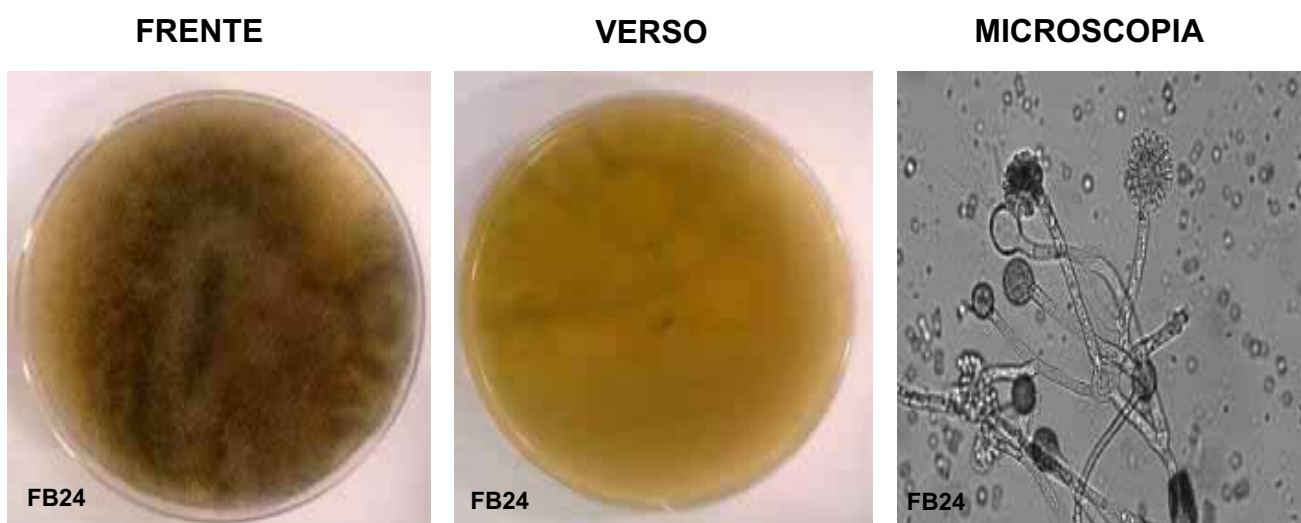
Características Macroscópicas das colônias:

- Crescimento rápido;
- Micélio aéreo abundante;
- Coloração cinza;
- Reverso da placa liso e amarelado.

Características Microscopias das colônias:

- Apresenta um septo (colarinho) abaixo da columela;
- Hifas moderadamente pigmentadas com ramificações e parede dupla;
- Possui rizoides;
- Esporos globosos produzidos em cadeia, envolvidos por uma vesícula.

FIGURA 6. Fotos das características macroscópicas e microscópicas do fungo *Syncephalastrum* sp.



Gênero: *Acremonium* sp.

Apenas uma cepa (FB16) foi isolada e identificada como pertencentes ao gênero em questão. Suas características macroscópicas e microscópicas estão descritas abaixo, e as fotos da cepa estão representadas na Figura 7.

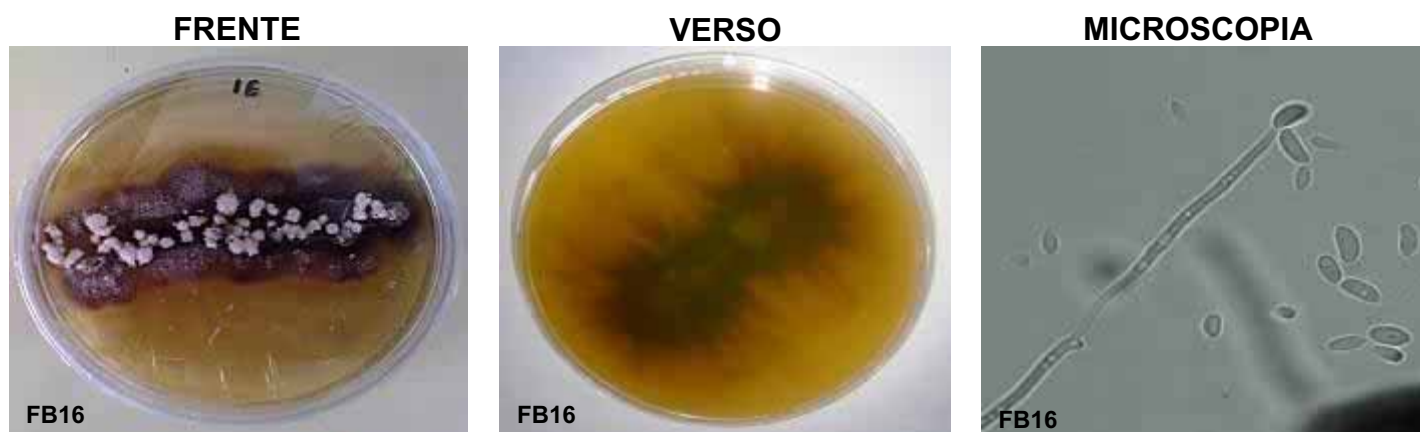
Características macroscópica da colônia:

- Micélio moderadamente aéreo;
- Coloração rosa a roxa;
- Reverso escuro.

