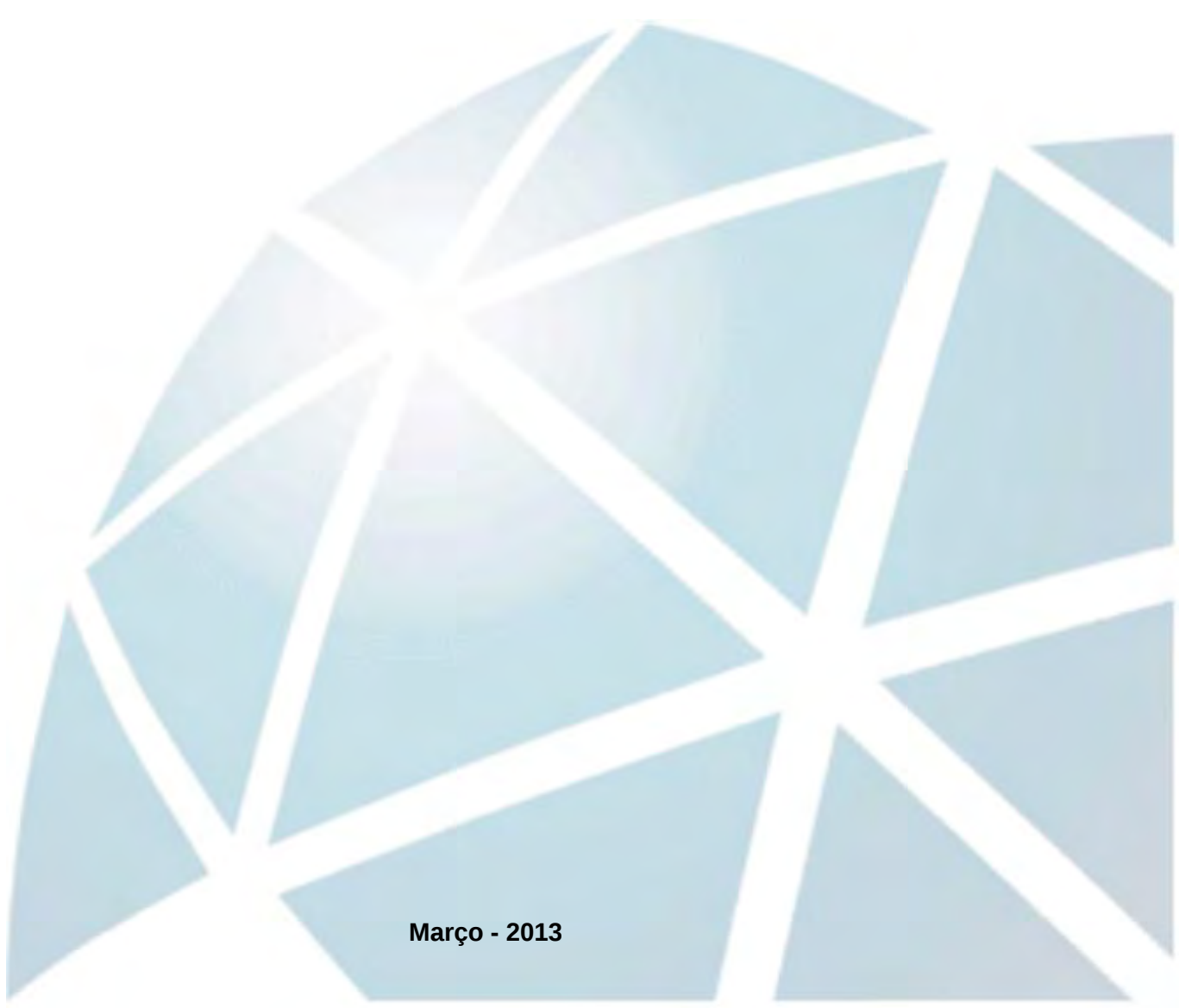

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

MICROBIOLOGIA APLICADA

Biodegradação de filmes de Polihidroxibutirato-co-hidroxivalerato (PHBV), Polietileno de Baixa Densidade (PEBD) e Blenda de PEBD/PHBV (70/30), com fungos específicos

THAYSE MARQUES PASSOS

The bottom half of the page features a large, abstract geometric pattern. It consists of several overlapping triangles in various shades of blue and white, creating a complex, crystalline structure that resembles a stylized snowflake or a molecular model.

Março - 2013

THAYSE MARQUES PASSOS

Biodegradação de filmes de Polihidroxibutirato-co-hidroxivalerato (PHBV), Polietileno de Baixa Densidade (PEBD) e Blenda de PEBD/PHBV (70/30), com fungos específicos

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

Orientadora: Profa. Dra. Sandra Mara Martins Franchetti

Co-orientador: Prof. Dr. José Carlos Marconato

Rio Claro

2013

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Volney e Layse, pelo carinho, incentivo e apoio, dados a mim, pra que eu seguisse sempre atrás dos meus sonhos.

À minha orientadora Professora Sandra Mara Martins Franchetti, pela oportunidade, pela orientação, pela paciência, pelo apoio, pelas críticas e correções, e pela contribuição para minha formação profissional.

Ao Adriano Uemura, pela amizade, apoio, incentivo, ensinamentos e toda a ajuda ao longo desses dois anos, muito do que aprendi devo a você.

Ao pessoal do Laboratório de Tratamento de Polímeros, pelo apoio.

Ao Laboratório de Microscopia Eletrônica do Departamento de Biologia da Unesp de Rio Claro, por permitirem o uso de seus equipamentos.

Aos amigos que fiz no Departamento de Bioquímica e Microbiologia, em especial: Érica, Mari, Jaque, Rafa, Bárbara e ao pessoal do Lab. Multi, por terem me acolhido.

A CAPES, por fomentar esse trabalho através da bolsa de mestrado.

RESUMO

O aumento do consumo de materiais plásticos, no mundo todo, tem sido objeto de grande preocupação e especial atenção por parte da comunidade científica, no sentido de promover o desenvolvimento de materiais que, ao serem descartados sejam biodegradados em tempo mais curto, no meio ambiente. Os plásticos sintéticos mais utilizados atualmente são de difícil degradação, por serem hidrofóbicos e resistentes à ação de enzimas microbianas. Entretanto, o uso de materiais alternativos, tais como as blendas de polímeros biodegradável e sintético, pode minimizar o efeito danoso do descarte desses materiais em lixões e aterros sanitários, por serem suscetíveis à ação de micro-organismo. Este trabalho visou investigar a biodegradação dos filmes de PHBV (biodegradável), PEBD (polietileno de baixa densidade) e da blenda de PEBD/PHBV (70/30), empregando fungos específicos em meios de cultura sólido e líquido, utilizando metodologias como: Microscopia óptica (MO), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia de Absorção no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR). Os fungos *Penicillium funiculosum* e *Paecilomyces variotii* degradam eficientemente o PHBV, sendo que o primeiro degradou o polímero com formação de ácidos insaturados, fortes indicadores da biodegradação deste tipo de material. Além disso, estes fungos aderem significativamente à superfície do PE, mudando expressivamente sua morfologia. A blenda de PE/PHBV (70/30), é um material suscetível à ação destes fungos, tendo sofrido mudanças, inclusive, na sua cristalinidade. Nesta blenda ficou evidente também a ação de proteção do PE, que inibiu o acesso do fungo à fase do PHBV contido na mesma. No meio mineral completo houve consumo da fase amorfa e aumento da cristalina (diminuição e aumento dos índices de carbonila, respectivamente - FTIR), e no meio mineral incompleto, tanto a fase amorfa como a cristalina foram consumidas, mostrando a eficiência do arsenal enzimático do *P. funiculosum* perante uma única fonte de carbono, o polímero.

Palavras-chave: Biodegradação, *P. funiculosum*, blenda, MEV, FTIR.

ABSTRACT

The increase in consumption of plastics in the world has been the subject of great concern and special attention from the scientific community, to promote the development of materials that are biodegradable in a shorter time when discarded in the environment. The most widely used synthetic plastics are hardly degraded, because they are hydrophobic and resistant to the action of microbial enzymes. However, the use of alternative materials, such as blends of biodegradable polymers and synthetic, can minimize the harmful effect of the disposal of these materials in dumps and landfills, because they are susceptible to the action of microorganisms. This work aims to investigate the biodegradation of PHBV films (biodegradable), LDPE (low density polyethylene) and blends of LDPE / PHBV (70/30), using specific fungi in culture media solid and liquid, employing methods such as optical microscopy (OM), scanning electron microscopy (SEM) and Fourier Transform Infrared (FTIR). *Penicillium funiculosum* and *Paecilomyces variotii* degrade PHBV efficiently and the first one degraded the polymer producing unsaturated acids, strong indicators of the biodegradation of this type of material. Besides that, they adhere significantly on PE surface, changing meaningfully the morphology of these materials. The PE / PHBV (70/30) blend, is a material susceptible to the fungi action, having undergone changes, including in its crystallinity. It was also evident the protective action of the PE, preventing the access of the fungus to the PHBV phase contained in the blend. In the complete mineral medium there was a consumption of amorphous and crystalline phases (decrease and increase of carbonyl indices, respectively – FTIR) and in the incomplete mineral medium, the amorphous and crystalline phases were consumed, showing the efficiency of *P. funiculosum* enzymatic system in view of the unique carbon source, the polymer.

Keywords: Biodegradation, *P. funiculosum*, blend, SEM, FTIR.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	7
2 OBJETIVOS	9
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	10
3.1. Polímeros	10
3.2. Biodegradação	13
3.3. Fungos filamentosos participantes do processo de biodegradação de polímeros	14
3.4. Avaliação da Biodegradação	16
3.4.1. FTIR	17
3.4.2. Microscopia Óptica (M.O.)	17
3.4.3. Microscopia Eletrônica de Varredura (M.E.V.)	18
3.4.4. Teste de Crescimento fúngico em polímeros	18
3.4.5. Medida de Massa	19
4 MATERIAL E MÉTODOS	20
4.1. Material	20
4.1.1. Polímeros	20
4.1.2. Fungos	20
4.1.3. Meios de Cultura	20
4.1.3.1. Meio de manutenção	20
4.1.3.2. Meio sólido	21
4.1.3.1. Meio Líquido	21
4.1.4. Equipamentos	22
4.2. Métodos	22
4.2.1. Preparo dos filmes	22
4.2.2. Esterilização dos filmes	23
4.2.3. Manutenção das culturas de fungos	23
4.2.4. Preparo da suspensão de esporos	24
4.2.5. Teste de crescimento em meio sólido	24
4.2.6. Tratamento microbiano em meio líquido	26
4.2.7. Microscopia Óptica (M.O.)	27
4.2.8. Medida de Massa	28

4.2.9. Espectroscopia de Absorção no Infravermelho com Transformada de Fourier	28
4.2.9.1. Índices de Carbonila	28
4.2.10. Microscopia Eletrônica de Varredura (M.E.V.)	28
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
5.1. Teste em meio sólido	30
5.1.1. Avaliação Visual	30
5.1.2. Avaliação por FTIR	32
5.2. Tratamento com <i>P. funiculosum</i> em Meio Líquido	34
5.3. Microscopia Óptica (M.O.)	36
5.4. Microscopia Eletrônica de Varredura (M.E.V.)	38
5.5. Medidas de Massa	42
5.6. FTIR	43
5.6.1. Índices de Carbonila.....	49
6 CONCLUSÕES	51
REFERÊNCIAS	52

1 INTRODUÇÃO

As preocupações com o meio ambiente têm se tornado cada vez maiores nos dias de hoje, pois à medida que o homem cria novas tecnologias para facilitar seu dia-a-dia, vão aparecendo também implicações de como lidar com os rejeitos produzidos pelas mesmas.

Dentre estas tecnologias, estão as utilizadas na produção e aplicação de polímeros, que são amplamente utilizados como embalagens, revestimentos de carros, celulares e muitos outros objetos na sociedade atual, gerando uma grande quantidade de resíduos que são descartados incorretamente. Isto faz crescer a preocupação da população e a busca de tratamentos adequados destes produtos, visto que poluem o meio ambiente, demorando muitos anos para se decompor.

Com o intuito de melhorar os índices de degradação desses materiais no meio ambiente, diversas propostas têm sido avaliadas. Dentre elas estão: (a) a incorporação de elementos na estrutura da embalagem que promovam processos de fotodegradação (fotossensibilizantes, sais metálicos, nitrocompostos, quinonas, benzofenóis, entre outros); (b) o estudo de utilização de estruturas poliméricas (poliamidas, poliésteres, poliuretanos) que contenham grupos funcionais hidrofílicos na sua composição, predispondo - as à degradação pela ação da umidade do ambiente; (c) o desenvolvimento de materiais mistos de embalagem, à base de polímeros sintéticos com amidos modificados, ou com outros polímeros que apresentem suscetibilidade natural ao ataque de micro-organismos no ambiente; (d) estudos de biodegradação em diferentes ambientes, anaeróbios e aeróbios (LOMAS-EESTEBAN, 1996; SHAH et al., 2008; MARTINS - FRANCHETTI et al., 2008a; LUCAS et al., 2008).

A biodegradação é um processo no qual, substâncias orgânicas, presentes no ambiente, são convertidas em compostos simples em condições apropriadas de temperatura e oxigenação, esse processo é mediado por micro-organismos que, por meio de produtos do seu catabolismo, as enzimas, conseguem promover a biodegradação (GABOARDI, 2007).

Geralmente, polímeros naturais e sintéticos são biodegradados por micro-organismos, tais como bactérias e fungos, os quais secretam enzimas capazes de hidrolisar e/ou oxidar esses substratos, levando à quebra de suas cadeias em produtos menores, como ácidos, aldeídos e cetonas, os quais podem então ser bioassimilados como fontes de carbono para seu crescimento.

Os fungos destacam-se no processo biodegradativo, pois muitos deles apresentam um sistema enzimático não específico, capaz de degradar lignina, por exemplo, e conseqüentemente, outros poluentes que sejam de mesma natureza, gerando como produto o dióxido de carbono

(BARR; AUST, 1994). Além disso, são capazes de crescer sob condições de estresse ambiental, o que limita o crescimento de muitos outros micro-organismos (COELHO, 2007), mas não dos fungos, que se constituem então, uma ótima opção para tratamentos de áreas contaminadas.

2 OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivo investigar a biodegradação dos filmes de PHBV (biodegradável), PEBD (polietileno de baixa densidade) e da blenda PEBD/PHBV (70/30), empregando fungos específicos em meios de cultura sólido e líquido, utilizando como metodologias: Microscopia óptica (MO), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Espectroscopia de absorção no infravermelho (FTIR) e medidas de massa.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Polímeros

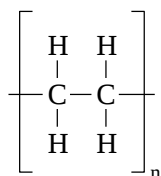
Os polímeros são macromoléculas caracterizadas por seu tamanho, sua estrutura química e interações intra e intermoleculares. Possuem unidades químicas que são unidas por ligações covalentes, que se repetem ao longo da cadeia (SPINACÉ; PAOLI, 2005). Esses materiais têm sido muito criticados, pois quando descartados podem demorar séculos para se degradar e ocupam grande parte do volume dos aterros sanitários, interferindo de forma negativa nos processos de compostagem e de estabilização biológica. Além disto, os resíduos poliméricos quando descartados em lugares inadequados, como lixões, rios, encostas, etc., causam um impacto ainda maior ao meio ambiente (SPINACÉ; PAOLI, 2005).

Existem dois tipos de polímeros, os de origem sintética e os naturais. A maioria dos polímeros sintéticos é largamente empregada em nosso cotidiano, e utilizada em diversas áreas tecnológicas em função de sua leveza, facilidade de processamento, menor custo e por possuir propriedades mecânicas e químicas satisfatórias. Eles foram desenvolvidos, originalmente, visando sua durabilidade e resistência a todas as formas de degradação (VOLKE-SEPÚLVEDA et al., 2002). Dentre os polímeros sintéticos mais consumidos estão os termoplásticos, tais como o poli (cloreto de vinila) (PVC), polipropileno (PP), polietileno (PE), poliestireno (PS), poli (tereftalato de etileno) e o poli (álcool vinílico) (PVA) (REDDY et al., 2003).

