

RESSALVA

Atendendo solicitação da
autora, o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 08/10/2021.

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(MICROBIOLOGIA APLICADA)

**Despolimerização de Polietilenotereftalato (PET) mediada por fungos
filamentosos**

LUSIANE MALAFATTI PICCA

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas-Microbiologia Aplicada.

Outubro-2018

DESPOLIMERIZAÇÃO DE POLIETILENOTEREFTALATO (PET) MEDIADA POR FUNGOS FILAMENTOSOS

LUSIANE MALAFATTI PICCA

Orientadora: Profa. Dra. Derlene Attili de Angelis

Co-orientadora: Profa. Dra. Dejanira de Franceschi de Angelis

Tese apresentada ao Instituto de
Biociências do Campus de Rio Claro,
Universidade Estadual Paulista, como
parte dos requisitos para obtenção do
título de Doutor em Ciências
Biológicas - Microbiologia Aplicada.

Rio Claro-SP

Outubro-2018

P587d Picca, Lusiane Malafatti
Despolimerização de Polietilenotereftalato (PET) mediada por
fungos filamentosos / Lusiane Malafatti Picca. -- Rio Claro, 2018
141 p. : il., tabs., fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Instituto de Biociências, Rio Claro
Orientadora: Derlene Attili de Angelis
Coorientadora: Dejanira de Franceschi de Angelis

1. INTRODUÇÃO. 2. OBJETIVOS. 3. REVISÃO DA
LITERATURA. 4. CAPÍTULO 1. 5. CAPÍTULO 2. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de
Biociências, Rio Claro. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: Despolimerização de Polietilenotereftalato (PET) mediada por fungos filamentosos

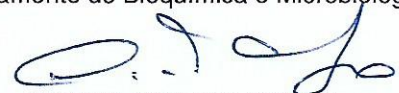
AUTORA: LUSIANE MALAFATTI PICCA

ORIENTADORA: DERLENE ATTILI DE ANGELIS

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (MICROBIOLOGIA APLICADA), pela Comissão Examinadora:


Profa. Dra. DERLENE ATTILI DE ANGELIS
Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas / Universidade Estadual de Campinas


Profa. Dra. DAIANE CRISTINA SASS
Departamento de Bioquímica e Microbiologia / IB Rio Claro


Prof. Dr. CARLOS RENATO CORSO
Departamento de Bioquímica e Microbiologia / IB Rio Claro


Profa. Dra. ADRIANA DE CAMPOS PASTRE
DCNME / UFSCar


Profa. Dra. LARISSA STIEVEN MONTAGNA
Instituto de Ciência e Tecnologia / UNIFESP

Rio Claro, 08 de outubro de 2018

Dedico este trabalho,

A meu filho amado, Vítor, que soube aceitar as minhas ausências, mesmo com tão pouca idade.

Ao meu marido, Daniel, que foi meu suporte e sanidade nos momentos em que achei que seria impossível.

Aos meus familiares, pai, mãe e irmã, José, Fátima e Eriane por estarem comigo mesmo que à distância, e terem sido mais que tia e avós para meu filho, nos períodos de férias e minha ausência.

A minha sogra Dinaura, por toda ajuda nos cuidados com meu filho e por torcer para que esse dia chegasse.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e Nossa Senhora Aparecida, presentes em todos os momentos de mais essa etapa da minha vida, obrigada pelo refúgio e fortaleza.

Ao meu filho querido, espero que um dia você entenda que minhas escolhas sempre serão por você e pra você e por me ensinar a ser mais leve. Te amo infinito!

Ao meu marido, obrigada por segurar a onda de tudo, obrigada por estar ao nosso lado, pela compreensão, paciência e por não sucumbir nos meus momentos de estresse. Amo-te!

Aos meus pais e irmã, obrigada por nunca esquecer ou abandonar. Ohana! Vocês são meu espelho.

À minha avó, Nica, pelas orações e torcida.

Aos outros familiares, por se preocuparem, torcerem pelo meu desenvolvimento e por toda ajuda.

À minha orientadora, professora Dra. Derlene Attili de Angelis, pela convivência, conhecimentos transmitidos, palavras de incentivo, paciência, confiança, empatia, caronas, e até por levar meu filho para sua mãe cuidar nos dias de correria, vou me lembrar de tudo isso com carinho. E também por permitir acesso à realização de parte deste trabalho na Divisão de Recursos Microbianos (DRM) do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) da Unicamp.

À professora Dra. Dejanira de Franceschi de Angelis, por me abrir as portas da Unesp para o doutorado, pelos ensinamentos, por permitir o uso do seu laboratório para execução de grande parte das análises. Obrigada também pelos docinhos, sempre alegraram meu dia.

Ao Centro de Pesquisa e Desenvolvimento Leopoldo Américo Miguez de Mello (Cenpes) nas pessoas de Dra. Aline Machado de Castro e Érika Valoni, pelas valiosas considerações no capítulo 1 deste trabalho e também pela demanda desta pesquisa, que fez com que eu me apaixonasse por fungos e também pelo trabalho com polímeros.

À professora Dra. Valéria Maia de Oliveira Merzel, pela confiança em meu trabalho, e por possibilitar a execução desta pesquisa de doutorado, além das considerações para o artigo 1.

Aos meus amigos do laboratório, Matheus e Carolina, que ouviram as mazelas com empatia e foram “ombro amigo” nos momentos de desesperança, obrigada por todas as risadas, tenho saudades de vocês.

Aos colegas do laboratório de Toxicidade, Dilza, Zito, João Paulo e Márcio, pela disponibilidade e torcida no final do trabalho. Obrigada!

Às minhas amigas, Cristina, Renata, Paula e Daniele por entenderem as minhas ausências nos cafés e sempre me receberem com sorrisos.

À professora Dra. Anita J. Marsaioli por permitir o uso do seu laboratório, toda infra-estrutura e reagentes para análises de HTS por fluorescência e ao seu aluno, Dr. Michel por ensinar os fundamentos das técnicas, me acompanhar nas análises e por ter me recebido como um membro do laboratório, com tamanha hospitalidade, muito obrigada!

Aos técnicos, Adriano e Carmen, pela disponibilidade quando precisei. Adriano, obrigada por todas as dicas para o trabalho com polímeros.

Ao Centro de Estudos Ambientais, por disponibilizar espaço e infra-estrutura para realização deste trabalho.

Aos funcionários do CEA, Gleide, Jorbison e Eleni por sempre estarem disponíveis a ajudar.

Às servidoras Miriam e Lú, pelos cuidados com o laboratório, e por receberem a mim e meu filho com tanto carinho.

À Coordenação da Pós-Graduação pela política de incentivo à pesquisa e produção acadêmica.

À Universidade Paulista UNIP, por permitir o desenvolvimento intelectual, possibilitando saídas para participação em eventos científicos.

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

Enfim, obrigada a todos que direta ou indiretamente ajudaram na realização deste trabalho.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar.

Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

(Madre Teresa de Calcutá)

RESUMO

As características de recalcitrância e insolubilidade em água tornam a disposição final de polímeros, um grande problema para sociedade moderna. Estima-se que em 30 anos, a quantidade de garrafas de polietilenotereftalato (PET) presentes no ambiente marinho irá se igualar à quantidade de peixes. Estratégias que programem a reciclagem de polímeros pós-consumo, tais como a despolimerização ou degradação de PET têm sido estudadas. Para contribuir com essa proposta, foram pesquisadas linhagens de fungos filamentosos com potencial para despolimerização de PET. Cem linhagens foram obtidas de diversos ambientes: amostras de água de rios do entorno de uma refinaria e de dentro dessa; cutícula de formiga; solo sob o plantio de *Citrus*; ar e de fragmentos de garrafa. Os isolados foram submetidos a uma triagem de atividades hidrolíticas para esterases e lipases por: ensaios em placas; análises de alto desempenho (HTS) com sondas esterificadas fluorogênicas com cadeias de 2 e 8 carbonos, e avaliação da capacidade de despolimerização de nanopartículas de PET. Nove isolados foram selecionados por apresentar promissoras atividades enzimáticas e são pertencentes aos gêneros *Microsphaeropsis*, *Mucor*, *Trichoderma*, *Westerdykella* e *Pycnidiophora* e seis linhagens foram capazes de converter as nanopartículas de PET em concentrações acima de 0,8% de ácido tereftálico (PTA): *Curvularia* sp, *Trichoderma* spp (2), *Cladosporium* sp e *Microsphaeropsis* (2). Estudos confirmatórios de fermentação foram conduzidos em fragmentos de PET de garrafas de diferentes cristalinidades. Dados de despolimerização foram obtidos pela quantificação do monômero PTA, bis-2-hidroxietiltereftalato (BHET) e metil-2-hidroxietiltereftalato (MHET), análises de espectroscopia de absorção no infravermelho (FTIR), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e avaliações de atividades de lipases e esterases nos líquidos fermentados. As linhagens eleitas liberaram PTA em concentrações acima de 12 ppm, BHET e MHET em concentrações acima de 0,6 ppm e também promoveram alterações na estrutura química e superfície dos fragmentos de PET. Os resultados corroboram que substratos associados a hidrocarbonetos são importantes fontes de microrganismos para aplicação em tecnologias ambientais. Por fim, este trabalho trouxe importante contribuição para estudos de biodegradação de polímeros, uma vez que destacou linhagens até então pouco estudadas para esta aplicação biotecnológica.

PALAVRAS-CHAVE: biodegradação; polímeros; catálise enzimática; microrganismos.

ABSTRACT

Recalcitrance and insolubility in water make the final disposal of polymers, a great problem for modern society. It is estimated that in 30 years, the amount of Polyethylene terephthalate (PET) bottles in the marine environment will match the quantity of fish. Green Strategies that program the recycling of post-consumer polymers such as depolymerization or degradation of PET has been studied. To contribute to this proposal, we investigated filamentous fungi strains with potential for depolymerization of PET. One hundred lines were obtained from several environments: water samples from rivers around a refinery and from within; ant cuticle; soil under the *Citrus* planting; air and bottle fragments. The isolates were subjected to a screening of hydrolytic activities for esterases and lipases by plaque assays; high performance analyzes (HTS) with fluorogenic esterified probes with chains of 2 and 8 carbons, and evaluation of the depolymerization capacity of PET nanoparticles. Nine isolates were selected for promising enzymatic activities and belong to the genera *Microsphaeropsis*, *Mucor*, *Trichoderma*, *Westerdykella* and *Pycnidiophora* and six lines were able to convert the PET nanoparticles to concentrations above 0.8% of terephthalic acid (PTA): *Curvularia* sp, *Trichoderma* spp (2), *Cladosporium* sp and *Microsphaeropsis* (2). Confirmatory fermentation studies were conducted on PET fragments from different crystallinity bottles. Depolymerization data were obtained by quantification of the PTA monomer, bis-2-hydroxyethylterephthalate (BHET) and methyl-2-hydroxyethylterephthalate (MHET), infrared absorption spectroscopy (FTIR), scanning electron microscopy (SEM) and activities of lipases and esterases in fermented liquids. The selected strains released PTA at concentrations above 12 ppm, BHET and MHET at concentrations above 0.6 ppm and also promoted changes in the chemical structure and surface of the PET fragments. The results corroborate that substrates associated with hydrocarbons are important sources of microorganisms for application in environmental technologies. Finally, this work has made an important contribution to studies of biodegradation of polymers, since it has highlighted lines that have not been studied for this biotechnological application.

KEY-WORDS: biodegradation; polymers; enzymatic catalysis, microorganisms.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Permanência de materiais poliméricos no ambiente	18
---	-----------

Tabela 2. Estudos de despolimerização de PET mediada por fungos	28
--	-----------

Capítulo 1

Table 1 Source, localization of isolation and fungal taxa screened for lipase and esterase activities.	34
---	-----------

Table 2 Primers and conditions used for amplification.	35
---	-----------

Table 3 Gradient program applied in HPLC separation	41
--	-----------

Table 4 Conversion extent of short-chain ester probe of selected isolates.	45
---	-----------

Table 5 Conversion extent of long-chain ester probe of selected isolates.	46
--	-----------

Table S1. Conversion extent of short-chain ester probe of isolates presented in Figure 3a.	68
---	-----------

Table S2. Conversion extent of long-chain ester probe of selected isolates presented in Figure 3b.	69
---	-----------

Capítulo 2

Tabela 1. Fonte, Local de isolamento e táxons triados para enzimas com potencial para conversão de PET	82
---	-----------

Tabela 2. Características físicas obtidas por análises de DSC para as amostras de PET 1 e PET 2. T_m °C= temperatura de fusão; $\Delta H_m(J.g^{-1})$ = entalpia de fusão; X(%)= porcentagem de cristalinidade.	86
--	-----------

Tabela 3. Meios de cultura utilizados no teste de despolimerização de PET.	87
---	-----------

Tabela 4. Programação de gradiente aplicado nas separações cromatográficas	91
---	-----------

Tabela 5. Conversão das nanopartículas de PET (%), no 15º dia de análise	92
---	-----------

Tabela 6. Atividades de lipase e esterase no líquido fermentado (resultados expressos em média $\pm$ desvio padrão, n=3)	96
---	-----------

Tabela 7. Atividades de lipase e esterase no líquido fermentado	98
--	-----------

Tabela S1. Atividades de lipase e esterase determinada por HTS com sondas fluorescentes esterificadas (resultados expressos em média $\pm$ desvio padrão, n=4, tempo de análise 96 h.	126
--	------------

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação da estrutura química da molécula de PET	18
Figura 2. Representação da reação de policondensação de Polietilenotereftalato	19
Figura 3. Polietilenotereftalato (PET) e os subprodutos tereftalato de Bis-hidroxietila (BHET), ácido mono (2-hidroxietil) tereftálico (MHET), ácido tereftálico (PTA) e etilenoglicol (EG).	26

