



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA APLICADA

BIODEGRADAÇÃO DE FILMES DE PVC E PCL POR FUNGOS FILAMENTOSOS

VIVIANE KAROLINA VIVI

Rio Claro

2011

BIODEGRADAÇÃO DE FILMES DE PVC E PCL POR FUNGOS FILAMENTOSOS

VIVIANE KAROLINA VIVI

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

Orientadora: Profa. Dra. Derlene Attili-Angelis

Co-orientadora: Profa. Dra. Sandra Mara Martins-Franchetti

Rio Claro

2011

589.2 Vivi, Viviane Karolina
V858b Biodegradação de filmes de PVC e PCL por fungos
 filamentosos / Viviane Karolina Vivi. - Rio Claro : [s.n.],
 2011
 103 f. : il., figs., gráfs., tabs., fots.

 Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
 Instituto de Biociências de Rio Claro
 Orientador: Derlene Attili-Angelis
 Co-Orientador: Sandra Mara Martins-Franchetti

 1. Fungos. 2. Chaetomium globosum. 3. ISO 846-1978. I.
 Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

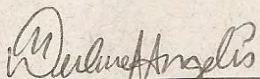
TÍTULO: Biodegradação de filmes de PVC e PCL por fungos filamentosos

AUTORA: VIVIANE KAROLINA VIVI

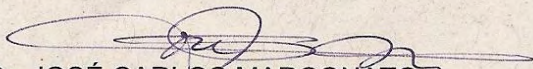
ORIENTADORA: Profa. Dra. DERLENE ATTILI DE ANGELIS

CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. SANDRA MARA MARTINS FRANCHETTI

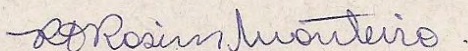
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM CIENCIAS BIOLÓGICAS (MICROBIOLOGIA APLICADA) , pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. DERLENE ATTILI DE ANGELIS
CEIS / Instituto de Biociências de Rio Claro



Prof. Dr. JOSÉ CARLOS MARCONATO
Departamento de Bioquímica e Microbiologia / Instituto de Biociências de Rio Claro



Profa. Dra. REGINA TERESA ROSIM MONTEIRO
Centro de Energia Nuclear Na Agricultura / Universidade de Sao Paulo

Data da realização: 08 de abril de 2011.

Dedico esta dissertação aos meus pais e meu irmão,
pelo apoio que sempre me foi dado ao longo de toda
minha vida acadêmica, e ao meu querido por seu
companheirismo e suporte nos últimos anos.

Foram dois anos de experiências inovadoras. Nesse tempo poli minha estupidez, aprendi novos truques, conheci pessoas novas, reencontrei com outras e estabeleci laços que ultrapassarão as barreiras do tempo cronológico. Errei e aprendi a pedir desculpas, mas também fiz as coisas piorarem e perdi amizades. Aprendi no convívio coletivo a esquecer a conjugação na primeira pessoa e professar mais a luta pelo coletivo. Chegou, então, o momento de agradecer a essas pessoas, que tiveram a paciência de conviver com minhas angústias, temores e decepções, mas também com a minha amizade, fornecendo condições de superar as dificuldades encontradas ao longo desse tempo.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Deus, quero agradecer-te por ser fonte inesgotável de luz que ilumina e guia todos os meus passos. Por me amparar quando meus pés já não conseguiam mais seguir, por manter-me forte antes mesmo que minhas lágrimas caíssem. Obrigada por ter sido sustentação nestes anos de estudo que direcionaram a obtenção deste título.

Um agradecimento especial aos meus pais, Domingos e Eliane, que sempre deram tudo de si para que tivesse o conhecimento e a educação melhores possíveis. Acreditaram em mim apoiando-me financeira e emocionalmente nos “tempos das vacas magras”, quando estive sem bolsa. Ao meu irmão, William, que durante os dois anos se tornou meu taxista oficial do aeroporto, sempre com um abraço tímido ao chegar ou partir.

A Profa. Dra. Derlene Attili-Angelis, conselheira, confidente, amiga, mãezona, companheira, motivadora e eterna mestra por tudo que me ensinou, apoiou e principalmente por sua humildade e afetuosidade. Sou imensamente grata por ter me adotado subitamente, depositando toda sua confiança e crença na possibilidade da realização deste trabalho. As suas críticas, em sua maioria, acompanhadas de um pão de queijo, as discussões e reflexões em almoços e cafés foram fundamentais ao longo de todo o percurso. Pela orientação, dedicação, paciência e principalmente pela amizade e presteza, empenho e dedicação, meu muitíssimo obrigada!

José Eduardo e família pelos maravilhosos momentos de risadas nos almoços ou jantares, que aconteciam horas antes de minha partida. À vocês que por muitas vezes estavam mais ansiosos pela minha chegada que minha própria mãe.

Minha avó Aparecida que encarou o início de tudo comigo em Rio Claro, montando e desmontando minha mudança, fazendo cachecóis para eu passar menos frio, sopas e comidas deliciosas quando eu chegava do laboratório, sem contar nos pães, geleias, condimentos, carne assada e tudo mais que eu trazia na mala a cada retorno que fazia de casa.

Meus tios Douglas e Flaviana que desde o começo me motivam a ir mais longe. Obrigada pelas viagens turísticas, pelas conversas intermináveis ao telefone e por estarem na arquibancada na torcida.

Meu tio Anselmo (*in memoriam*) que teve papel fundamental em meu crescimento e que de lá do céu sei que torce pelo meu sucesso.

Agradeço imensamente a todos os familiares e amigos próximos por me auxiliarem, ampararem, consolarem e estarem sempre do meu lado incansavelmente. Por terem sido compreensíveis com os longos períodos distância torcendo para que cada dia passasse logo e eu pudesse retornar o mais rápido possível.

Meu sincero agradecimento ao meu querido Thiago Luciano pelo amor, carinho, companheirismo, cumplicidade, compreensão e incentivo desde o instante em que decidi trilhar novos caminhos. Por ter sabedoria suficiente para lidar com as novas situações e novos sentimentos,

provando que um *sonho que se sonha só*, é só um *sonho que se sonha só*, mas sonho que se sonha junto é realidade. Tenha certeza que teu apoio incondicional nos momentos mais difíceis e a paciência ao longo desse período foram de grande valia. Por me ajudar a superar a distância de ti, dos amigos e familiares, obrigada! Aos teus pais, Francisco e Luciana, por aguardarem pacientemente meu retorno, sempre preocupados com meu bem estar longe de casa, torcendo pela minha vitória como verdadeiros pais.

AGRADECIMENTOS

A Profa Dra. Sandra Mara Martins-Franchetti, minha co-orientadora, pela oportunidade oferecida abrindo as portas de seu laboratório para a realização do estágio, dando todo o apoio necessário para prestar a prova e escrever o projeto inicial, sempre pronta a esclarecer toda e qualquer dúvida. Obrigada de coração pelo conhecimento repassado, confiança, pela força em todos os momentos e principalmente pela amizade!

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por fomentar esse trabalho por meio da bolsa de mestrado.

À Maria Luiza B. O. Rodrigues, por ser uma excelente técnica, sempre auxiliando nos experimentos, trocando conversas, receitas e por sua grande amizade, proporcionando bons momentos de trabalho. Ao Valdenilson José A. de Oliveira, o Zito, que me acompanhou desde o início deste trabalho dando “aquela forcinha” para carregar aquários para lá e para cá, monitorando os experimentos quando precisei, sempre com uma brincadeira ou piadinha para descontrair os momentos em que me desesperava com fatos inesperados. Aos demais técnicos que forneceram condições adequadas para o desenvolvimento do trabalho, obrigada.

Aos professores do Depto de Bioquímica, cada um à sua maneira transmitiu não só o conhecimento, mas também valores que jamais serão esquecidos

Prof. Dr. Jonas Contiero e a Profa. Dra Dejanira F. de Angelis pela infra-estrutura e disponibilidade de alguns equipamentos necessários para realização deste trabalho.

Aos colegas de Laboratório IV pela amizade e auxílio no desenvolvimento do trabalho.

À Viviane C. P. Lopes (Vivi Comparsa) fiel inseparável dos momentos mais felizes e tristes que vivemos literalmente juntas. Você esteve incansavelmente ao meu lado, forte como um carvalho.

A todos os colegas do Programa de Microbiologia Aplicada pela convivência e troca de conhecimentos, agradáveis momentos juntos em viagens, festas de aniversário no departamento e outros eventos.

A Angela B. Scatolin por ter sido prestativa e me orientado todas as vezes que precisei de serviços na secretaria do departamento.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para o meu crescimento e realização deste trabalho,

MUITO OBRIGADA!

*“Em ciência, o crédito vai para o homem que convence o mundo de uma idéia,
não para aquele que a teve primeiro.”*
William Osler

“A ciência nunca resolve um problema sem criar pelo menos outros dez”
George Bernard Shaw

*“A grande tragédia da ciência: o massacre de uma bela hipótese
por parte de um horrível fato.”*
Thomas Huxley

RESUMO

Os polímeros vêm substituindo materiais como madeira, vidro e metal em variadas aplicações. Nos dias atuais, seu uso tem sido extensivamente alto em todo o mundo, tornando o volume de material descartado um grande problema. Acredita-se, portanto, que investigações sobre a capacidade microbiológica em degradar resíduos gerados pela atividade humana sejam de extrema importância. Um dos polímeros avaliados nesse trabalho, o poli (cloreto de vinila) (PVC) é o segundo termoplástico mais consumido no mundo. A poli (caprolactona) (PCL) é um poliéster sintético facilmente degradado por enzimas como lipases, esterases e despolimerases extracelulares de bactérias e fungos. Neste contexto, o presente estudo avaliou a eficiência de degradação de filmes poliméricos de PVC e PCL utilizando a linhagem *Phanerochaete chrysosporium* CCB 478 e um consórcio padrão de espécies fúngicas recomendado pela metodologia ISO 846-1978 - *Testing of Plastics - Influence of fungi and bacteria*. Os filmes foram individualmente mergulhados em suspensões de esporos, incubados em placas de Petri contendo meio completo (suplementado com glicose) e meio incompleto (sem glicose). As placas foram acondicionadas em câmaras úmidas por trinta dias a 28°C. A biodegradação dos filmes foi avaliada mediante análises de perda de massa, coloração, microscopia óptica e microscopia eletrônica de varredura (MEV). Não foi observado o crescimento de *P. chrysosporium* nos filmes havendo, porém, a presença de estirpes contaminantes, que foram isoladas e caracterizadas. Em amostras de PVC biotratadas a perda de massa foi insignificante. A degradação dos filmes de PCL pelo consórcio foi mais eficiente do que pelos micro-organismos isolados, nos dois meios testados. Com relação a estes meios, também foram encontradas diferenças estatísticas para tratamentos com o PCL. Dentre os fungos do consórcio, o ascomiceto *Chaetomium globosum* foi o único capaz de colonizar a superfície de filmes de PVC e degradar expressivamente os filmes de PCL. As mudanças morfológicas resultantes da ação dos fungos nos filmes, também foram significativas.

Palavras-chave: biodegradação, PVC, PCL, *Chaetomium globosum*, ISO 846-1978.

ABSTRACT

Polymers have been replacing materials such as wood, glass and metal in different applications. Nowadays their use have extensively increased worldwide, making the volume of discharged material a great problem. Therefore, scientific investigations on the microbial ability to degrade plastic waste are considered extremely important. One of the recalcitrant polymers evaluated in this work, poly (vinyl chloride) (PVC) is considered the second most consumed thermoplastic in the world. Poly (caprolactone) (PCL), is a synthetic polyester easily degraded by enzymes such as lipases, esterases and extracellular depolymerases of bacteria and fungi. In this context, this study evaluated the capability of *Phanerochaete chrysosporium*, strain CCB 478, and a set of fungal species recommended by ISO 846-1978 (Testing of Plastics - Influence of fungi and bacteria), to degrade PVC and PCL films. The films were individually immersed in a spore suspension, and incubated in Petri dishes containing complete medium (supplemented with glucose) and incomplete medium (without glucose). The plates were kept in humidity chamber for thirty days at 28°C. The biodegradation of the films was investigated through the analyses of weight loss, color changes, optical microscopy and scanning electron microscopy (SEM). In our results, there was no growth of *P. chrysosporium* on the films, however interesting contaminants were isolated and characterized. Samples of the biotreated PVC presented no weight losses. The degradation of PCL films by the recommended fungal set was more efficient than the isolated microorganisms in both culture media. With respect to these media, statistical differences were also found for treatments with the PCL. Among all fungi tested, the ascomycete *Chaetomium globosum* was the only one able to colonize the surface of PVC films and degrade the PCL films significantly. Morphological changes resulting from the action of fungi on the PVC and PCL films were also important.

Keywords: biodegradation, PVC, PCL, *Chaetomium globosum*, ISO 846-1978.

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Parâmetros e fatores envolvidos no processo de degradação.	26
Tabela 2. Testes padrões internacionais para degradação de plásticos.	36
Tabela 3. Estimativa da biodegradabilidade mediante técnicas analíticas.	37
Tabela 4. Fungos empregados em diversos testes de biodegradação e biodeterioração.	39
Tabela 5. Propriedades biológicas de <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	44
Tabela 6. Testes empregados na norma.	47
Tabela 7. Relação dos fungos isolados de amostras de PVC e PCL	79

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Segmentação do mercado de transformados plásticos por aplicação (2009).....	23
Figura 2. Consumo aparente de resinas termoplásticas (2009).	24
Figura 3. Bio-plásticos: plásticos biodegradáveis e plásticos bio-baseados.....	25
Figura 4. Fórmula estrutural do PVC.	27
Figura 5. Segmentação do mercado de transformados plásticos do PVC (2009).....	27
Figura 6. Volume de material plástico reciclado pós-consumo produzido no Brasil em 2007 (mil tons/ano).....	28
Figura 7. Grupos de poliésteres biodegradáveis.....	30
Figura 8. Fórmula estrutural do PCL.....	30
Figura 9. Estruturas à base de PCL: (a, b) nanoesferas; (c, d) nanofibras; (e, f) espumas; (g, h, i) malha; (o-j) <i>scaffolds</i> seletivos sinterizados a laser; (p-u) <i>scaffolds</i> modelados por fusão e deposição.	31
Figura 10. Mecanismo de hidrólise e degradação do PCL.	32
Figura 11. Destinação final de Resíduos sólidos urbanos no Brasil em 2009.....	33
Figura 12. Esquema da degradação polimérica envolvendo micro-organismos.	35
Figura 13. Preparo dos filmes de PVC e PCL por evaporação.....	46
Figura 14. Esquema da câmara úmida utilizada no teste de biodegradação.....	48
Figura 15. Esquema do tratamento microbiano em meio sólido	49
Figura 16. (A) Aquário com prateleiras de papelão (Piloto 1) e (B) aquário montado no interior da câmara de fluxo laminar (Piloto 2).	51
Figura 17. Incubação das câmaras úmidas em estufa.....	51
Figura 18. Aquários montados no interior da câmara de fluxo laminar. (A) Ensaio 1, (B) Ensaio 2, (C) Ensaio 3, e (D) Ensaio 4 no interior da estufa bacteriológica.	52
Figura 19. (A e B) filme de PCL em meio completo, (C) PVC em meio completo e (D) PVC em meio incompleto. Setas apontam os locais de crescimento dos fungos.....	54
Figura 20. Micrografias ópticas de filmes de PVC: (A e C) original (sem tratamento) e (B e D) biotratados por 20 dias: (B) com hifas aderidas e (D) com esporos. Aumento de 20x. Setas indicam estruturas fúngicas aderidas aos filmes.....	55

Figura 21. Micrografias ópticas de filmes de PCL: (A, C e E) original (sem tratamento) e processos deteriorativos em: (B) biotratados por 20 dias com amarelamento e poros, (D) biotratados por 20 dias com enegrecimento e poros e (F) biotratados por 20 dias com rachadura. Aumento de 20x. Setas apresentam mudanças morfológicas dos filmes.	56
Figura 22. MEV dos filmes de PVC: (A) original e (B) biotratados por 20 dias com adesão de hifas, (C) biotratados por 20 dias com esporos e (D) biotratados por 20 dias com erosão. Setas apontam poros, hifas e esporos aderidos e região biodegradada.	57
Figura 23. MEV dos filmes de PCL: (A) original e (B) biotratados por 20 dias com erosão superficial dos esferulitos, (C) biotratados por 20 dias com formação de poros, (D) biotratados por 20 dias com adesão de hifas, (E) biotratados por 20 dias com esporos e hifas no poro e (F) biotratados por 20 dias com presença de hifas em rachaduras. Setas indicativas de formação de poros e adesão de estruturas fúngicas.	58
Figura 24. (A) filme de PCL e (B, C e D) de PVC em meio completo. Locais de crescimento fúngico indicados por setas.	59
Figura 25. Micrografias ópticas de filmes de PVC: (A e C) original (sem tratamento) e (B e D) biotratados por 20 dias: (B) com peritécio de <i>Chaetomium globosum</i> aderido e (D) com hifas. Aumento de 20x. As setas indicam estruturas fúngicas aderidas aos filmes.	60
Figura 26. Micrografias ópticas de filmes de PCL: (A, C e E) original (sem tratamento) e (B) biotratados por 20 dias apresentando formação de poros, (D) biotratados por 20 dias com adesão de hifas e (F) biotratados por 20 dias com pigmentos. Aumento de 20x). Poros e hifas aderidas (setas).	60
Figura 27. MEV dos filmes de PVC: (A) original e (B e C) biotratados por 20 dias com erosão. Setas indicam a presença de hifas e esporos.	61
Figura 28. MEV dos filmes de PCL: (A) original e (B) biotratado por 20 dias apresentando erosão em camadas, (C) biotratado por 20 dias com penetração de hifa em microporo e (D) biotratado por 20 dias com densa colonização. Setas apontam região de erosão e a adesão microbiana no filme.	62
Figura 29. Filme de PVC (A) e PCL (B) em meio completo e PCL em incompleto (C). Região de crescimento fúngico indicado por setas.	63
Figura 30. Micro-organismos contaminantes: (A) PVC-controle em meio completo e (B) PCL tratamento com <i>Phanerochaete chrysosporium</i> em meio completo.	64
Figura 31. Micrografias ópticas de filmes de PVC (A e B) e de PCL (C-H). (A, C, E, e G) original (sem tratamento) e (B) biotratado por 30 dias apresentando adesão de hifas, (D) biotratado por 30 dias com adesão e pigmentação, (F) biotratado por 30 dias com rachaduras e (H) biotratado por 30 dias com formação de microporos. Aumento de 20x. As setas indicam adesão microbiana e alterações morfológicas dos filmes.	65

Figura 32. MEV dos filmes de PVC: (A) original e (B e C) biotratados por 30 dias. Setas indicam a erosão e colonização ocorrida nas amostras.	66
Figura 33. MEV dos filmes de PCL: (A) original e (B) biotratado por 30 dias com esporos no interior da amostra, (C) biotratado por 30 dias com presença de hifas e esporos e (D) biotratado por 30 dias com efeito biofísico das hifas no poro. Hifas e esporos indicados por setas.	67
Figura 34. (A) filmes de PVC em meio completo com crescimento fúngico nas bordas e enumerações, (B) crescimento microbiano por toda extensão do filme de PCL em meio completo, e (C) predileção de <i>Chaetomium globosum</i> pelo PCL em meio incompleto. Região de crescimento fúngico (setas indicativas).	67
Figura 35. Micrografias ópticas de filmes de PVC (A-D) e PCL (E-H): (A, C, E, e G) original (sem tratamento) e (B e D) biotratados por 30 dias com deposição de pigmentos e peritécios de <i>C.globosum</i> , (F) biotratado por 30 dias com formação de poros e adesão de material microbiano e (H) biotratado por 30 dias com presença de microporos e rachaduras. Aumento de 20x. As setas indicam estruturas fúngicas aderidas e alterações morfológicas nos filmes.	69
Figura 36. MEV dos filmes de PVC: (A) original e (B) biotratado por 30 dias com erosão superficial em escamas, (C) biotratado por 30 dias com peritécio de <i>Chaetomium</i> e (D) biotratado por 30 dias com esporos sob a superfície polimérica. Setas indicam superfície modificada.	71
Figura 37. MEV dos filmes de PCL: (A) original e (B) biotratados por 30 dias apresentando rachaduras e remoção da superfície em camadas, (C) biotratado por 30 dias com erosão superficial de esferulitos, formação de poros e adesão de esporos e (D) biotratado por 30 dias com colonização fúngica no poro. Setas indicam modificações da superfície e adesão microbiana.	71
Figura 38. Filmes de PVC (A) e PCL (B) em meio completo com crescimento escasso de <i>Phanerochaete chrysosporium</i> . Setas indicam o crescimento margeando a borda.	72
Figura 39. Crescimento de outros fungos durante o experimento em: (A-C) PVC e (D-F) em PCL. Setas indicam crescimento nas bordas dos filmes.	72
Figura 40. Micrografias ópticas de filmes de PVC (A e B) e PCL (D-G): (A, D e F) original (sem tratamento) e (B) biotratado por 30 dias com hifas e estruturas reprodutivas, (C) biotratado por 30 dias com peritécio de <i>Chaetomium</i> , (E) biotratado por 30 dias com rachaduras e (G) biotratado por 30 dias com adesão de hifas. Aumento de 20x. As setas indicam estruturas fúngicas aderidas e rachaduras nos filmes.	73
Figura 41. MEV dos filmes de PVC: (A) original e (B) biotratado por 30 dias apresentando peritécios de <i>Chaetomium</i> e (C e D) biotratados por 30 dias com aglomerados de hifas e esporos.	74