O polietileno constitui 64% do total dos polímeros sintéticos e é muito utilizado na fabricação de garrafas, sacolas, recipientes de embalagens, entre outros (SANGALE et al., 2012). Ele pertence à família das poliolefinas (estrutura química representada na Fig. 1) originado de monômeros de hidrocarboneto alifático insaturado (COUTINHO et al., 2003). É um polímero semi-cristalino, flexível, cujas propriedades são influenciadas pela quantidade relativa das fases amorfa e cristalina. Dependendo das condições reacionais e do sistema catalítico empregado na polimerização, diferentes tipos de polietilenos podem ser produzidos, sendo os mais utilizados o polietileno de baixa densidade (PEBD) e o de alta densidade (PEAD). O polietileno de alta densidade (PEAD) é um termoplástico derivado do eteno, cuja temperatura de fusão varia entre 128 e 135°C, já o polietileno de baixa densidade (PEBD), cuja temperatura de fusão está na região de

110 a 115°C (cristalinidade 50-60) possui cadeias ramificadas que determinam seu grau de cristalização e suas temperaturas de transição (COUTINHO et al., 2003).

Figura 1 – Estrutura química condensada do PE.



Fonte: Elaborado pelo autor

O Polietileno de baixa densidade (PEBD) e o polipropileno (PP) são as duas classes de termoplásticos mais consumidas e que estão disponíveis em grandes quantidades a partir do descarte doméstico (MARCONCINI; RUVOLO, 2006), sendo responsáveis por 9,7% de todo o resíduo descartado no Brasil (FABRO et al., 2007). Em função da sua pouca degradabilidade, os resíduos poliméricos permanecem na natureza por períodos longos, causando a poluição visual e, eventualmente, química, do ambiente (XAVIER et al., 2006). O PE é resistente a biodegradação e persiste no solo por muito tempo, devido à sua natureza hidrofóbica (cadeias de carbono sem grupos funcionais ativos), alta massa molar e cristalinidade, que dificultam sua interação com enzimas microbianas (ARKATKAR et al., 2009a). Os efeitos das condições ambientais sobre a deterioração das propriedades mecânicas de PEBD foram estudados por Alhamdan & Al-Helal (2008). Após diferentes tempos de exposição a duras condições ambientais (altos níveis de radiação solar e temperaturas) a resistência mecânica de filmes de polietileno foi reduzida.

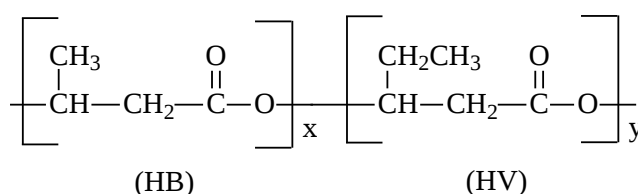
A biodegradação do PE tem sido melhorada por aplicação de pré-tratamentos com luz, calor ou adição de aditivos (polímeros naturais ou pró-oxidantes) (ARKATKAR et al., 2009a). Apesar da dificuldade de degradação do PE por ação microbiana, alguns micro-organismos têm sido considerados promissores para o processo de degradação, devido a sua grande produção de biofilme (agregado de micro-organismos e exopolissacarídeos), o qual facilita a colonização da superfície polimérica (ARKATKAR et al., 2009a; FLEMMING, 1998).

Outros tipos de polímeros que estão se destacando nos últimos anos são os polímeros biodegradáveis naturais (produzidos por micro-organismos), chamados também de biopolímeros ou bioplásticos (SHAH et al., 2008) (MARTINS - FRANCHETTI; MARCONATO, 2006). Dentre estes, se destacam os polihidroxialcanoatos (PHAs) que são poliésteres alifáticos, produzidos e

acumulados intracelularmente como reserva de carbono e energia por inúmeros micro-organismos, quando em meio de cultura, nutrientes essenciais limitados (nitrogênio, potássio, magnésio, ferro etc.) e excesso de fonte de carbono (FORMOLO et al., 2003).

O PHB, poli (3-hidroxibutirato), é o polímero mais estudado dentre os polihidroxialcanoatos (PHAs), apresentando propriedades termoplásticas e características físicas e mecânicas semelhantes as do polipropileno (PP), entretanto, biodegradável quando exposto a ambientes biologicamente ativos (KUNASUNDARI; SUDESH, 2011). O PHBV (poli(3-hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) (Fig. 2) é um copolímero do PHB, entretanto, mais flexível que ele (AVELLA et al., 2000), sendo que suas propriedades físicas e térmicas dependem do conteúdo de unidades de hidroxivalerato (HV) (KANSIZ et al., 2007). Ele é um material semicristalino de cadeia linear, apresentando unidades de hidroxibutirato (HB) e unidades hidroxivalerato (HV), em menor proporção.

Figura 2 – Estrutura química condensada do PHBV



Fonte: Avella et al., 2000.

Experimentos de biodegradação destes polímeros, em diferentes ecossistemas, foram realizados por Sridewi et al. (2006), em três diferentes áreas de manguezais no sul da Malásia, por 8 semanas, e mostraram que a razão de degradação para os copolímeros (PHB-V - 5% HV) foi maior, devido às diferenças de cristalinidade e morfologia da superfície. As amostras dos filmes de PHB foram degradadas em 6 semanas e as amostras dos copolímeros em 4 semanas, e nas diferentes áreas de trabalho também foram observados resultados diferentes, atribuídos à grande atividade de micro-organismos.

Dentre estes micro-organismos biodegradadores encontram-se os fungos, os quais são capazes de crescer sobre os polímeros, podendo excretar ácidos orgânicos, que podem causar deterioração do material (JENKINS et al., 2007). Sanyal et al. (2006), analisaram a biodegradação de PHB e PHB-V (16%HV) por 6 fungos isolados de solo, sendo todos *Aspergillus* spp. Para todos os *Aspergillus* spp. testados, o máximo de biodegradação ocorreu em temperatura de 37°C, pH ótimo entre 6,5-7,0, entretanto a suplementação do meio com fonte de carbono externa (glucose,

frutose, lactose entre outros) teve um efeito inibitório na taxa de degradação de ambos os polímeros. Em outro trabalho, filmes de PHBV de 100 µm de espessura foram biodegradados em 30 dias quando enterrados em colunas de solo com 37% de umidade a 23°C (GONÇALVES; MARTINS-FRANCHETTI, 2010).

3.2. Biodegradação

A biodegradação é considerada um tipo de degradação que envolve atividade biológica, sendo definida como: “um processo importante e irreversível para uma significativa mudança da estrutura do material, tipicamente caracterizado pela perda de propriedades (isto é: integridade, massa molar, deformações estruturais e mecânicas) e/ou fragmentação. A degradabilidade de materiais poliméricos está relacionada com a estrutura do material na presença da população microbiana degradativa e condições ambientais apropriadas ao crescimento microbiano (KRZAN et al., 2006). O ataque dos micro-organismos ao material polimérico depende da especificidade dos micro-organismos, das propriedades químicas e físicas dos materiais e das condições ambientais (GU, 2003).

Os mecanismos de biodegradação podem resumir-se em dois, dependendo da natureza do polímero e do meio (SCOTT, 2000). São eles: a hidrólise biológica, que ocorre pela ação de enzimas proteolíticas, catalisadoras da hidrólise de ligações peptídicas e por outras enzimas responsáveis por catalisar a hidrólise de ligações éster. O outro mecanismo é a oxidação biológica, responsável por quebras da cadeia polimérica, em fragmentos menores capazes de serem assimilados pelos micro-organismos. Neste caso a ação de oxigenases e dioxigenases, provoca introdução de grupos peróxidos nas cadeias carbônicas, levando à quebra da cadeia com geração de produtos como ácidos carboxílicos, aldeídos e cetonas, os quais podem ser bioassimilados. A hidrólise biológica ocorre normalmente em polímeros que possuem hetero-cadeias (grupos funcionais, carbonilas e ésteres) e a oxidação biológica ocorre usualmente em polímeros contendo apenas cadeias carbônicas (CHANDRA, RUSTGI, 1998; MARTINS-FRANCHETTI, MARCONATO, 2006.)

Em polímeros, o processo de biodegradação inicia, em geral, através do ataque microbiano a sua superfície e de sua colonização, na forma de biofilme, danificando o filme. O biofilme é uma mistura complexa de micro-organismos, água e substâncias poliméricas extracelulares, que podem aderir ao filme polimérico por interações de Van der Waals ou interfaciais (FLEMMING, 1998).

Esta adesão do biofilme à superfície polimérica é um meio de sobrevivência utilizado pelos micro-organismos quando as condições ambientais são pobres. A formação de biofilmes é um pré-requisito para a corrosão e/ou a deterioração dos materiais, também denominado de biodeterioração, segundo Flemming (1998). Este tipo de interação matéria orgânica/superfície polimérica provoca um efeito biofísico na matriz polimérica, pelo qual o crescimento celular causa danos ao polímero. Além disso, estas interações levam a efeitos: bioquímico (no qual as substâncias produzidas pelos micro-organismos agem sobre o polímero) e enzimático (no qual as enzimas atacam as cadeias do polímero, provocando quebras oxidativas na matriz polimérica) (MADDEVER; CHAPMAN, 1987).

3.3. Fungos filamentosos participantes do processo de biodegradação de polímeros

Um teste que tem sido empregado para avaliar a biodegradabilidade de polímeros segue a norma ASTM-ISO 846-1997, que consiste em expor amostras de polímeros à ação de fungos recomendados, por determinado período de tempo, sob condições específicas de temperatura e umidade, a fim de testar a capacidade de degradação fúngica dos polímeros em questão. Utiliza-se uma suspensão mista de esporos de fungos para verificação da resistência de filmes plásticos à ação dos mesmos. Dentre estes estão os fungos padrão: *Penicillium funiculosum* (ATCC 11797), *Paecilomyces variotii* (ATCC 16023), *Trichoderma virens* (IMI 45553), *Aspergillus niger* (ATCC 9642) e *Chaetomium globosum* (ATCC 16021), usados em testes de biodegradabilidade dentro da norma ISO846.

Quadro 1 - Visão geral de estudos que utilizam os fungos padrão em estudos de biodegradação de polímeros.

Fungo	Características	Polímeros	Referência
<i>Penicillium funiculosum</i>	Ascomiceto de solo capaz de crescer sob condições de alta acidez, causa biodeterioração em ambientes úmidos (PITT et al., 1991).	PCL, PCL/PEBD, PEBD, PEBD/Bionolle®, PHBV, PHBV/PCL, PET/Bionolle®, PHB.	Tilstra, Johnsonbaugh, 1993; Nowak et al., 2012; Vergara-Porras; Gracida-Rodríguez, 2011; Nowak et al., 2011; Kim et al., 2000; McCarthy et al., 1994; Ammala et al., 2011.

<i>Paecilomyces variotii</i>	São ascomicetos comumente encontrados em diversos ambientes. Apresentam crescimento rápido, sendo termotolerante e também capaz de crescer em baixos níveis de oxigênio (HOUBRAKEN et al., 2008; SAMSON et al., 2004).	PEBD/Bionolle®, PE, PEBD/amido, PU, silicone, PP, PLA.	Nowak et al., 2012; Weiland et al., 1995; Borghei et al., 2010; Arkatkar et al., 2009a; Kaali et al., 2010; Stromberg, Karlsson, 2009.
<i>Trichoderma virens</i> (sinônimo <i>Gliocladium virens</i>) (WHILHITE et al., 2001)	São deuteromicetos de vida livre, saprófitos, comuns em ecossistemas de solo e raiz. Eles têm sido amplamente estudados quanto à sua capacidade de produzir antibióticos, parasitar outros fungos e de competir com micro-organismos vegetais (HARMAN et al., 2004).	PCL, PCL/PEBD, PEBD, PP, Quitina, POE/amido.	Tilstra, Johnsonbaugh, 1993; Ammala et al., 2011; Arutchelvi et al., 2008; Abd-Aziz et al., 2008; Shang et al., 2009.
<i>Apergillus niger</i>	É um fungo filamentoso, ascomiceto, encontrado no solo e em plantas em decomposição. Capaz de crescer numa ampla faixa de PH, sendo ubíquo, aparecendo mais frequentemente em ambientes quentes e úmidos. (SCHUSTER et al., 2002).	PCL, PCL/PEBD, PEBD, PEBD/Bionolle®, PP, PLA, PU, silicone, POE/amido.	Tilstra, Johnsonbaugh, 1993; Nowak et al., 2012; Stromberg, Karlsson, 2009; Kaali et al., 2010; Manzur et al., 2004; Volke-Sepulveda et al., 2002.

<i>Chaetomium globosum</i>	Ascomiceto celulolítico capaz de ocasionar a podridão mole, habita lugares diversos (Oprea, Doroftei, 2011)	PU, silicone, POE/amido, PUA.	Kaali et al., 2010; Shang et al., 2009; Oprea, Doroftei, 2011.
----------------------------	---	-------------------------------	--

Obs: PHB (Polihidroxibutirato), PHBV (Polihidroxibutirato-co-hidroxivalerato), PEBD (Polietileno de baixa densidade), PELBD (Polietileno linear de baixa densidade), PEBD/amido (blenda de polietileno de baixa densidade com amido), PCL (Policaprolactona), Bionolle® (Poli (butileno succinato)), PET (Politereftalato de etileno), PP (Polipropileno), PLA (Poli (ácido láctico)), PU (Poliuretana), PUA (Acrilato de Poliuretana), POE (Polietileno octeno). Fonte: Elaborado pelo autor.

Alguns experimentos têm mostrado a eficiência destes fungos na degradação de polímeros. Um deles trata de filmes de PEBD enriquecidos com pró-oxidante, que após serem expostos à radiação UV, foram incubados com o fungo *Aspergillus oryzae*, pelo período de 3 meses, tendo como resultados a diminuição das propriedades mecânicas do polietileno, bem como a degradação dos grupos carbonil e carboxil (KONDURI et al., 2011).

Um estudo realizado por Nowak et al., 2011, analisou a biodegradação de filmes de PET e da blenda PET/Bionolle® depois de incubados por 84 dias com o fungo *Penicillium funiculosum*. Como resultados foram observadas: a redução do número de anéis aromáticos provenientes do ácido teraftálico e a inibição da degradação do Bionolle® (facilmente biodegradável), pela presença do PET, na blenda.

Diversos outros estudos têm sido realizados e, em geral, estes têm demonstrado o grande potencial de várias espécies de fungos para a degradação de diferentes filmes poliméricos.

3.4. Metodologias de avaliação da biodegradação

Alguns dos métodos mais empregados na avaliação da biodegradação de materiais poliméricos têm sido: a espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), a microscopia óptica (M.O.), microscopia eletrônica de varredura (M.E.V.), teste de crescimento (T.C.) e as medidas de massa.

3.4.1. FTIR

A espectroscopia de absorção no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) é uma técnica utilizada na caracterização de filmes poliméricos que sofreram foto e/ou biodegradação (XU; GUO, 1995).

Esta técnica permite identificar grupos funcionais presentes em um composto (ARKATKAR et al., 2009b), seu desaparecimento ou modificação, em caso de biodegradação (SUDHAKAR et al., 2007). Além disso, possibilita a investigação de muitas mudanças no índice de cristalinidade relativo de um polímero (BLOEMBERGEN et al., 1986).

Durante o processo de degradação há um aumento na cristalinidade do polímero, que é atribuída ao eventual desaparecimento das porções amorfas do polímero. A degradação das regiões amorfas ocorre, normalmente, antes das regiões cristalinas, pois os micro-organismos produzem enzimas extracelulares que realizam uma degradação seletiva, o que se deve ao fato de as regiões amorfas não serem muito organizadas, possibilitando assim um melhor contato entre as enzimas e a cadeia polimérica (CHANDRA; RUSTGI, 1998).

No estudo da oxidação de polímeros, o FTIR é muito utilizado, pois permite quantificar a oxidação das cadeias a partir da medida das intensidades das bandas de carbonila (cetona e éster) (AMMALA et al., 2011). Weng et al., (2011), utilizaram o FTIR para avaliar a biodegradação de filmes de PHB e alguns de seus copolímeros, após passarem por 30 dias em compostagem. Depois do biotratamento, foi observado o aparecimento de bandas na região de $3385\text{--}3281\text{cm}^{-1}$, indicando que mais grupos hidroxil e carboxílicos foram formados.