Capítulo 1

Fig.1 Chain reaction for the fluorescence-based HTS assays with probes 1 and 2	37
Fig.2 Plate assay for lipase and esterase activity.	42
Fig.3 Conversion extent of probes by the most promising fungal strains: a. probe 1 b. probe 2. Data expressed as average $\pm$ standard deviation (n=4).	44
Fig. 4 SEM images of PET fragments of commercial bottle PET 1.	48
Fig. 5 SEM images of PET fragments of commercial bottle PET 2.	49
Fig. 6 Lipase and esterase activity after 14 days of fermentation in PDB with isolates <i>M. arundinis</i> (CBMAI 2109 and CBMAI 2110).	50
Fig. 7 Weigh loss of PET fragments and terephthalic acid, Bis- 2 hydroxyethyl terephthalate (BHET) and Methylhydroxyethyl terephthalate (MHET) content in PDB after 14 days of fermentation with the isolates <i>M. arundinis</i> (CBMAI 2109 and CBMAI 2110).	51
Fig. 8 FTIR graphs of PET 1 (A) and PET 2 (B) after 14 days of fermentation with the isolates <i>M. cf. arundinis</i> (CBMAI 2109 and CBMAI 2110). A) a. PET 1 abiotic control; b. CBMAI 2109 treatment; c. CBMAI 2110 treatment. B) a. PET 2 abiotic control; b. CBMAI 2110 treatment; c. CBMAI 2109 treatment.	52
Figure S1 Plate assay for esterase activity. a1. seven-days-old <i>Mucor fragilis</i> CBMAI 2080 colonies, before revelation.	70
Figure S2 Plate assay for lipase activity.	71
Figure S3 A 1. Figure 8 A rescaled region of 4000-3000 cm^{-1}	72
Figure S3 A 2. Figure 8 A rescaled region of 3000-2000 cm^{-1}	72
Figure S3 A 3. Figure 8 A rescaled region of 2000-1000 cm^{-1}	73
Figure S3 A 4. Figure 8 A rescaled region of 1000-400 cm^{-1}	73
Figure S3 B 1. Figure 8 B rescaled region of 4000-3000 cm^{-1}	74
Figure S3 B 2. Figure 8 B rescaled region of 3000-4000 cm^{-1}	74

LISTA DE FIGURAS

Figure S3 B 3. Figure 8 B rescaled region of 2000-1000 cm ⁻¹	75
Figure S3 B 4. Figure 8 B rescaled region of 1000-400 cm ⁻¹	75

Capítulo 2

Figura 1- Esquema de ensaios da placa de 96 poços.	83
Figura 2- Reação de conversão de ácido tereftálico (PTA) em 2-hidroxitereftalato (HOTP)	84
Figura 3- Formação de diazocomplexo pela ação de esterases sobre alfa-naftil acetato	89
Figura 4- Fluxograma da extração líquido-líquido de PTA, BHET e MHET do caldo fermentado.	90
Figura 5- Cromatograma de separação dos analitos ácido tereftálico, bis-2-hidroxietiltereftalato, ácido benzóico e metil-2-hidroxietiltereftalato (soluções padrões 240 ppm, volume de injeção = 3 µL)	91
Figura 6- Ensaio qualitativo para avaliação de linhagens produtoras de cutinase	93
Figura 7- Variação de massa dos fragmentos de PET pós-fermentação.	94
Figura 8- Concentrações em ppm de PTA, MHET e BHET liberados de PET 1 e PET2 com 3 meios de cultivo diferentes (tempo= 40 dias).	96
Figura 9- Espectros de Absorção de Infravermelho (FTIR) dos polímeros PET 1 e PET 2 após 40 dias de contato com os isolados <i>Trichoderma</i> sp CBMAI 2073 e <i>Cladosporium</i> sp CBMAI 2075.	97
Figura 10- Variação de massa em miligramas e concentrações de PTA, BHET e MHET obtidas com as linhagens <i>Curvularia</i> sp CBMAI 2111 e <i>Trichoderma</i> sp CBMAI 2071.	98
Figura 11- Espectros de Infravermelho (FTIR) dos polímeros PET 1 e PET 2 após 15 dias de contato com os isolados <i>Curvularia</i> sp CBMAI 2111 e <i>Trichoderma</i> sp CBMAI 2073.	99

LISTA DE FIGURAS

Figura 12- Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) demonstrando ação dos isolados <i>Trichoderma</i> sp CBMAI 2073 e <i>Cladosporium</i> sp CBMAI 2075 sobre as amostras de PET 1 e PET 2, em comparação ao controle abiótico (meio caldo CBD, sem inóculo).	100
Continuação Figura 12- Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) demonstrando ação dos isolados <i>Curvularia</i> sp CBMAI 2111 e <i>Trichoderma</i> sp CBMAI 2071 sobre as amostras de PET 1 e PET 2, em comparação ao controle abiótico (meio caldo CBD, sem inóculo).	101
Figura S1. Termogramas dos fragmentos de PET 1 (marca Crystal) e PET 2 (marca Sprite), temperaturas de fusão- PET1= 251,12 °C e PET 2= 253,41 °C.	113
Figura S2. Espectros de absorção no Infravermelho para Policaprolactona (em diclorometano) e cutina em pó extraída das cascas de maçã <i>Fuji</i> . As amostras foram preparadas em pastilhas de KBr.	114
Figura S3 A. Espectros de FTIR da região 4000- 3000 cm ⁻¹ do tratamento com o isolado <i>Trichoderma</i> sp CBMAI 2073 em PET 1.	114
Figura S3 B. Espectros de FTIR da região 3000- 2000 cm ⁻¹ do tratamento com o isolado <i>Trichoderma</i> sp CBMAI 2073 em PET 1.	115
Figura S3 C. Espectros de FTIR da região 2000- 1000 cm ⁻¹ do tratamento com o isolado <i>Trichoderma</i> sp CBMAI 2073 em PET 1.	115
Figura S3 D. Espectros de FTIR da região 1000- 400 cm ⁻¹ do tratamento com o isolado <i>Trichoderma</i> sp CBMAI 2073 em PET 1.	116
Figura S3 E. Espectros de FTIR da região 4000- 3000 cm ⁻¹ do tratamento com o isolado <i>Trichoderma</i> sp CBMAI 2073 em PET 2.	116
Figura S3 F. Espectros de FTIR da região 3000- 2000 cm ⁻¹ do tratamento com o isolado <i>Trichoderma</i> sp CBMAI 2073 em PET 2.	117
Figura S3 G. Espectros de FTIR da região 2000- 1000 cm ⁻¹ do tratamento com o isolado <i>Trichoderma</i> sp CBMAI 2073 em PET 2.	117
Figura S3 H. Espectros de FTIR da região 1000- 400 cm ⁻¹ do tratamento com o isolado <i>Trichoderma</i> sp CBMAI 2073 em PET 2.	118
Figura S3 I. Espectros de FTIR da região 4000- 3000 cm ⁻¹ do tratamento com o isolado <i>Cladosporium</i> sp CBMAI 2075 em PET 1.	118