Figura 42. MEV dos filmes de PCL: (A) original e (B) biotratado por 30 dias com rachaduras e erosão em camadas e (C) biotratado por 30 dias com colonização do poro. Setas indicam modificações na superfície e efeito biofísico no polímero.	75
Figura 43. Contaminação em filme de PVC (A) e PCL (B). Setas indicando crescimento nas bordas.	75
Figura 44. Crescimento de outros fungos durante o experimento em PVC (A-C) e em PCL (D-F). Setas indicam crescimento de hifas sobre e nas bordas dos filmes.	76
Figura 45. Micrografias ópticas de filmes de PVC (A-D) e PCL (E-H): (A, C, E e G) original (sem tratamento) e (B, D e H) biotratado por 30 dias apresentando hifas e pigmentos e (F) biotratados por 30 dias com a presença de poros. Aumento final de 20x. Setas indicam estruturas fúngicas aderidas e poros formados na superfície.	77
Figura 46. MEV dos filmes de PVC: (A) original e (B e C) biotratados por 30 dias contendo rachaduras nas regiões de erosão e (D, E e F) biotratados por 30 dias apresentando esporos de diferentes estirpes. Setas apontam regiões biodegradadas.	78
Figura 47. MEV dos filmes de PCL: (A) original e (B) biotratado por 30 dias apresentando erosão superficial dos esferulitos, (C) biotratado por 30 dias com esporos de <i>Aspergillus</i> e (D) biotratado por 30 dias com rachaduras (setas).....	79

ABREVIATURAS E SIGLAS

AAC – Copoliéster Alifático-Aromático
AcC – Acetil celulose
ASTM – American Society for Testing and Materials
ATCC – American Type Culture Collection
BDA – Batata Dextrose Agar
CCB – Centro de Ciências Biológicas
ISO – International Standard Organization
kDa – Kilodalton
MEV – Microscopia eletrônica de varredura
MO – Microscopia óptica
NRRL – Northern Regional Research Laboratory
NY11 – Nylon 11
PBAT – Tereftalato de polibutadieno adipato
PBS – Poli (succinato de butileno)
PBSA – Poli (butileno succinato adipato)
PCL – Poli (caprolactona)
PE – Polietileno
PEBD – Polietileno de baixa densidade
PES – Poli (éter sulfona)
PET – Poli (tereftalato de etileno)
PGA – Ácido poliglicólico
PHA – Poli (hidroxialcanoato)
PHB – Poli (hidroxibutirato)
PHBV – Poli (hidroxibutirato co-valerato)
PHEMA – Poli (metacrilato de 2-hidroxietil)
PHH – Poli (hidroxihexanoato)
PHV – Poli (hidroxivalerato)
PLA – Poli (ácido láctico)
PTMAT – Poli (tereftalato de metileno adipato)
PVC – Poli (cloreto de vinila)
RSU – Resíduos Sólidos Urbanos
UFC – Unidade formadora de colônia
UV – Ultravioleta

SÍMBOLOS

ε – Épsilon

T_g – Transição vítrea

M_w – Massa molar média em massa

T_f – Temperatura de fusão

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	20
2 OBJETIVOS.....	22
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	23
3.1 Polímeros Sintéticos e Biodegradáveis.....	23
3.1.1 Poli (cloreto de vinila) (PVC).....	26
3.1.2 Poli (caprolactona) (PCL).....	29
3.2 Materiais Plásticos e o Meio Ambiente.....	33
3.3 Biodegradação de Plásticos.....	34
3.4 Métodos de Análise de Biodegradação.....	36
3.5 Fungos Empregados na Degradação de Plásticos.....	38
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	46
4.1 Polímeros.....	46
4.2 Preparo dos Filmes.....	46
4.3 Amostras dos polímeros.....	46
4.4 Teste de resistência ao ataque fúngico (ISO 846-1978).....	47
4.5 Manutenção das culturas.....	47
4.6 Condições de cultivo.....	47
4.7 Quantificação de unidades formadoras de colônias.....	48
4.8 Montagem do experimento.....	48
4.9 Avaliação da ação fúngica.....	49
4.10 Análise de coloração.....	49
4.11 Perda de massa.....	50
4.12 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	50
4.13 Pilotos.....	50
4.14 Ensaios.....	51

4.15 Análise estatística	53
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
5.1 Piloto 1.....	54
5.2 Piloto 2.....	58
5.3 Ensaio 1	62
5.4 Ensaio 2	67
5.5 Ensaio 3	72
5.6 Ensaio 4	75
5.7 Perdas de massa	81
6 CONCLUSÕES	83
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84
ANEXO A	100
ANEXO B	102

1 INTRODUÇÃO

Apesar dos benefícios de sua aplicação, os plásticos são considerados materiais não biodegradáveis devido ao longo tempo que levam para se decompor. Dessa forma, a natureza é incapaz de assimilar suas substâncias em um ciclo equilibrado de produção, uso e descarte, o que provoca consequências ambientais comprometedoras para o equilíbrio do planeta (MORAES, 2003). Uma vez descartados, dão origem às enchentes, fazendo transbordar águas pluviais e provocando graves problemas nas proximidades dos rios e mares. No solo diminuem a produtividade de espécimes vegetais, pois liberam aditivos tóxicos e plastificantes. Muitos animais e peixes têm morrido devido à ingestão de restos de plásticos sintéticos, que por sua vez, perturbam o ecossistema (YANG et al. 2004). O avanço tecnológico e industrial associado ao adensamento populacional desordenado nos grandes centros urbanos, vem contribuindo negativamente para formação deste cenário.

Nos últimos anos, o homem vem descobrindo a necessidade da preservação do ambiente em que vive, tendo em vista o aumento significativo do uso de polímeros sintéticos desde o começo do século XX (SAPONARO et al. 2008). De acordo com estimativas, são produzidos no mundo cerca de 100 milhões de toneladas/ano de polímeros sintéticos. Praticamente metade de toda essa produção é descartada rapidamente, permanecendo em depósitos de lixo e aterros sanitários por décadas. Desse modo, os plásticos sintéticos vêm se acumulando na natureza com uma taxa crescente de 25 milhões de toneladas/ano (AHN, et al. 2001; JARA, 2007).

O manejo total dos resíduos plásticos requer combinações complementares de biodegradação, incineração e reciclagem (MARTINS-FRANCHETTI; MARCONATO, 2006). A biodegradação consiste na transformação bioquímica de compostos, realizada pelos micro-organismos, podendo constituir-se de: mudanças nas propriedades da superfície polimérica ou perda de força mecânica; assimilação pelos micro-organismos; degradação por enzimas; quebra da cadeia principal e subsequente redução nos valores de massa molar (SINGH; SHARMA, 2008).

A busca de micro-organismos capazes de degradar compostos xenobióticos é de grande interesse para os processos de biorremediação, principalmente na remoção de plásticos. Estirpes de *Phanerochaete chrysosporium*, *Poliporus* spp. e *Pleurotus* spp. são conhecidas pelo potencial enzimático na degradação de lignina, e por conseguinte, apresentam habilidade de degradar plásticos (KIRBAS et al. 1999). Alguns gêneros fúngicos e bacterianos também

são comumente citados como promissores no processo de biodegradação de materiais como: *Aspergillus* (fluoropolímeros e couro artificial); associações de *Aspergillus*, *Penicillium* e *Pseudomonas* (poliamidas); *Aspergillus*, *Penicillium*, *Pseudomonas* e *Corynebacterium* (poliimididas); *Fusarium*, *Pseudomonas* e *Arthrobacter* (borrachas); *Aspergillus*, *Fusarium* e *Scopulariopsis* (silicones); e *Aspergillus* e *Penicillium* (poliésteres) (KURAKOV et al. 2008).

A biodegradação tem sido descrita como um processo fundamental para reduzir o acúmulo dos polímeros contaminantes ambientais e inúmeras pesquisas são desenvolvidas com a finalidade de degradar os plásticos sintéticos. Os poliésteres, como a poli (ϵ -caprolactona) (PCL), têm sido alvo de atenção dos pesquisadores pelas suas propriedades mecânicas e potencial biodegradabilidade, dos quais os grupos ésteres sofrem ação microbiana por meio de hidrólise enzimática e degradação oxidativa (TSUJI; SUZUYOSHI, 2002). Por outro lado, os termoplásticos sintéticos como o poli (cloreto de vinila) (PVC), apesar de sua grande aplicação tecnológica, são mais resistentes à biodegradação no meio ambiente (LUCAS et al. 2008).

Visto que normas internacionais sugerem o emprego de consórcios fúngicos padrões na otimização do processo de degradação, nosso estudo torna-se promissor no que diz respeito ao PVC, um plástico de grande aplicação e com propriedades que lhe conferem resistência à degradação, e ao PCL, por ser biodegradável, colaborando com métodos eficazes de diminuição dos resíduos descartados no meio ambiente.

2 OBJETIVOS

O presente trabalho teve por objetivo avaliar a eficiência de degradação de filmes poliméricos de PVC e PCL utilizando o *Phanerochaete chrysosporium* e um consórcio padrão de espécies fúngicas (ISO 846-1978), verificando as alterações mediante análises de perda de massa, coloração, Microscopia Óptica (MO), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Polímeros Sintéticos e Biodegradáveis

Na sociedade contemporânea, os plásticos vêm sendo utilizados em quase todos os setores da economia como alternativa para a substituição de outros materiais, pela escassez destes, altos custos de obtenção dos mesmos ou simplesmente pelas melhores propriedades apresentadas em relação aos materiais substituídos (ROSA; PANTANO FILHO, 2003).

Quantidades enormes de materiais poliméricos sintéticos de várias formulações são produzidas e utilizadas em várias esferas da atividade humana (Figura 1). No ano de 2009, no Brasil, foram produzidos 5,19 milhões de toneladas de plásticos, representando um aumento de 1% em relação ao ano anterior (ABIPLAST, 2009).

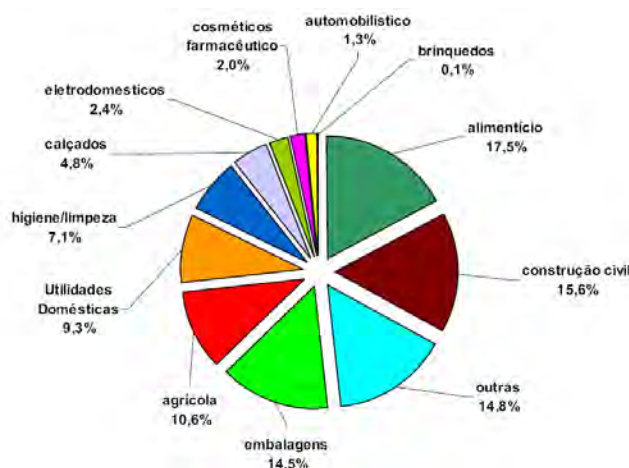


Figura 1. Segmentação do mercado de transformados plásticos por aplicação (2009).
Fonte: Anuário da Indústria Química Brasileira 2009 / Tabulação ABIPLAST

Os plásticos mais representativos são os destinados às aplicações técnicas, tais como borrachas vulcanizadas, feitas com matérias-primas naturais e sintéticas, poliuretanas, plásticos fenólicos, polietileno, poliamidas, tereftalatos, fluorpolímeros, silicones orgânicos, poliacrilatos, polipropileno e PVC (Figura 2) (LUGAUSKAS et al. 2004; TOKIWA et al. 2009).

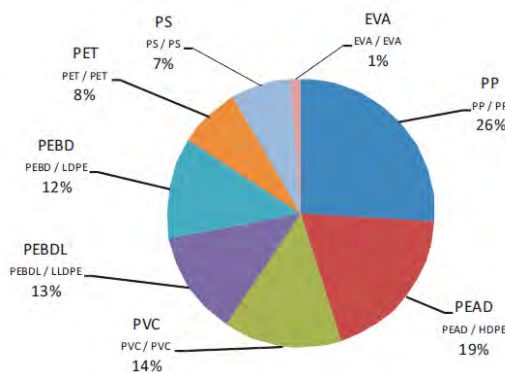


Figura 2. Consumo aparente de resinas termoplásticas (2009).
 Fonte: Anuário da Indústria Química Brasileira 2009 / Tabulação ABIPLAST

A questão é que a vida útil desses materiais é pequena (menos de dois anos em geral), em contraste com sua elevada resistência à degradação (ROSA et al. 2009). Muitos dos plásticos quando descartados são resistentes aos fatores ambientais, condições climáticas, diversidade biológica e fatores antropológicos (FLEMMING, 1998). Essa degradabilidade limitada é preocupante devido aos efeitos deletérios de seu acúmulo no meio ambiente. Para minimizar o efeito do grande volume de resíduos descartados, tem-se empregados métodos como:

Aterros sanitários – locais afastados da cidade que são preparados para acondicionar o material plástico que ficará exposto ou será utilizado para geração de energia por meio da reciclagem térmica (AMASS et al. 1998);

Incineração – apresenta a vantagem da redução do volume de material descartado em 80%, porém não é um método recomendável, devido ao alto custo e liberação de poluentes voláteis e tóxicos (PACI; LA MANTIA, 1999);

Reciclagem – tem como vantagem a diminuição da quantidade de resíduos sólidos, economia de matéria-prima e energia, aumento da vida útil dos lixões e alto rendimento no processo. Dados da Plastivida (2010) referentes ao período de 2003-2007, apontam um índice médio de 21,2% de plásticos pós-consumo reciclados no Brasil. Trata-se de um percentual muito positivo em comparação às taxas da União Européia (18,3%), Espanha (17,9%), Reino Unido (14,9%), Portugal (11,8%), e Grécia (5%). Alguns fatores corroboraram para o crescimento desses percentuais, como: baixo custo e qualidade similar se comparado ao plástico não reciclado; diminuição do consumo de energia e baixo investimento no setor;

Biodegradação – consiste na avaliação da biodegradabilidade de polímeros em laboratório com a aplicação de micro-organismos que modificarão física ou quimicamente o

material, sob certas condições de calor, umidade, luz, oxigênio e nutrientes orgânicos (ABOU-ZEID et al. 2001; SAPONARO et al. 2008).

Nos dias atuais, os polímeros biodegradáveis vêm se destacando cada vez mais. Busca-se um material com durabilidade em uso e degradabilidade após o descarte. Devido à ação de micro-organismos (fungos, bactérias, algas e protozoários) e macro-organismos, estes por sua vez, serão degradados em compostos de baixa massa molar. Outra característica importante refere-se ao fato de serem provenientes de fontes renováveis (FALCONE et al. 2007).

Os bio-plásticos consistem em plásticos biodegradáveis, produzidos por materiais fósseis, ou plásticos bio-baseados, sintetizados a partir de biomassa ou fontes renováveis, como por exemplo, o poli (hidroxibutirato) (PHB), o poli (ácido láctico) (PLA) e as blends com amido. Existem algumas exceções como o polietileno (PE) e o nylon 11 (NY 11) que são considerados não biodegradáveis, apesar de serem produzidos de biomassa ou fontes renováveis. Policaprolactona (PCL) e polibutileno succinato (PBS), entretanto, são fabricados a partir do petróleo, mas também podem ser degradados por micro-organismos. Dependendo da quantidade de acetil celulose (AcC) adicionada, esta pode ser biodegradável ou não (TOKIWA et al. 2009). A inter-relação entre os bio-plásticos é mostrada na Figura 3.

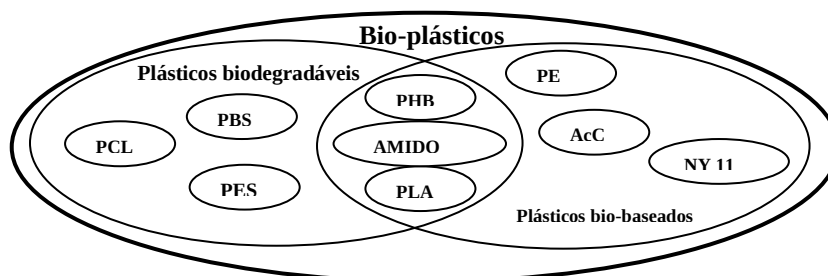


Figura 3. Bio-plásticos: plásticos biodegradáveis e plásticos bio-baseados.

Os plásticos biodegradáveis encontraram aplicações na área médica (fios de sutura, implantes, sistema de liberação controlada de drogas, enxerto vascular, etc) em decorrência de sua biocompatibilidade, capacidade de dissolução no interior do organismo e propriedades mecânicas adequadas às tais aplicações. Com o tempo, poderão também encontrar aplicações no setor de embalagens e setor agrícola (FALCONE et al. 2007). Quando dispostos no ambiente, esses materiais oferecem vantagens como o aumento da fertilidade no solo e baixo volume acumulado no ambiente, minimizando danos aos animais e diminuindo custos com o gerenciamento do lixo. As propriedades dos polímeros e parâmetros físico-químicos do ambiente têm importante papel no processo de degradação (Tabela 1) (TOKIWA et al. 2009).

Tabela 1. Parâmetros e fatores envolvidos no processo de degradação

Parâmetros	Fatores
Físico-químicos do ambiente	Temperatura Potencial hidrogeniônico Quantidade de água Quantidade de oxigênio Potencial redox Suplemento nutriente Presença de inibidores
Microbiológicos no ambiente	Densidade da população Diversidade microbiológica Atividade microbiológica Distribuição de micro-organismos Habilidade para adaptação
Propriedades dos materiais	Composição do polímero Massa molar Distribuição da massa molar Cristalinidade Temperatura de transição vítrea Porosidade Hidrofobicidade Tipo de ligações entre os monômeros
Processamento do material	Tipo de processamento Características da superfície Aditivos Espessura do material Revestimentos

Fonte: BRANDL, 1990; TOKIWA et al. 2009.

3.1.1 Poli (cloreto de vinila) (PVC)

No ano de 2008, o consumo de resinas termoplásticas foi de 27,7 kg/hab. As estimativas são de que nos Estados Unidos gire em torno de 100 kg/hab, na França por volta de 60 kg/hab e na Argentina cerca de 30 kg/hab. Desse total, o consumo *per capita* de resinas de PVC situou-se em torno de 5,6 kg/hab (ABIQUIM, 2010). Em 2009 foram produzidas 5,5 milhões de toneladas de resinas termoplásticas, destas, 14% corresponderam ao PVC (ABIPLAST, 2009).

Em termos estequiométricos o PVC é obtido a partir de 56,8% de cloro, proveniente do cloreto de sódio, e 43,2% de insumos provenientes de fontes não renováveis como o petróleo e o gás natural. O cloro presente na estrutura molecular do PVC provém do sal marinho ou do cloreto de sódio mineral (salgema), uma fonte praticamente inesgotável de matéria-prima (Figura 4).

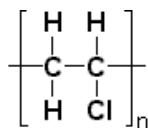


Figura 4. Fórmula estrutural do PVC.

O cloro é utilizado na produção do PVC e também em diversas aplicações devido às suas propriedades oxidantes, germicidas e alvejantes. Por outro lado, sua persistência no ambiente é muito questionada. Muitos compostos organoclorados, oriundos tanto de fontes agrícolas como industriais, apresentam alta resistência à degradação química e biológica (NUNES et al. 2006). Os halogênios compreendem o cloro, bromo, iodo e flúor, sendo considerados os mais importantes elementos químicos de caráter xenobiótico (BOSNA et al. 2001).

O grande teor deste halogênio na estrutura molecular do PVC garante resistência à propagação de chamas, contribuindo para aplicações ligadas à construção civil tais como em fios e cabos elétricos, eletrodutos e forros/revestimentos residenciais (BIDOKI; WITTLINGER, 2010). Devido à presença do cloro, a molécula de PVC é extremamente polar, aumentando sua afinidade e permitindo sua mistura com uma gama muito maior de aditivos que a de qualquer outro termoplástico. Isso possibilita a preparação de formulações com propriedades e características perfeitamente adequadas à cada aplicação, variando do rígido ao extremamente flexível (Figura 5) (RODOLFO JR; MEI, 2007).