3.4.2. Microscopia Óptica (M.O.)

Dentre as diversas técnicas disponíveis para caracterização e monitoramento da degradação de polímeros, a microscopia é a mais comumente usada na investigação da morfologia polimérica (ROSA et al., 2005). Ela é uma técnica complementar e essencial na resolução de diferentes morfologias de filmes poliméricos submetidos à foto e biodegradação (MARTINS-FRANCHETTI et al. 2008b; GOLDSTEIN et al., 2003).

Segundo Shah et al. (2008), o aparecimento de furos, fraturas, rugosidade, fragmentação, mudança de cor ou a formação de biofilme na superfície polimérica, são possíveis indicativos do ataque do micro-organismo, e os mesmos podem ser visualizados através da microscopia.

Uemura & Martins-Franchetti (2010), realizando estudos com filmes de PP, PHB e blenda, biotratados com água de rio poluído, verificaram a importância da microscopia para a investigação da morfologia do filme polimérico, através das alterações ocorridas na superfície do polímero devido à adesão de micro-organismos sobre a mesma.

3.4.3. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Técnicas mais avançadas de microscopia como a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), têm sido utilizadas na investigação da morfologia dos polímeros, auxiliando na compreensão das propriedades e do comportamento dos materiais poliméricos (KACZMAREK, 1996). As mudanças superficiais tais como, furos, rachaduras, rugosidade são sinais significativos da degradação da superfície polimérica (SHAH et al., 2008).

Wang e colaboradores (2004) utilizaram MEV para investigar a biodegradação de filmes de PHB, PHBHHx e Ecoflex® em lodo ativado. A partir dessa metodologia eles puderam observar mudanças nos filmes, como aparecimento de furos, adesão de bactérias e aumento de sua porosidade.

3.4.4. Teste de crescimento fúngico em polímeros

A realização deste teste foi baseada na ASTM-ISO 846 – 1997 - *Testing of Plastics – Influence of fungi and bacteria*, a qual avalia a biodeterioração de materiais poliméricos por meio de alterações visuais, variação de massa e alterações de propriedades mecânicas e físicas provocadas por micro-organismos.

O teste é realizado expondo-se os filmes poliméricos à ação de micro-organismos de espécies conhecidas, por um período pré-definido, de tempo. É utilizada uma suspensão de esporos de fungos para verificação da resistência de filmes plásticos à ação dos mesmos.

Após o período de incubação é verificada a ocorrência de alterações físicas ou químicas no filme, podendo haver crescimento do micro-organismo e/ou de biofilme sobre o polímero,

provocando um efeito biofísico de dano ao mesmo (FLEMMING, 1998; MADDEVER; CHAPMAN, 1987).

3.4.5. Medida de massa

Um método simples de medir a biodegradação de polímeros é realizado através da determinação da perda de massa, que ocorre através de hidrólise e/ou quebras oxidativas da cadeia polimérica (SHAH et al., 2008). O crescimento de micro-organismos na superfície do polímero pode levar à um aumento da massa do mesmo, bem como pode levar à perda de integridade do polímero e consequentemente à perda de massa, sendo esta proporcional à área da superfície, visto que a biodegradação geralmente é iniciada na superfície do polímero (SUDHAKAR et al., 2007).

Essa metodologia foi utilizada por Oprea & Doroftei (2011) para avaliar a biodegradação de PUA na presença do fungo *Chaetomium globosum*. Como resultado eles observaram uma perda de massa dos filmes de 16% , após o período de 130 dias de incubação.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material

4.1.1. Polímeros

Neste estudo foram utilizados os seguintes polímeros:

- Polihidroxibutirato – co – valerato (PHBV) – 18% HV (doado pelo Departamento de Engenharia de Materiais - Universidade Federal de São Carlos);
- Polietileno (PE) (PB 681/59 - Fortymil): densidade = 0.922 g/cm³;
- Blenda PE/PHBV na proporção em massa de 70/30 (composição feita no laboratório para testes).

4.1.2. Fungos

Foram utilizados os micro-organismos de referência recomendados pela norma ISO 846 :

- *Penicillium funiculosum* (ATCC 11797);
- *Paecilomyces variotii* (ATCC 16023);
- *Trichoderma virens* (IMI 45553);
- *Aspergillus Níger* (ATCC 9642);
- *Chaetomium globosum* (ATCC 16021).

As cepas padrão utilizadas neste estudo foram adquiridas da Coleção de Culturas Tropical, Fundação André Tosello, Campinas, SP.

4.1.3. Meios de Cultura

4.1.3.1. Meio de Manutenção

Potato Dextrose Agar (PDA - HIMEDIA[®]), usado para o crescimento e manutenção do fungo:

- 200 g/L Infusão de Batatas;
- 20 g/L Dextrose;
- 15 g/L Ágar;
- 1000 mL Água destilada q.s.p.

4.1.3.2. Meio Sólido (Meio Mineral Completo):

- 30 g Dextrose anidra;
- 2,0g NaNO₃;
- 0,7 g KH₂PO₄;
- 0,3g K₂HPO₄;
- 0,5g KCl;
- 0,5g MgSO₄.7H₂O;
- 0,01g FeSO₄.7H₂O;
- 20 g Ágar;
- 1000mL Água destilada q.s.p.

4.1.3.3. Meio Líquido:

MEIO MINERAL COMPLETO

- 1,5g Dextrose (5%);
- 1,0g Extrato de Levedura (5%);
- 1g NH₄NO₃;
- 0,7g KH₂PO₄;
- 0,7g K₂HPO₄;
- 0,005g NaCl;
- 0,7g MgSO₄ . 7H₂O;
- 0,002g FeSO₄ . 7H₂O;
- 0,002g ZnSO₄ . 7H₂O;
- 0,001g MnSO₄ . H₂O;
- 1000mL Água destilada q.s.p.

MEIO MINERAL INCOMPLETO

- 1g NH₄NO₃;
- 0,7g KH₂PO₄;
- 0,7g K₂HPO₄;
- 0,005g NaCl;
- 0,7g MgSO₄ . 7H₂O;
- 0,002g FeSO₄ . 7H₂O;
- 0,002g ZnSO₄ . 7H₂O;
- 0,001g MnSO₄ . H₂O;
- 1000mL Água destilada q.s.p.

4.1.4. Equipamentos

- Balança analítica da marca CHYO modelo JK 200;
- Câmera digital, marca Sony, modelo DSC-S730;
- Espectrofotômetro IR com transformada de Fourier, marca Shimadzu, modelo FTIR – 8300;
- Estufa bacteriológica, marca SOLAB - Equipamentos para Laboratórios;
- Prensa hidráulica com aquecimento, marca SOLAB – Equipamentos para Laboratórios;
- Frascos Erlenmeyer de 250 mL;
- Micrometro, marca Mitutoyo, modelo nº. 7301;
- Placas de Petri;
- Dessecador;
- Câmara de Neubauer;
- Microscópio óptico, marca BEL[®] photonics, B4 model, optech: optical technology Germany;
- Microscópio Eletrônico de Varredura, marca HITACHI TM 3000 – tabletop microscope.

4.2. Métodos

4.2.1. Preparo dos filmes e da blenda polimérica

Os homopolímeros e a blenda PEBD/PHBV (70/30) foram processados em reômetro de torque, modelo Haake Polylab 900 (Depto. de Engenharia Metalúrgica e de Materiais, USP/SP), garantindo assim, uma boa dispersão das fases. Essa blenda ainda não é comercializada, e sua composição foi determinada como teste, a fim de se estudar quais as quantidades de cada polímero permitem a melhoria tanto das propriedades mecânicas do material como de sua biodegradabilidade.

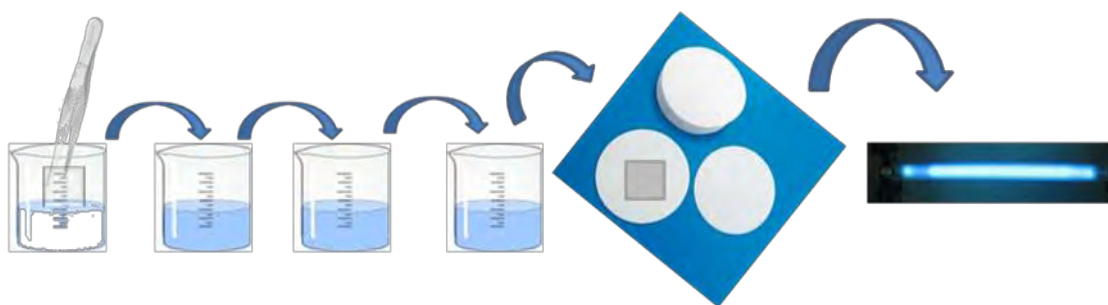
Os filmes poliméricos foram obtidos fundindo-se 0,3 g de cada polímero, entre folhas de alumínio, em prensa hidráulica, marca SOLAB, sob temperatura de 170 °C e pressões de 53,4 Kgf./cm² para a blenda e para o PE, e de 44,5 Kgf./cm² para o PHBV, por um período de 3 minutos

cada. Os filmes foram resfriados em condições de ambiente controlado (25°C) no Laboratório de Tratamento de Polímeros do Departamento de Bioquímica e Microbiologia – UNESP/Rio Claro.

4.2.2. Esterilização dos filmes

A esterilização dos filmes poliméricos foi feita lavando-os em uma solução com hipoclorito 0,3%, enxaguando-os em água destilada estéril e secando-os entre papéis de filtro, também estéreis. Após essa etapa cada filme foi submetido à radiação UV, suave, durante 15 minutos, em cada face (Fig. 3)

Figura 3 – Esterilização dos filmes.



Obs.: o primeiro frasco contém hipoclorito a 0,3% e os outros três contêm água destilada e esterilizada; secagem dos filmes em papel de filtro e esterilização com luz UV. Fonte: Elaborada pelo autor.

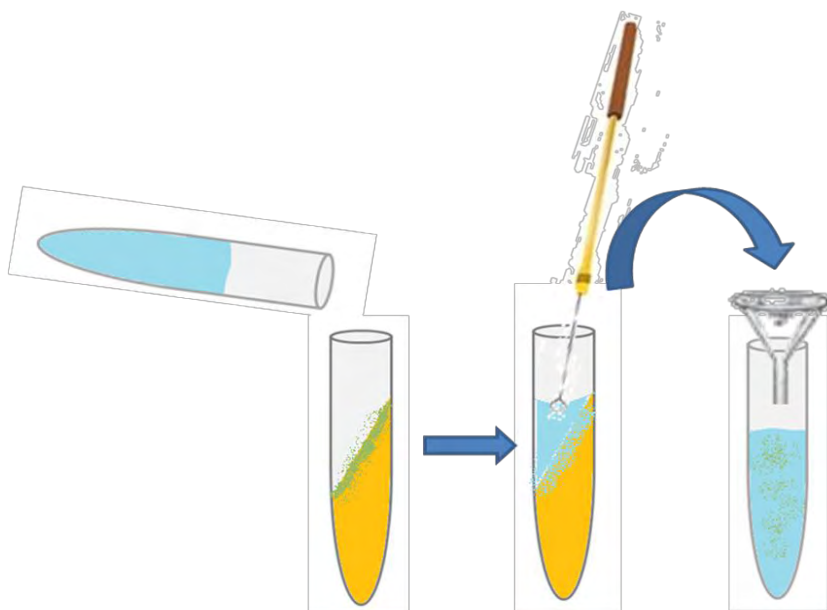
4.2.3. Manutenção das culturas de fungos

Para manutenção das culturas puras fúngicas, estas foram repicadas, isoladamente, em tubos de ensaio contendo o meio de cultura PDA estéril, os quais, posteriormente foram colocados em B.O.D à 28°C, para o crescimento e esporulação das mesmas.

4.2.4. Preparo da suspensão de esporos

Em um tubo contendo a cultura pura do fungo esporulado, foram introduzidos 9 mL de solução salina (0,85%) e posteriormente foi feita uma raspagem da superfície da cultura com uma alça estéril até se obter uma suspensão aquosa de esporos. Após este processo, foi realizada a filtração da suspensão em funil de vidro contendo algodão e lã de vidro (estéreis) para remoção dos fragmentos de micélio (Fig. 4). A concentração da suspensão foi ajustada para 10^6 esporos / mL, através da contagem em câmara de Neubauer.

Figura 4 – Preparo da suspensão de esporos em salina a 0,85%.



Fonte: Elaborada pelo autor.

4.2.5. Teste de crescimento em meio sólido

Foi realizado um teste de crescimento fúngico na presença do polímero ou resistência do polímero ao ataque fúngico, baseado na ASTM-ISO 846-1997, onde cada amostra de filme polimérico foi exposta aos esporos dos fungos, isoladamente, em meio mineral completo na forma

sólida. Este método tem como objetivo avaliar se há ação direta dos fungos sobre o material, ou seja, se o fungo é capaz de crescer sobre o material, utilizando o mesmo como fonte de carbono, e também a ação indireta, através da ação de metabólitos secundários produzidos pelos fungos sobre os filmes.

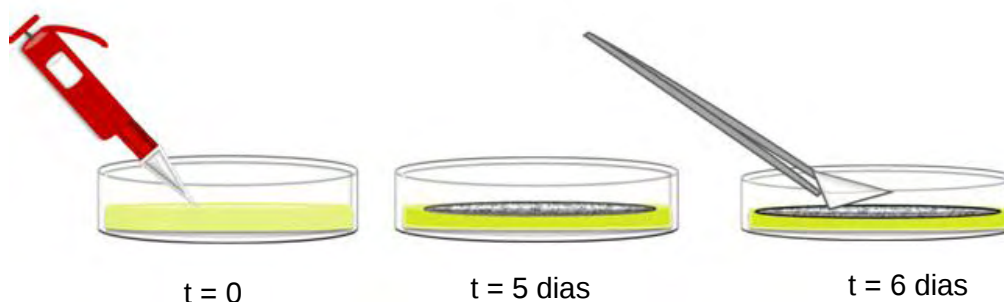
Neste trabalho esse teste foi aplicado com os cinco fungos, listados no item 4.1.2, para se descobrir quais desses fungos indicados pela norma possuem maior afinidade pelos polímeros em questão, e assim selecionar um desses fungos para realizar os experimentos em meio de cultura líquido.

O teste foi realizado da seguinte maneira: uma suspensão de esporos, de 200 μL , de cada um dos fungos indicados pela ISO 846, foi inoculada em placas de Petri, previamente esterilizadas em autoclave (121°C a 1 atm), contendo o meio mineral completo e sólido. Estas foram colocadas em B.O.D., a 28°C, para o crescimento fúngico.

Após cerca de 5 dias de crescimento, foram adicionados, a cada placa, os filmes poliméricos de interesse (Fig. 5), previamente pesados, analisados em FTIR e esterilizados em UV por 15 minutos. As placas foram levadas novamente para a B.O. D a 28°C por um período de 30 dias.

Foram feitos também controles negativos, em que os filmes poliméricos, sem os micro-organismos, foram adicionados às placas estéreis contendo o meio mineral completo sólido.

Figura 5 – Teste para efeito de crescimento fúngico.



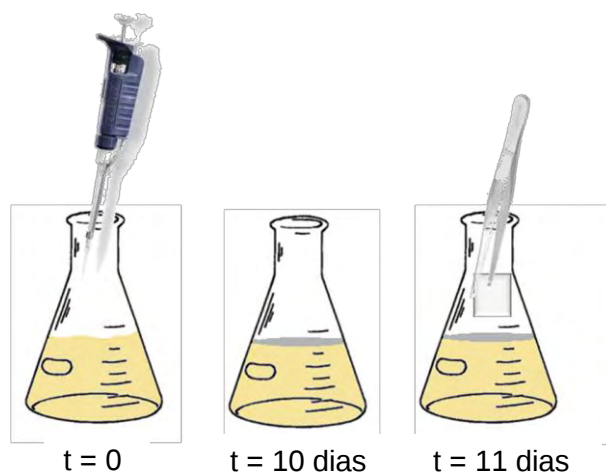
Nota: t=0: adição da suspensão de esporos; t=5 dias: crescimento fúngico e t=6 dias: adição do filme polimérico Fonte: Elaborada pelo autor.

A partir deste teste foi escolhido o fungo *Penicillium funiculosum* para ser utilizado como inóculo, no tratamento em meio líquido.