Figura S3 J. Espectros de FTIR da região 3000- 2000 cm^{-1} do tratamento com o isolado <i>Cladosporium</i> sp CBMAI 2075 em PET 1.	119
Figura S3 K. Espectros de FTIR da região 2000- 1000 cm^{-1} do tratamento com o isolado <i>Cladosporium</i> sp CBMAI 2075 em PET 1.	119
Figura S3 L. Espectros de FTIR da região 1000- 400 cm^{-1} do tratamento com o isolado <i>Cladosporium</i> sp CBMAI 2075 em PET 1.	120
Figura S3 M. Espectros de FTIR da região 4000- 3000 cm^{-1} do tratamento com o isolado <i>Cladosporium</i> sp CBMAI 2075 em PET 2.	120
Figura S3 N. Espectros de FTIR da região 3000- 2000 cm^{-1} do tratamento com o isolado <i>Cladosporium</i> sp CBMAI 2075 em PET 2.	121
Figura S3 O. Espectros de FTIR da região 2000- 1000 cm^{-1} do tratamento com o isolado <i>Cladosporium</i> sp CBMAI 2075 em PET 2.	121
Figura S3 P. Espectros de FTIR da região 1000- 400 cm^{-1} do tratamento com o isolado <i>Cladosporium</i> sp CBMAI 2075 em PET 2.	122
Figura S4 A. Espectros de FTIR da região 4000- 3000 cm^{-1} dos tratamentos com os isolados <i>Curvularia</i> sp CBMAI 2111 e <i>Trichoderma</i> sp CBMAI 2071 em PET 1.	122
Figura S4 B. Espectros de FTIR da região 3000- 2000 cm^{-1} dos tratamentos com os isolados <i>Curvularia</i> sp CBMAI 2111 e <i>Trichoderma</i> sp CBMAI 2071 em PET 1.	123
Figura S4 C. Espectros de FTIR da região 2000- 1000 cm^{-1} dos tratamentos com os isolados <i>Curvularia</i> sp CBMAI 2111 e <i>Trichoderma</i> sp CBMAI 2071 em PET 1.	123
Figura S4 D. Espectros de FTIR da região 1000- 400 cm^{-1} dos tratamentos com os isolados <i>Curvularia</i> sp CBMAI 2111 e <i>Trichoderma</i> sp CBMAI 2071 em PET 1.	124
Figura S4 E. Espectros de FTIR da região 4000- 3000 cm^{-1} dos tratamentos com os isolados <i>Curvularia</i> sp CBMAI 2111 e <i>Trichoderma</i> sp CBMAI 2071 em PET 2.	124
Figura S4 F. Espectros de FTIR da região 3000- 2000 cm^{-1} dos tratamentos com os isolados <i>Curvularia</i> sp CBMAI 2111 e <i>Trichoderma</i> sp CBMAI 2071 em PET 2.	125
Figura S4 G. Espectros de FTIR da região 2000- 1000 cm^{-1} dos tratamentos com os isolados <i>Curvularia</i> sp CBMAI 2111 e <i>Trichoderma</i> sp CBMAI 2071 em PET 2.	125
Figura S4 H. Espectros de FTIR da região 1000- 400 cm^{-1} dos tratamentos com os isolados <i>Curvularia</i> sp CBMAI 2111 e <i>Trichoderma</i> sp CBMAI 2071 em PET 1.	126

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
2. OBJETIVO GERAL.....	16
2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3. REVISÃO DE LITERATURA	18
3.1. Polietilenotereftalato (PET).....	18
3.2. Ácido tereftálico e a reciclagem de PET	22
3.3. Biocatálise - enzimas envolvidas na degradação de PET	24
3.4. Estudos envolvendo despolimerização de PET por fungos.....	27
3.5. Avaliação do processo de degradação	29
4.1. CAPÍTULO 1	30
4.2. CAPÍTULO 2	76
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	127
REFERÊNCIAS.....	129
ANEXO	136

1. INTRODUÇÃO

Grande parte das mudanças tecnológicas realizadas pelo homem se deve à ascensão dos polímeros como material alternativo. Assim, borrachas, plásticos e fibras sintéticas impulsionaram o desenvolvimento dos setores automotivo, eletro-eletrônico, têxtil, de embalagem e da medicina (ANDRADY; NEAL, 2009; NAMAZI, 2017). O termo *polímero* foi criado pelo químico alemão Jöns Jakob Berzelius em 1833, que o definiu como uma substância química feita de unidades repetitivas, formado de redes tridimensionais, bidimensionais ou unidimensionais (JENSEN, 2006, 2008).

O aumento no poder de compra e o crescimento populacional conferem estimativas de aumento exponencial na quantidade consumida e descarte destes materiais (ELVERS et al., 2016). O consumo mundial de plásticos em 2016 foi de 335 milhões de toneladas (PLASTICS EUROPE, 2017). É esperado que o seu mercado mundial movimente cerca de 375 bilhões de dólares em 2020, com uma taxa de crescimento anual de 4,8% (MARKET RESEARCH STORE, 2016).

Na Europa, 39,9% de todo o plástico produzido é utilizado para compor embalagens, 7,4% dessas são de Polietilenotereftalato (PET) com aplicação em garrafas de água, refrigerantes, sucos, produtos de limpeza, entre outros (PLASTICS EUROPE, 2017). O Brasil não fica distante desta estimativa, em 2016 foram produzidas 840 mil toneladas do polímero. Dados anteriores estimavam que em 2011, 90% de todo o PET produzido no país seria aplicado na composição de embalagens de bebidas e alimentos. Na verdade, em 2015 apenas 51% desse material foi reciclado no Brasil (ABIPET, 2012; ABIPET, 2017), o que considera-se muito preocupante.

A apreensão sobre a utilização de polímeros em geral, especificamente o PET, se dá por alguns motivos, por exemplo, pelo fato de ser considerado um material de alta permanência ambiental, devido à sua baixa biodegradabilidade, proveniente de suas propriedades físico-químicas (TOKIWA et al., 2009). Segundo, pelos tímidos índices de reciclagem encontrados em alguns países (COELHO et al., 2001). E terceiro, os monômeros que compõem o PET, ácido tereftálico e monoetilenoglicol adveêm de recursos fósseis não renováveis (WEI; ZIMMERMANN, 2017a).

Nos últimos anos, garrafas PET tem sido responsável pelo aumento no volume dos resíduos sólidos, resultante de atividades econômicas baseadas no consumo, produção em massa e eliminação de resíduos. Por isso, é urgente o desenvolvimento de

sistemas sustentáveis para destinação de PET e de melhores alternativas para sua disposição (COELHO; CASTRO; JR, 2011)

Além disso, quando estas garrafas são descartadas de maneira incorreta no meio ambiente, podem atingir os oceanos, e acarretar diversos problemas. Foi demonstrado que no ambiente marinho, sob a ação da luz solar e das ondas, os itens plásticos quebram-se em fragmentos cada vez menores, de dimensões micrométricas, dando o nome de microplástico. Este material fica disponível para a ingestão por diferentes organismos residentes nos oceanos (COLE et al., 2011; IOAKEIMIDIS et al., 2016).

Sendo assim, a reciclagem surge como uma alternativa viável e rentável para a destinação de materiais poliméricos por agregar valor a um resíduo sólido e oferecer benefícios ao meio ambiente (COELHO; CASTRO; JR, 2011; SILVA, 2012) e transformar materiais previamente separados para posterior utilização. Desta forma, os resíduos são recuperados por meio de uma série de operações que permitem que materiais já processados sejam aproveitados como matéria-prima no processo gerador ou em outros processos (MWANZA; MBOHWA; TELUKDARIE, 2018).

O reaproveitamento do PET está dividido em três tipos: reciclagem química, mecânica e térmica, agrupadas em primária, secundária, terciária e quaternária (GARCIA; ROBERTSON, 2017). A hidrólise de PET se enquadra na estratégia terciária de reciclagem e pode ser mediada por substâncias químicas, como por exemplo, em meio fortemente alcalino, mas também por ser executada por microrganismos, neste processo ocorre a despolimerização com produção de ácido tereftálico e etilenoglicol (PATNI et al., 2013), possibilitando assim a reutilização desses monômeros para produção de novas garrafas.

A utilização de microrganismos no processo de despolimerização/degradação de PET é recomendada, pois estes são capazes de produzir enzimas promotoras de hidrólise das cadeias poliméricas, como esterases e cutinases (WEI; ZIMMERMANN, 2017b). Algumas linhagens de microrganismos demonstraram resultados positivos na degradação de PET, *Penicillium* sp (NOWAK et al., 2011; SEPPERUMAL; MARKANDAN; PALRAJA, 2013), *Pleurotus* spp (SILVA, 2009). Atualmente, estudos têm focado na utilização de enzimas purificadas em ensaios de biodegradação com resultados favoráveis, hidrolases recombinantes de *Termobifida fusca* (MÜLLER et al., 2005); cutinases de *Humicola insolens* (DE CASTRO et al., 2017), esterases de

Termobifida halotolerans (RIBITSCH et al., 2012). Quanto às enzimas produzidas por fungos há hidrolases de *Fusarium* spp (NIMCHUA; PUNNAPAYAK; ZIMMERMANN, 2007); *Penicillium* sp (LIEBMINGER et al., 2007) e cutinases de *Glomerella cingulata* (SEMAN et al., 2014), os quais apresentaram resultados importantes para a mobilização do polímero.