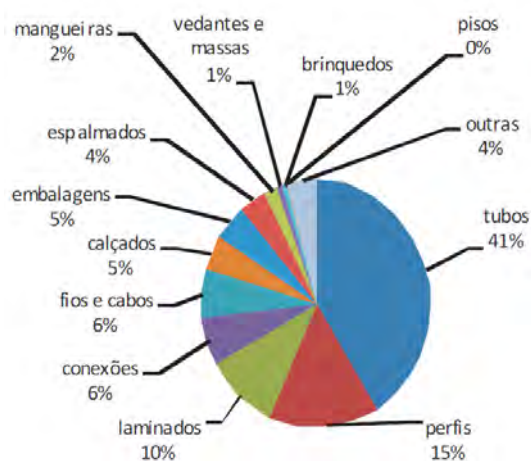


Figura 5. Segmentação do mercado de transformados plásticos do PVC (2009).
Fonte: Anuário da Indústria Química Brasileira 2009 / Tabulação ABIPLAST

Muitos instrumentos utilizados em exames, cirurgias e recuperação de pacientes utilizam produtos à base de PVC: bolsas de sangue, tubos endotraqueais, bolsas de soro,

catéteres cardiovasculares, tubos que saem do coração do paciente e levam o sangue até a máquina de circulação extracorpórea, sondas e equipamentos de alimentação enteral, cânulas de perfusão, ponteiros para micropipetadores e equipos para soro. A existência do PVC, associando alta tecnologia e baixo custo, proporcionou a criação de produtos descartáveis, encontrando uma solução definitiva para as infecções causadas pela reutilização de artigos médicos. Permitiu também a criação e desenvolvimento de órgãos artificiais como as próteses (INSTITUTO DO PVC, 2010).

Recentemente o PVC vem substituindo materiais como fibras, madeira, concreto e a argila em muitas áreas. Diante da demanda crescente no consumo de plásticos e posterior descarte, torna-se necessária a administração dos resíduos sólidos gerados. Isso requer métodos complementares de reciclagem, incineração e biodegradação. Em 2007, o volume de PVC reciclado pós-consumo foi de 22 mil toneladas/ano, para um total de 556 mil toneladas de plásticos de diferentes formulações (Figura 6) (PLASTIVIDA, 2010). A incineração, sob o ponto de vista ambiental, é uma alternativa inviável, pois produz materiais voláteis, tóxicos e poluentes como o cloreto de hidrogênio, dioxinas e furanos (KRUPP; JEWELL, 1992). Segundo Roaf et al. (2007), 82% dos dejetos de PVC vão para o lixo e apenas 15% são incinerados.

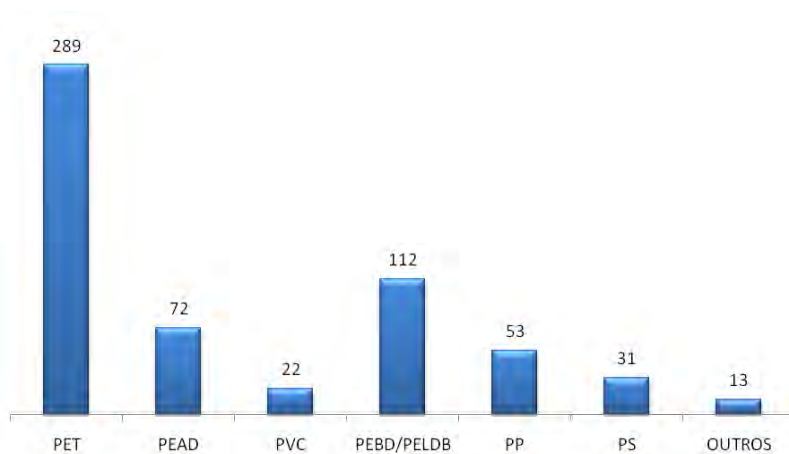


Figura 6. Volume de material plástico reciclado pós-consumo produzido no Brasil em 2007 (mil tons/ano).

Fonte: PLASTIVIDA, 2010

O processo de degradação do PVC ocorre com a liberação de cloreto de hidrogênio (HCl), acompanhado da formação de sequências poliênicas e ligações cruzadas na cadeia, resultando em um rápido processo de degradação, revelado normalmente pela mudança de coloração gradual, do amarelo, passando pelo castanho, até ao negro (RODOLFO JÚNIOR; MEI, 2007). O mecanismo de degradação dos polímeros envolve a utilização do polímero e/

ou aditivos como fonte de carbono e energia para os micro-organismos (GU et al. 1996). Os fatores que podem induzir esses processos no meio ambiente são a temperatura, a umidade, as impurezas e a própria microbiota, podendo ocorrer também devido a fenômenos complexos combinados tais como termo-oxidação e fotodegradação (GRISA et al. 2009).

Estudos sobre colonização de fungos e biodeterioração de filmes de PVC contendo plastificantes por El-Aghoury et al. (2006) evidenciaram que os fungos produzem esterases, enzimas capazes de realizar a quebra das ligações ésteres presentes nos plastificantes. Os fragmentos das moléculas produzidos podem ser metabolizados pelos fungos e a formação de fissuras e microporos na superfície do material polimérico é o resultado da atividade dos micro-organismos. Grisa e Zeni (2008) observaram nas análises por microscopia eletrônica de varredura, irregularidades na superfície polimérica, adesão bacteriana, formação de material extracelular, fissuras e microporos em amostras de PVC aterradas por 11 meses. Concluíram que as amostras de PVC aterradas sofreram modificações estruturais, térmicas, colonização e erosão na superfície polimérica.

3.1.2 Poli (caprolactona) (PCL)

A maior parte dos polímeros biodegradáveis descobertos durante os últimos 25 anos contém ligações hidrolisáveis de amida, éster, uréia e/ou uretano em sua cadeia polimérica (MORAES, 2004). Segundo Pacia (2002), as ligações ésteres são facilmente biodegradáveis, possuindo propriedades físicas e químicas muito variadas. Por esse motivo, os polímeros biodegradáveis mais utilizados são os poliésteres, que por sua vez, dividem-se em dois grandes grupos: os alifáticos e os aromáticos (Figura 7).

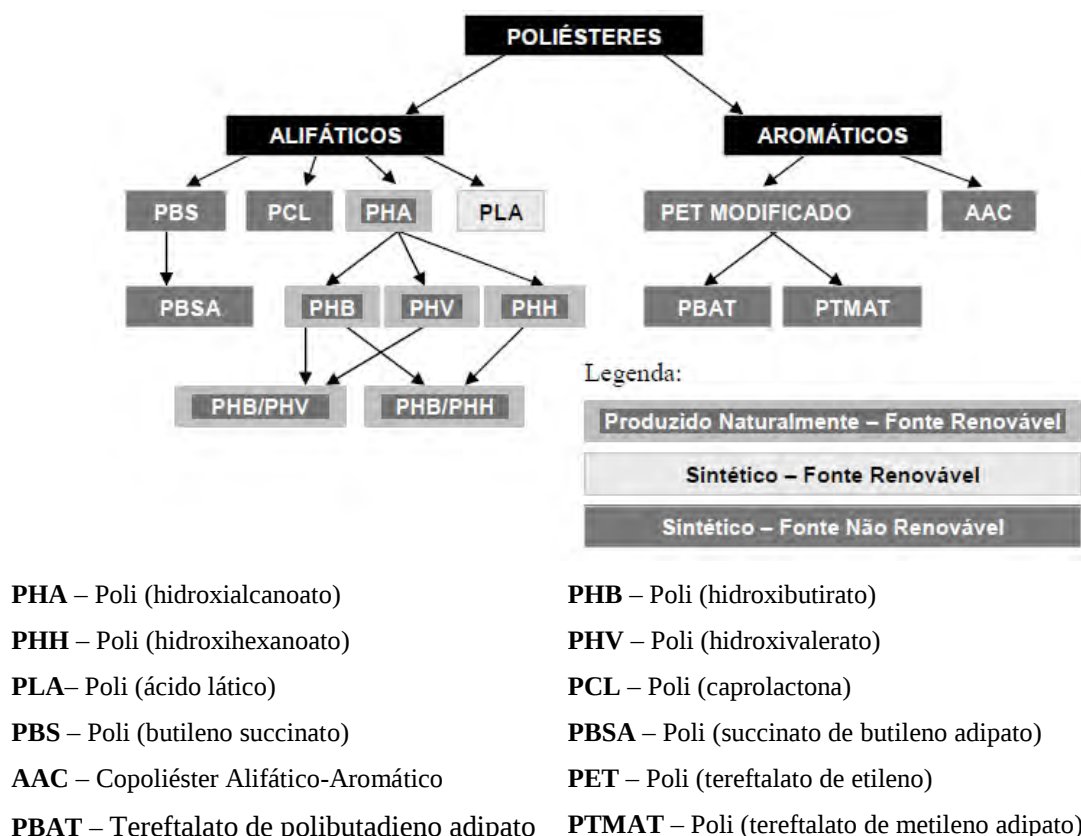


Figura 7. Grupos de poliésteres biodegradáveis.
 Fonte: PACIA, 2002.

A poli (ϵ -caprolactona) se tornou comercialmente disponível devido aos esforços em se identificar polímeros sintéticos que pudessem ser degradados por micro-organismos. Trata-se de um poliéster sintético preparado pela abertura do anel da ϵ -caprolactona, um derivado do petróleo cru, facilmente degradado por micro-organismos de ecossistemas marinhos, do solo e esgoto. A secreção de enzimas como lipases, esterases e despolimerases extracelulares permite que bactérias e fungos degradem o PCL utilizando-o como nutriente (KHATIWALA et al. 2008; KUNIOKA et al. 2007; PREMRAJ; DOBLE, 2005) (Figura 8).

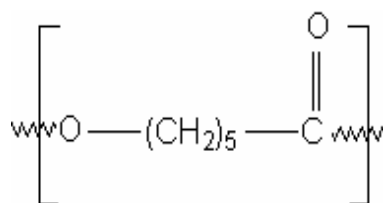


Figura 8. Fórmula estrutural do PCL.

O PCL caracteriza-se por ser um polímero semi-cristalino e sua cristalinidade tende a diminuir com o aumento da massa molar. Quando cristalizado a partir do estado líquido, são formados esferulitos, que consistem em um agregado de lamelas que se irradiam a partir de

um ponto central, nas três direções formando esferas. A boa solubilidade, a baixa temperatura de fusão (59-64°C), de transição vítrea (T_g) em -60°C, e excepcional compatibilidade tem estimulado amplas pesquisas sobre sua potencial aplicação na área da biomedicina (Figura 9) (CALLISTER Jr, 2001; NAIR; LAURENCIN, 2007; OKADA, 2002).

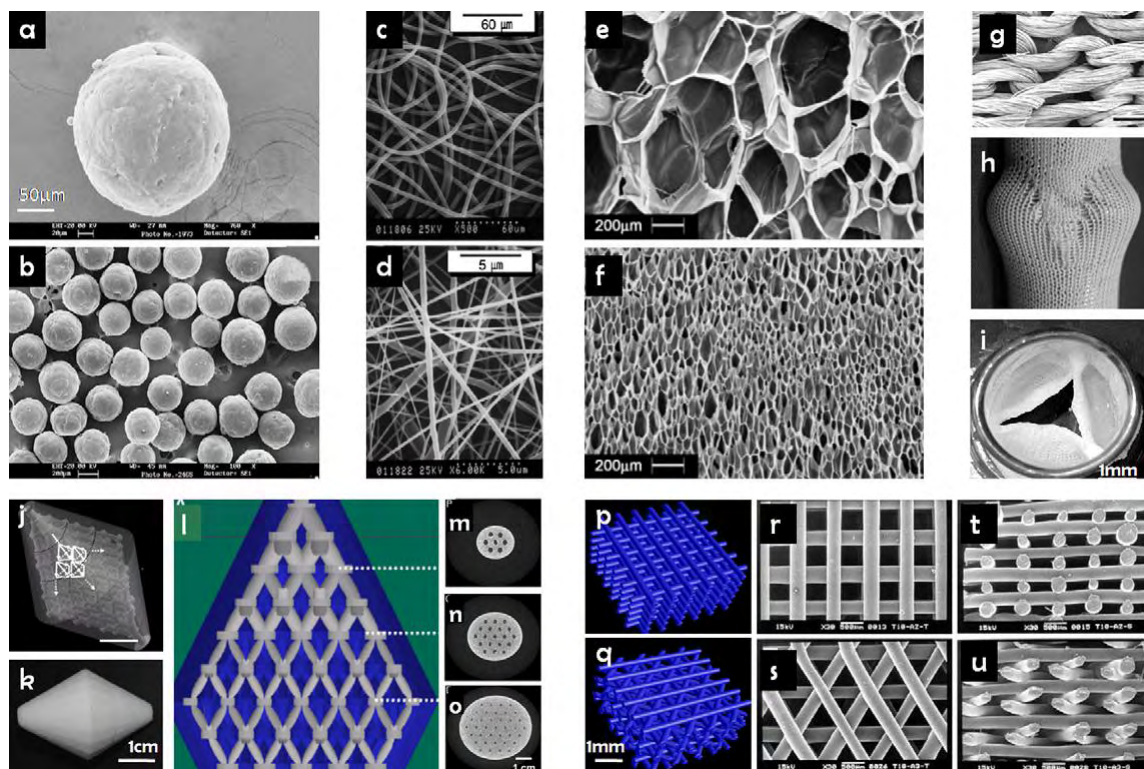


Figura 9. Estruturas à base de PCL: (a, b) nanoesferas; (c, d) nanofibras; (e, f) espumas; (g, h, i) malha; (o-j) *scaffolds* seletivos sinterizados a laser; (p-u) *scaffolds* modelados por fusão e deposição.

Fonte: WOODRUFF; HUTMACHER, 2010

Devido à sua baixa transição vítrea e habilidade em aumentar a mobilidade molecular, tem sido usado como plastificante polimérico (GASSNER; OWEN, 1994). Vários estudos estão voltados ao PCL, principalmente no contexto de sistemas de liberação de drogas, sendo aplicado na área biomédica em dispositivos de uso temporário, como suturas, fibras, material fortalecedor de sapatos e talas ortopédicas. Ainda na área médica produtos como *scaffolds*, malhas utilizadas para direcionar o crescimento celular durante o processo de reparação ou regeneração dos tecidos que tem trazido ótimos resultados (CHIELLINI; SOLARO, 1996; CHUNG et al. 2011; ZHAO et al. 2008). O PCL é principalmente usado em poliuretanas termoplásticas, revestimento de superfície de resinas, adesivos e couros sintéticos, além de seu emprego em embalagens na agricultura, graças as suas excelentes propriedades mecânicas e de flexibilidade (ROSA; PANTANO FILHO 2003; KUNIOKA et al. 2007).

Ensaios realizados *in vivo* demonstraram que o PCL apresentou degradação total em 2 - 4 anos, dependendo da massa molar do dispositivo ou implante (GUNATILLAKE; ADHIKARI, 2003; MIDDLETON; TIPTON, 2000). A partir de estudos de degradação apresentados na literatura, pode-se concluir que o PCL sofre uma degradação de duas fases: a primeira, trata-se da clivagem não enzimática hidrolítica de grupos ésteres. A segunda ocorre quando o polímero é altamente cristalino e possui massa molar inferior a 3000 kDa, sofrendo assim, degradação intracelular (WOODWARD et al. 1985) (Figura 10).

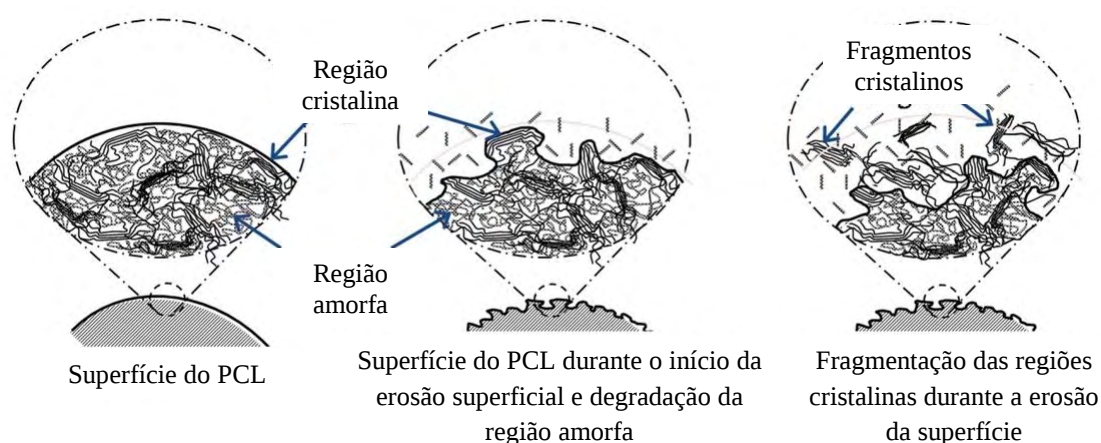


Figura 10. Mecanismo de hidrólise e degradação do PCL.
Fonte: ZHANG et al. 2001.

Dentre 341 actinomicetos termofílicos isolados do solo, 198 (58,1%) foram capazes de degradar o PCL, número bem acima daquele para os degradadores de poli (hidroxibutirato) (PHB) e poli (éter sulfona) (PES) (TSENG et al. 2007). Oda e colaboradores (1995) isolaram cinco estirpes fúngicas capazes de degradar PHB e PCL, sendo uma delas, a D218, identificada como *Paecilomyces lilacinus*, produtora potencial de PCL despolimerase. Pesquisas sobre o mecanismo de degradação deste polímero têm assumido que várias despolimerases de PCL reagem preferencialmente na região amorfa do PCL semicristalino, combinando endo e exo clivagens (KHATIWALA et al. 2008). Bardi e Rosa (2007) em solo simulado verificaram que a morfologia do PCL influencia na biodegradação, visto quando o mesmo se apresenta com esferulitos e ondulações, favorece a ação microbiana e absorção de água. Filmes de PCL misturados com 40% de acetato de celulose apresentaram perda de massa maior quando comparados ao PCL puro, 25,8% e 8,4% respectivamente (CALIL et al. 2006).

3.2 Materiais Plásticos e o Meio Ambiente

No Brasil, o consumo aparente de plásticos transformados em 2009 foi de 5,38 milhões de toneladas, um aumento de 1,6% em relação ao ano anterior. Para o mesmo ano, o consumo *per capita* foi de 27,94 kg/hab (ABIPLAST, 2009). A ampla aplicação destes materiais tem por consequência a geração de enorme quantidade de resíduos sólidos que perduram por muito tempo no ambiente até serem degradados. A Figura 11 apresenta, em termos percentuais, as modalidades de destinação final de resíduos sólidos urbanos (RSU) praticadas no Brasil em 2008 e 2009.

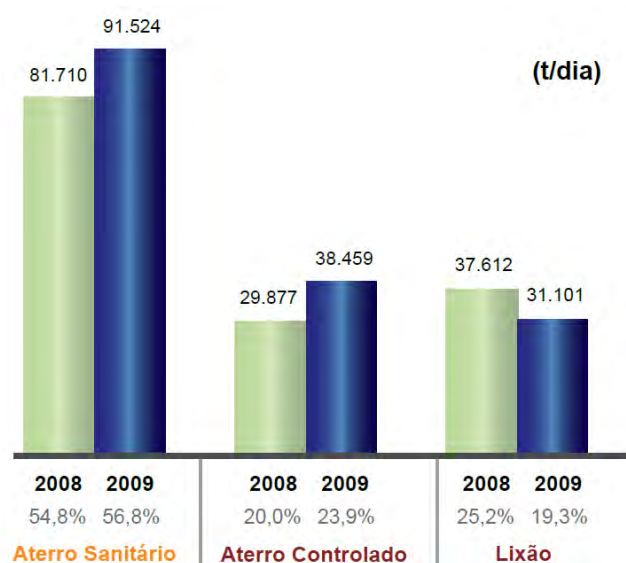


Figura 11. Destinação final de Resíduos sólidos urbanos no Brasil em 2009.

Fonte: Pesquisas ABRELPE 2009.

A comparação entre os dois períodos (2009 e 2008) leva à constatação positiva de que houve um crescimento na adequação da destinação final dos RSU coletados no Brasil em 2009, indicando uma gradual evolução dessa atividade. Todavia 43,2% dos resíduos coletados no país ainda são destinados de maneira inadequada, pois aterros controlados pouco se diferenciam de lixões, uma vez que ambos não possuem o conjunto de sistemas necessários para proteção do meio ambiente contra danos e degradações (ABRELPE, 2009). Ocupando índices expressivos dentre os resíduos sólidos, os polímeros, como todos os materiais de origem orgânica, podem servir de substrato para micro-organismos heterotróficos, como bactérias e fungos. Investigações sobre a capacidade microbiológica em degradar tais materiais são consideradas de extrema importância.

3.3 Biodegradação de Plásticos

A biodegradação constitui-se na transformação bioquímica de compostos, realizada principalmente pelos micro-organismos. Tem sido definida de várias formas por diversos autores, podendo se constituir de: mudanças nas propriedades da superfície polimérica ou perda de força mecânica; assimilação por micro-organismos; degradação por enzimas; quebra da cadeia principal e subsequente redução nos valores de massa molar (SINGH; SHARMA, 2008). Segundo a “American Society for Testing and Materials” - ASTM D-5488-94d, a mineralização é definida como um processo capaz de decompor os materiais em dióxido de carbono (CO_2), metano (CH_4), água (H_2O), compostos inorgânicos ou biomassa, no qual o mecanismo predominante é a ação enzimática dos micro-organismos.