4.2.6. Tratamento microbiano em meio líquido

Para o experimento em Meio Mineral Completo, foram realizados os seguintes procedimentos: em erlenmeyers de 250 mL foram adicionados 200 mL do meio de cultura, foram então tampados com rolhas e autoclavados à 121°C e 1 atm por 15 minutos. Posteriormente, com o auxílio de uma pipeta automática, foram adicionados aos erlenmeyers 200µL da suspensão de esporos a uma concentração de 10^6 . Os frascos foram levados à estufa bacteriológica por cerca de 10 dias, a 28°C e sem agitação, para o crescimento do fungo. Após o crescimento, foram adicionados os filmes poliméricos a cada frasco (Fig. 6).

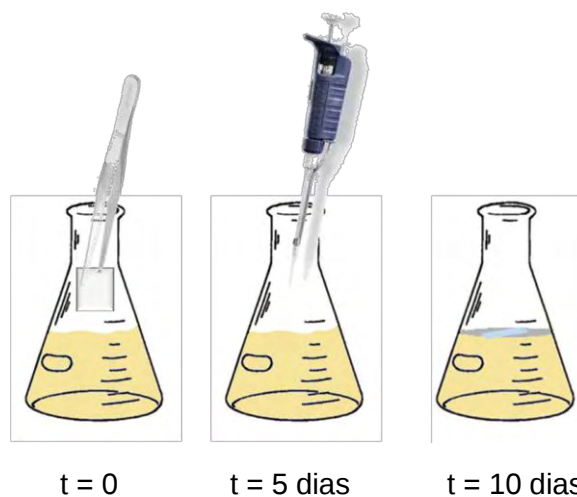
Figura 6 – Esquema do biotratamento em Meio Mineral Completo.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Para o experimento em Meio Mineral Incompleto, os procedimentos foram semelhantes aos descritos acima, com a diferença de que, neste caso, foram adicionados os filmes poliméricos, esterilizados, aos frascos contendo o meio de cultura autoclavado, e somente depois disso foi introduzida a suspensão de esporos. Os frascos também foram levados à incubadora a 28°C, sem agitação (Fig. 7).

Figura 7 – Esquema do experimento em Meio Mineral Incompleto.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Todos os experimentos foram feitos em duplicatas e os controles negativos foram feitos colocando-se apenas os filmes poliméricos nos erlenmeyers, com o meio de cultura, sem inoculação do fungo.

Para as análises, os filmes foram retirados dos meios de cultura com o auxílio de uma peneira e uma pinça, lavados com jatos de água destilada provenientes de uma pisseta e então secos entre folhas de papel de filtro estéreis. Cada filme foi colocado em placa de Petri estéril, devidamente identificada e mantido em dessecador a vácuo, por um período de 3 dias, afim de retirar o excesso de umidade do mesmo.

4.2.7. Microscopia Óptica (MO)

A microscopia óptica é um excelente instrumento investigativo das alterações superficiais e morfológicas dos polímeros (ROSA et al., 2005).

Os fungos e os filmes foram analisados em microscópio óptico, com aumento de 400X (marca B4 - BEL photonics, Germany) e fotografados.

4.2.8. Medidas de massa

As massas dos filmes, antes e após o biotratamento, foram obtidas em balança analítica da marca CHYO, modelo JK 200.

4.2.9. Espectroscopia de absorção no infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia de absorção no infravermelho (FTIR), é uma técnica aplicada na investigação estrutural de matrizes poliméricas (BELTRÁN et al., 1997) e tem sido bastante empregada na análise de modificações estruturais do polímeros, após o processo biodegradativo (SUDHAKAR et al., 2007; UEMURA; MARTINS-FRANCHETTI, 2010; GONÇALVES; MARTINS-FRANCHETTI, 2010).

Os filmes originais e biotratados foram analisados em um espectrofotômetro IR com transformada de Fourier, marca Shimadzu, modelo FTIR – Prestige-21, com resolução 4 cm^{-1} (Laboratório UNESP/Rio Claro – SP) .

4.2.9.1 Índices de carbonila

Aos espectros obtidos por FTIR foi aplicado um tratamento matemático (desconvolução) a fim de melhorar a separação e resolução das bandas, para tal foi utilizado o Software Origin 8.0, na função Lorentziana, sendo aplicada às bandas de carbonila (1720 cm^{-1} , fase cristalina e 1751 cm^{-1} , fase amorfa). A partir destas bandas foram calculados os índices de C=O, através da razão das bandas destas bandas em relação à banda de padrão interno a 1380 cm^{-1} , (atribuída à vibração simétrica de grupos CH_3 na fase cristalina do PHBV) (LAMBEEK et al., 1995; XU et al., 2002).

4.2.10. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Os filmes utilizados no trabalho, originais e biotratados, foram analisados por MEV. Estes foram recortados e fixados em suportes de alumínio com o auxílio de uma fita adesiva e posteriormente, recobertos com pó de ouro, em câmara a vácuo, utilizando o metalizador MED 010,

da marca Balzers. Após a metalização os filmes foram observados no microscópio eletrônico de varredura (marca HITACHI TM3000) com os aumentos de 300X, 1000X e X2000X. Este equipamento está alocado no Laboratório de Microscopia Eletrônica do Departamento de Biologia da Unesp - Rio Claro – SP.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a incubação dos filmes de PE, PHBV e blenda, tanto no meio sólido, quanto no meio líquido, foram analisados com a finalidade de se verificar quais as mudanças ocorridas durante o período de biotratamento.

Os filmes incubados nos meios de cultura, sem a inoculação dos fungos (controle negativo), foram analisados através de FTIR, M.O. e tiveram sua massa aferida em balança analítica, porém não apresentaram nenhuma mudança, conforme esperado.

Primeiramente foram analisados os filmes incubados por 30 dias em meio sólido. A avaliação foi feita a olho nu, por microscopia óptica e por medidas de FTIR, para verificação do crescimento fúngico e da ocorrência de alterações nos filmes. Este é um método viável para verificar a interação do fungo com o filme polimérico, em meio de cultura sólido completo, podendo ocorrer: a adesão do fungo sobre o filme ou nas bordas do mesmo.

5.1. Teste em meio sólido

5.1.1. Avaliação visual

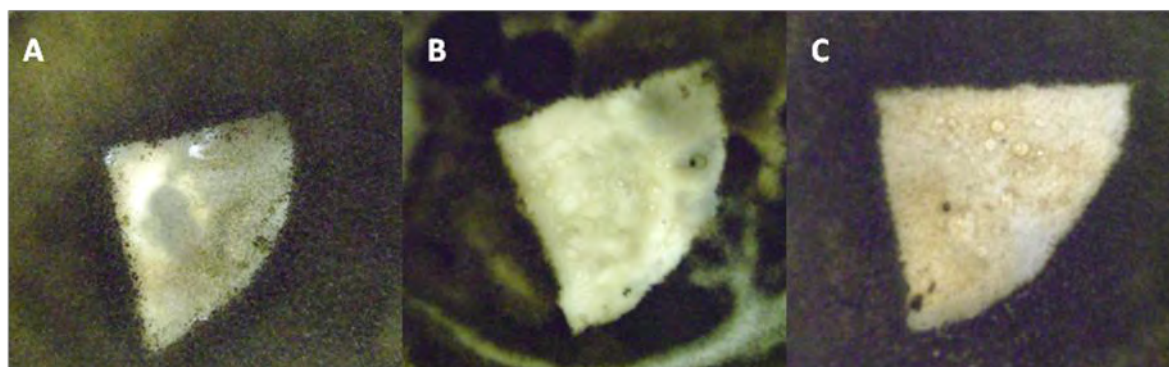
As figuras 8 a 12 mostram o teste de crescimento dos fungos *Aspegillus niger*, *Paecilomyces variotii*, *Chaetomium globosum*, *Trichoderma virens* e *Penicillium funiculosum*.

Através de uma avaliação visual, dentre os cinco fungos testados, os que apresentaram menor adesão foram *Aspergillus niger* e *Chaetomium globosum* (Fig. 8 e 10), ou seja, são fungos com pouca afinidade relativa aos polímeros utilizados neste trabalho.

Os fungos *Paecilomyces variotii* e *Trichoderma virens* (Fig. 9 e 11) também apresentaram pouca adesão ao PE, mas tornaram os filmes de PHBV e da blenda mais opacos, após o período de incubação.

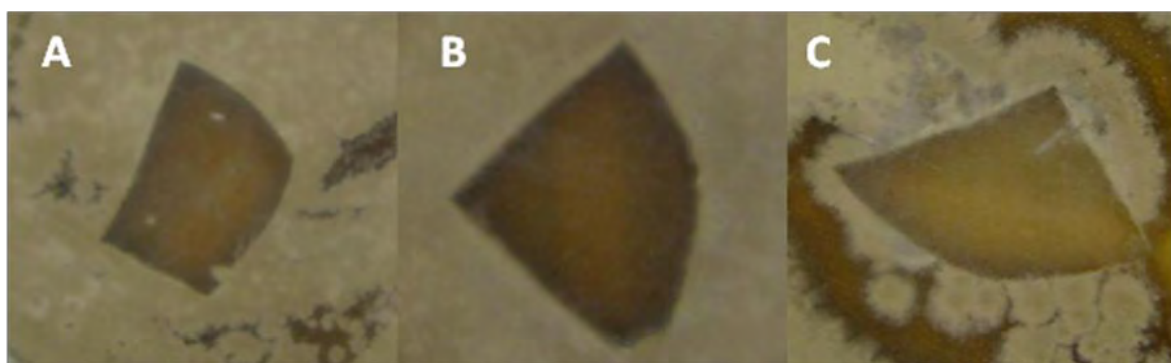
Por outro lado, o fungo *Penicillium funiculosum* aderiu aos filmes poliméricos de PHBV e da blenda. Este resultado foi satisfatório, pois a adesão do fungo ao filme polimérico é o primeiro passo para iniciar a biodegradação, possibilitando que metabólitos secundários produzidos pelo mesmo, interajam com o polímero. Devido a este fato, o *Penicillium funiculosum* foi escolhido para a continuidade ao trabalho em meio líquido.

Figura 8 – Crescimento do fungo *Aspergillus niger* com os polímeros A: Polietileno, B: PHBV e C: Blenda, em meio sólido, a 28°C, durante 30 dias.



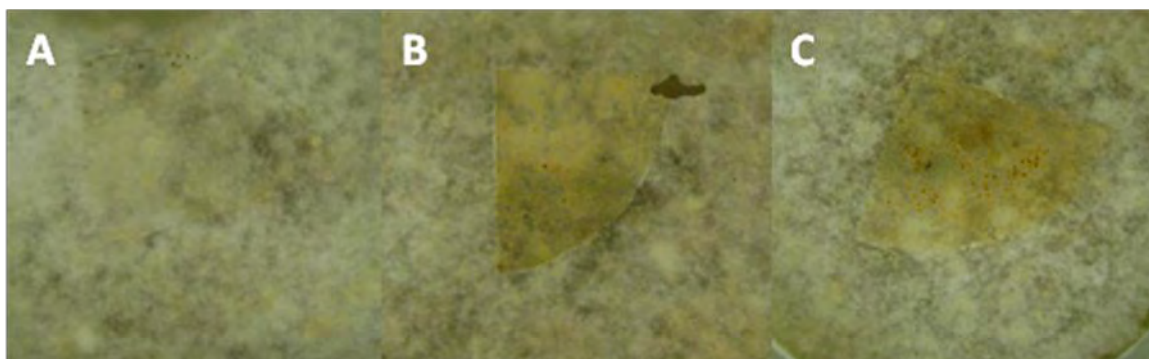
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 9 – Crescimento do fungo *Paecilomyces variotii* com os polímeros A: Polietileno, B: PHBV e C: Blenda, em meio sólido, a 28°C, durante 30 dias.



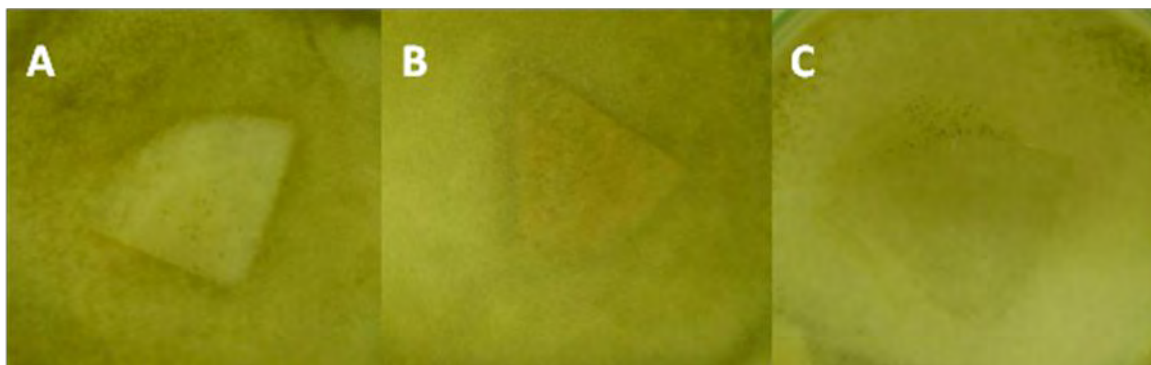
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 10 – Crescimento do fungo *Chaetomium globosum* com os polímeros A: Polietileno, B: PHBV e C: Blenda, em meio sólido, a 28°C, durante 30 dias.



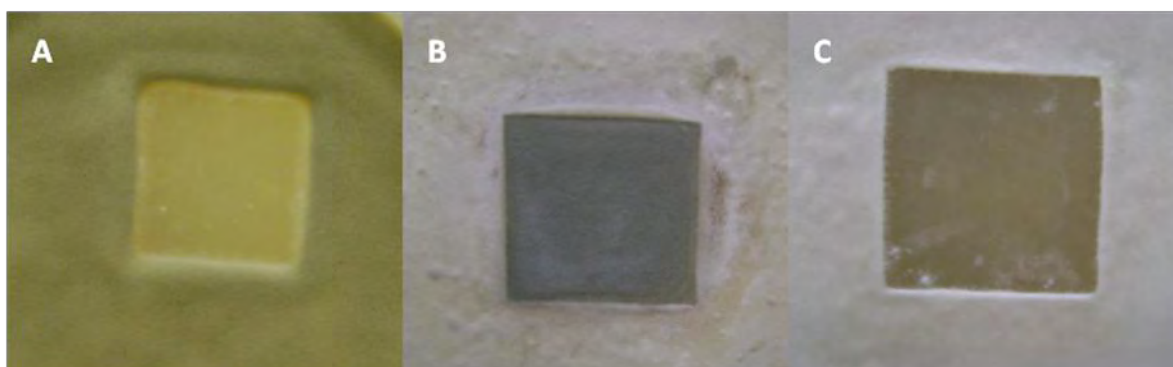
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 11 – Crescimento do fungo *Trichoderma virens* com os polímeros A: Polietileno, B: PHBV e C: Blenda, em meio sólido, a 28°C, durante 30 dias.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 12 – Crescimento do fungo *Penicillium funiculosum* com os polímeros A: Polietileno, B: PHBV e C: Blenda, em meio sólido, a 28°C, durante 30 dias.



Fonte: Elaborada pelo autor.

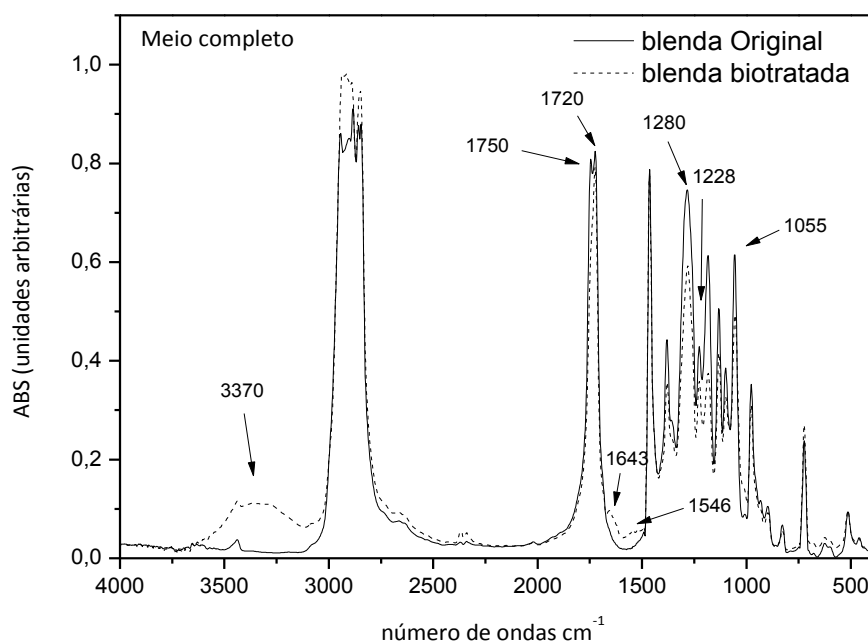
5.1.2. Avaliação por FTIR

Na avaliação dos filmes por FTIR, os resultados foram mais satisfatórios (com maiores mudanças) para os fungos *Paecilomyces variotii* e *Penicillium funiculosum*. Apesar de não ter aderido tanto quanto o fungo *Penicillium funiculosum* aos filmes, o fungo *Paecilomyces variotii*, em meio sólido, foi capaz de alterar alguns desses polímeros a nível molecular, como pode ser visto na figura 13.