As abordagens que destacam linhagens ou enzimas com potencial para despolimerização, contudo, partem do pressuposto que essas devam ser capazes de coexistir com o polímero em um determinado meio, para então assimilá-lo (GHAFARI MOSANENZADEH et al., 2014). Considerando que no meio ambiente existe uma grande diversidade de microrganismos e apenas uma pequena porcentagem foi explorada quanto ao seu potencial biotecnológico (TRIPATHI et al., 2007), estudos que atuem na pesquisa de linhagens com capacidade de assimilar polímeros (diante da problemática em que estão envolvidos) merecem reconhecimento e incentivo.

2. OBJETIVO GERAL

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade de despolimerização de PET proveniente de garrafas com diferentes cristalinidades, mediada por fungos filamentosos, visando à recuperação de monômeros. Para isso, foram selecionados cem isolados fúngicos que fazem parte do acervo de interesse para o setor de petróleo, gás e biocombustíveis, Centro de Estudos Ambientais (Laboratório de Microbiologia Ambiental - LMA), Unesp- Rio Claro, SP.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Promover uma triagem qualitativa para avaliar a produção das enzimas lipases, esterases e cutinases, por meio de ensaios em placas com técnicas colorimétricas e de assimilação de substratos específicos.
- Aplicar uma triagem quantitativa de alto desempenho (do inglês, HTS) para selecionar linhagens produtoras de esterases e lipases com sondas fluorogênicas de cadeia curta e longa.
- Executar triagem de linhagens fúngicas também por HTS para avaliar o potencial enzimático de despolimerização de nanopartículas de PET.

- Realizar ensaios para avaliação quantitativa de ácido tereftálico (PTA), bis-2 tereftalato de hidroxietila (BHET) e metil-2-hidroxietiltereftalato (MHET) utilizando os isolados selecionados promissores via processo fermentativo.
- Quantificar os analitos supracitados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), com detector Ultravioleta (UV) após extração líquido-líquido.
- Verificar as alterações físicas da ação dos isolados fúngicos selecionados sobre filmes de PET, mediante análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FTIR).
- Elegir meio de cultura que proporcionou melhores resultados nos ensaios de despolimerização.
- Identificar e caracterizar os isolados selecionados neste estudo.
- Depositar as culturas de melhor eficiência na Coleção Brasileira de Microrganismos de Ambiente e Indústria (CBMAI).

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- As 100 linhagens fúngicas utilizadas neste estudo pertencem às seguintes classes: 34% Eurotiales, principalmente *Penicillium* e *Aspergillus*; 33% Hypocreales (*Trichoderma* e *Fusarium*), 28% Pleosporales e Mucorales, o menor grupo 5% é mais diversificado contendo representantes de Glomerellales, Microascales, Capnodiales e fungos não esporulantes. Estas foram isoladas de ambientes diversos, tais como: amostras de água de rios do entorno de uma refinaria, cutícula de formigas, solo sob o plantio de *Citrus*, amostras de ar, polímeros; água tratada, efluente e lodo de esgotode refinaria de petróleo. A maior parte das amostras foi obtida de ambientes associados a hidrocarbonetos, 60% de amostras de água e 8% de amostras de corpo de formiga cortadeira.

- Os ensaios qualitativos em placas para avaliar a produção de hidrolases (lipases e esterases) permitiram diferenciar linhagens com boa, intermediária e baixa capacidade de produção de lipases, bem como aquelas que são produtoras de esterases. Sendo assim, 39 linhagens tiveram atividade lipolítica, enquanto que 51 foram consideradas produtoras de esterases; 21 isolados apresentaram atividades hidrolíticas para ambas as enzimas.

- Os resultados qualitativos corroboram com aqueles obtidos nos ensaios quantitativos, com sondas fluorescentes de cadeia curta e longa e triagens de alto desempenho, sendo que as linhagens destacadas acima se encontraram em posição de destaque entre aquelas que foram capazes de converter as sondas em porcentagens acima de 50%, quando comparado ao controle positivo.

- A abordagem inicial deste trabalho foi selecionar linhagens com reconhecido potencial para produção de hidrolases, e as linhagens que se destacaram foram: *Mucor cf. fragilis* CBMAI2080; *Microsphaeropsis cf. arundinis* CBMAI 2109 e 2110; *Westerdykella dispersa* CBMAI 2076, 2077 e 2081; *Trichoderma cf. longibrachiatum* CBMAI 2082; *Mucor cf. ramosissimus* CBMAI 2079, *Trichoderma cf. asperellum* CBMAI 2074 e *Pycnidophora cf. dispersa* LMA 30. Essas linhagens em específico são provenientes de ambientes associados a hidrocarbonetos, amostras de água e cutícula de formiga cortadeira, mostrando assim que esse ambiente pode ser considerado uma fonte importante de linhagens com potencial biotecnológico.

- Uma segunda abordagem foi elencar linhagens produtoras de enzimas com

capacidade de despolimerizar nanopartículas de PET. As linhagens que obtiveram êxito neste *screening* foram: *Curvularia* sp CBMAI 2111, *Trichoderma* spp CBMAI 2071 e CBMAI 2073 e *Cladosporium* sp CBMAI 2075, além das duas linhagens de *Microsphaeropsis arundinis* (CBMAI 2109 e 2110) destacadas acima além de um representante da família Microascacea LMA 192. Tais linhagens apresentaram porcentagens de conversão das nanopartículas acima de 0,8%. Dessas, *Curvularia* sp CBMAI 2111, *Trichoderma* spp CBMAI 2071 e CBMAI 2073 e *Cladosporium* sp CBMAI 2075 demonstraram capacidade de assimilar cutina e Policaprolactona como única fonte de carbono, sendo assim consideradas produtoras de cutinases.

- As linhagens *Microsphaeropsis arundinis* CBMAI 2109 e 2110, *Curvularia* sp 2111, *Trichoderma* spp CBMAI 2071 e 2073 e *Cladosporium* CBMAI 2075 foram capazes de despolimerizar PET de garrafas com diferentes cristalinidades, produzindo o monômero (PTA), e os oligômeros (BHET e MHET) em concentrações acima de 12,0 e 0,6 ppm (mg.L^{-1}), respectivamente. Ensaios de FTIR, MEV e atividades hidrolíticas foram condizentes com os dados de despolimerização por HPLC-UV, diferente dos ensaios de gravimetria (perda de massa dos polímeros após a fermentação), que não foram constantes ao longo dos ensaios.

- Ensaios com diferentes meios de cultura, meio mínimo mineral com azeite e glicose, como única fonte de carbono e Caldo Batata Dextrose, evidenciaram que o Caldo Batata Dextrose apresentou melhores resultados para despolimerização com as linhagens acima destacadas e, um período de 15 dias de fermentação foi capaz de promover a liberação de subprodutos pelas linhagens estudadas.