A degradação de materiais poliméricos inclui vários passos, que podem eventualmente ser interrompidos (Figura 12). A ação combinada de comunidades microbianas, outros organismos decompositores e/ou fatores abióticos fragmentam os materiais biodegradáveis em frações minúsculas. Esse passo é denominado biodeterioração (EGGINS; OXLEY, 2001; WALSH, 2001). Os micro-organismos secretam/excretam agentes catalíticos como enzimas e radicais livres capazes de clivarem moléculas poliméricas, diminuindo progressivamente a massa molar. Tal processo, denominado despolimerização, origina oligômeros, dímeros e monômeros. Muitas moléculas são reconhecidas por receptores em células microbianas e atravessam a membrana plasmática. Outras permanecem externamente circundantes podendo ser objetos de diferentes modificações. No citoplasma, as moléculas transportadas integram o metabolismo produzindo energia, biomassa, vesículas de armazenamento e numerosos metabólitos primários e secundários, sendo tal passo chamado de assimilação. Concomitantemente, muitos metabólitos simples e complexos podem ser excretados e alcançar as proximidades extracelulares, como por exemplo, ácidos orgânicos, aldeídos, terpenos e antibióticos. Moléculas simples como CO_2 , N_2 , CH_4 , H_2O e diferentes sais advindos de metabólitos intracelulares que são completamente oxidados liberam-se no ambiente. Este metabolismo é denominado mineralização (LUCAS et al. 2008).

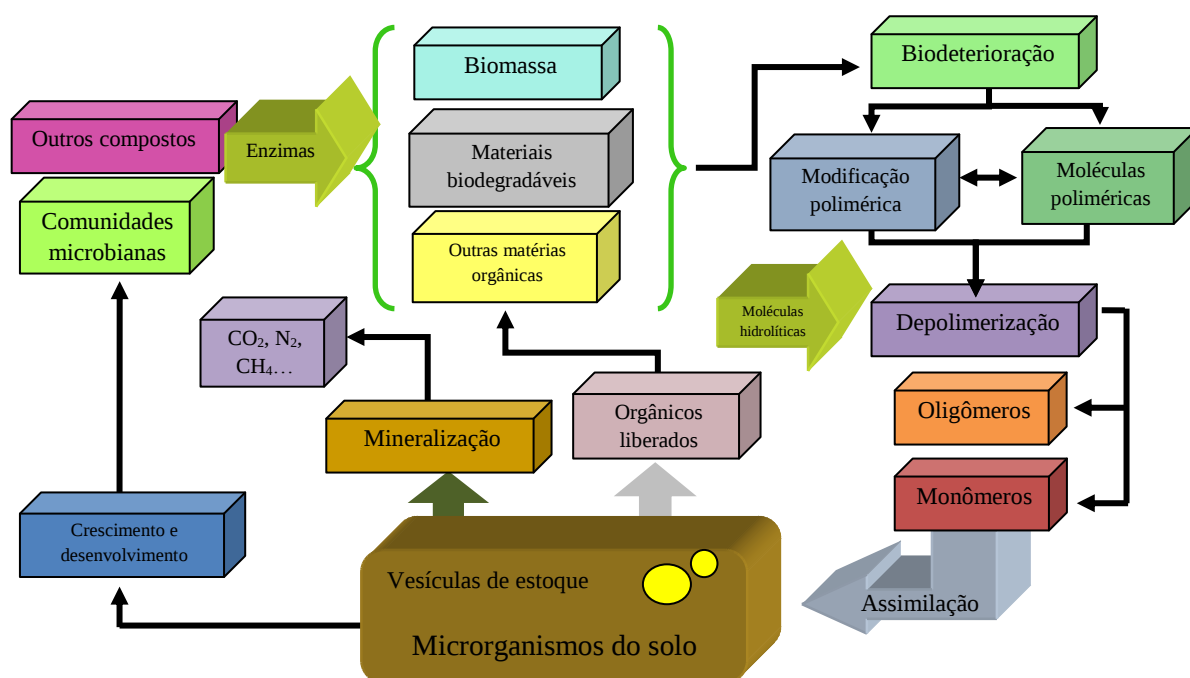


Figura 12. Esquema da degradação polimérica envolvendo micro-organismos.
Fonte: LUCAS et al. 2008.

As reações de degradação dos polímeros podem ser classificadas como degradação térmica, mecânica e química (fotodegradação, termo-oxidação, foto-oxidação), denominadas de degradação abiótica e a degradação por intermédio de micro-organismos, chamada de degradação biótica (KAMO et al. 2004; MARONGIU et al. 2004). Os diferentes tipos de degradação polimérica podem ser analisados segundo Kelen (1983) sob os seguintes aspectos em relação:

- ↳ à severidade da degradação, que pode ser superficial ou estrutural;
- ↳ aos mecanismos gerais das reações de degradação, ocorrendo com ou sem a cisão da cadeia principal;
- ↳ a atuação dos agentes degradantes, podendo ter como causa o processamento do polímero ou condições de uso do material polimérico;
- ↳ aos agentes ou fatores causadores da degradação, que pode ocorrer pela ação de agentes físicos (radiação solar, temperatura, atrito mecânico), agentes químicos (água, ácidos, bases, oxigênio, solventes, ozônio e outros poluentes atmosféricos) e biológicos (fungos, bactérias e outros).

3.4 Métodos de Análise de Biodegradação

O fator mais importante na determinação da biodegradação é a seleção do método adequado baseado na natureza do plástico e condições de estudo. Muitas destas metodologias padrões são desenvolvidas pela “International Standard Organization” (ISO) e “American Society for Testing and Materials” (ASTM) (Tabela 2) (SINGH; SHARMA, 2008).

Tabela 2. Testes padrões internacionais para degradação de plásticos

ISO/ASTM nº	Meio	Título
ISO 14851	Aquoso	Determinação da degradabilidade aeróbia de materiais plásticos em meio aquoso – Método de mensuramento da demanda de O ₂ em respirômetro fechado.
ISO 14852	Aquoso	Determinação da degradabilidade aeróbia de materiais plásticos em meio aquoso – Método de análise de CO ₂ liberado.
ISO 14855-1	Compostável	Determinação da degradabilidade aeróbia de materiais plásticos em condições de compostagem controladas - Método de análise de CO ₂ liberado – parte 1: métodos gerais.
ISO 14855-2	Compostável	Determinação da degradabilidade aeróbia de materiais plásticos em condições de compostagem controladas - Método de análise de CO ₂ liberado – parte 2: mensuramento gravimétrico de CO ₂ liberado em testes laboratoriais.
ISO 16929	Desintegração	Determinação dos graus de desintegração dos materiais plásticos sob condições de compostagem definidas na prática.
ISO 20200	Desintegração	Determinação dos graus de desintegração dos materiais plásticos sob condições de compostagem simuladas em laboratório.
ISO 17556	Solo	Determinação da degradabilidade aeróbia em solo pelo mensuramento da demanda de O ₂ em respirômetro ou quantidades de CO ₂ liberado.
ISO 14853	Anaeróbio	Determinação da biodegradação anaeróbia de materiais plásticos em meio aquoso – Método de mensuramento da produção de biogás.
ISO 15985	Anaeróbio	Determinação da biodegradação anaeróbia e desintegração sob condições de digestão anaeróbia de sólidos – Método de mensuramento do biogás produzido.
ISO 17088	Especificação	Especificações de plásticos compostáveis.
ASTM D-6400-04	Especificação	Especificações de plásticos compostáveis.
ASTM D-5338-98	Compostagem	Determinação da degradabilidade aeróbia de materiais plásticos em condições de compostagem controladas.
ASTM 6288-98	Separação	Separação e lavagem de plásticos reciclados antes do teste de degradação.
ASTM D-5208	Fotodegradação	Prática e exposição de plásticos fotodegradáveis em UV.
ASTM D-5526	Anaeróbio	Determinação da degradação anaeróbia de materiais plásticos em aterros.
ASTM D-5988	Aeróbia	Determinação da biodegradabilidade aeróbia de materiais plásticos residuais após compostagem.
ASTM D-883	Terminologia	Terminologia a respeito dos plásticos.

Fonte: Kunioka et al. 2007 e www.astm.org/standards

Para avaliar a biodegradação de filmes poliméricos por micro-organismos, algumas técnicas de análise têm sido empregadas (Tabela 3).

Tabela 3. Estimativa da biodegradabilidade mediante técnicas analíticas

Técnicas	Características	
	Custo	Dificuldade
<i>Morfológicas</i>		
Coloração	+	+
Microscopia fotônica	++	++
Microscopia eletrônica	++++	++++
Microscopia polarizada	+++	++
<i>Reológicas</i>		
Força tênsil	++	+
Difração de raios X	++++	+++
Difração por calorimetria diferencial	++++	++
Análise termogravimétrica	++++	++
<i>Espectroscopia</i>		
Fluorescência	++	++
UV-visível	+	+
Infravermelho com transformada de Fourier	++	++
RM nuclear	++++	++
Espectroscopia de massa	++++	+++
<i>Cromatografia</i>		
Permeação em gel	+++	++
Líquida de alta performance	+++	++
Fase gasosa	+++	++

Fonte: LUCAS et al. 2008

A interação entre micro-organismos e superfícies poliméricas constitui um processo complexo que dificulta a padronização dos métodos de análise, sendo necessário em certos casos, o emprego de vários deles de acordo com as características do material polimérico em estudo (PACI; LAMANTIA, 1999).

A norma ISO 846-1978 – *Plastics: Determination of behaviour under the action of fungi and bacteria - Evaluation by visual examination or measurement of change in mass or physical properties*, consiste em expor amostras de polímeros à ação de um consórcio recomendado de fungos, por determinado período de tempo sob condições específicas de temperatura e umidade, a fim de testar a capacidade dos mesmos em degradar os polímeros a serem testados. Para refinar esta avaliação sugere-se a utilização da estatística, a qual visa intensificar a confiabilidade dos resultados de perda de massa, no caso, obtida pela ação dos fungos filamentosos e do consórcio fúngico, nos dois polímeros em estudo (KIRBAS et al. 1999).

3.5 Fungos Empregados na Degradação de Plásticos

A grande maioria dos fungos verdadeiros ou Eumycota são quimiorganotróficos e aeróbios obrigatórios. Entretanto, um número significativo de espécies é fermentativo facultativo, isto é, pode obter energia tanto por oxidação (respiração aeróbia) como por fermentação (GOÉS NETO; GUSMÃO, 2004). Estão difundidos em habitats diversos, sendo alguns aquáticos, principalmente vivendo em água doce, embora também sejam conhecidas espécies marinhas. A maioria, no entanto, está distribuída em ambientes terrestres, no solo ou em matéria vegetal morta, desempenhando papel crucial na mineralização do carbono orgânico na natureza. Um grande número é parasita de plantas terrestres, ou de animais, inclusive humanos (MADIGAN et al. 2004).

Em um ambiente hipotético sem os fungos, era de se esperar a escassez de certos compostos. Não havendo nutrientes para as plantas, disponibilizados no solo pelos fungos, muitos animais poderiam ficar sem comida, a madeira não seria decomposta, muitos insetos e outros animais não seriam capazes de digerirem materiais vegetais e até a estrutura edáfica seria diferente (JOBARD et al. 2010).

Os fungos influenciam a vida do homem participando de processos desejáveis ou prejudiciais para o ser humano. Dentre os desejáveis podemos citar a fabricação do álcool etílico, álcool de cereal, aguardente, cerveja, vinho, pão, glicerol, vitaminas, alcaloides, pigmentos e inúmeras enzimas. Mediados pelos fungos filamentosos temos a fabricação de ácidos cítrico (*Aspergillus niger*), glucônico (*Aspergillus niger*, *Penicillium purpurogenum*), oxálico (*Aspergillus niger*), láctico (*Rhizopus oryzae*), vitaminas (*Aspergillus niger*), antibióticos (*Penicillium chrysogenum*), queijos (*Penicillium camemberti*, *Penicillium roqueforti*), enzimas (*Aspergillus* spp., *Trichoderma* spp., *Chaetomium* spp.) e esteróides (*Rhizopus arrhizus*). São de grande importância para a agricultura participando do controle biológico de pragas (*Metarhizium anisopliae*), na micorrização de sementes e raízes das plantas cultivadas e na alimentação humana (*Agaricus* spp., *Pleurotus* spp.) (ESPOSITO; AZEVEDO, 2004).

Como atividades prejudiciais destacam-se o parasitismo em espécies vegetais de importância agrícola, em animais de importância veterinária e aqueles que causam micoses profundas ou superficiais em humanos. Os sapróbios também podem trazer grandes prejuízos através da biodeterioração de materiais de constituição orgânica, comercializáveis ou não, mas que tenham certo valor agregado (GOÉS NETO; GUSMÃO, 2004).

Micro-organismos aeróbios e anaeróbios degradadores têm sido isolados de vários substratos como solo, areia, lodo ativado, sedimentos marinhos, adubo composto, água doce e água salgada (OHURA et al. 1999). Recentemente, têm sido aplicados na biorremediação de compartimentos ambientais (ex. solo), comprometidos por altos índices de poluentes para uma decomposição mais eficiente do lixo orgânico, compostos naturais recalcitrantes e xenobióticos, assim como na biossorção de metais pesados e compostos radioativos que podem ocorrer naturalmente (SANTAELLA et al. 2009). Fungos mesófilos como *Aspergillus*, *Penicillium* e *Paecilomyces* são capazes de degradar polímeros (KIM et al. 2000; MERGAET et al. 1993). Alguns podem ser utilizados em consórcios para otimizar a biodegradação, como apresentado na Tabela 4.

Tabela 4. Fungos empregados em diversos testes de biodegradação e biodeterioração

Micro-organismo	Cultura ATCC*	Aplicação
<i>Aspergillus niger</i>	9642	Testes de degradação de plásticos, resistência fúngica com equipamentos aéreos, componentes automotivos, cortiça, isolamento elétrico, couro, polímeros, verniz e cera. Produção de isopululanase pululana 4-glucanohidrolase, lactolglutathione glioxalase, ensaios antimicrobianos e testes preventivos em madeira.
<i>Penicillium funiculosum</i>	11797	Aplicado em estudos de resistência fúngica de equipamentos aéreos, componentes automotivos, tintas, polímeros, produção de fosfatase ácida e dextranase
<i>Chaetomium globosum</i>	16021	Teste de resistência fúngica em adesivos.
<i>Trichoderma virens</i>	9645	Relacionado com estudos em testes de resistência fúngica em transmissões de aeronaves, componentes automotivos, cortiça, isolamento elétrico, materiais de embalagem, papéis, plásticos, polímeros, têxteis, vernizes, ceras e herbicidas.
<i>Paecilomyces variotti</i>	16023	Utilizado em estudos de resistência fúngica.

Fonte: www.atcc.com – 2009

Legenda: * American Type Culture Collection

A literatura relata que o processo de biodegradação pode ser investigado sob vários aspectos, utilizando-se praticamente todos os materiais, sejam eles poluentes ou não. A grande diversidade de espécies bacterianas, fungos filamentosos e leveduras, estimula a busca por enzimas específicas que possam ser empregadas na biodegradação de diferentes polímeros. Neste contexto, faz-se necessário destacar o potencial dos fungos filamentosos que, em função de suas particularidades morfológicas e bioquímicas, encontram-se hoje em uma posição de destaque entre os estudos desta natureza.

A habilidade de produzir várias enzimas extracelulares hidrolíticas capazes de quebrar moléculas complexas como lignina, celulose, pectina, proteínas e outros polímeros, torna os

fungos degradadores muito eficientes. Devido à sua organização em hifas, são mais eficazes que as bactérias em colonizar e decompor macromoléculas. O contato superficial destas estruturas com o contaminante é amplo, aumentando sua biodisponibilidade e, conseqüentemente, apresentando uma biodegradação aumentada. Se comparados às leveduras, os fungos filamentosos são menos sensíveis às variações de nutrientes, aeração, pH e temperatura, crescendo em habitats inóspitos e ambientes extremos (DUPONT et al. 1998; JOBARD et al. 2010; LEITÃO, 2009).

Espécimes pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Phanerochaete*, *Fusarium* e *Trichoderma*, vêm se mostrando promissoras em estudos referentes à biodegradação de compostos xenobióticos e outros materiais de grandes moléculas como os plásticos (SANTAELLA et al. 2009; SHAH et al. 2008).

Aspergillus niger é um fungo filamentoso que cresce aerobiamente na matéria orgânica morta, sendo na natureza encontrado no solo e uma minoria em plantas em decomposição (SCHUSTER et al. 2002). É capaz de crescer na faixa de pH de 1,4 - 9,8, obtendo profusa produção de conídios que garantem sua dispersão pelo ar, habitando preferencialmente lugares quentes e úmidos (RIPPEL-BALDES, 1955). Causam um amplo espectro de infecções incluindo manifestações cutâneas, otomicoses e infecções invasivas como aspergilose pulmonar e endocardites (BALAJEE et al. 2007). Nos últimos 20 anos, tem sido utilizado industrialmente na produção de enzimas extracelulares e ácido cítrico, um acidulante de comidas, bebidas, geleias e vinhos (ROKAS et al. 2007). É utilizado também na biotransformação e tratamento de lixo (SCHUSTER et al. 2002).

Tal espécie e outras pertencentes ao gênero *Aspergillus* são capazes de deteriorar materiais como tintas a óleo e acrílica, papéis e materiais celulósicos como algodão e linho (STERFLINGER, 2010). Referente aos plásticos, diversos estudos são realizados no que diz respeito à biodegradação e/ou adesão. Dentre as espécies fúngicas mais abundantes em vários materiais poliméricos temos: *A. niger* (70%), *A. versicolor* (15%) e *A. fumigatus* (7%) (KURAKOV et al. 2008). Gumargalieva et al. (1999) mostraram que a perda do plastificante dialquil ftalato pelo PVC quando colonizado por *A. niger* ocorreu mais rapidamente se comparado ao filme sem crescimento microbiano. Grisa e colaboradores (2009) em análises realizadas com filmes de PVC comercial em célula de aterro sanitário, observaram intenso crescimento de *A. niger* e *Pseudomonas aeruginosa*, concluindo que o material polimérico sofreu alterações micro-estruturais com indicações de quebras oxidativas da cadeia polimérica.

As espécies de *Penicillium* podem colonizar diversos ambientes, sendo mais comuns em solos, comidas, bebidas e no ar (BANKE et al. 1997). São capazes de produzir celulase, mananase, e pectinase, além de enzimas extracelulares, tornando possível a degradação de vasto espectro de poluentes, desencadeando um importante papel na remediação de agentes no ecossistema (LEITÃO, 2009). Estirpes de *Penicillium* geralmente são halotolerantes, capazes de crescer na presença de sal (aproximadamente 15% de NaCl) (WOOLARD; IRVINE, 1995). Estudos recentes reportam a habilidade de tal gênero em mineralizar hidrocarbonetos como fenóis, compostos halogenados e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (LEITÃO, 2007; MELÉNDEZ-ESTRADA et al. 2006). Atuam como biossorventes na diminuição de metais pesados em soluções aquosas, podendo futuramente ser aplicados em tratamentos de esgoto e dejetos industriais (FAN et al. 2008). *Penicillium funiculosum* provoca biodeterioração em condições de umidade, sendo capaz de crescer em condições altamente ácidas, como por exemplo, em ácido cítrico puro (PITT, 1991).

Fujii e Takeshi (2007) selecionaram 25 estirpes de *Penicillium* capazes de degradar resíduos de café. Há também estudos referentes à degradação de dejetos de indústrias de oliva com a linhagem *Penicillium* P4 e de resíduos de destilarias por *Penicillium decumbens* (JIMÉNEZ et al. 2006; ROBLES et al. 2000). Ao estudarem a degradação do polietileno por *P. simplicissimum*, Yamada-Onodera et al. (2001) observaram que as hifas deste fungo foram mais eficazes em degradar o polímero se comparadas aos esporos. Kurakov et al. (2008) avaliaram 900 materiais poliméricos sintéticos observando que o gênero *Penicillium* está dentre as espécies fúngicas mais abundantes depois do gênero *Aspergillus*: *P. aurantiogriseum* (31%), *P. melinii* (16%) e *P. chrysogenum* (24%).

Chaetomium globosum pertence ao filo *Ascomycota*, família *Chaetomiaceae*, descrito por Kunze em 1817. Constitui um dos maiores gêneros de ascomicetos sapróbios, abrangendo mais de 300 espécies por todo o mundo (RODRÍGUEZ et al. 2002; VON ARX et al. 1986). Espécies de *Chaetomium* são conhecidas por serem coprófilas, habitarem sementes, solo e compostos orgânicos (SOMRITHPOL, 2004). De acordo com Von Arx et al. (1986) e Seth (1970), a identificação destas se dá pela morfologia, forma e tamanho do asco e ascósporos, tipo de filamentos terminais e laterais ou ainda ascomatais (liso, enganchado, espiralado, enrolado). A formação de peritécio e ascósporos por este fungo é favorecido em meio ácido, sendo inibido em condições alcalinas em meios artificiais (FOGLE et al. 2008).