No espectro da blenda biotratada com *P. variotii* (Fig.13), a banda a 1750 cm⁻¹ (estiramento de grupos C=O na fase amorfa) diminuiu de intensidade, a banda a 1720 cm⁻¹ (estiramento de grupos C=O na fase cristalina) não sofreu mudança e novas bandas apareceram a 1643 cm⁻¹ e 1546

cm^{-1} (estiramento de C=O de ácido e C=C, respectivamente). O aparecimento da banda a 3270 cm^{-1} (alargada) corresponde ao estiramento O–H, de ácidos. As bandas a 1280 cm^{-1} , 1228 cm^{-1} e a 1055 cm^{-1} sofreram diminuição na intensidade, indicando mudança na cristalinidade e alteração do grupo C–O–C do éster, respectivamente. A mudança estrutural significativa da matriz polimérica, notada no FTIR, mostrou que a blenda PEBD/PHBV (70/30) sofreu biodegradação pelo fungo *P. variotii*, o que, neste caso, pode ser atribuído à estrutura química e morfológica desta blenda.

Figura 13 – FTIR das blendas original e biotratada com *P. variotii* (ATCC 16023), durante 30 dias, em meio sólido.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Para o fungo *P. funiculosum* os melhores resultados foram obtidos em meio líquido, portanto serão apresentados apenas os espectros provenientes desse biotratamento (ver item 5.6).

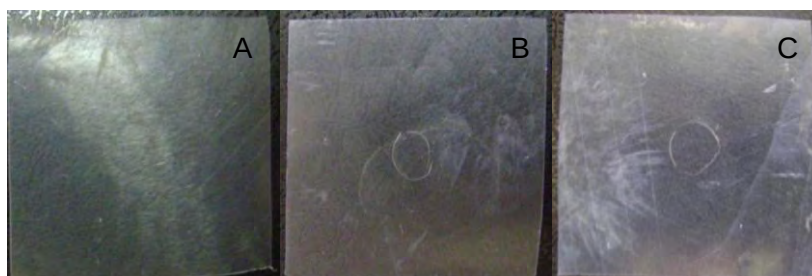
5.2. Tratamento com *P. funiculosum* em meio líquido

Este tipo de tratamento é importante, pois o meio líquido gera melhor contato entre os micro-organismos e a superfície do filme e favorece a ação enzimática.

Os filmes de PEBD e blenda incubados tanto durante 15 dias quanto por 6 meses, apresentaram várias mudanças a olho nu, tais como: maior opacidade dos filmes, aderência microbiana, quebras e descamações, como pode ser observado nas figuras 14-16. Os filmes de PE, após o biotratamento com os dois meios, apresentaram uma superfície mais rugosa (Fig. 14). Os filmes de PHBV incubados por 6 meses, tanto no meio mineral completo como no incompleto, bem como os incubados durante 15 dias em meio mineral completo, foram totalmente biodegradados (mineralizados), porém os incubados em meio mineral incompleto, apresentaram biofilme aderido em sua superfície, perceptível mudança na espessura e tornaram-se quebradiços (Fig. 15).

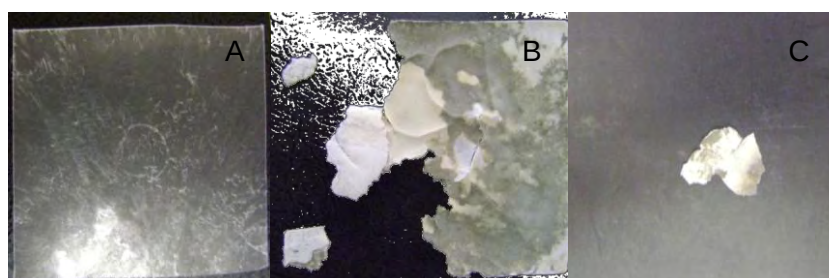
A blenda (Fig. 16), apresentou uma superfície bastante heterogênea e descamada após o biotratamento (Fig. 16 – B e C).

Figura 14 – Fotografias dos filmes de PE incubados em meio líquido durante 15 dias a 28⁰C. A: filme original; B: filme biotratado em M.M.I e C: filme biotratado em M.M.C.



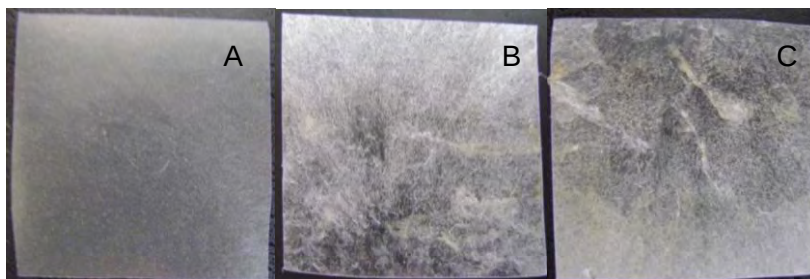
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 15 – Fotografias dos filmes de PHBV incubados em meio líquido durante 15 dias, a 28⁰C. A: filme original; B: filme biotratado em M.M.I e C: filme biotratado em M.M.C.



Fonte: Elaborada pelo autor.

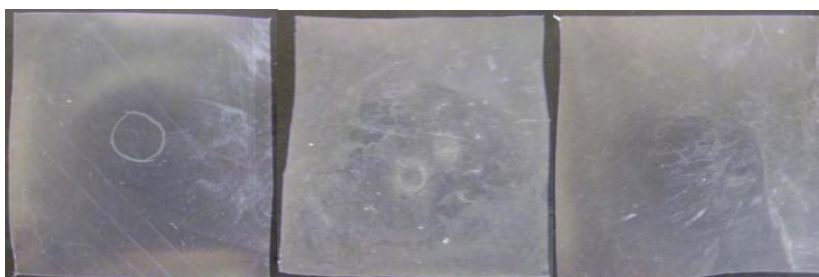
Figura 16 – Fotografias dos filmes da Blenda incubados em meio líquido durante 15 dias, a 28⁰C. A: filme original; B: filme biotratado em M.M.I e C: filme biotratado em M.M.C.



Fonte: Elaborada pelo autor.

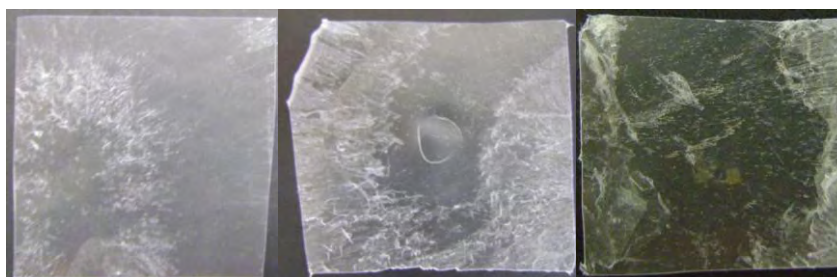
As figuras 17 e 18 mostram a adesão do fungo à superfície dos filmes de PE e da Blenda após terem sido incubados pelo período de 6 meses no meio de cultura líquido, a 28⁰C.

Figura 17 – Fotografias dos filmes de PE incubados em meio líquido durante 6 meses, a 28⁰C. A: filme original; B: filme biotratado em M.M.I e C: filme biotratado em M.M.C.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 18 – Fotografias dos filmes da blenda incubados em meio líquido durante 6 meses, a 28⁰C. A: filme original; B: filme biotratado em M.M.I e C: filme biotratado em M.M.C.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Isto mostra que provavelmente, no meio rico em nutrientes, o fungo se desenvolve mais, acelerando assim o processo de biodegradação, porém, fica evidente também que, no meio

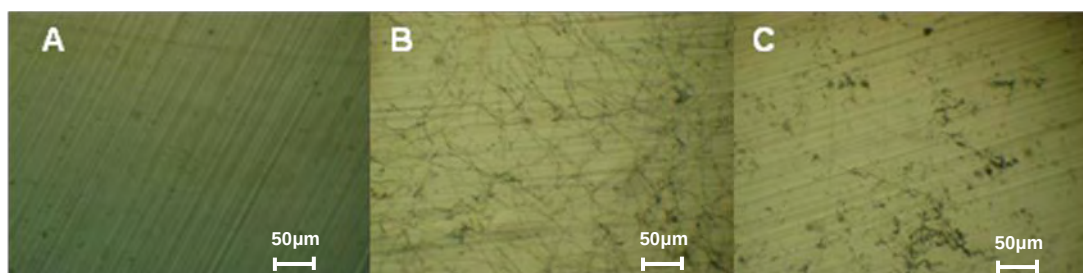
incompleto, a única fonte de carbono utilizada pelo *P. funiculosum*, é o polímero, mostrando assim o grande potencial desse fungo em assimilar esse tipo de material, como fonte de carbono.

As mudanças visuais não provam o processo de biodegradação, mas são indicativas do ataque microbiano à superfície polimérica (SHAH et al., 2008).

5.3. Microscopia Óptica (M.O.)

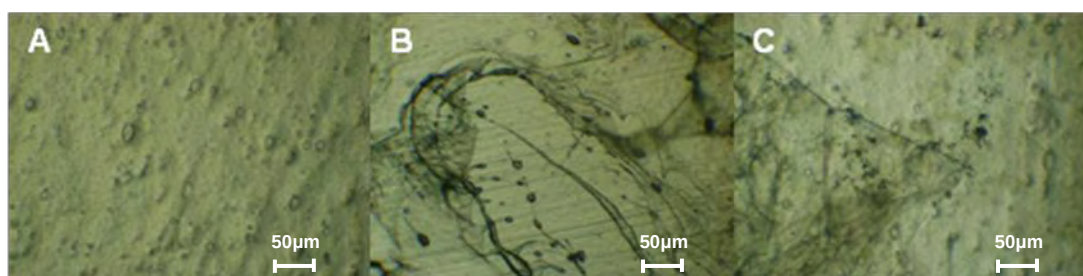
Os filmes de PE e blenda, biotratados em meio líquido, durante 6 meses, a 28°C, mostraram mudanças em sua morfologia. Nas figuras 19 a 23 (com aumentos de 400X), foram observadas alterações na superfície polimérica, através da presença de rachaduras, descamações e da adesão microbiana, evidenciada pela presença de hifas e esporos fúngicos.

Figura 19 – Micrografias de M.O. dos filmes de PE (400X). A: filme original, sem biotratamento; B: filme biotratado por 6 meses em M. M. I. e C: filme biotratado durante 6 meses, a 28°C, em M. M. C.



Fonte: Elaborada pelo autor.

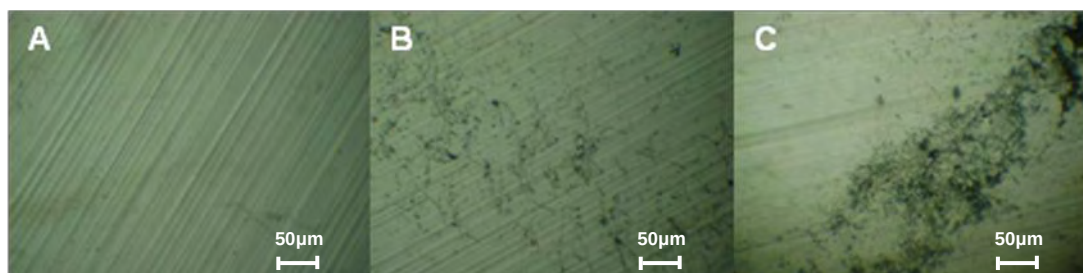
Figura 20 – Micrografias de M.O. dos filmes da Blenda (400X). A: filme original, sem biotratamento; B: filme biotratado por 6 meses, a 28°C, em M. M. I. e C: filme biotratado durante 6 meses, a 28°C, em M. M. C.



Fonte: Elaborada pelo autor.

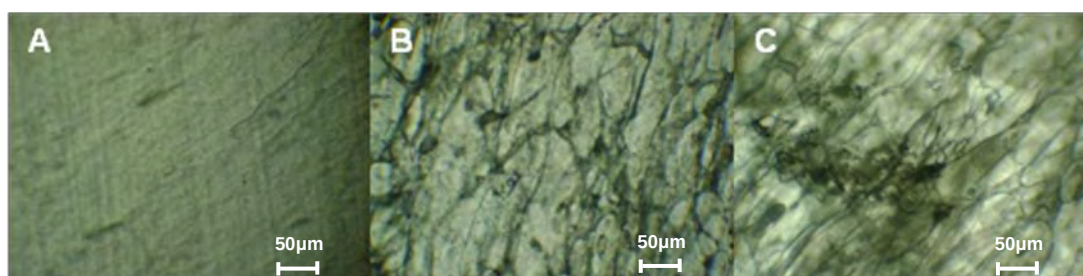
Os filmes de PE e blenda biotratados em meio mineral líquido, durante 15 dias, estão apresentados nas figuras 21 e 22, ressaltando que neste período, ainda foi possível analisar os pedaços do filme de PHBV, mas somente em meio mineral incompleto (Fig. 23).

Figura 21 – Micrografias de M.O. dos filmes de PE (400X). A: filme original, sem biotratamento; B: filme biotratado por 15 dias, a 28⁰C, em M. M. I. e C: filme biotratado durante 15 dias, a 28⁰C, em M. M. C.



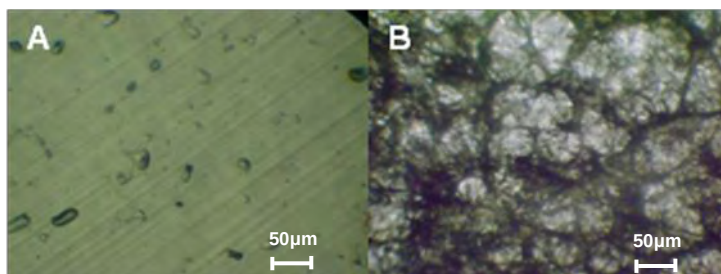
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 22 – Micrografias de M.O. dos filmes da Blenda (400X). A: filme original, sem biotratamento; B: filme biotratado por 15 dias, a 28⁰C, em M. M. I. e C: filme biotratado durante 15 dias, a 28⁰C, em M. M. C.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 23 – Micrografias de M.O. dos filmes de PHBV (400X). A: filme original, sem biotratamento e B: filme biotratado durante 15 dias, a 28⁰C, em M. M. I.



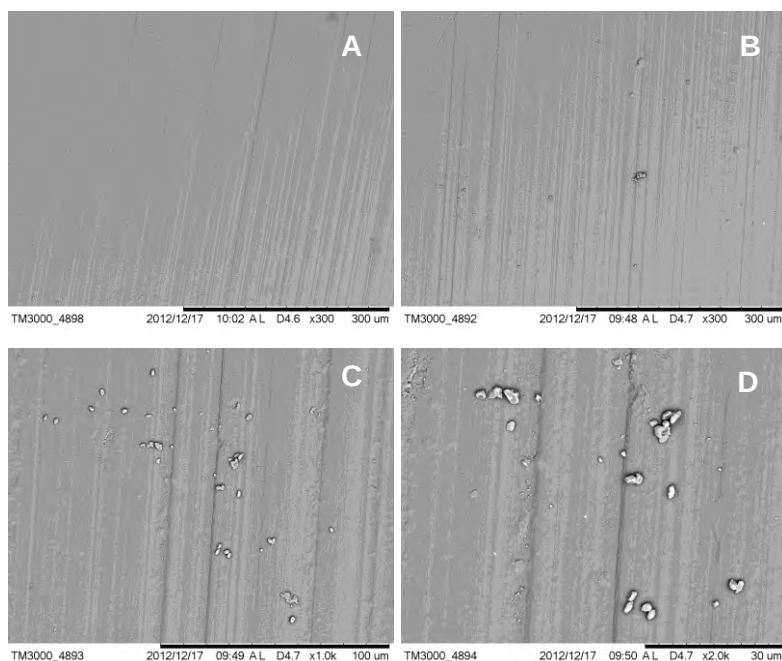
Fonte: Elaborada pelo autor.