- No nosso entender, os resultados obtidos neste trabalho ainda são modestos diante do que se pode alcançar com as linhagens *Microsphaeropsis arundinis* CBMAI 2109 e 2110, *Curvularia* sp 2111, *Trichoderma* spp CBMAI 2071 e 2073 e *Cladosporium* CBMAI 2075. Estudos futuros objetivando o melhoramento e o monitoramento das condições de cultivo, além do isolamento, caracterização e identificação de suas enzimas se fazem necessárias, para que essas linhagens sejam de fato utilizadas no setor industrial para despolimerização de PET e produção de ácido tereftálico.

REFERÊNCIAS

- AL-AZZAWI, F. **Degradation studies on recycled polyethylene terephthalate**. 2015. 234 f. Tese (Doutorado). Sir John Cass faculty of art, arquitetura and design. Polymer Science and Engineering. London Metropolitan University. 2015.
- AL-SABAGH, A. M. et al. Greener routes for recycling of polyethylene terephthalate. **Egyptian Journal of Petroleum**, v. 25, n. 1, p. 53–64, 2016.
- ALISCH, M. et al. Biocatalytic modification of polyethylene terephthalate fibres by esterases from actinomycete isolates. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 22, n. 5–6, p. 347–351, 2004.
- ALBUQUERQUE, M. C. C. et al. Aplicações de enzimas na síntese e na modificação de polímeros. **Quim. Nova**, v. 37, n. 4, p. 699–708, 2014.
- AL-SALEM, S. M.; LETTIERI, P.; BAEYENS, J. The valorization of plastic solid waste (PSW) by primary to quaternary routes: From re-use to energy and chemicals. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 36, p. 103–129, 2010.
- AMERICAN CHEMISTRY ASSOCIATION. **Beyond the ethylene steam cracker**, 2017. Disponível em: <<https://www.acs.org/content/acs/en/pressroom/cutting-edge-chemistry/beyond-the-ethylene-steam-cracker.html>>. Acesso em: 18 jun. 2018.
- AMERICAN CHEMISTRY COUNCIL. Lifecycle of a Plastic Product. **Plastics**, p. 1–11, 2013. Disponível em: <https://plastics.americanchemistry.com/Lifecycle-of-a-Plastic-Product>. Acesso em: 15 jun. 2018.
- ANDRADY, A. L.; NEAL, M. A. Applications and societal benefits of plastics. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 364, n. 1526, p. 1977–1984, 2009.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE PET (ABIPET). Indústria do PET no Brasil. p. 20, 2012. Disponível em: www.abipet.org.br/indexAjax.html?method=baixarArquivo&id=392. Acesso em: 15 jun. 2018.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE PET (ABIPET). 9º Censo da Reciclagem de PET – Brasil O Ano 2012 PET no Brasil. 2013. Disponível em: <http://www.abipet.org.br/index.html?method=mostrarDownloads&categoria.id=3>. Acesso em: 15 jun. 2018.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE PET (ABIPET). 10º Censo da Reciclagem de PET no Brasil. n. 32, 2014. Disponível em: <http://www.abipet.org.br/index.html?method=mostrarDownloads&categoria.id=3>. Acesso em: 15 jun. 2018.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE PET (ABIPET) - Reciclagem - Aplicações para PET Reciclado, 2017. Disponível em: <http://www.abipet.org.br/index.html?method=mostrarInstitucional&id=72>. Acesso em: 15 jun. 2018.
- AWAJA, F.; PAVEL, D. Recycling of PET. **Eur. Polym. J.**, v. 41, n. 7, p.1453 – 1477, 2005.
- AUSTIN, H. P. et al. Characterization and engineering of a plastic-degrading aromatic

- polyesterase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, p. 201718804, 2018.
- BOEKEMA, B. K. H. L. et al. Hexadecane and Tween 80 stimulate lipase production in *Burkholderia glumae* by different mechanisms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 12, p. 3838–3844, 2007.
- BORKAR, P. S. et al. Purification and characterization of extracellular lipase from a new strain: *Pseudomonas aeruginosa* SRT 9. **Brazilian journal of microbiology : [publication of the Brazilian Society for Microbiology]**, v. 40, n. 2, p. 358–66, 2009.
- BROWNE, M.A., et al. Microplastic moves pollutants and additives to worms, reducing functions linked to health and biodiversity. **Curr. Biol.**, v. 23, p. 2388-2392, 2013.
- BYUN, Y.; KIM, Y. T. **Utilization of Bioplastics for Food Packaging Industry**. In: HAN, J. Innovations in Food Packaging [s.l.] Elsevier Ltd, 2013, 369-389 p.
- CHAHINIAN, H. et al. Distinction between esterases and lipases: a kinetic study with vinyl esters and TAG. **Lipids**, v. 37, n. 7, p. 653–62, 2002.
- CHEN, S. et al. Cutinase : Characteristics, preparation, and application. v. 31, p. 1754–1767, 2013.
- COELHO, T. M. et al. PET Containers in Brazil : A logistics model for post-consumer waste recycling. 2001.
- COELHO, T. M.; CASTRO, R.; JR, J. A. G. Resources , Conservation and Recycling PET containers in Brazil : Opportunities and challenges of a logistics model for post-consumer waste recycling. **“Resources, Conservation & Recycling”**, v. 55, n. 3, p. 291–299, 2011.
- COLE, M., et al. Microplastics as contaminants in the marine environment: a review. **Mar. Pollut. Bull.**, v. 62, p. 2588 – 2597, 2011.
- CONCEIÇÃO, D.M. et al. Fungos filamentosos isolados do rio Atibaia, SP e refinaria de petróleo biodegradadores de compostos fenólicos. Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo, v.71, n.4, p.99-106, out./dez., 2004.
- COSTA, C. Z. Degradação microbiológica e enzimática de polímeros: uma revisão. **Quim. Nova**, v. 38, n. 2, p.259-267, 2015.
- DE CASTRO, A. M. et al. Screening of commercial enzymes for poly (ethylene terephthalate) (PET) hydrolysis and synergy studies on different substrate sources. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 44, n. 6, p. 835–844, 2017.
- DI SOUZA, L.; TORRES, M. C. M.; RUVOLO FILHO, A. C. Despolimerização do poli (tereftalato de etileno) - PET: efeitos de tensoativos e excesso de solução alcalina. **Polímeros**, v. 18, n. 4, p. 334–341, 2008.
- ELVERS, D. et al. Technology trends in biodegradable polymers: Evidence from patent analysis. **Polymer Reviews**, v. 56, n. 4, p. 584–606, 2016.
- ESPINO-RAMMER, L. et al. Two novel class II hydrophobins from *Trichoderma* spp. Stimulate enzymatic hydrolysis of poly (ethylene terephthalate) when expressed as fusion proteins. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 14, p. 4230–4238, 2013.
- FALCÃO, M. Polo petroquímico de Suape vive incerteza operacional _ Valor