Os fungos deste gênero destacam-se pela produção de metabólitos secundários tais como derivados de benzoquinona, ergosterol, ergosteril palmitato, crisofanol, quetoglobosina C, éter alternariol monometil e isoquetoglobosina D (KANOKMEDHAKUL et al. 2001).

Novos compostos têm sido relatados na literatura, como a antraquinona-cromanona, nomeado de quetomanona e as azafilonas, chamadas de rotiorinols A-C (KANOKMEDHAKUL et al. 2006). Em condições adversas as quetominas e quetoglobosinas A e C produzidas podem ser letais aos mamíferos pois inibem a divisão celular, locomoção, formação de projeções de superfície e transporte de glicose. Estudos com quetoglobosina A em roedores mostraram que esta pode matar mesmo em doses baixas (FOGLE et al. 2008; UENO, 1985). Recentemente as quetoglobosinas C, F, E, e penocalasina A, além da nova chaetoglobosina U, foram também isoladas de uma cepa endofítica de *C. globosum*. Novas quetoglobosinas continuam a ser identificadas de fungos de solo e marinhos (MOMESSO et al. 2008).

Este gênero possui espécies consideradas ótimas decompositoras de celulose e outros materiais orgânicos, atuando como antagonistas de fitopatógenos e micro-organismos do solo (SOYTONG, 2001; AGGARWAL et al. 2004). Estudos em superfícies de PVC e borracha realizados por Lugauskas e colaboradores (2003), apontaram a presença de quatro espécies fúngicas dominantes, dentre elas, *C. globosum*, *Mortierella isabellina*, *Paecilomyces puntonii* e *Penicillium expansum*.

O gênero *Trichoderma* é constituído por um grupo heterogêneo de fungos em grande parte classificados como Hypocreales. São ascomicetos ubíquos encontrados comumente na agricultura, nos campos, florestas, solos salinos e desertos, prevalentes em camadas húmicas das florestas, onde representam até 3% de todos os propágulos fúngicos (KLEIN; EVELEIGH 1998; PAPAVIZAS 1985). Recentemente, foram encontrados em materiais de construção, danificados pela água ou poeira e nos hospitais.

Muitas espécies de *Trichoderma* são consideradas saprófitas superiores capazes de atacar enzimaticamente e metabolizar vasta gama de substratos, levando-os a serem explorados na indústria e agricultura. Devido às habilidades antagônicas contra fungos fitopatógenos têm sido utilizado como controlador biológico, uma vez que as espécies deste gênero representam um terço das empregadas no biocontrole de patógenos de plantas (HARMAN et al. 2006).

Espécies do presente gênero são capazes de degradar alguns compostos: hidrocarbonetos, clorofenóis, polissacarídeos, xenobióticos e pesticidas, conferindo habilidades potenciais para sua utilização na bioremediação de contaminações em solo e água (HARMAN et al. 2004). Diferenciam-se com base em suas características macroscópicas (coloração do conídio, modelo de esporulação e superfície da colônia) e microscópicas (estrutura e arranjo das fiálides, tamanho e forma do conídio) (YU et al. 2007).

Trichoderma virens caracteriza-se por apresentar crescimento rápido, esporulação abundante e produção de conídios com tempo de vida longo (KLEIN; EVELIGH, 1998). Aspectos ecológicos peculiares fazem dessa espécie uma candidata atrativa para a biorremediação e o biocontrole. Isso se deve à capacidade de metabolizar uma impressionante quantidade de substratos incluindo toxinas (PAPAVIZAS, 1985; WEAVER; KENERLEY, 2008). Diversas espécies produzem polissacarases, gliotoxina e viridina, porém esta produção é maior em *Trichoderma virens* (FRISVALD; THRANE, 2002). Outros metabólitos bioativos do gênero incluem um número pequeno e frequente de pironas voláteis e lactonas, peptídeos ativos de membrana, proteínas citotóxicas capazes de inativar ribossomos, isonitrilas e numerosos metabólitos de baixa massa molar (CLAYDON et al. 1987; FAULL et al. 1994; LIN et al. 1991).

Devido à produção de inúmeros metabólitos, vários estudos em biodegradação de plásticos e outros materiais são realizados com a finalidade de diminuir a quantidade de materiais poliméricos dispostos no ambiente. Weiland et al. (1995), estudaram a biodegradação de polietileno termicamente oxidado, tendo o cobalto como pró-oxidante. Utilizaram uma cultura mista de quatro esporos de fungos (*Aspergillus niger*, *Penicillium funiculosum*, *Paecilomyces variotii* e *Gliocladium virens*), concluindo que a massa molar do polímero diminuiu em relação ao crescimento do fungo nos filmes.

Paecilomyces variotii Bainier é um ascomiceto comumente encontrado em solos, ambientes internos, plantas, animais e alimentos pasteurizados. Apresenta crescimento rápido, sendo termotolerante e capaz de crescer em baixos níveis de oxigênio. Suas hifas, conídios e ascósporos são de parede espessa, conferindo resistência ao calor (HOUBRAKEN et al. 2006).

Algumas aplicações industriais têm sido propostas como produção de tanase e biofiltração de tolueno (BATTESTIN; MACEDO, 2007). Houbraken e colaboradores (2008) em seus ensaios observaram a possibilidade de resistência dos ascósporos ao calor em alimentos crus. Lugauskas et al. (2003) testaram espécies de *Chaetomium globosum*, *Aspergillus ustus*, *Cladosporium cladosporioides*, *Paecilomyces variotii*, *Penicillium frequentans* e *Trichoderma viride*, em materiais poliméricos como o PVC, plásticos orgânicos siliconados, poli-imidas, borrachas e fluoroplásticos, obtendo crescimento expressivo desses micro-organismos. Isso ocorre devido à liberação de metabólitos agressivos causando a degradação dos materiais.

Na natureza, várias espécies de fungos lignocelulolíticos do filo Basidiomycota crescem sobre a madeira em decomposição e outros resíduos de origem vegetal. Em geral sapróbios,

podem ser ocasionalmente fitopatógenos, ocorrendo em quase todos os ecossistemas naturais e modificados, sendo mais abundantes em áreas com maior concentração de árvores mortas ou disponibilidade de resíduos agrícolas (BONONI et al. 2008).

Os fungos da podridão branca são assim denominados devido a sua capacidade em degradar lignina, retirando a pigmentação marrom associada a este biopolímero, mineralizando-a eventualmente até CO₂ e H₂O (KUMAR et al. 1983; SINGH; CHEN, 2008). Destacam-se as espécies *Pleurotus pulmonaris*, *Pleurotus sapidus*, *Phlebia radiata*, *Phlebia tremellosa* e *Phanerochaete chrysosporium*, sendo esta última a mais conhecida e de maior aplicação biotecnológica. Culturas de *P. chrysosporium* Burdsall 1974 apresentam crescimento significativo, produzindo enzimas degradadoras de ligninas cloradas em efluentes de papel moído e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (Tabela 5) (MARTINS et al. 2001). Tal fato ocorre devido à inespecificidade do sistema enzimático extracelular desse fungo, permitindo a utilização numa ampla variedade de poluentes orgânicos (RABINOVICH et al. 2004).

Tabela 5. Propriedades biológicas de *Phanerochaete chrysosporium*

Degradação	Produto produzido
Pinheiros, palhas e ligninas alcalinas	Lignina peroxidase
Polpa e efluentes de papel moído	Manganês peroxidase
Descoloração de efluentes têxteis	Peroxidase
Triclorofenol, pentaclorofenol, tolueno	Xilanase
Vermelho Congo, atrazina, amaranço	Celulase
Azo corantes	Succinimidas
DDT, benzeno, tolueno, xileno	Álcool aril-dehidrogenase
Ácido húmico	Celobiose dehidrogenase

Fonte: SINGH; CHEN, 2008

A atividade biodegradatória da estirpe de *P. chrysosporium* CCB 478 (ATCC 28326) utilizada no presente estudo também foi avaliada por Campos (2008) em filmes de PVC e PCL previamente tratados com o calor. Para a mesma estirpe, estudos relacionados à atividade enzimática deste basidiomiceto foram desenvolvidos por Machado et al. (2005). Argôlo et al. (2003) avaliaram a capacidade de degradação de uma estirpe de *P. chrysosporium* em filmes poliméricos de polietileno de baixa densidade (PEBD e PEBD/amido). Nas condições desenvolvidas nos experimentos, a cultura apresentou maior desempenho para os filmes estudados, do que o fungo *Talaromyces wortmannii* (Klöcker) C.R. Benjamin, por um período de 7 dias. Yamada et al. (2006) observaram que a utilização da palha de trigo como fonte de carbono para a obtenção de filtrado contendo enzimas ligninolíticas mostrou-se como o melhor indutor de crescimento da estirpe *P. chrysosporium* BKM1767 (ATCC 24725). Esta

mesma foi empregada em estudos de degradação de compostos fenólicos por Falconi (1998). *P. chrysosporium* NRRL 6359 e NRRL 6361 foram testadas quanto à produção de enzimas degradadoras de resíduos agrícolas, tais como: bagaço de cana tratado e não tratado, palha de trigo, sabugo de milho, cascas de arroz, cascas de amendoim e celulose em pó. O pH ótimo para produção de celulase foi de 5,5 com palha de trigo e 6,5 com bagaço de cana tratado. Para produção de glucanase, entre 6,5 e 7,5 enquanto para a xilanase, o pH ótimo esteve em torno de 4,5 – 5,5 para todos os substratos num período de incubação de 7 dias (ABD EL-NASSER et al. 1997).

Recentemente os ensaios comprovaram a eficiência de remoção de materiais como a carboximetilcelulose, pectina, lã de vidro e o ca-alginato por este fungo (YONG LU et al. 2009). Estudos envolvendo *P. chrysosporium* inoculado em poliolefinas, como PP e PE misturadas em diferentes proporções de lignina, apresentaram considerável eficiência de degradação (MIKULASOVA et al. 2001). A poliamida-6, um análogo do PCL, quando exposta ao *Phanerochaete*, apresentou adesão às fibras, reduzindo a massa molar do polímero a 50% e o seu grau de cristalinidade após três meses de incubação. As amostras testadas apresentaram rachaduras e perda de características físicas, além de estarem demasiadamente fragmentadas (KLUN et al. 2003). Yong Lu e colaboradores (2009) obtiveram uma eficiência de remoção de compostos fenólicos e demanda química de oxigênio por *P. chrysosporium* de 87,05% e 72,09%, respectivamente, em 6 dias.

Dessa forma, o conjunto desses estudos demonstrou a atuação expressiva de diversos fungos específicos na biodegradação/biodeterioração de vários polímeros tecnologicamente importantes.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Polímeros

Poli (cloreto de vinila) (Sigma-P-9401) - M_w : 73,491, T_g : 82°C; T_f : 180°C.

Poli (ϵ -caprolactona) (Solvay-K-6800) - M_w : 85.000g/mol; T_g : -71°C; T_f : 60°C.

4.2 Preparo dos Filmes

A partir dos polímeros em pó, foram preparados filmes de PVC e PCL com massa de 0,2 g cada, obtidos por evaporação de soluções diluídas de 15 mL de 1,2-dicloroetano (*casting*) a 60°C, com agitação magnética constante, por 30 minutos. Posteriormente foram colocados em placas de Petri para secagem em estufa com temperatura e vácuo controlados, 45°C e 0,5 mmHg respectivamente, para a evaporação do solvente (Figura 13). Os filmes assim obtidos foram mantidos por dois dias em dessecador a vácuo e recortados de maneira a serem obtidas quatro amostras.



Figura 13. Preparo dos filmes de PVC e PCL por evaporação.

4.3 Amostras dos polímeros

Piloto 1 e 2

Com auxílio de agulha esterilizada, amostras poliméricas foram numeradas a quente, pesadas em balança analítica e esterilizadas sob luz ultravioleta germicida (Philips 15w, 254nm) por 15 minutos cada face.

Ensaio 1-4

Foram mantidos os mesmos procedimentos de enumeração a quente e pesagem empregados nos Pilotos 1 e 2, havendo modificações no método de esterilização. Foi adotada a metodologia segundo a ASTM D- 6288-98, com imersão das amostras em hipoclorito de sódio 3% durante 30 minutos e posterior lavagem com água destilada esterilizada.

4.4 Teste de resistência ao ataque fúngico (ISO 846-1978)

Para a realização dos testes empregados (Tabela 6), foram adquiridas da Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia André Tosello as estirpes que compõem o consórcio fúngico: *Aspergillus niger* (ATCC 9642), *Penicillium funiculosum* (ATCC 11797), *Chaetomium globosum* (ATCC 16021), *Trichoderma virens* (ATCC 9645) e *Paecilomyces variotti* (ATCC 16023). A estirpe de *Phanerochaete chrysosporium* CCB 478 foi gentilmente fornecida pela seção de Micologia e Liquenologia do Instituto de Botânica - SP, Brasil.

Tabela 6. Testes empregados na norma

Teste para crescimento (A)	Teste para efeito fungistático (B)
Expõe a amostra a certo consórcio de esporos em meio incompleto, obrigando o fungo a degradar o polímero, uma vez que não há outra fonte de carbono.	Submete-se a amostra ao consórcio de esporos em meio completo, verificando se os metabólitos secundários produzidos pelo crescimento do fungo atacam o polímero. Havendo inibição do crescimento fúngico, indica-se efeito fungistático do polímero sobre o micro-organismo.

4.5 Manutenção das culturas

As estirpes foram preservadas em tubos inclinados de ágar malte 2%, mantidos a 10°C e em *ultrafreezer* mediante a técnica de criopreservação a -80°C. Nesta, microtubos de 2 mL e pérolas de vidro (3 mm diâmetro) foram esterilizados em autoclave, a 1 atm, a 121°C, por 15 minutos. Em seguida foram etiquetados em duplicata, sendo dois microtubos para cada estirpe a ser preservada. Em cada microtubo, foram adicionados 300 µL de caldo de malte 2% esterilizado. Os fungos a serem estocados foram cultivados nos microtubos por 7 dias. Após, foi adicionado 300 µL de glicerol 30% e agitado vigorosamente em vortex por 10 segundos e, logo após, foram adicionadas 12-15 pérolas de vidro de 0,2-0,3 mm de diâmetro até cobrir todo o volume de glicerol. Em seguida, os microtubos foram congelados por 2 horas a -20°C antes de serem transferidos para os *ultrafreezers* a -80°C. As duplicatas foram guardadas em caixas e *freezers* separados, para garantir uma cópia de segurança para cada estirpe (modificado de CBS, 2010).

4.6 Condições de cultivo

Os fungos foram repicados em placas de Petri contendo o ágar específico para cada espécie e posteriormente mantidos em ágar estoque (ANEXO B), incubados por quinze dias em estufa bacteriológica a 28°C para quantificação de unidades formadoras de colônias (UFC).

4.7 Quantificação de unidades formadoras de colônias

A contagem microbiana foi realizada por contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) em câmara de Neubauer. Para o teste de crescimento, as superfícies das colônias foram cobertas com 5 mL de solução dispersante de sais minerais (ANEXO B) e para o teste de efeito fungistático, 5 mL de solução dispersante de sais minerais adicionado de glicose (ANEXO B) realizando-se esfregaços delicados com alça de platina esterilizada. A câmara foi preparada com uma lamínula, sendo contabilizados os esporos da parte central, de maneira que fossem obtidos em torno de 10^6 esporos/mL. Esta operação foi repetida para cada estirpe fúngica, antes de se obter a suspensão mista final.

4.8 Montagem do experimento

Três amostras de polímeros foram colocadas sobre o meio completo e três sobre o meio incompleto (ANEXO B) (uma por placa de meio), permanecendo uma parte do polímero como amostra reserva, mantida em envelope de papel, em ambiente escuro. Individualmente as amostras dos polímeros (PVC e PCL) foram mergulhadas em 25 mL de suspensão de esporos com concentração de 10^6 esporos por 15 segundos e deixados em repouso fora da suspensão por 5 segundos a fim de evitar o excesso de inóculo. Posteriormente foram inoculados em duas placas contendo ágar completo e duas de ágar incompleto. As duas placas restantes (uma de meio completo e outra de meio incompleto) foram inoculadas com polímeros imersos em água destilada esterilizada, para verificação de possível hidrólise. Estas foram acondicionadas em aquários de vidro contendo água destilada e prateleiras esterilizadas, totalizando três câmaras úmidas: controle, *pool* e *Phanerochaete chrysosporium*, todas vedadas com filme de PVC MagicPack®, incubadas em estufa bacteriológica a 28°C variando-se a quantidade de dias de permanência (Figura 14).

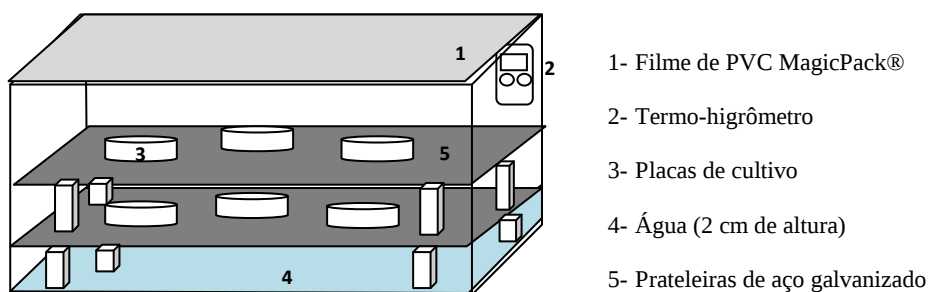


Figura 14. Esquema da câmara úmida utilizada no teste de biodegradação.

Em cada aquário a temperatura e umidade foram aferidas com auxílio de um termohigrômetro digital (Marca: Equitem). Esse procedimento foi realizado em triplicata com o fungo *P. chrysosporium* e com o consórcio de fungos. (Figura 15).

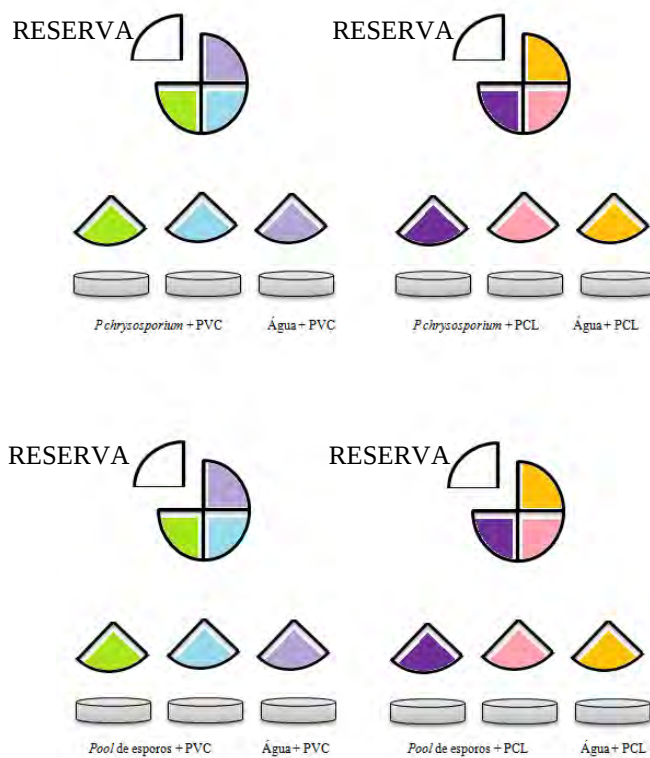


Figura 15. Esquema do tratamento microbiano em meio sólido

4.9 Avaliação da ação fúngica

A inspeção foi realizada a olho nu e sob estereomicroscópio quando necessário. Por meio de microscopia óptica estabeleceram-se comparações entre os filmes originais e biotratados.

4.10 Análise de coloração

As amostras foram analisadas segundo alteração de cor a olho nu, após testes microbianos em comparação com as amostras originais. As imagens foram registradas mediante fotos digitais.

4.11 Perda de massa

Os filmes antes e após o tratamento microbiano foram aferidos em balança analítica, sendo a degradação microbiana expressa como porcentagem de perda de massa segundo Fórmula 1 (DARWIS et al. 1998):

$$\text{Perda de Massa (\%)} = (W_0 - W_1) / W_0 \times 100\% \quad (\text{Fórmula 1})$$

Onde: W_0 = massa do filme original

W_1 = massa do filme após tratamento microbiano

4.12 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura dos filmes foi realizada no Laboratório de Microscopia da UNESP - Rio Claro. As micrografias foram obtidas no microscópio Philips modelo 505, a 10-12KV, sob aumentos diversos. Os filmes originais e biotratados foram recortados e acoplados nos *stubs* com fita dupla face (Marca 3M) e recobertos com ouro em câmara de vácuo, utilizando o metalizador Balzers modelo SCD050, com *sputtering*.

Com a finalidade de aprimorar e adequar-se à metodologia empregada, foram realizados dois experimentos pilotos e posteriormente quatro ensaios de biodegradação.