Características Microscópica da colônia:

- Fiálides solitárias ou ramificadas originadas do feixe de hifas;
- Esporos de parede lisa com formato cilíndrico.

FIGURA 7. Fotos das características macroscópicas e microscópicas do fungo *Acremonium* sp.



Gênero: *Exophiala* sp. (Leveduras negras).

Foi isolada e identificada uma cepa de levedura negra (FB10). Suas características morfológicas e microscópicas estão descritas abaixo, assim como as fotos da cepa, conforme mostra a Figura 9.

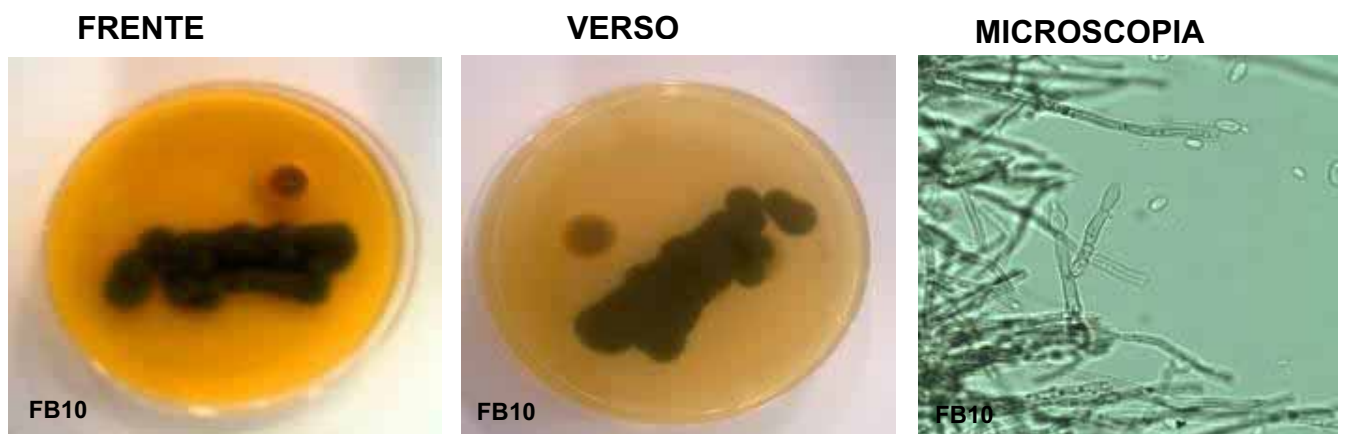
Características macroscópicas da colônia:

- Cor preta brilhante;
- Presença de micélio;
- Reverso da placa escuro e liso.

Características microscópicas da colônia:

- Apresenta hifas septadas;
- Reprodução por brotamento;
- Esporos cilíndricos com parede lisa.

FIGURA 8. Fotos das características macroscópicas e microscópicas do fungo *Exophiala* sp.



APÊNDICE 1B- Identificação dos isolados

Tabela 6- Locais e amostras coletadas e os respectivos fungos isolados e identificados

Amostra/Local	Código em Coleção	Gênero
Fungicida	FB01	<i>Trichoderma</i>
Resina	FB02	<i>Trichoderma</i>
Tinta branca	FB03	<i>Trichoderma</i>
Tinta gelo podre	FB04	<i>Trichoderma</i>
Tinta branca podre	FB05	<i>Trichoderma</i>
Moinho de partículas	FB06	<i>Fusarium</i>
Tinta gelo podre	FB07	<i>Fusarium</i>
Tinta gelo podre	FB08	<i>Fusarium</i>
Tinta gelo podre	FB09	<i>Aspergillus</i>
Tinta gelo podre	FB10	<i>Levedura Negra</i>
Resina	FB11	<i>Trichoderma</i>
Bactericida	FB12	<i>Aspergillus</i>
Tinta branca podre	FB13	<i>Aspergillus</i>
Balde de água suja 2	FB14	<i>Aspergillus</i>
Água do tanque tratamento 1	FB15	<i>Penicillium</i>
Água do tanque tratamento 1	FB16	<i>Acremonium</i>
Água do tanque tratamento 2	FB17	F.N.I
Tinta branca podre	FB18	<i>Trichoderma</i>
Água do tanque tratamento 3	FB19	<i>Fusarium</i>
Água do tanque tratamento 3	FB20	<i>Trichoderma</i>
Água do tanque tratamento 3	FB21	<i>Trichoderma</i>
Balde de água 1	FB22	<i>Paecilomyces</i>
Balde de água 2	FB23	<i>Fusarium</i>
Tinta branca	FB24	<i>Syncephalastrum</i>
Tinta gelo podre	FB25	<i>Aspergillus</i>
Tinta branca podre	FB26	<i>Aspergillus</i>
Resina	FB27	<i>Syncephalastrum</i>
Resina	FB28	<i>Paecilomyces</i>
Tanque de água 4	FB29	<i>Paecilomyces</i>
Biofilme de Tubulações	FB30	<i>Paecilomyces</i>
Misturador de Tinta	FB31	<i>Paecilomyces</i>
Tinta branca podre	FB32	<i>Rhodotorula</i>