5.4. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Os filmes originais e biotratados foram analisados também por Microscopia Eletrônica de Varredura, a qual é muito importante na investigação da morfologia dos filmes poliméricos.

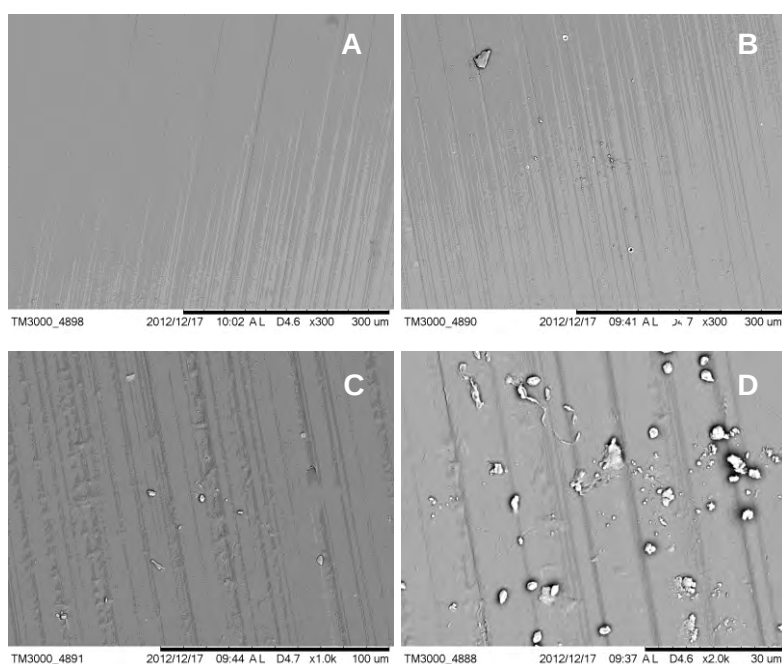
As micrografias de MEV dos filmes de PE biotratados em M.M.I e em M.M.C estão apresentadas nas figuras 24 e 25, respectivamente. Nas figuras 24 e 25 – A (300X), pode ser observada a superfície do filme original, com a presença de algumas marcas e riscos, provenientes do processo de prensagem utilizado para produção dos filmes poliméricos. As figuras 24 e 25 – B, C e D mostram diferentes aumentos (300X, 1000X e 2000X, respectivamente) dos filmes após o biotratamento, podendo ser observados pequenos grânulos, os quais acredita-se serem devido a adesão fúngica à superfície polimérica. Estes provavelmente são resíduos do biofilme que restou no material após a lavagem do mesmo.

Figura 24 - Micrografias de MEV dos filmes de PE. A: filme original, sem biotratamento; B, C e D: filmes biotratados durante 6 meses, a 28⁰C, em M.M.I.



Fonte: Elaborada pelo autor.

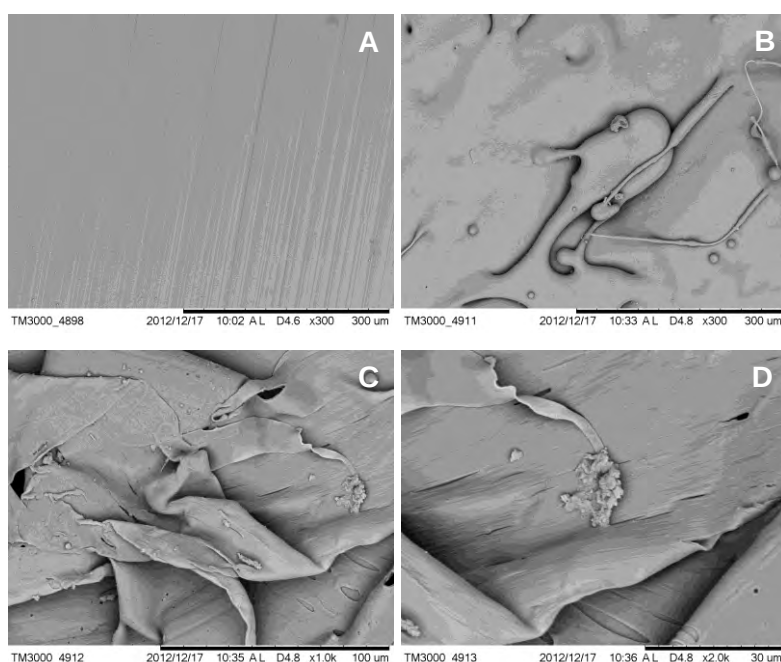
Figura 25 – Micrografias de MEV dos filmes de PE. A: Filme original, sem biotratamento; B, C e D: filmes biotratados durante 6 meses, a 28⁰C, em M.M.C.



Fonte: Elaborada pelo autor.

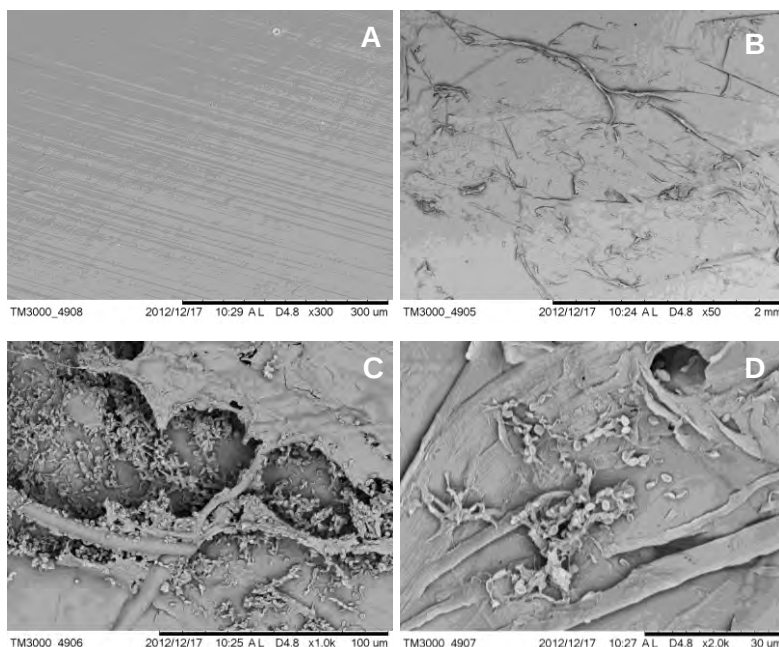
As micrografias de MEV correspondentes aos filmes da blenda originais e biotratados, estão apresentadas abaixo (Fig. 26 e 27). Estas micrografias apresentam tanto a adesão do fungo à superfície polimérica (Fig. 26-D; 27-B,C e D), quanto a evidência do processo de degradação desse tipo de material, que ocorre pela descamação de camada por camada (Fig. 26 – C e D; 27 – D) (CORRÊA et al., 2008).

Figura 26 – Micrografias de MEV dos filmes da blenda. A: filme original, sem biotratamento; B, C e D: filmes biotratados durante 6 meses, a 28⁰C, em M.M.I.



Fonte: Elaborada pelo autor.

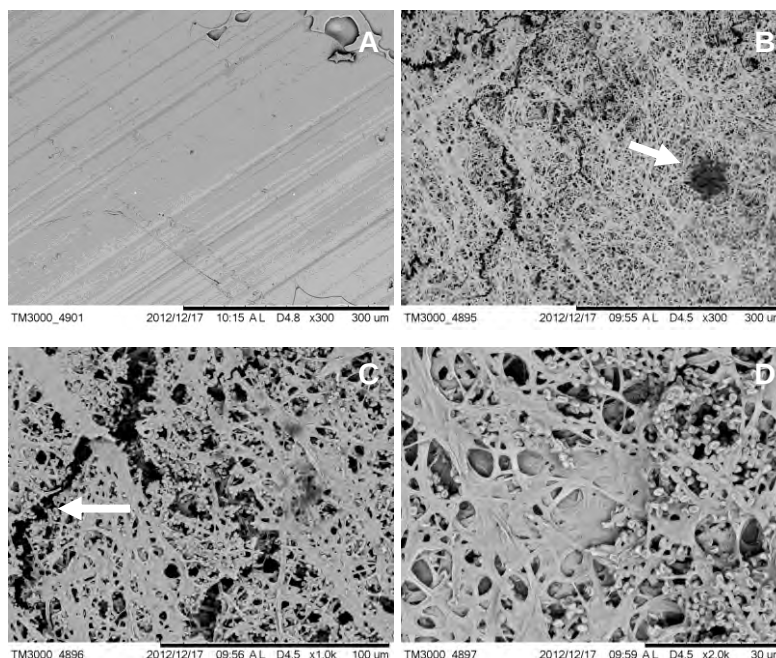
Figura 27 – Micrografias de MEV dos filmes da blenda. A: filme original, sem biotratamento; B, C e D: filmes biotratados durante 6 meses, a 28⁰C, em M.M.C.



Fonte: Elaborada pelo autor.

A figura 28-A, referente à micrografia de MEV do filme original de PHBV, mostra uma superfície com marcas da prensa e do papel alumínio, nos quais o filme foi produzido. Após o biotratamento do filme de PHBV em meio mineral incompleto, observa-se uma estrutura com grande adesão de micro-organismos, evidenciada pelo aparecimento de hifas (Fig. 28- B, C e D) e esporos (Fig. 28- D). Além disso, podem ser observados buracos e rachaduras na superfície do filme (indicadas pelas setas nas fig. 28 B e C), causados pelo processo de degradação ocasionado pelo fungo *P. funiculosum*.

Figura 28 – Micrografias de MEV dos filmes de PHBV. A: Filme original, sem biotratamento; B, C e D: filmes biotratados durante 15 dias, a 28⁰C, em M.M.I (Obs: as setas indicam o aparecimento de furos e rachaduras).



Fonte: Elaborada pelo autor.

5.5. Medidas de massa

Este é o método mais comumente aplicado e que tem relativa sensibilidade na determinação de mudanças de massa causadas pelo ataque de micro-organismos ao polímero (FLEMMING, 1998). Comparando-se as variações de massa que ocorreram nos biotratamentos, tanto a blenda como o PHBV sofreram a maior perda de massa, tanto no período de 6 meses como no de 15 dias, respectivamente. Os filmes de PHBV biotratados por 6 meses foram totalmente biodegradados, diferentemente dos tratados por apenas 15 dias, mostrando a relação entre o tempo de exposição ao micro-organismo e a taxa de biodegradação (Tabelas 1 e 2).

Tabela 1 – Porcentagem de perda de massa dos filmes de PHBV, de PE e da Blenda submetidos aos biotratamentos durante 6 meses, a 28⁰C.

Polímero	Meio Completo	Meio Incompleto
PHBV	100	100
PE	- 0,5	- 0,3
Blenda	14	14

Obs: a) PE sofreu aumento de massa (valores negativos). Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 2 – Porcentagem de perda de massa dos filmes de PHBV, de PE e da Blenda submetidos aos biotratamentos durante 15 dias, a 28⁰C.

Polímero	Meio Completo	Meio Incompleto
PHBV	96	54
PE	0	- 0,3
Blenda	12	14

Fonte: Elaborada pelo autor.

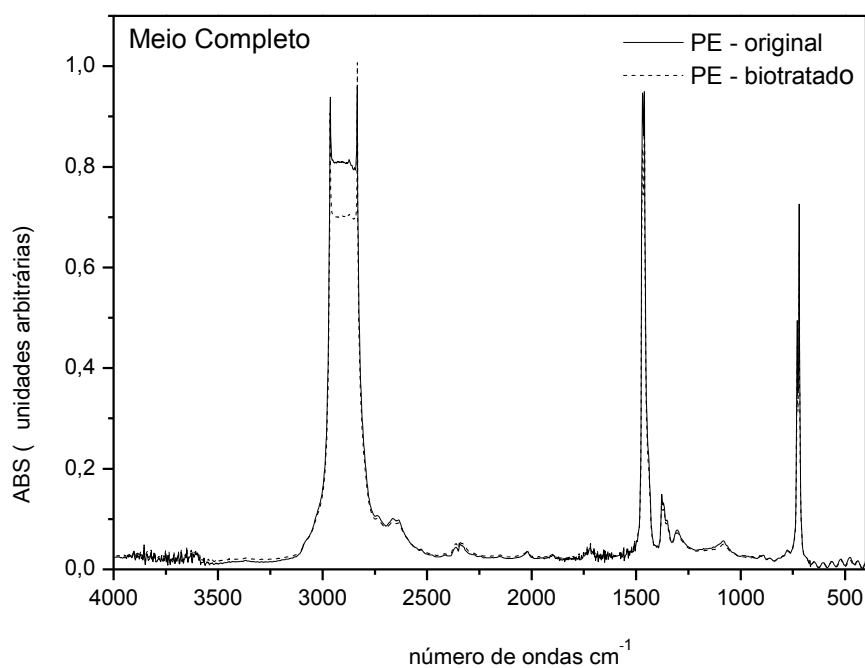
O PHBV sofreu a maior perda de massa, seguido da blenda. O PE não sofreu perda significativa, mostrando inclusive um pequeno aumento da massa, causado provavelmente pela adesão microbiana à sua superfície.

5.6. FTIR

Os espectros dos filmes originais e biotratados em meio de cultura líquido estão apresentados nas figuras 29 a 33. Os espectros de PE e da Blenda foram normalizados pela intensidade da absorbância da banda considerada como padrão interno em 1465 cm⁻¹ (deformação simétrica de CH₃ do PE) (ALBERTSSON et al., 1987). Para o PHBV, o padrão utilizado foi a banda a 1463 cm⁻¹ (deformação simétrica de CH₂) (BLOEMBERGEN, 1986).

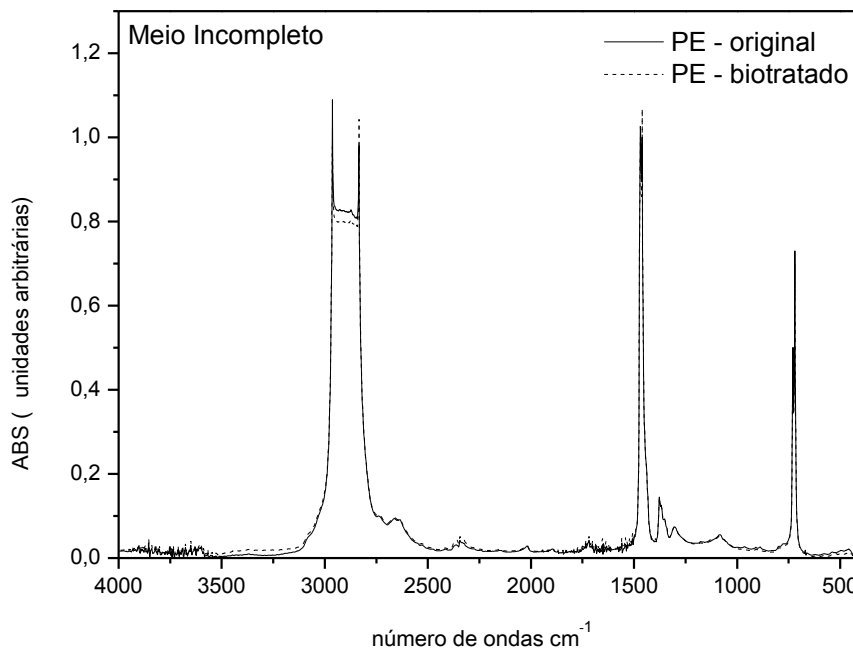
Através da análise espectral, verificou-se que o PE não sofreu mudanças a nível de estrutura molecular, nos dois meios, apesar da adesão do fungo sobre o polímero com consequente mudança na sua morfologia (vista por microscopia).

Figura 29 – FTIR do PE original e o biotratado com *P. funiculosus* (ATCC 11797), durante 6 meses, a 28⁰C, em meio mineral completo.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 30 - FTIR do PE original e o biotratado com *P. funiculosum* (ATCC 11797), durante 6 meses, a 28⁰C, em meio mineral incompleto.