4.13 Pilotos

O Piloto 1 foi montado em aquário com prateleiras de papelão, previamente esterilizadas em autoclave a 1 atm, a 121°C, por 15 minutos. Os filmes de PVC e PCL já inoculados na suspensão de esporos de *P. chrysosporium* foram incubados em placas de Petri destampadas contendo os meios completo e incompleto. O mesmo processo foi realizado com o consórcio. Os ensaios com o *P. chrysosporium* e o consórcio de fungos permaneceram em estufa com umidade e temperatura controladas diariamente em intervalos de três a quatro horas. Com a finalidade de erradicar a contaminação obtida no Piloto 1 (Figura 16 A), as câmaras úmidas foram montadas com prateleiras de aço galvanizado, dentro de um aquário (Figura 16 B). Todo o ensaio com o *P. chrysosporium* e o consórcio de fungos, incluindo montagem das prateleiras e a disposição das placas de Petri destampadas foi realizado assepticamente no interior da câmara de fluxo laminar.

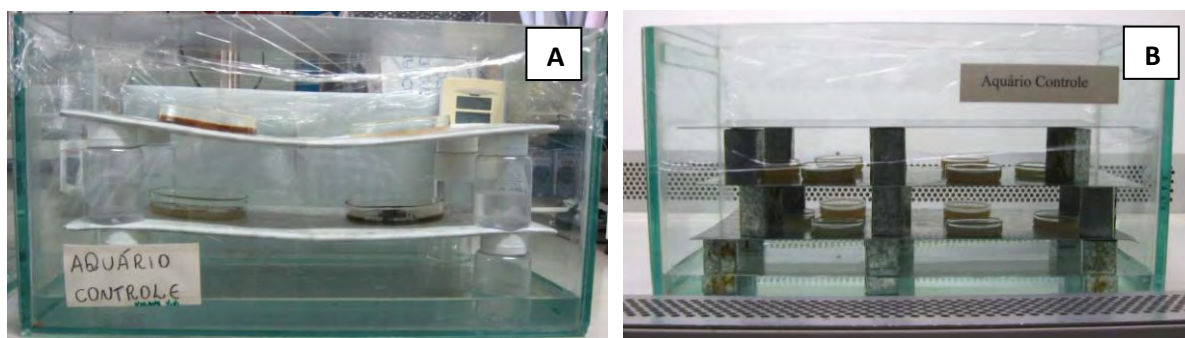


Figura 16. (A) Aquário com prateleiras de papelão (Piloto 1) e (B) aquário montado no interior da câmara de fluxo laminar (Piloto 2).

Após montagem, tais câmaras foram mantidas por 20 dias em estufa bacteriológica sob controle diário de temperatura e umidade (Figura 17).



Figura 17. Incubação das câmaras úmidas em estufa.

4.14 Ensaios

O Ensaio 1 com o fungo *P. chrysosporium* e o consórcio foi realizado com polímeros de PVC e PCL inoculados na suspensão de esporos pertinente a cada tratamento, incubados em placas de Petri descartáveis e tampadas contendo meio completo e incompleto (Figura 18 A). A fim de diminuir a incidência de contaminantes, o Ensaio 2 foi realizado com filmes de PVC e PCL inoculados apenas na suspensão de esporos do consórcio, também em placas descartáveis tampadas contendo os dois meios de cultivo (Figura 18 B). Para o Ensaio 3 incubou-se os filmes de PVC e PCL apenas com a suspensão do fungo *P. chrysosporium* em meio completo, em placas descartáveis tampadas (Figura 18 C). Por fim, o Ensaio 4, deu-se

com o fungo *P. chrysosporium* em filmes de PVC e PCL incubados em meio incompleto (Figura 18 D). Vale ressaltar que a montagem e manipulação dos ensaios foram realizadas no interior câmara de fluxo laminar. Todos os ensaios permaneceram incubados por um período de 30 dias em estufa bacteriológica a 28°C.

Durante a realização dos experimentos, observou-se o crescimento de outros fungos além daqueles envolvidos no consórcio em estudo. Tais espécies fúngicas que se desenvolveram nas amostras dos polímeros (PVC e PCL), a princípio consideradas contaminantes, foram isoladas e repicadas em BDA (Batata Dextrose Agar), incubadas em estufa bacteriológica à 28°C por aproximadamente 7 dias, para posterior identificação. Para a observação das estruturas reprodutivas utilizou-se a técnica de cultura em lâmina ou microcultivo (KERN et al. 1999). As estruturas foram coradas com lactofenol azul de algodão e analisadas ao microscópio óptico. A identificação dos isolados foi realizada de acordo com a literatura especializada (DOMSCH et al. 1983). As culturas foram preservadas em ágar batata inclinado a 4°C, para futuros estudos.

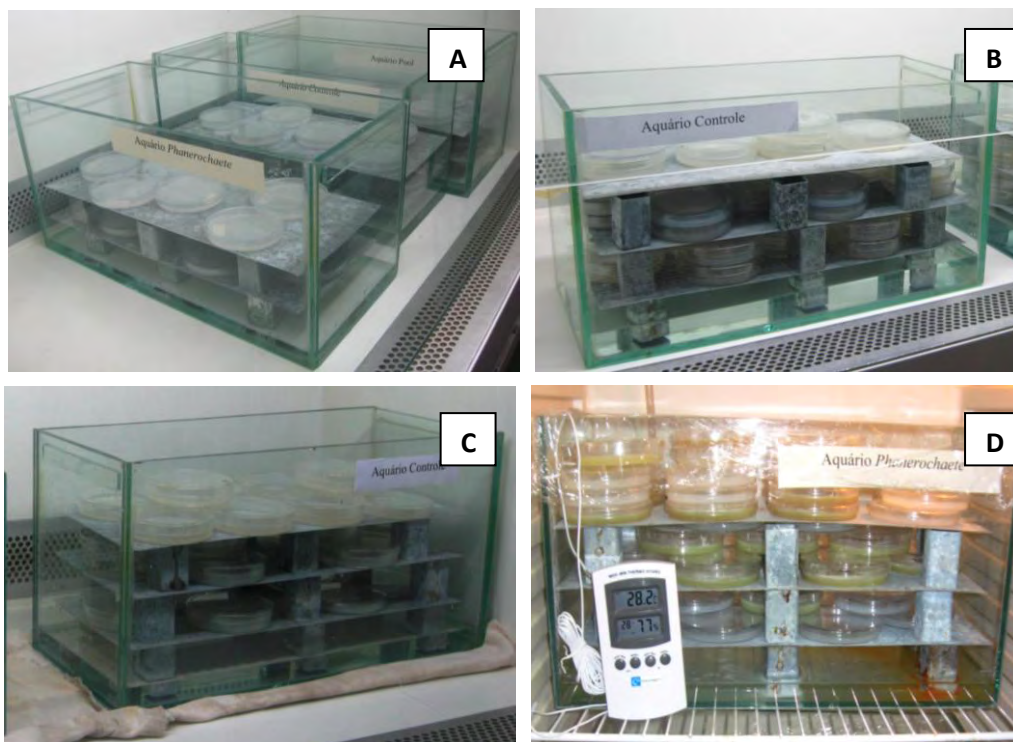


Figura 18. Aquários montados no interior da câmara de fluxo laminar. (A) Ensaio 1, (B) Ensaio 2, (C) Ensaio 3, e (D) Ensaio 4 incubados em estufa bacteriológica por 30 dias.

4.15 Análise estatística

Para avaliar a eficiência de degradação do consórcio de fungos em comparação às estirpes fúngicas isoladas e também os diferentes meios de cultivo empregados, teve-se como base os dados de perda de massa. A comparação entre os grupos experimentais foi realizada por meio do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, utilizando-se o programa estatístico BioEstat, versão 5 (2008) considerando diferenças significativas quando o valor de p foi menor que 0,05 ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Piloto 1

O crescimento das estirpes do consórcio foi maior em polímeros de PCL (Figuras 19 A e B), onde o crescimento fúngico deu-se por todo o filme do que no PVC, onde houve crescimento apenas nas bordas e numerações (Figuras 19 C e D). As setas indicam as regiões onde o crescimento fúngico foi mais evidente. Verificou-se que não houve crescimento evidente do fungo *P. chrysosporium*.

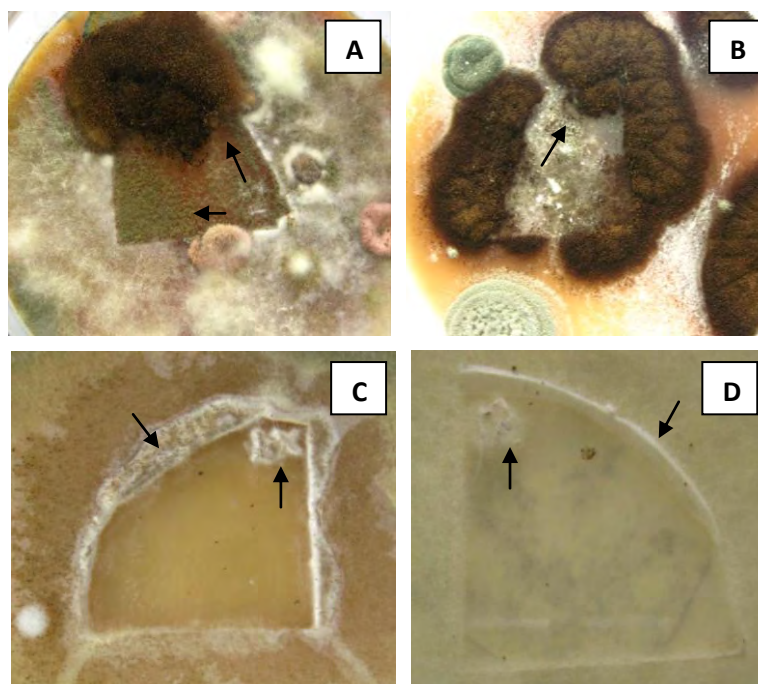


Figura 19. (A e B) filme de PCL em meio completo, (C) PVC em meio completo e (D) PVC em meio incompleto. Setas apontam os locais de crescimento dos fungos.

De acordo com Klemchuk (1990), polímeros puros sintéticos biodegradáveis são difíceis de ser degradados, pois sua hidrofobicidade natural tende a inibir a atividade enzimática dos micro-organismos. A boa porosidade do PCL facilita a permeabilidade de água no polímero, em consequência, realiza a hidrólise e aumenta o nível de degradação (ROSA et al. 2009). Por se tratar de um poliéster sintético derivado do petróleo cru, o PCL pode ser degradado por micro-organismos de ecossistemas marinhos, solo e esgotos. Esse processo ocorre graças à secreção de enzimas como lipases, esterases e despolimerases extracelulares, permitindo que bactérias e fungos utilizem o PCL como nutriente (ELDSÄTER et al. 2000).

Análises sob estereomicroscópio confirmaram as realizadas a olho nu: em meio completo com PCL houve crescimento mais expressivo dos fungos *Aspergillus niger* e

Penicillium funiculosum, pigmentando o ágar e em meio incompleto, *Chaetomium globosum* foi mais expressivo. A norma ASTM G21 sugere que as espécies: *Penicilium pinophilum*, *Gliocladium viriens*, *Aspergillus niger*, *Chaetomium globosum* e *Aureobasidium pullulans* podem utilizar os polímeros como substrato. No estudo de Gracida et al. (2010), *Penicillium funiculosum* apresentou melhor desempenho durante a biodegradação de poli (hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) (PHBV) e poli (metacrilato de 2-hidroxietil) (PHEMA). Isso se deve às enzimas extracelulares produzidas por várias espécies de *Penicillium* capazes de degradar poliésteres, como é o caso do PCL do presente estudo (LEITÃO, 2009).

Foram realizadas comparações de mudanças morfológicas e colorimétricas entre os filmes originais e biotratados com microscopia óptica do PVC (Figura 20) e PCL (Figura 21). Em nível micro e macroscópico não foi possível inferir sinais de deterioração nos filmes de PVC. Setas indicativas mostram a adesão de hifas (Figura 20 B) e esporos (Figura 20 D).

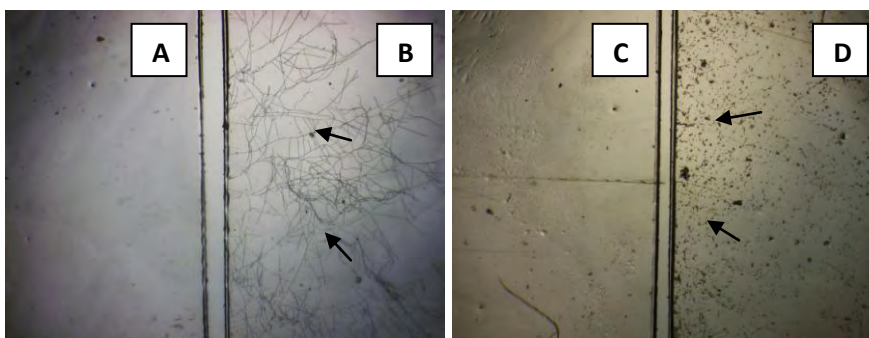


Figura 20. Micrografias ópticas de filmes de PVC: (A e C) original (sem tratamento) e (B e D) biotratados por 20 dias: (B) com hifas aderidas e (D) com esporos. Aumento de 20x. Setas indicam estruturas fúngicas aderidas aos filmes.

Ao analisar macroscopicamente as amostras biotratadas de PCL observou-se que estas se tornaram mais opacas e quebradiças. Variações na coloração e morfologia (Figuras 21 B e D), como poros (setas) e rachaduras (Figura 21 F) (setas) puderam ser vistas após 26 dias de exposição aos fungos.

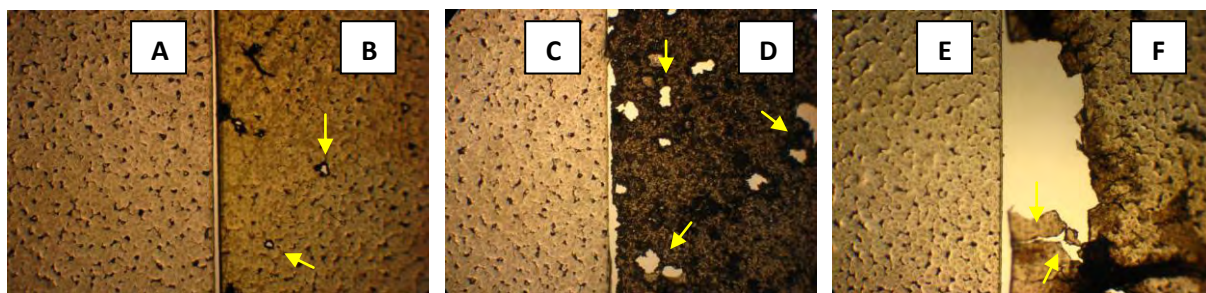


Figura 21. Micrografias ópticas de filmes de PCL: (A, C e E) original (sem tratamento) e processos deteriorativos em: (B) biotratados por 20 dias com amarelamento e poros, (D) biotratados por 20 dias com enegrecimento e poros e (F) biotratados por 20 dias com rachadura. Aumento de 20x. Setas apresentam mudanças morfológicas dos filmes.

Nossos resultados concordam com os propostos pela literatura, nos quais a deterioração dos polímeros pode ocasionar transparência da amostra, amarelamento, presença de esporos de fungos e fragmentos de hifas. Segundo Flemming (1998), mudanças na cor são atribuídas à colonização de micro-organismos e excreção de pigmentos microbianos lipofílicos, iniciando a biodegradação. Os fragmentos das moléculas produzidas podem ser metabolizados pelos fungos e a formação de poros na superfície do material polimérico é o resultado da atividade microbiana (EL-AGHOURY et al. 2006).

Mediante as análises de MEV, verificou-se que a amostra de PVC original (Figura 22 A) apresentou poros (setas), formados devido à saída de ácido clorídrico da superfície polimérica, bem como constatado pelos estudos de CAMPOS (2008). Estabelecendo comparações entre este último e a amostra biotratada, observou-se que o tratamento microbiano ocasionou mudanças morfológicas no polímero devido à adesão de hifas fúngicas e esporos (Figura 22 B e C) (setas) tais como crateras e erosões na superfície polimérica (Figura 22 D) (setas). Como conseqüências do ataque microbiológico surgem tais mudanças na superfície polimérica acima citada. A deterioração e/ou erosão da superfície polimérica é um processo interfacial, que depende fortemente dos parâmetros ambientais (FLEMMING, 1998).

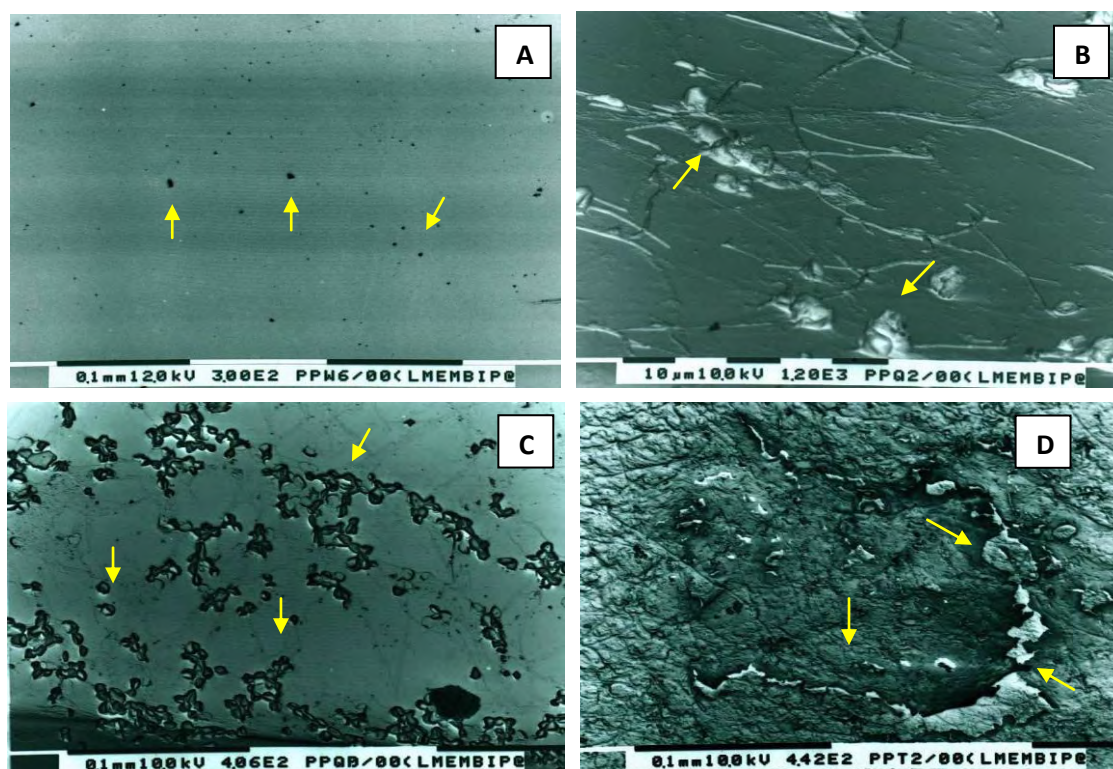


Figura 22. MEV dos filmes de PVC: (A) original e (B) biotratados por 20 dias com adesão de hifas, (C) biotratados por 20 dias com esporos e (D) biotratados por 20 dias com erosão. Setas apontam poros, hifas e esporos aderidos e região biodegradada.

A Figura 23 A apresenta a amostra de PCL original com superfície lisa e arranjo uniforme dos esferulitos. Ao observarmos os filmes biotratados por 20 dias, constatamos mudanças morfológicas mais intensas tais como: degradação superficial dos esferulitos (Figura 23 B); formação de poros (Figura 23 C) (setas); presença de hifas por toda a extensão do filme (Figura 23 D) (setas); presença de hifas e esporos corroborando para ou aumento dos poros (Figura 23 E) e de rachaduras (Figura 23 F). Bardi e Rosa (2007) em solo simulado verificaram que a morfologia do PCL influencia na biodegradação, visto que o mesmo se apresenta com esferulitos e ondulações, favorecendo a ação microbiana e absorção de água, observações estas confirmadas neste estudo.