- Econômico., 2018. Disponível em: <https://www.valor.com.br/empresas/5483811/polo-petroquimico-de-suape-vive-incerteza-operacional>. Acesso em: 18 jun. 2018.
- FOJAN, P. et al. What distinguishes an esterase from a lipase: A novel structural approach. **Biochimie**, v. 82, n. 11, p. 1033–1041, 2000.
- FONSECA, T.G.; ALMEIDA, Y.M.B; VINHAS, G.M. Reciclagem química do PET pós-consumo: caracterização estrutural do ácido tereftálico e efeito da Hidrólise alcalina em baixa temperatura. **Polímeros**, v. 24, n. 5, p. 567-571, 2014.
- GARCIA, J. M.; ROBERTSON, M. L. The future of plastics recycling. **Science**, v. 358, n. 6365, p. 870–872, 2017.
- GEYER, R.; JAMBECK, J. R.; LAW, K. L. Production, uses, and fate of all plastics ever made. **Science Advances**, v. 3, n. 7, p. 5, 2017.
- GHAFFARI MOSANENZADEH, S. et al. Effect of biopolymer blends on physical and Acoustical properties of biocomposite foams. **Journal of Polymer Science, Part B: Polymer Physics**, v. 52, n. 15, p. 1002–1013, 2014.
- GOUIN, T. et al. Thermodynamic approach for assessing the environmental exposure of chemicals absorbed to microplastic. **Environ. Sci. Technol**, v. 45, p. 1466-1472, 2011.
- GREGORY, M.R. Environmental implications of plastic debris in marine settings-Entanglement, ingestion, smothering, hangers-on, hitch-hiking and alien invasions. **Philos. Trans. R. Soc. B**, v. 364, n. 1526, p. 2013–2025, 2009.
- HAN, X. et al. Structural insight into catalytic mechanism of PET hydrolase. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, 2017.
- HAMMER, J., KRAAK, M.H., PARSONS, J.R. Plastics in the marine environment: the dark side of a modern gift. **Rev. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 220, p. 1- 44, 2012.
- HOLCAPEK, M. et al. Trace determination of glycols by HPLC with UV and Electrospray ionization mass spectrometric detections. **Anal. Chem.**, v.71, p.2288-2293, 1999.
- HOPEWELL, J.; DVORAK, R.; KOSIOR, E. Plastics recycling: challenges and opportunities. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 364, n. 1526, p. 2115–2126, 2009.
- IGNATYEV, I. A.; THIELEMANS, W.; VANDERBEKE, B. Recycling of Polymers : A Review Recycling of Polymers : A Review. n. June 2018, 2014.
- CEMPRE- COMPROMISSO EMPRESARIAL PARA RECICLAGEM. **Lixo municipal**. 4ª. ed. São Paulo, 2018, 316 p.
- IOAKEIMIDIS, C. et al. The degradation potential of PET bottles in the marine environment: An ATR-FTIR based approach. **Scientific Reports**, v. 6, n. October 2015, p. 1–8, 2016.
- JENSEN, W. B. Ask the Historian The Origin of the Term “ Base ”. **Journal of Chemical Education**, v. 83, n. 12, p. 45221, 2006.
- JENSEN, W. B. The Origin of the Polymer Concept. **Journal of Chemical Education**, v. 85, n. 5, p. 624, 2008.

- KHANNOUS, L. et al. Isolation of a novel amylase and lipase-producing *Pseudomonas luteola* strain: study of amylase production conditions. **Lipids in Health and Disease**, v. 13, n. 1, p. 9, 2014.
- KRUEGER, M. C.; HARMS, H.; SCHLOSSER, D. Prospects for microbiological solutions to environmental pollution with plastics. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 21, p. 8857–8874, 2015.
- LEE, L. P. et al. Lipase-secreting *Bacillus* species in an oil-contaminated habitat: Promising strains to alleviate oil pollution. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1–6, 2015.
- LEMOS, J. L.S. et al. Fungos filamentosos: agentes de degradação de petróleo e de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs). Rio de Janeiro: CETEM/MCT, 2008, 48 p.
- LIEBMINGER, S. et al. Hydrolysis of PET and bis-(benzoyloxyethyl) terephthalate with a new polyesterase from *Penicillium citrinum*. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 25, n. 2–4, p. 171–177, 2007.
- LOPES, D. B. et al. Lipase and esterase: to what extent can this classification be applied accurately? **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 31, n. 3, p. 603–613, 2011.
- MARKET RESEARCH STORE. Global Plastic Packaging (rigid plastic packaging and flexible plastic packaging) Market set for rapid growth, to reach around USD 375, 2016. Disponível em: <https://www.marketresearchstore.com/news/global-plastic-packaging-market-170>. Acesso em: 15 jul. 2018.
- MARTEN, E.; MÜLLER, R. J.; DECKWER, W. D. Studies on the enzymatic hydrolysis of polyesters. II. Aliphatic-aromatic copolyesters. **Polymer Degradation and Stability**, v. 88, n. 3, p. 371–381, 2005.
- MAZZUCOTELLI, C. A. et al. Isolation and characterization of bacterial strains with a hydrolytic profile with potential use in bioconversion of agroindustrial by-products and waste. **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 33, n. 2, p. 295–303, 2013.
- MOBARAK-QAMSARI, E.; KASRA-KERMANSHAHI, R.; MOOSAVI-NEJAD, Z. Isolation and identification of a novel, lipase-producing bacterium, *Pseudomonas aeruginosa* KM110. **Iranian Journal of Microbiology**, v. 3, n. 2, p. 92–98, 2011.
- MÜLLER, R. J. et al. Enzymatic degradation of poly(ethylene terephthalate): Rapid hydrolyse using a hydrolase from *T. fusca*. **Macromolecular Rapid Communications**, v. 26, n. 17, p. 1400–1405, 2005.
- MWANZA, B. G.; MBOHWA, C.; TELUKDARIE, A. Strategies for the Recovery and Recycling of Plastic Solid Waste (PSW): A Focus on Plastic Manufacturing Companies. **Procedia Manufacturing**, v. 21, n. 2017, p. 686–693, 2018.
- NAMAZI, H. Polymers in our daily life. **BioImpacts**, v. 7, n. 2, p. 73–74, 2017.
- NIMCHUA, T.; PUNNAPAYAK, H.; ZIMMERMANN, W. Comparison of the hydrolysis of polyethylene terephthalate fibers by a hydrolase from *Fusarium oxysporum* LCH I and *Fusarium solani* f. sp. pisi. p. 361–364, 2007.
- NOWAK, B. et al. Biodegradation of poly(ethylene terephthalate) modified with polyester “Bionolle®” by *Penicillium funiculosum*. **Polimery/Polymers**, v. 56, n. 1, p.

35–44, 2011.

OEHLMANN, J. et al. A critical analysis of the biological impacts of plasticizers on wildlife. **Phil. Trans. R. Soc. B.**, v. 364, n. 1526, p. 2047–2062, 2009.

PACHECO, J. J.; DAVIS, M. E. Synthesis of terephthalic acid via Diels-Alder reactions with ethylene and oxidized variants of 5-hydroxymethylfurfural. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 23, p. 8363–8367, 2014.

PACKAGING EUROPE. PET Plastic Bottle Consumption Set to Grow by 3.9% Over the Next Five Years, 2017. Disponível em: <<https://packagingeurope.com/pet-plastic-bottle-consumption-set-to-grow/>>. Acesso em: 15 jun. 2018

PATNI, N. et al. Alternate Strategies for Conversion of Waste Plastic to Fuels. **ISRN Renewable Energy**, v. 2013, n. May, p. 1–7, 2013.

PELLIS, A. et al. Ultrasound-enhanced enzymatic hydrolysis of poly (ethylene terephthalate). **Bioresource Technology**, p. 1–5, 2016.

PLASTICS EUROPE, Plastics-the facts 2017, An analysis of European plastics production, demand and waste data; 2017. 2017. Disponível em: https://www.plasticseurope.org/application/files/5715/1717/4180/Plastics_the_facts_2017_FINAL_for_website_one_page.pdf. Acesso em: 15 jun. 2018.