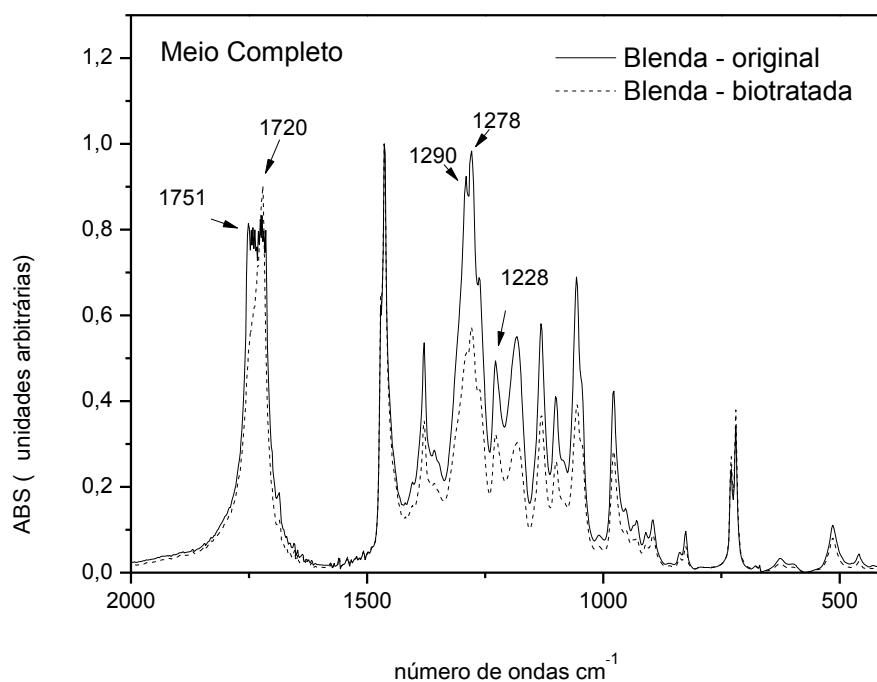


Fonte: Elaborada pelo autor.

As blendas, nos dois meios, mostraram mudanças evidentes: houve diminuição na intensidade da banda a 1751 cm⁻¹, atribuída ao estiramento de C=O de fase amorfa e pequeno aumento na banda a 1720, referente à fase cristalina (Fig. 31), bem como diminuição na intensidade e deslocamento das mesmas bandas tratadas no meio de cultivo incompleto (Fig. 32).

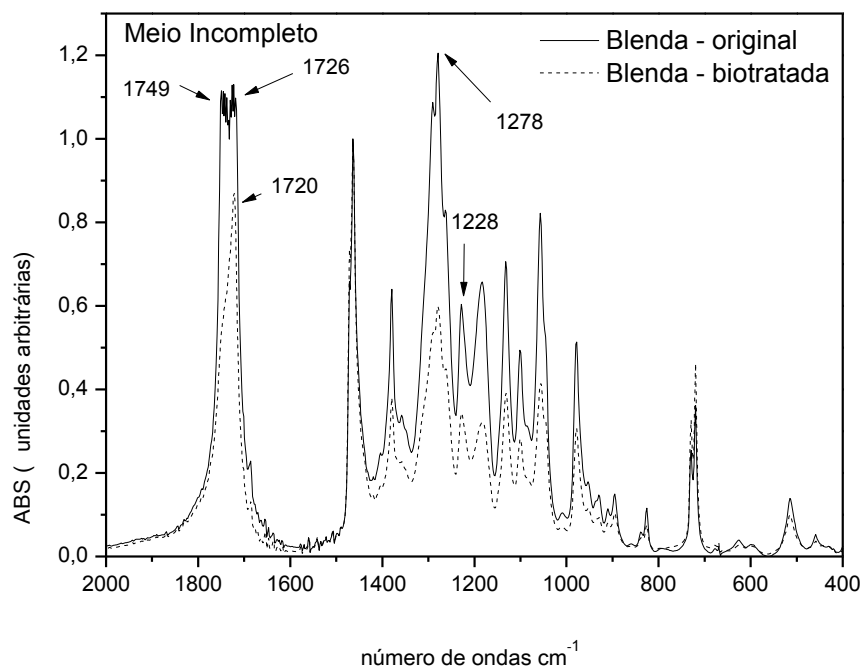
As bandas relativas ao PHBV, sensíveis a cristalização, 1278 e 1228 cm⁻¹ (BLOEMBERGEN, 1986) sofreram diminuição, indicando, assim, queda na cristalinidade da blenda.

Figura 31 – FTIR das blendas original e biotratada com *P. funiculosum* (ATCC 11797), durante 6 meses, a 28⁰C, em meio mineral completo.



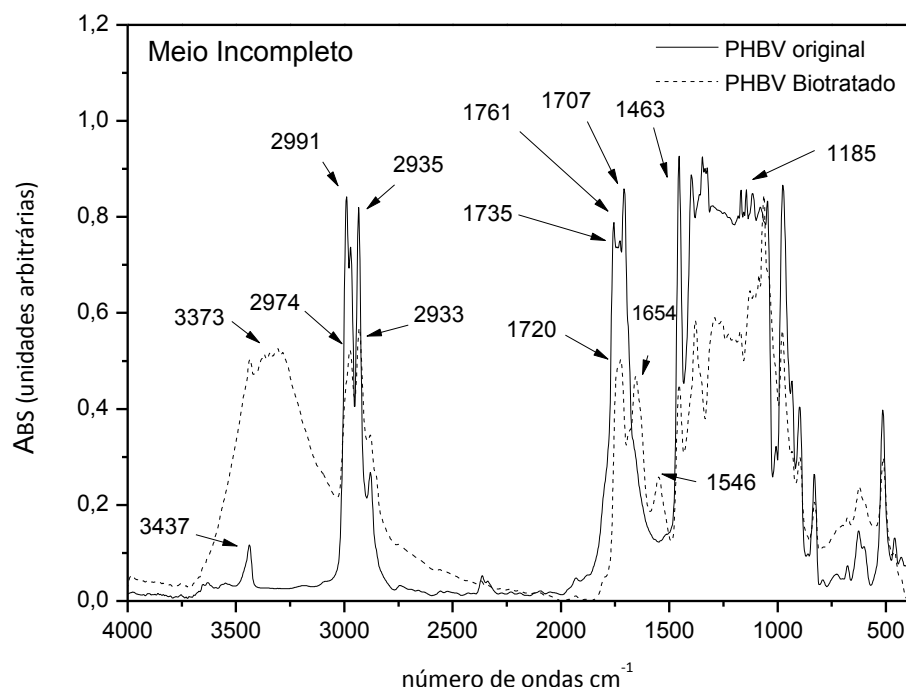
Obs: flechas indicativas da ocorrência das mudanças mais evidentes. Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 32 – FTIR das blendas original e biotratada com *P. funiculosum* (ATCC 11797), durante 6 meses, a 28⁰C , em meio mineral incompleto.



Obs: flechas indicativas da ocorrência das mudanças mais evidentes. Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 33 – FTIR de PHBV original e biotratado com *P. funiculosum* (ATCC 11797), durante 15 dias, a 28⁰C, em meio mineral incompleto.



Fonte: Elaborada pelo autor.

No espectro do PHBV original (Fig. 33), foram observadas as bandas 1761 cm⁻¹, 1735 cm⁻¹ e 1707 cm⁻¹ que correspondem ao estiramento de grupos C=O da fase amorfa, fase cristalina menos ordenada (PADERMSHOKE et al., 2004) e fase cristalina propriamente dita, respectivamente; que no PHBV biotratado estão diminuídas e mais alargadas, juntamente com a cristalina a 1720 cm⁻¹, indicando a degradação das diferentes fases do PHBV. Além disso, a presença de uma nova banda a 1546 cm⁻¹, relativa ao aparecimento de grupos C=C na cadeia, aliada à presença da banda a 3373 cm⁻¹, alargada, que corresponde ao estiramento O-H, são fortes evidências da formação de ácido insaturado (2-butenóico), após a biodegradação do PHBV (JENKINS et al., 2007).

5.6.1. Índices de carbonila

A partir dos espectros obtidos dos filmes antes e após o biotratamento, foram calculados os índices de carbonila dos polímeros estudados, a fim de se entender melhor quais as mudanças morfológicas e estruturais ocorridas nos filmes.

Como pode ser observado na Tabela 3, há um consumo da carbonila (C=O) do PHBV, tanto da fase amorfa como da cristalina, após o biotratamento em meio mineral incompleto (27 e 56% de diminuição, respectivamente).

Tabela 3 - Índices de Carbonila de fase amorfa e cristalina, calculados para os filmes de PHBV original e biotratado, por 15 dias, a 28^oC, em Meio Mineral Incompleto.

PHBV	Original	Biotratado
Fase amorfa (ABS _{1751/1463})	0,37	0,27
Fase cristalina (ABS _{1720/1463})	0,50	0,22

Fonte: Elaborada pelo autor.

Para as blendas biotratadas em meio completo (Tab.4), observou-se uma diminuição no índice de carbonila de fase amorfa (30%), com um consequente aumento do índice de carbonila da fase cristalina (9%), o que pode indicar um aumento da cristalinidade do material como um todo. O consumo de fase amorfa induz a uma reorganização das cadeias remanescentes e consequente aumento de cristalinidade. Neste meio, mais rico em nutrientes e portanto, com grande quantidade de enzimas e biofilme, as fases amorfa e interfase dos dois diferentes polímeros (mais desorganizadas, são as mais acessíveis às várias e diferentes enzimas presentes.

Tabela 4 - Índices de Carbonila de fase amorfa e cristalina, calculados para os filmes das blendas original e biotratado, por 6 meses, a 28^oC, em Meio Mineral Completo.

Blenda	Original	Biotratado
Fase amorfa (ABS _{1751/1463})	0,64	0,45
Fase cristalina (ABS _{1720/1463})	0,65	0,71

Fonte: Elaborada pelo autor.

Entretanto para as blendas biotratadas em meio mineral incompleto (Tabela 5), houve uma diminuição do índice de carbonila das fases amorfa e cristalina, sendo a da fase amorfa mais

significativa. Neste meio, contendo uma fonte de carbono apenas, as enzimas provavelmente são mais específicas e estão em menor quantidade, sendo mais fácil seu acesso à fase amorfa, mais desorganizada.

Tabela 5 - Índices de Carbonila de fase amorfa e cristalina, calculados para os filmes das blendas, original e biotratado, por 6 meses, a 28⁰C, em Meio Mineral Incompleto.

Blenda	Original	Biotratado
Fase amorfa (ABS _{1751/1463})	0,90	0,44
Fase cristalina (ABS _{1720/1463})	0,91	0,70

Fonte: Elaborada pelo autor.

No PHBV ocorre a biodegradação através do ataque hidrolítico à carbonila do grupo éster, tanto na fase amorfa, quando na cristalina. Na blenda, o processo ocorre por consumo da carbonila da fase amorfa (hidrólise do PHBV, também) e o aumento da mesma na fase cristalina, no meio mais rico em nutrientes. No meio pobre em nutrientes, ocorre o consumo das duas fases: amorfa e cristalina, sendo a amorfa, a mais consumida.

6 CONCLUSÕES

- Os fungos *Penicillium funiculosum* e *Paecilomyces variotii* mostraram-se eficientes em degradar a blenda constituída de um polímero sintético e um biodegradável.

- O meio de cultura e tempo de incubação são fatores importantes na taxa de biodegradação dos polímeros envolvidos neste estudo. O meio rico em nutrientes com fonte de carbono e nitrogênio, provavelmente, possibilitou que o fungo produzisse uma variedade maior de enzimas, aumentando a eficácia para a degradação total do PHBV neste meio (15 dias e 6 meses), como também permitindo que houvesse um consumo da fase amorfa da carbonila da blenda, seguida de sua reorganização e aumento da fase cristalina.

- No meio pobre em nutrientes, tendo o polímero como única fonte de carbono, o *P. funiculosum*, deve ter produzido enzimas mais específicas para degradar o polímero, por isso, tanto para o PHBV quanto para a blenda, foi observado um consumo da carbonila das fases amorfa e cristalina do polímero.

- O PE não sofreu biodegradação no período estudado, mas sofreu alterações morfológicas, devido à adesão do fungo.

- Na blenda, o PE influenciou a biodegradação (durabilidade) da mesma, protegendo a fração de polímero biodegradável contra o ataque fúngico.

- As metodologias utilizadas para avaliação da biodegradação, foram eficientes e complementares, pois a microscopia óptica permitiu a visualização da adesão fúngica, bem como das mudanças de cor do filme, após o biotratamento. Através do MEV, notou-se não só a adesão de esporos e hifas, como também o aparecimento de furos, rachaduras e descamações. O FTIR permitiu identificar mudanças estruturais nas cadeias poliméricas e o mecanismo de ação dos fungos no processo de biodegradação.

- A blenda de PE/PHBV (70/30) é um material promissor em aplicações na área de embalagens, devido a sua biodegradação na presença de um fungo comumente encontrado no meio ambiente.

REFERÊNCIAS

- ABD-AZIZ, S.; SIN, T.L.; ALITHEEN, N.; SHAHAB, N.; KAMARUDDIN, K. Microbial degradation of chitin materials by *Trichoderma virens* UKM1. Journal of Biological Sciences, v. 8, n. 1, p. 52-59, 2008.
- ALBERTSSON, A. C.; ANDERSSON, S. O.; KARLSSON S. The mechanism of biodegradation of polyethylene. Polymer Degradation and Stability, Londres, v. 18, p. 73-87, 1987.
- ALHAMDAN, A. M.; AL-HELAL M. I. Mechanical deterioration of polyethylene greenhouses covering under arid conditions. Journal of Materials Processing Technology, Lausanne, v. 209, p. 63 – 69, 2008.
- AMMALA, A.; BATEMAN, S.; DEAN, K.; PETINAKIS, E.; SANGWAN, P.; WONG, S.; YUAN, Q.; YU, L.; PATRICK, C.; LEONG, K.H. An overview of degradable and biodegradable polyolefins. Progress in Polymer Science, Londres, v. 36, p.1015–1049, 2011.
- ARKATKAR, A.; ARUTCHELVI, J.; SUDHAKAR, M.; BHADURI, S.; UPPARA, P.V.; DOBLE, M. Approaches to enhance the biodegradation of polyolefins. The Open Environmental Engineering Journal, Bussum, v. 2, p. 68-80, 2009a.
- ARKATKAR, A.; ARUTCHELVI, J.; BHADURI, S.; UPPARA, P.V.; DOBLE, M. Degradation of unpretreated and thermally pretreated polypropylene by soil consortia. International Biodeterioration and Biodegradation, Londres, v. 63, p. 106–111, 2009b.
- ARUTCHELVI, J.; SUDHAKAR, M.; DOBLE, M.; BHADURI, S.; UPPARA, P. V. Biodegradation of polyethylene and polypropylene. Indian Journal of Biotechnology, Nova Delhi, v.7, p. 9-22, 2008.
- ASTM - ISO 846:1997. Plastics: Determination of behaviour under the action of fungi and bacteria evaluation by visual examination or measurement of change in mass or physical properties.
- AVELLA, M.; LA ROTA, G.; MARTUSCELLI, E.; RAIMO, M.; SADOCCO, P.; ELEGIR, G.; RIVA, R. Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and wheat straw fibre composites: thermal, mechanical properties and biodegradation behaviour. Journal of Materials Science, Nova Iorque, v. 35, p. 829-836, 2000.
- BARR, D. P.; AUST, S. D. Mechanisms white rot fungi use to degrade pollutants. Environmental Science and Technology, Dordrecht, v. 28, n. 2, p. 78-87, 1994.
- BELTRÁN, M.; GARCIA, J. C.; MARCILLA, A. Infrared spectral changes in PVC and plasticized PVC during gelation and fusion. European Polymer Journal, Oxford, v. 33, p. 453-462, 1997.