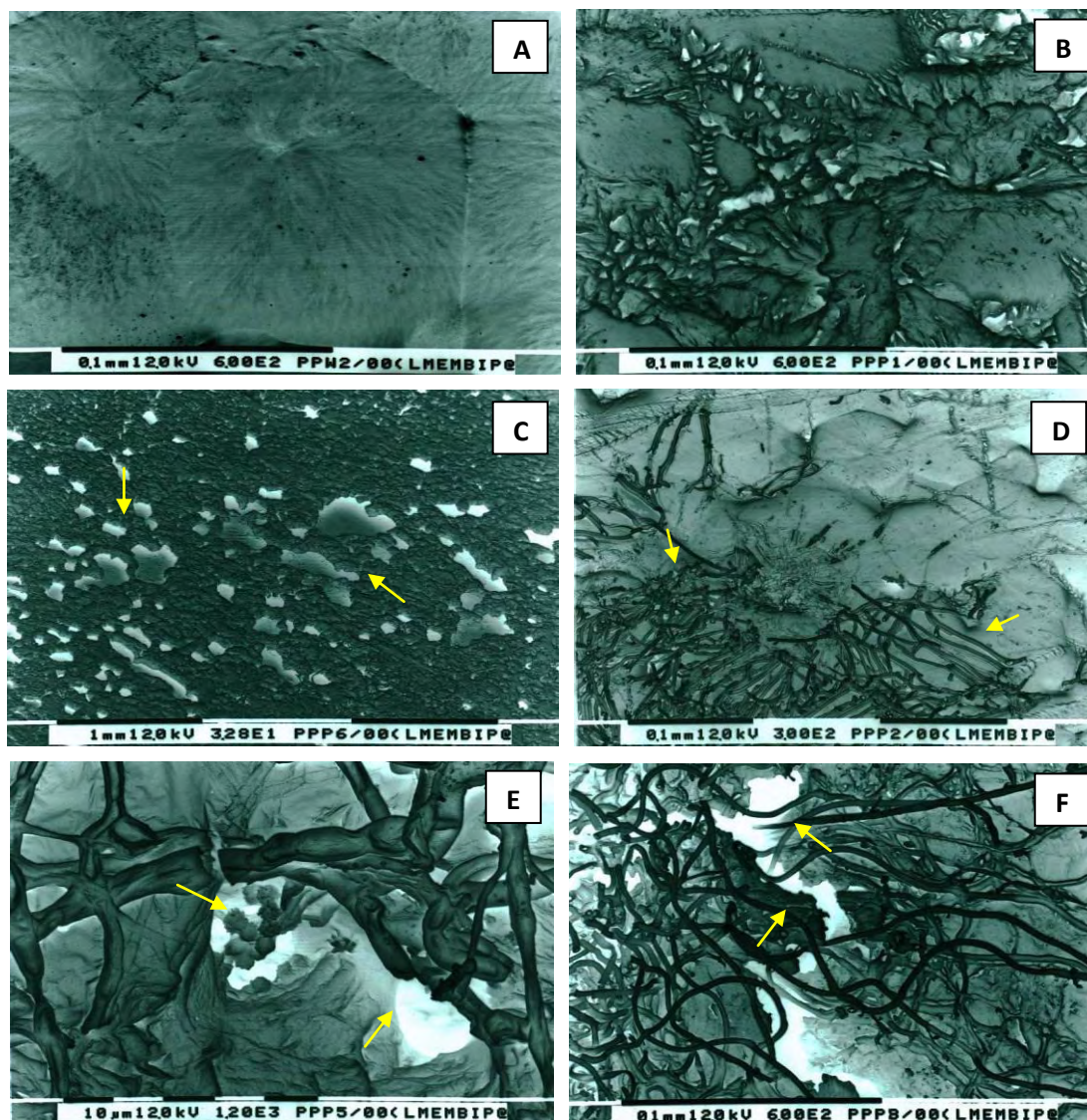


Figura 23. MEV dos filmes de PCL: (A) original e (B) biotratados por 20 dias com erosão superficial dos esferulitos, (C) biotratados por 20 dias com formação de poros, (D) biotratados por 20 dias com adesão de hifas, (E) biotratados por 20 dias com esporos e hifas no poro e (F) biotratados por 20 dias com presença de hifas em rachaduras. Setas indicativas de formação de poros e adesão de estruturas fúngicas.

5.2 Piloto 2

Semelhante ao ensaio anterior, o crescimento do fungo sobre os filmes de PCL ocorreu em toda a extensão do filme (Figura 24 A), formando uma camada densa em muitos casos. Nas placas com PVC e PCL em meio completo prevaleceu o crescimento de espécies como *Penicillium funiculosum*, *Aspergillus niger*, pigmentando o ágar, e em menor frequência, *Chaetomium globosum*. A estirpe *C. globosum* ATCC 16021 apresentou crescimento pioneiro nas placas com PCL em meio incompleto. No PVC observou-se apenas micélio nas bordas do polímero e sobre os números dos filmes, marcados com calor (Figuras 24 B, C e D). Mais uma vez, não houve crescimento de *P. chrysosporium*.

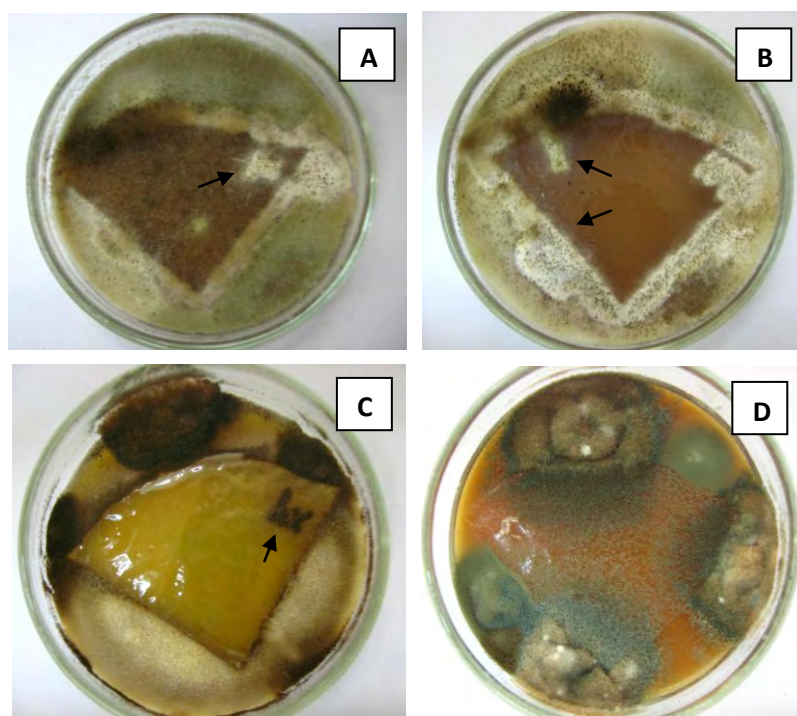


Figura 24. (A) filme de PCL e (B, C e D) de PVC em meio completo. Locais de crescimento fúngico indicados por setas.

A presença de grupos ésteres no PCL é fundamental para a ação microbiana, isto é, hidrólise enzimática dos ésteres, semelhante a outros trabalhos da literatura (MARTINS-FRANCHETTI et al. 2008; SHAH et al. 2008). O crescimento de *C. globosum*, *Penicillium funiculosum* e *Aspergillus niger* em filmes de PCL e em alguns de PVC infere que estes materiais não são completamente resistentes ao ataque de fungos, levando ao desenvolvimento dos mesmos. Benedict et al. (1983) também conseguiram resultados promissores com as estirpes de *Aspergillus fischeri*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium funiculosum*, *Chaetomium globosum* e *Fusarium* sp., obtendo a biodegradação de PCL.

Observações realizadas a olho nu não apontaram nenhuma mudança morfológica nas amostras de PVC, ao contrário das de PCL, que se apresentaram opacas e quebradiças. As comparações entre os filmes originais e biotratados quanto à mudança na morfologia e coloração do PVC e PCL estão apresentadas nas Figuras 25 e 26, respectivamente. No PVC foi observada a adesão de peritécios do fungo *C. globosum* e hifas (Figuras 25 B e D) (setas), nos filmes.

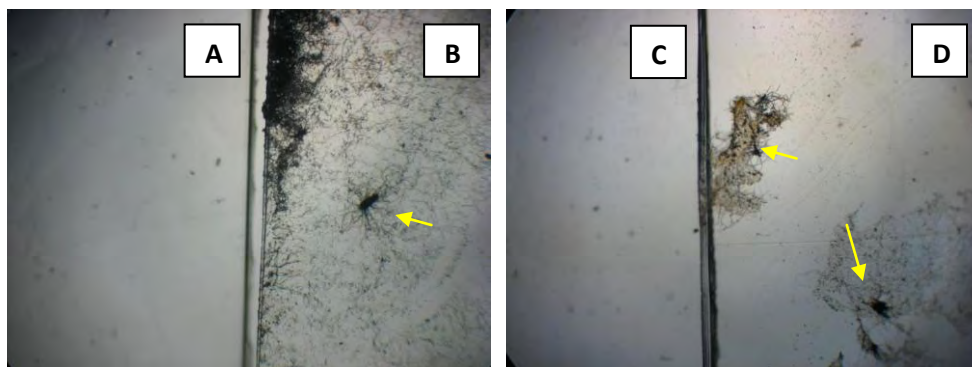


Figura 25. Micrografias ópticas de filmes de PVC: (A e C) original (sem tratamento) e (B e D) biotratados por 20 dias: (B) com peritécio de *Chaetomium globosum* aderido e (D) com hifas. Aumento de 20x. As setas indicam estruturas fúngicas aderidas aos filmes.

Além da formação de poros (Figura 26 B), os filmes de PCL do presente piloto apresentaram fatores tidos como pré-requisitos para a deterioração tais como: pigmentos escuros (Figuras 26 B, D e F) e adesão de hifas (Figura 26 D). Processos outros influentes na microestrutura e/ou a ação funcional dos polímeros como penetração, formação de biofilme, reação enzimática não puderam ser visualizados mediante este tipo de microscopia. Estes processos ocorrem em função da estrutura do material e das condições ambientais para o crescimento de bioagentes (bactérias, fungos e protozoários) que interagem com a superfície do polímero (GU, 2003; MARTINS-FRANCHETTI et al. 2010).

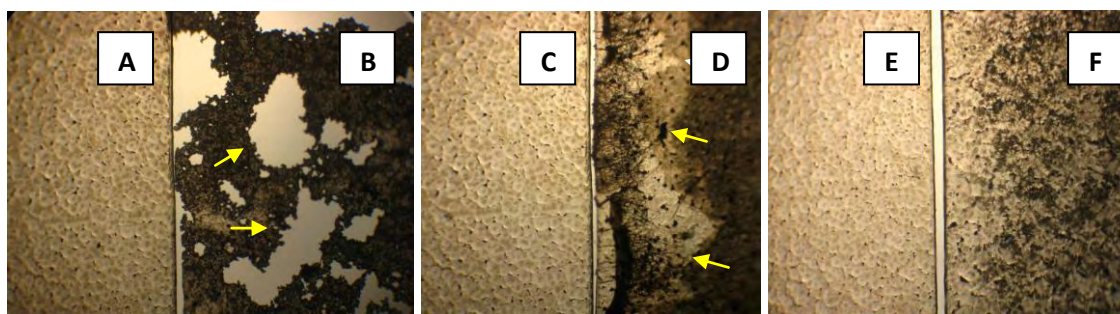


Figura 26. Micrografias ópticas de filmes de PCL: (A, C e E) original (sem tratamento) e (B) biotratados por 20 dias apresentando formação de poros, (D) biotratados por 20 dias com adesão de hifas e (F) biotratados por 20 dias com pigmentos. Aumento de 20x). Poros e hifas aderidas (setas).

As Figuras 27 e 28 apresentam as micrografias das amostras originais e biotratadas por 20 dias dos filmes de PVC e de PCL, respectivamente. Na Figura 27 B as setas apontam para a região onde ocorreu a erosão na superfície, sendo claramente visível a presença de hifas e esporos fúngicos. Tal fato também é confirmado ao observarmos as setas da Figura 27 C. É sabido que esta mudança morfológica, em especial na região colonizada, é devida a ação

microbiana por meio da penetração de estruturas e ação de enzimas e demais metabólitos produzidos.

A morfologia da superfície polimérica pode indicar a instabilidade do material quando exposto ao tratamento microbiano. Verificou-se que o filme de PCL biotratado apresentou erosões em camadas por toda sua extensão (Figura 28 B) (setas), diferente da superfície lisa do filme original (Figura 28 A). As setas apontam a ação biofísica das hifas causando danos no filme, nesse caso, a formação de poros (Figura 28 C). O crescimento celular resultante da colonização pelos micro-organismos (Figura 28 D) contribui para que haja um efeito bioquímico e/ou enzimático direto no polímero, onde enzimas microbianas atacam os componentes do polímero provocando quebras da cadeia. No caso do PCL, tal ação será sobre os carbonos dos grupos ésteres, potenciais sítios de ação destas enzimas (LUCAS et al. 2008; MADDEVER; CHAPMAN, 1989).

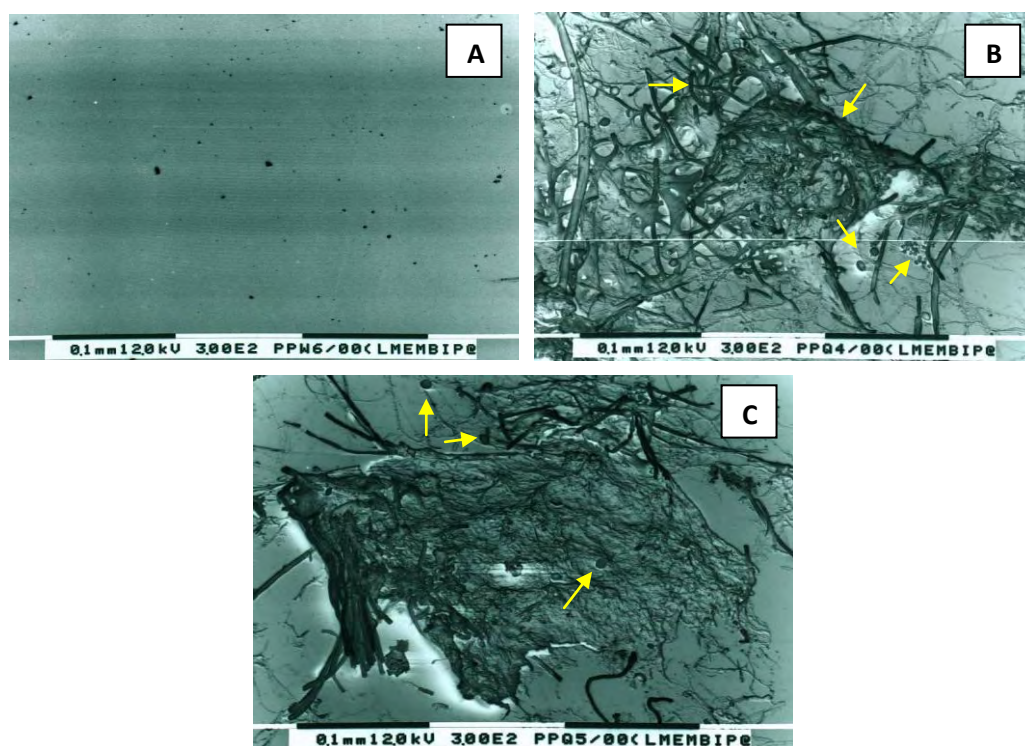


Figura 27. MEV dos filmes de PVC: (A) original e (B e C) biotratados por 20 dias com erosão. Setas indicam a presença de hifas e esporos.

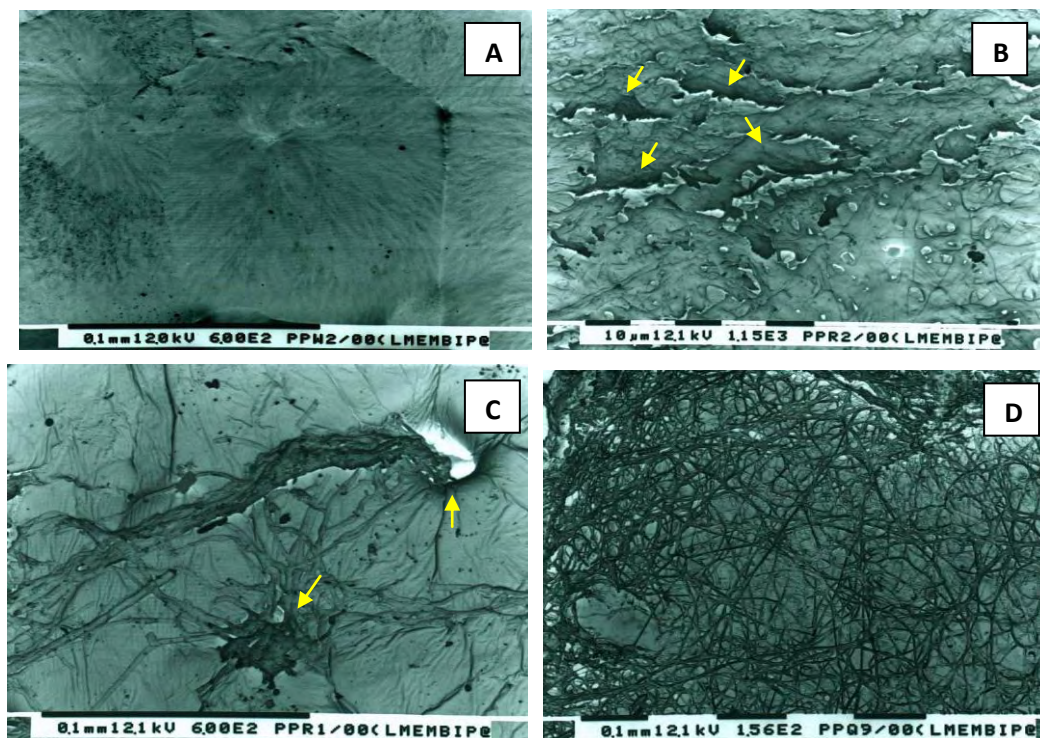


Figura 28. MEV dos filmes de PCL: (A) original e (B) biotratado por 20 dias apresentando erosão em camadas, (C) biotratado por 20 dias com penetração de hifa em microporo e (D) biotratado por 20 dias com densa colonização. Setas apontam região de erosão e a adesão microbiana no filme.

Nos dois pilotos realizados a contaminação foi um fator crítico. No primeiro, deu-se pelas prateleiras de papelão revestidas por papel sulfite, um substrato propício para micro-organismos, ainda que irradiado com U.V. Como solução, prateleiras de aço galvanizado foram adotadas, pois podem ser lavadas e esterilizadas em autoclave. O cultivo em câmara úmida utilizando placa de Petri destampada mostrou-se inviável, e dessa forma, decidiu-se utilizar placas descartáveis tampadas nos ensaios subsequentes.

A irradiação germicida empregada nos filmes foi ineficaz sendo notório o crescimento fúngico em todos os filmes. A medida adotada para todos os ensaios foi utilizar a esterilização por imersão em hipoclorito de sódio 3% durante 30 minutos e posterior lavagem com água destilada esterilizada, segundo ASTM D- 6288-98.

5.3 Ensaio 1

Em todos os filmes de PVC e PCL testados constatou-se pigmentação do meio completo devido ao crescimento fúngico, que se deu fracamente nas enumerações e até na borda dos filmes (Figuras 29 A e B) (setas). Os filmes de PVC incubados em meio incompleto não apresentaram crescimento fúngico no meio e no filme. Já para os de PCL neste mesmo meio, foi observada a especificidade da espécie *C. globosum* por tal polímero,

não havendo nenhum outro crescimento microbiano sobre o meio (Figura 29 C). Não foi observado o crescimento de *P. chrysosporium* em meio incompleto e em meio completo seu desenvolvimento foi escasso.

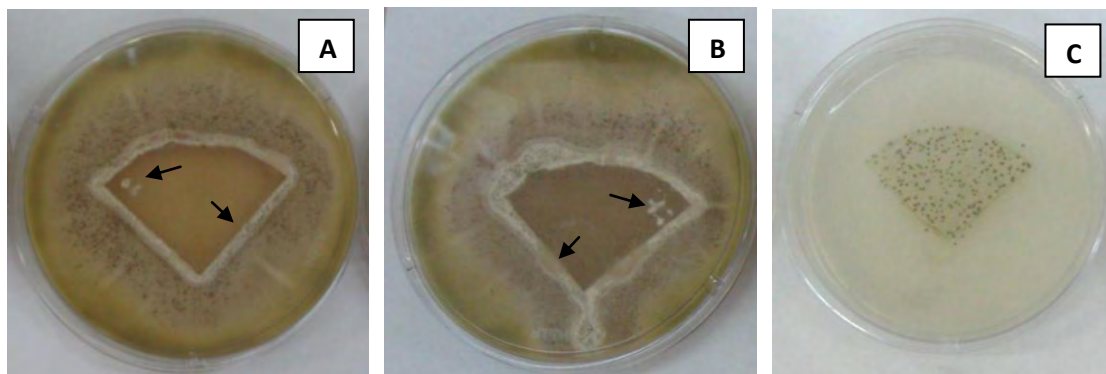


Figura 29. Filme de PVC (A) e PCL (B) em meio completo e PCL em incompleto com adesão de *C. globosum* (C), biotratados por 30 dias. Região de crescimento fúngico indicado por setas.

A espécie *C. globosum* foi capaz de utilizar o PCL como única fonte de carbono, realizando a adesão e a degradação do mesmo, visto que em alguns ensaios a biodegradação da amostra foi total após o período de 30 dias. Sugere-se que devido à sua estrutura e hidrofiliidade, o PCL possua maior capacidade de adesão de micro-organismos, se comparado ao PVC. Em função da presença do átomo de cloro, altamente eletronegativo, a macromolécula de PVC possui densidade de carga negativa nos átomos de cloro, fazendo com que haja interações do tipo dipolo (GRISA et al. 2009; MARTINS-FRANCHETTI; MARCONATO, 2006).