PLASTICS INSIGHT. Global Polyethylene Terephthalate (PET) Resin Market, 2016. Disponível em: <https://www.plasticsinsight.com/global-pet-resin-market>. Acesso em: 18 jun. 2018.

RATHI, P.; SAXENA, R. K.; GUPTA, R. A novel alkaline lipase from *Burkholderia cepacia* for detergent formulation. **Process Biochemistry**, v. 37, n. 2, p. 187–192, 2001.

RAVINDRANATH, K.; MASHELKAR, R. A. Polyethylene terephthalate-I. Chemistry, thermodynamics and transport properties. **Chemical Engineering Science**, v. 41, n. 9, p. 2197–2214, 1986.

PETRA/ RECYCLING. Information on the Use, Benefits and Safety of PET Plastic. , 2016. Disponível em: <www.petresin.org/recycling.asp>. Acesso em: 15 jun 2018

RESTREPO-FLÓREZ, J. M.; BASSI, A.; THOMPSON, M. R. Microbial degradation and deterioration of polyethylene - A review. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 88, p. 83–90, 2014.

RIBEIRO, B. D. et al. Production and use of lipases in bioenergy: A review from the feedstocks to biodiesel production. **Enzyme Res.**, v. 11, p.1-16, 2011.

RIBITSCH, D. et al. A new esterase from *Thermobifida halotolerans* hydrolyses polyethylene terephthalate (PET) and polylactic acid (PLA). **Polymers**, v. 4, n. 1, p. 617–629, 2012.

ROMÃO, W.; SPINACÉ, M. A. S.; DE PAOLI, M.A. Poli(tereftalato de etileno), PET: uma revisão sobre os processos de síntese, mecanismos de degradação e sua reciclagem. **Polímeros**, v. 19, n. 2, p. 121–132, 2009.

SAMMOND, D. W. et al. Predicting enzyme adsorption to lignin films by calculating enzyme surface hydrophobicity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 30, p. 20960–20969, 2014.

SANTOMAURO, A.C. Resinas PET avança em novas aplicações - Perspectivas 2018, 2018. Disponível em: <https://www.quimica.com.br/resinas-pet-avanca-em-novas-aplicacoes-perspectivas-2018>. Acesso em: 15 jun. 2018.

SEMAN, W. M. K. W. et al. High level expression of *Glomerella cingulata* cutinase in dense cultures of *Pichia pastoris* grown under fed-batch conditions. **Journal of Biotechnology**, v. 184, p. 219–228, 2014.

SEPPERUMAL, U.; MARKANDAN, M.; PALRAJA, I. Micromorphological and chemical changes during biodegradation of Polyethylene terephthalate (PET) by *Penicillium* sp . **Journal of Microbiology and Biotechnology Research**, v. 3, n. 4, p. 47–53, 2013.

SILVA, K.R.I.S. **Biodegradação de polietileno tereftalato (pet) por fungos ligninolíticos**. 2009. 193 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Departamento Ciência de Alimentos, Unicamp, Campinas, 2009.

SILVA, C. T. **Avaliação de metodologia de obtenção do ácido tereftálico via reciclagem química do pet**. 2012. 110 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Escola de Química, Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

SINHA, V.; PATEL, M. R.; PATEL, J. V. Pet waste management by chemical recycling: A review. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 18, n. 1, p. 8–25, 2010.

SOLOMONS, T.W.G; FRYHLE, C. B. **Organic Chemistry**. 10. ed, USA:John Wiley & Sons, 2000, 1277 p.

SULAIMAN, S. et al. Isolation of a novel cutinase homolog with polyethylene terephthalate-degrading activity from leaf-branch compost by using a metagenomic approach. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 5, p. 1556–1562, 2012.

TEUTEN, E. L. et al. Transport and release of chemicals from plastics to the environment and to wildlife. *Phil. Trans. R. Soc. B.*, v. 364, n. 6, p. 2027–2045, 2009.

TOKIWA, Y. et al. Biodegradability of plastics. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 10, n. 9, p. 3722–3742, 2009.

TSUCHIDA, D. et al. Hydrogen sulfide production by sulfate-reducing bacteria utilizing additives eluted from plastic resins. **Waste Manag. Res.**, v. 29, n. 6, p. 594–601, 2011.

TRIPATHI, C. K. M. et al. Microbial diversity--biotechnological and industrial perspectives. **Indian journal of experimental biology**, v. 45, n. 4, p. 326–332, 2007.

UMAMAHESWARI, S.; MARGANDAN, M.; NATARAJAN A. Electron microscopic studies of Polyethylene terephthalate degradation potential of *Pseudomonas species*. **J. Microbiol. Biotech. Res.**, v. 3, n. 1, p. 104–110, 2013.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DE SÃO PAULO_UNIFESP. Tempo de decomposição de alguns resíduos. Disponível em: http://dgi.unifesp.br/ecounifesp/index.php?option=com_content&view=article&id=16&Itemid=11 Acesso em: 18 dez. 2015.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA (UFSC). Tempo de decomposição do materiais na natureza. Disponível em: http://portal.ctc.ufsc.br/decomposicao_materiais. Acesso em: 20 jun. 2018.

U. S. PHARMACOPOEIA. Polyethylene terephthalate bottles and polyethylene terephthalate g bottles. **United States Pharmacopoeia**, p. 1784-1787. 1995.

VAKHLU, J.; KOUR, A. Yeast lipases: Enzyme purification, biochemical properties and gene cloning. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 1, p. 69–85, 2006.

VALT, R. B. G. Análise do ciclo de vida de embalagens de PET, de alumínio e de vidro para refrigerantes no brasil variando a taxa de reciclagem dos materiais. 2014. 208 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia, Engenharia de Processos Térmicos e Químicos, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.

VERTOMMEN, M. A. M. E. et al. Enzymatic surface modification of poly(ethylene terephthalate). **Journal of Biotechnology**, v. 120, n. 4, p. 376–386, 2005.

WEI, R. et al. A high-throughput assay for enzymatic polyester hydrolysis activity by fluorimetric detection. **Biotechnology Journal**, v. 7, n. 12, p. 1517–1521, 2012.

WEI, R. et al. Turbidimetric analysis of the enzymatic hydrolysis of polyethylene terephthalate nanoparticles. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 103, p. 72–78, 2014.

WEI, R.; ZIMMERMANN, W. Biocatalysis as a green route for recycling the recalcitrant plastic polyethylene terephthalate. **Microbial Biotechnology**, v. 10, n. 6, p. 1302–1307, 2017a.

WEI, R.; ZIMMERMANN, W. Microbial enzymes for the recycling of recalcitrant petroleum-based plastics: how far are we? **Microbial Biotechnology**, v. 10, n. 6, p. 1308–1322, 2017b.

XU, S.Y. et al. Leaching behaviour of bisphenol A from municipal solid waste under landfill environment. *Environ. Technol.*, v. 32, n. 11, p. 1269–1277, 2011.

YAMADA-ONODERA, K. et al. Degradation of polyethylene by a fungus, *Penicillium simplicissimum* YK. **Polymer degradation and stability**, v. 72, n. 2, p. 323–327, 2001.

YOSHIDA, S. et al. Response to Comment on “A bacterium that degrades and assimilates poly(ethylene terephthalate)”. **Science**, v. 353, n. 6301, p. 759–759, 2016.

ZHANG, J. et al. A study on the biodegradability of polyethylene terephthalate fiber and diethylene glycol terephthalate. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 93, n. 3, p. 1089–1096, 2004.