- BLOEMBERGEN, S.; HOLDEN, D. A.; HAMER, G. K.; BLUHM, T. L.; MARCHESSAULT, R. H. Studies of composition and crystallinity of bacterial poly (B-hydroxybutyrate-co-Bhydroxyvalerate). *Macromolecules*, Washington, v.19, p. 2865 - 2871, 1986.
- BORGHEI, M.; KARBASSI, A.; KHORAMNEJADIAN, S.; OROMIEHIE, A.; JAVID, A. H. Microbial biodegradable potato starch based low density polyethylene. *African Journal of Biotechnology*, Lagos, v. 9, n. 26, p. 4075-4080, 2010.
- CHANDRA, R.; RUSTGI, R. Biodegradable Polymers. *Progress in Polymer Science*, Londres, v. 23, p.1273-1335, 1998.
- COELHO, G. D. Purificação parcial do sistema enzimático produzido por *Psilocybe castanella* CCB444 durante crescimento em solo. 2007. 101 f. Tese (Doutorado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente) – Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, 2007.
- CORRÊA, M. C. S.; REZENDE, M. L.; ROSA, D. S.; AGNELLI, J. A. M.; NASCENTE, P. A. P. Surface composition and morphology of poly(3-hydroxybutyrate) exposed to biodegradation. *Polymer Testing*, Londres, v. 27, p. 447-452, 2008.
- COUTINHO, F. M. B.; MELLO, I. L.; MARIA, L. C. S. Polietileno: principais tipos, propriedades e aplicações. *Polímeros: Ciência e tecnologia*, São Carlos, v.13, n. 1, p. 1-13, 2003.
- FABRO, A. T.; LINDEMANN, C.; VIEIRA, S. C. Utilização de sacolas plásticas em supermercados. *Revista Ciências do Ambiente*, Campinas, v. 3, n. 1, 2007.
- FLEMMING, H. C. Relevance of biofilms for the biodeterioration of surfaces of polymeric materials. *Polymer Degradation Stability*, Essex, v.59, p. 309-15, 1998.
- FORMOLO M. C.; DUART, M. A. T.; SCHNEIDER, A. L.; FURLAN, S. A.; PEZZIN, A. P. T. Poli-hidroxialcanoatos: biopoliésteres produzidos a partir de fontes renováveis. *Revista Saúde e Ambiente*, Joinville, v. 4, n. 2, p. 14-21, 2003.
- GABOARDI, F. Avaliação das propriedades mecânicas, térmicas e de biodegradação de blendas de PHB e PEBD com e sem aditivos pro-oxidantes. 2007. 117 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência dos Materiais). Universidade São Francisco. Itatiba. 2007.
- GOLDSTEIN, J.; NEWBURY, D.; JOY, D.; LYMAN, C.; ECHLIN, P.; LIFSHIN, E.; SOWYER, L.; MICHAEL, J. Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis. In: GOLDSTEIN, J., NEWBURY, D. (Ed.), Third Edition, Chapter 12, Specimen Preparation of Polymer Materials. Nova Iorque: Springer Science, p. 565-589, 2003.
- GONÇALVES, S. P. C.; MARTINS-FRANCHETTI, S. M. Action of soil microorganisms on PCL and PHBV blend films. *Journal of Polymers and the Environment*, Nova Iorque, p. 714-719, 2010.
- GU, J. D. Microbiological deterioration and degradation of synthetic polymeric materials: recent research advances. *International Biodeterioration and Biodegradation*, Londres, v.52, p.69-91, 2003.

- HARMAN, G. E.; HOWELL, C. R.; VITERBO, A. CHET, I.; LORITO, M. Trichoderma species: opportunistic, avirulent plant symbionts. *Natura Reviews – Microbiology*, v. 2, p. 43-56, 2004.
- HOUBRAKEN, J.; VARGA, J.; RICO-MUNOZ, E.; JOHNSON, S.; SAMSON, R. A. Sexual reproduction as the cause of heat resistance in the food spoilage fungus *Byssoschlamys spectabilis* (Anamorph *Paecilomyces variotii*). *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v.74, p.1613-1619, 2008.
- JENKINS, M. J.; CAO, Y.; HOWELL, L.; LEEKE, G. A. Miscibility in blends of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and poly(3-caprolactone) induced by melt blending in the presence of supercritical CO₂. *Polymer*, Londres, v. 48, p. 6304 – 6310, 2007.
- KAALI, P.; MOMCILOVIC, D.; MARKSTRÖM, A. AUNE.; R. CZEL, G.; KARLSSON, S. Degradation of biomedical polydimethylsiloxanes during exposure to in vivo biofilm environment monitored by FE-SEM, ATR-FTIR, and MALDI-TOF. *Journal of Applied Polymer Science*, Hoboken, v. 115, p. 802-810, 2010.
- KACZMAREK, H. Changes of polymer morphology caused by U.V. irradiation: Surface damage polymer. *Polymer Degradation Stability*, Londres, v. 37, p. 189-194, 1996.
- KANSIZ, M.; DOMÍNGUEZ-VIDAL, A.; MCNAUGHTON, D. LENDL, B. Fourier-transform infrared (FTIR) spectroscopy for monitoring and determining the degree of crystallization of polyhydroxyalkanoates (PHAs). *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, Heidelberg, v. 388, n. 5-6, p. 1207-1213, 2007.
- KIM, M. N.; LEE, A. R.; YOON, J. S.; CHIN, IN. J. Biodegradation of poly(3-hydroxybutyrate), Sky-Green® and Mater-Bi® by fungi isolated from soils. *European Polymer Journal*, Oxford, v.36, p. 1677-1685, 2000.
- KONDURI, M.K.R.; KOTESWARAREDDY, G.; ROHINI-KUMAR, D.B.; VENKATA-REDDY, B.; LAKSHMI NARASU, M. Effect of Pro-Oxidants on Biodegradation of Polyethylene (LDPE) by Indigenous Fungal Isolate, *Aspergillus oryzae*. *Journal of Applied Polymer Science*, Hoboken, v. 120, p. 3536–3545, 2011.
- KRZAN, A.; HEMJINDA, S.; MIERTUS, S.; CORTI, A.; CHIELLINI, E. Standardization and certification in the area of environmentally degradable plastics. *Polymer Degradation and Stability*, Londres, v.91, p. 2819-2833, 2006.
- KUNASUNDARI, B.; SUDESH, K. Isolation and recovery of microbial polyhydroxyalkanoates. *Express polymer letters*, Budapeste, v. 5, p. 620-634, 2011.
- LAMBEEK, G.; VORENKAMP, E. J.; SCHOUTEN, A. J. Structural Study of Langmuir-Blodgett Mono- and Multilayers of Poly (β-hydroxybutyrate). *Macromolecules*, Washington, v. 28, p. 2023-2032, 1995.

- LOMAS-ESTEBAN, M. C. El envase y el embalaje alimentario ante la directiva medioambienta Alimentacion, Equipos y Tecnologia, Logronho, v.15(1), p.39-43, 1996.
- LUCAS, N.; BIENAIME, C.; BELLOY, C.; QUENEUDEC, M.; SILVESTRE, F.; NAVASAUCEDO, J. E. Polymer biodegradation: mechanisms and estimation techniques, Chemosphere, Oxford, v. 73, p. 429-442, 2008.
- MADDEVER, W. J.; CHAPMAN, G.M. Making plastics biodegradable using modified starch additions, Proceedings of Symposium on Degradable Plastics. The Society of the plastics Industry Inc., Washington, p. 41-44, 1987.
- MANZUR, A.; LIMÓN-GONZÁLES, M.; FAVELA-TORRES, E. Biodegradation of Physicochemically Treated LDPE by a Consortium of Filamentous Fungi. Journal of Applied Polymer Science, Hoboken, v. 92, p. 265–271, 2004.
- MARCONCINI, J. M.; RUVOLO F. A. Blendas de poli(tereftalato de etileno) reciclado e poliolefinas recicladas. Polímeros: Ciência e Tecnologia, São Carlos, v. 16, n. 4, p. 323-331, 2006.
- MARTINS - FRANCHETTI, S. M. M.; MARCONATO, J. C. Polímeros biodegradáveis – uma solução parcial para diminuir a quantidade dos resíduos plásticos. Química Nova, São Paulo, v. 29, n. 4, p. 811-816, 2006.
- MARTINS - FRANCHETTI, S. M. M.; MARCONATO, J. C., CAMPOS, A. Biodegradação de Polímeros sintéticos. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. Microbiologia Ambiental, cap. 16, Segunda edição, Jaguariúna, EMBRAPA, p.351 – 375, 2008a.
- MARTINS-FRANCHETTI, S. M; CAMPOS, A.; EGERTON T.; WHITE J. R. Structural and morphological changes in Poly(caprolactone)/poly(vinyl chloride) blends caused by UV irradiation. Journal of Materials Science, Nova Iorque, v. 43, p. 1063–1069, 2008b.
- MCCARTHY, S. P.; DAVE, P.; JAHEDI, T.; EBERIEL, D.; GROSS, R. Enzymatic degradation of blends containing poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate). Polymer Degradation and Stability, London, v. 45, p. 197-203, 1994.
- NOWAK, B.; PAJAK, J.; LABUZEK, S.; RYMARZ, G.; TALIK, E. Biodegradation of poly(ethylene terephthalate) modified with polyester “Bionolle®” by *Penicillium funiculosum*. Polimery, Warsaw, v. 56, n. 1, p. 35-44, 2011.
- NOWAK, B. PAJAK, J. KARCZ, J. Biodegradation of Pre-Aged Modified Polyethylene Films. In: Dr. Viacheslav Kazmiruk, Scanning Electron Microscopy, Rijeka, Intech, 2012, p. 643-670. Disponível em: < <http://www.intechopen.com/books/scanning-electron-microscopy/biodegradation-of-pre-aged-modified-polyethylene-films>>. Acesso em: 5 jan 2013.
- OPREA, S.; DOROFTEI, F. Biodegradation of polyurethane acrylate with acrylated epoxidized soybean oil blend elastomers by *Chaetomium globosum*. International Biodeterioration & Biodegradation, Londres, v. 65, p. 533-538, 2011.

- PADERMSHOKE, A.; KATSUMOTO, Y.; SATO, H.; EKGASIT, S.; NODA, I.; OZAKI, Y. Surface melting and crystallization behavior of polyhydroxyalkanoates studied by attenuated total reflection infrared spectroscopy. *Polymer*, Londres, v.45, p. 6547–6554, 2004.
- PITT, J. I.; SPOTTS, R. A.; HOLMES, R. J.; CRUICSHANK, R.H. *Penicillium solitum* Revived, and its role as a pathogen of Pomaceous fruit. *Phytopathology*, St. Paul, v. 81, p. 1108-1112, 1991.
- REDDY, C. S. K.; GHAI, G.; KALIA, V.C. Polyhydroxyalkanoates: an overview. *Bioresource Technology*, Inglaterra, v. 87, p. 137-146, 2003.
- ROSA, D. S.; ANGELINI, J. M. G.; AGNELLI, J. A. M.; MEI, L. H. I. The use of microscopy to follow the degradation of isotactic polypropylene (iPP) subjected to natural and accelerated ageing. *Polymer Testing*, Londres, v. 24, p. 1022-1026, 2005.
- SANGALE, K. M.; SHAHNAWAZ, M.; ADE, A. B. A review on biodegradation of polythene: the microbial approach. *Journal of Bioremediation & Biodegradation*, Los Angeles, p. 3-10, 2012.
- SANYAL, P.; SAMADDAR, P.; PAUL, A. K. Degradation of Poly(3-hydroxybutyrate) and Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by Some Soil *Aspergillus spp.* *Journal of Polymers and the Environment*, Nova Iorque, v.14, p. 257 – 263, 2006.
- SAMSON, R. A.; HOEKSTRA, E. S.; FRISVAD, J. C. In: SANSOM, R. A.; *Introduction to food and airborne fungi*, 7th ed. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, 2004.
- SCHUSTER, E.; DUNN-COLEMAN, N.; FRISVAD, J. C. On the safety of *Aspergillus niger* – a review. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Heidelberg, v.59, p. 426-435, 2002.
- SCOTT, G. “Green” polymers. *Polymer Degradation and Stability*, Londres, v. 68, p. 1-7, 2000.
- SHAH, A.; HASAN, F.; HAMEED, A.; AHMED, S. Biological degradation of plastics: A comprehensive review. *Biotechnology Advances*, Nova Iorque, v. 26, p. 246-265, 2008.
- SHANG, X. Y.; FU, X.; CHEN, X. D.; YANG, L. S. Biodegradation of Blends of Polyethylene-Octene Elastomer with Starches by Fungi. *Journal of Applied Polymer Science*, Hoboken, v. 114, p. 3574–3584, 2009.
- SPINACÉ, M. A. S.; PAOLI, M. A., A tecnologia da reciclagem de polímeros, *Química Nova*, São Paulo, v. 28, n. 1, p. 65-72, 2005.
- SRIDEWI, N.; BHUBALAN, K.; SUDESH, K. Degradation of commercially important polyhydroxyalkanoates in tropical mangrove ecosystem. *Polymer Degradation and Stability*, Londres, v.91, p. 2931 - 2940, 2006.
- STROMBERG, E.; KARLSSON, S. The Design of a Test Protocol to Model the Degradation of Polyolefins During Recycling and Service Life. *Journal of Applied Polymer Science*, Hoboken, v. 112, p. 1835-1844, 2009.

- SUDHAKAR, M.; TRISHUL, A.; DOBLE, M.; KUMAR, K. S.; JAHAN, S. S.; INBAKANDAN, D.; VIDUTHALAI, R. R.; UMADEVI, V. R.; MURTHY, P. S.; VENKATESAN, R. Biofouling and biodegradation of polyolefins in ocean waters. *Polymer Degradation and Stability*, Londres, v.92, p.1743-1752, 2007.
- TILSTRA, L.; JOHNSONBAUGH, D. A Test Method to Determine Rapidly If Polymers are Biodegradable. *Journal of Environmental Polymer Degradation*, Nova Iorque, v. 1, n. 4, 1993.
- UEMURA, A. F.; MARTINS-FRANCHETTI, S. M. Biodegradação de filmes de polipropileno (PP), Poli (3-hidroxibutirato) (PHB) e blenda de PP/PHB por microrganismos das águas do Rio Atibaia. *Polímeros*, São Carlos, vol. 20, n. 2, p. 141-147, 2010.
- VERGARA-PORRAS, B.; GRACIDA-RODRÍGUEZ, J. N. Morphology of *Penicillium funiculosum* During Biodegradation of Poly (b-hydroxybutyrate-co-b-hydroxyvalerate) [PHBV] with Poly (ε-Caprolactone) [PCL] Blends. *Journal of Polymers and the Environment*, Nova Iorque, v. 19, p. 834-840, 2011.
- VOLKE-SEPÚLVEDA, T.; SAUCEDO-CASTAÑEDA, G.; GUITIERREZ-ROJAS, M.; MANZUR, A.; FAVELA-TORRES, E. Thermally treated low density polyethylene biodegradation by *Penicillium pinophilum* and *Aspergillus niger*. *Journal of Applied Polymer Science*, Hoboken, v. 83, p. 305-314, 2002.
- XAVIER, L. H.; CARDOSO, R.; MATOS, R. M.; ADISSI, P. J. Legislação ambiental sobre destinação de resíduos sólidos: o caso das embalagens plásticas pós-consumo. In: Simpósio de Engenharia de Produção, n.13, Bauru- SP. Anais, 2006, p. 1-11. Disponível em: http://www.simpep.feb.unesp.br/anais/anais_13/artigos/689.pdf. Acesso em: 12 mar 2012.
- XU, X.; GUO, S. A study on morphological struture of low molecular weight PVC prepared by vibromilling degradation. *Polymer*, Londres, v. 4, n. 34, p.621-632, 1995.
- XU, J.; GUO, B. H.; YANG, R.; WU, Q.; CHEN, G. Q.; ZHANG, Z. M. In situ FTIR study on melting and crystallization of polyhydroxyalkanoates. *Polymer*, Londres, v. 43, p. 6893-6899, 2002.
- WEILAND, M.; DARO, A.; DAVID, C. Biodegradation of thermally oxidized polyethylene, *Polymer Degradation and Stability*, Londres, v.48, p. 275-289, 1995.
- WANG, Y. W.; MO, W.; YAO, H.; WU, Q.; CHEN, J.; CHEN, G. Q. Biodegradation studies of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate). *Polymer Degradation and Stability*, Londres, v. 85, p. 815-821, 2004.
- WENG, Y. X.; WANG, X. L.; WANG, Y. Z. Biodegradation behavior of PHAs with different chemical structures under controlled composting conditions. *Polymer Testing*, Londres, v. 30, p. 372-380, 2011.
- WILHITE, S. E.; LUMSDEN, R. D.; STRANEY, D. C. Peptide Synthetase Gene in *Trichoderma virens*. *Applied And Environmental Microbiology*, v. 67, n. 11, p. 5055-5062, 2001.