O envolvimento de interações hidrofóbicas e eletrostáticas também tem sido sugerido ser de grande importância para a adesão dos conídios de alguns fungos. Com base no tamanho dos mesmos, Jones (1994) questionou a importância das interações eletrostáticas para a adesão dos fungos. No entanto, sugere que os micro-organismos têm um potencial de superfície negativo, assim como a outra superfície a ser colonizada, existindo dessa maneira, uma repulsão eletrostática entre os conídios e a superfície, sendo que fatores como as ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas podem neutralizar tais forças de repulsão eletrostática.

Nos tratamentos com o *Phanerochaete*, com o consórcio e com o controle houve crescimento de micro-organismos contaminantes (Figura 30).

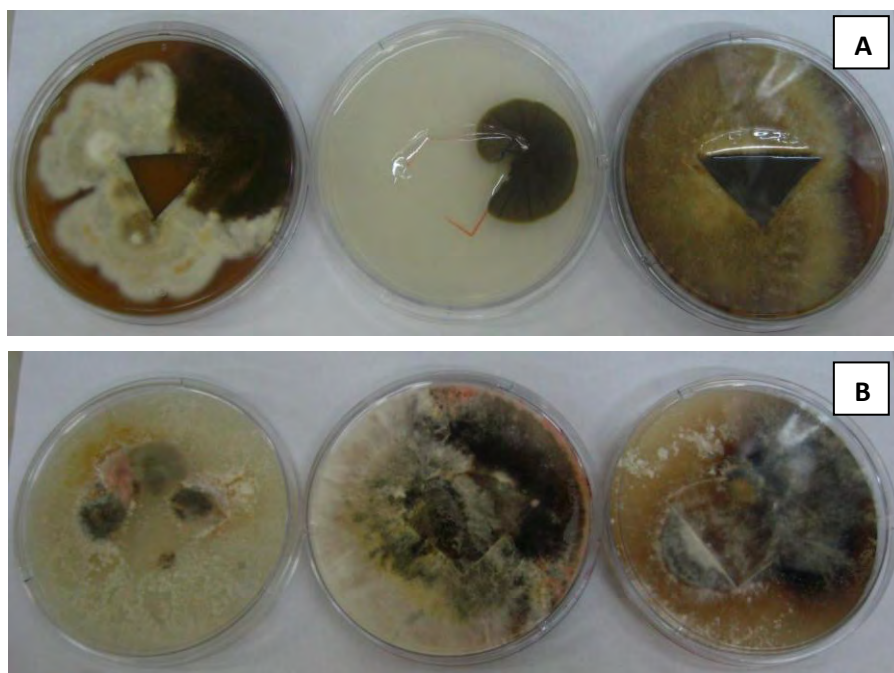


Figura 30. Micro-organismos contaminantes: (A) PVC-controle em meio completo e (B) PCL tratamento com *Phanerochaete chrysosporium* em meio completo.

Como observado na Figura 30, muitos são os micro-organismos capazes de crescer sobre superfícies poliméricas. Os dominantes pertencem aos gêneros: *Alternaria*, *Aspergillus*, *Chaetomium*, *Fusarium* e *Penicillium* (fluorocarbonos), *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Mucor* e *Scopulariopsis* (poliamidas), *Alternaria*, *Aspergillus* e *Penicillium* (compostos organosiliconados), *Aspergillus*, *Fusarium* e *Mucor* (borrachas), *Alternaria*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Trichoderma* e *Verticillium* (couro artificial) (KURAKOV et al. 2008)

Macroscopicamente os filmes de PVC não apresentaram mudanças morfológicas visíveis. Os filmes de PCL apresentaram mudanças em sua morfologia tais como: manchas escuras provavelmente causadas pela colonização dos micro-organismos, rachaduras, opacidade e perda de flexibilidade. Com o auxílio da microscopia óptica, evidenciou-se a presença de hifas aderidas na borda do filme de PVC (Figura 31 B) e diferentes sinais do processo de biodegradação nos filmes de PCL, tais como a pigmentação e adesão hifas (Figura 31 D), fragmentação (Figura 31 F) e formação de microporos (Figura 31 H), todos indicados por setas.

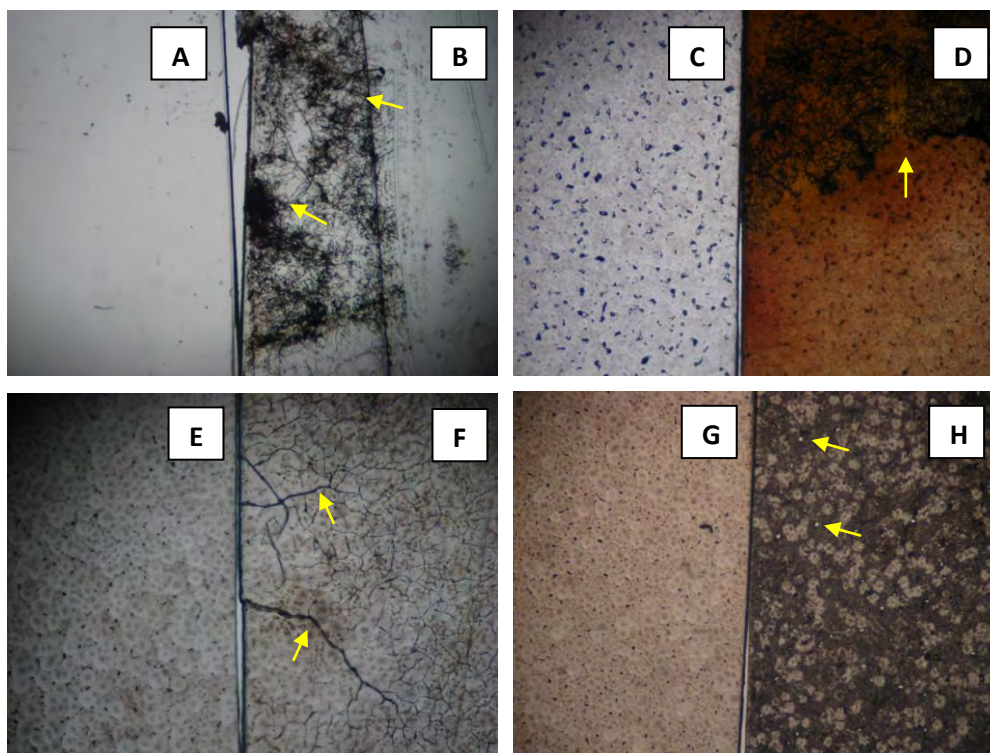


Figura 31. Micrografias ópticas de filmes de PVC (A e B) e de PCL (C-H). (A, C, E, e G) original (sem tratamento) e (B) biotratado por 30 dias apresentando adesão de hifas, (D) biotratado por 30 dias com adesão e pigmentação, (F) biotratado por 30 dias com rachaduras e (H) biotratado por 30 dias com formação de microporos. Aumento de 20x. As setas indicam adesão microbiana e alterações morfológicas dos filmes.

Os efeitos esperados quanto ao crescimento microbiano em polímeros sintéticos são: ataque da superfície do polímero, descoloração e perda de transparência, fatos estes constatados nos filmes do presente ensaio. A remoção dos plastificantes, modificadores e lubrificantes resulta na diminuição da flexibilidade, mudanças de massa e outras propriedades físicas (ASTM G21-96).

Sanchez e colaboradores (2000) ao estudarem a biodegradação de PCL em meio líquido por *Aspergillus* sp. observaram certa rugosidade e pequenos microporos na superfície, além de rachaduras na extensão do filme. Notaram que as bordas dos filmes desintegravam e quebravam-se em fragmentos menores até serem totalmente dispersas no meio de cultura. Tal fato coincide com os resultados encontrados em nossos estudos, uma vez que se empregou o meio sólido para avaliação da biodegradação.

As micrografias dos filmes originais e biotratados seguintes mostram as mudanças morfológicas ocorridas nas amostras de PVC (Figura 32) e PCL (Figura 33) após 30 dias em contato com o inóculo fúngico.

Comparando-se as microscopias da amostra de PVC original (Figura 32 A) com as biotratadas por 30 dias, observou-se erosão da superfície polimérica e densa colonização (Figura 32 B) e, em alguns casos, hifas fúngicas por toda a extensão (Figura 32 C). Os fragmentos das moléculas produzidas podem ser metabolizados pelos fungos, sendo a formação de crateras e erosões na superfície do material o resultado da atividade dos micro-organismos (EL-AGHOURY et al. 2006).

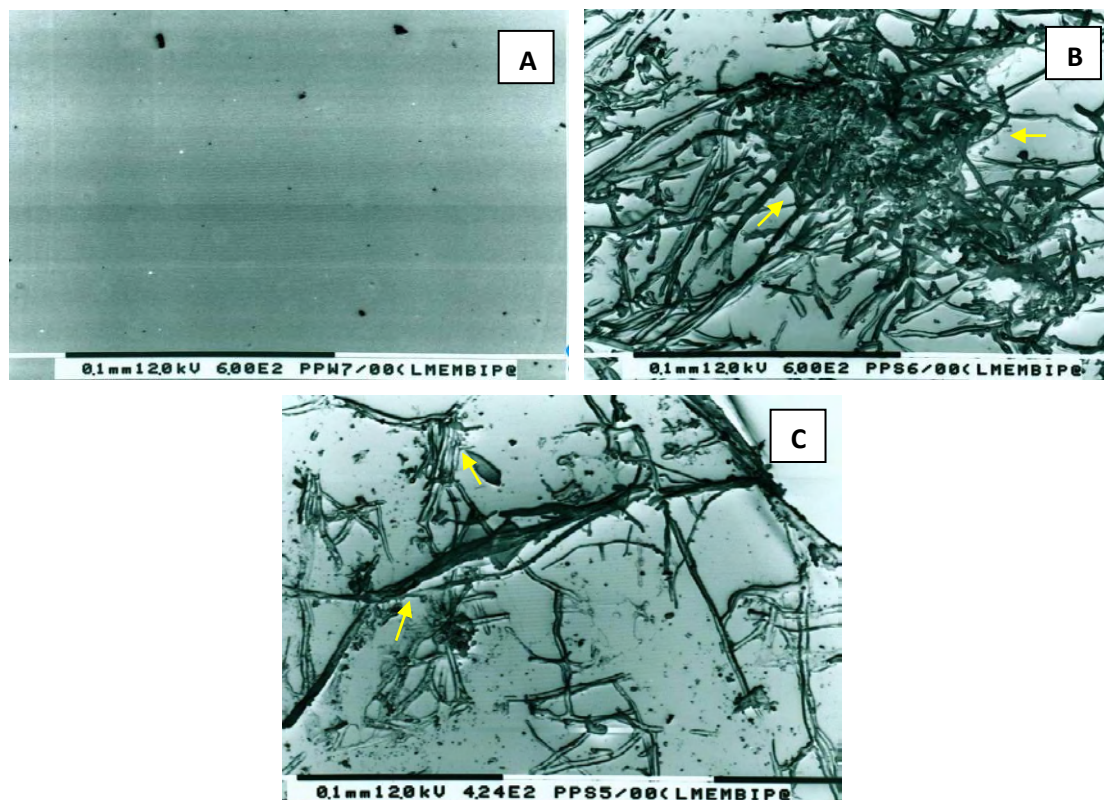


Figura 32. MEV dos filmes de PVC: (A) original e (B e C) biotratados por 30 dias. Setas indicam a erosão e colonização ocorrida nas amostras.

Nas micrografias do PCL biotratado verificou-se a presença de esporos fúngicos inseridos nas superfícies e também no interior das amostras o que provavelmente provocou sua fragmentação (Figura 33 B) (seta). Na Figura 33 C visualiza-se a presença de esporos e hifas por toda a extensão do polímero. Esta colonização microbiana nas superfícies dos polímeros é um dos fatores determinantes para o processo de quebras das cadeias poliméricas, corroborando para a formação de poros (Figura 33 D), erosões, e fragmentações decorrentes do processo de biodegradação.

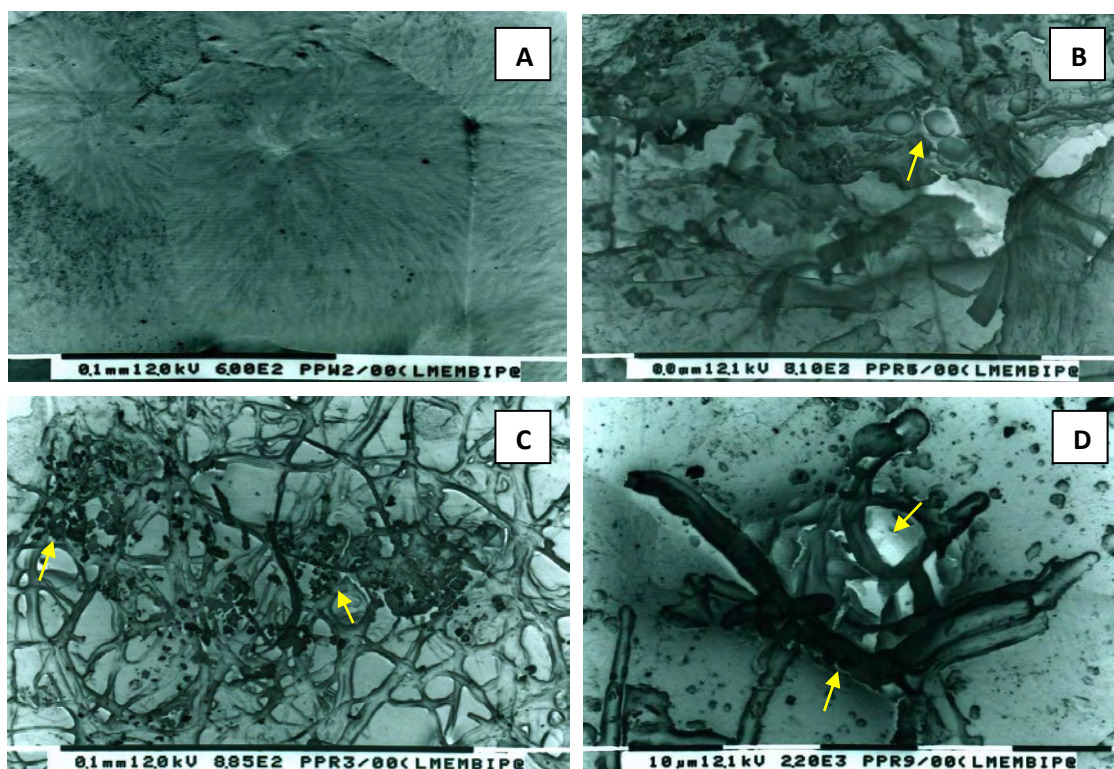


Figura 33. MEV dos filmes de PCL: (A) original e (B) biotratado por 30 dias com esporos no interior da amostra, (C) biotratado por 30 dias com presença de hifas e esporos e (D) biotratado por 30 dias com efeito biofísico das hifas no poro. Hifas e esporos indicados por setas.

5.4 Ensaio 2

Confirmando as observações do ensaio anterior, o crescimento fúngico deu-se apenas nas bordas e enumerações dos filmes de PVC (Figura 34 A) e por toda a extensão dos de PCL testados em meio completo, também pigmentado pelos fungos (Figura 34 B). A especificidade da espécie *C. globosum* pelo PCL foi novamente observada, já que seu crescimento ocorreu apenas sobre o polímero (Figura 34 C).

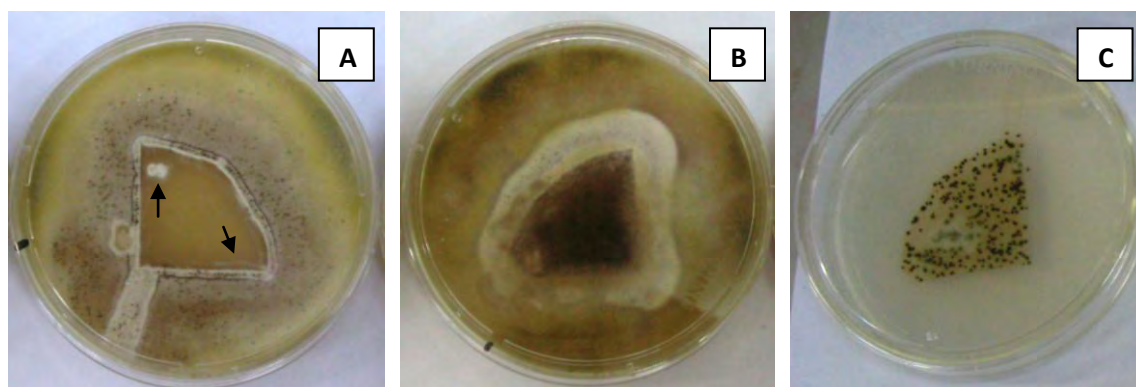


Figura 34. (A) filmes de PVC em meio completo com crescimento fúngico nas bordas e enumerações, (B) crescimento microbiano por toda extensão do filme de PCL em meio completo, e (C) predileção de *Chaetomium globosum* pelo PCL em meio incompleto. Região de crescimento fúngico (setas indicativas).

Semenov et al. (2003) ao ventilar amostras de materiais poliméricos com fluxo contínuo de esporos, observaram que estes aderiram em ambos os lados e nas bordas. Consequentemente, a quantidade de esporos nas bordas foi mais densa se comparada ao meio da amostra. Em quase a totalidade de nossos resultados, os fungos permaneceram apenas nas imediações dos filmes de PVC e por toda a extensão dos de PCL. Vale ressaltar que a adesão de esporos e hifas em materiais poliméricos depende da água contida nos mesmos, inferindo novamente que a hidrofiliabilidade do PCL se comparado ao PVC, corrobora para que haja adesão e conseguinte biodegradação.

Os meios de cultura recomendados pela ISO 846-1976 não favoreceram o crescimento de *P. chrysosporium*: em meio completo seu desenvolvimento foi insignificante enquanto que no meio incompleto nem chegou a acontecer. Contrariamente, em cultivos realizados nos meios Sabouraud Dextrose e ágar batata obteve-se o crescimento maciço do basidiomiceto.

Testes de biodegradação de polímeros em sua maioria são realizados em Sabouraud líquido, incubados a 35-37°C (ARGÔLO, 2003; JARA, 2007). Na composição deste último estão presentes o extrato de carne (fonte de carbono orgânico), nitrogênio, vitaminas e sais minerais e peptona (proteína semi-digerida), atuando como fonte de nitrogênio. O meio completo proposto pela ISO 846-1976 não possui tais elementos. A temperatura de manutenção do experimento, de 28°C também pode ter sido um fator limitante de crescimento, visto que difere da usualmente utilizada em ensaios de biodegradação e da ótima requerida para tal micro-organismo que é 40°C, segundo Singh e Chen (2008).

A relação entre carbono e nitrogênio é muito importante para o crescimento e esporulação dos fungos, uma vez que a alta concentração de nitrogênio reprime a esporulação e está diretamente ligada a concentração de carbono (GRIFFIN, 1994). A concentração mínima de nutrientes que permite o crescimento micelial é muitas vezes insuficiente para produzir esporos, ou seja, geralmente a condição nutricional ótima para o crescimento micelial não é necessariamente a melhor para a produção de esporos e frequentemente inibe a reprodução (VÉRAS et al. 1997).

Urek e Pazarlioglu (2007) testaram diferentes meios, condições de crescimento e produção de manganês peroxidase (MnP), concluindo que a máxima atividade de MnP foi conseguida com 356 U/L sob condições otimizadas: 0,05% Tween 80, 22 mM de nitrogênio, 10 g/L de glicose, 37°C e pH 4,5. O crescimento do micro-organismo foi obtido com um valor máximo de 3,1 g/L de biomassa. Em meio completo, a concentração de glicose foi de 30 g/L, três vezes mais que a empregada no estudo acima citado. Concluiu-se então que todos esses fatores corroboraram para o crescimento sutil em meio completo, mas não em placas

contendo meio incompleto, pois a estirpe de *Phanerochaete* estudada não foi capaz de crescer sem a suplementação de carbono, no caso a glicose.

Análises macroscópicas quanto à morfologia do PVC não mostraram mudanças morfológicas. Já os filmes de PCL se tornaram mais opacos após o biotratamento, além de sofrerem alteração de cor e formação de poros. Com o emprego da microscopia óptica foi possível confirmar as constatações acima relacionadas ao fenômeno de biodegradação dos polímeros. Nas Figuras 35 B e D, as setas denotam que houve apenas a adesão de peritécios do fungo *C. globosum* e a deposição de pigmentos nos filmes de PVC. Indícios de biodegradação puderam ser mais bem observados nos filmes de PCL, onde houve erosão da superfície e adesão de material microbiano (hifas e pigmentos) (Figura 35 F) (setas) e a formação de fissuras e microporos (Figura 35 H) (setas). A mudança morfológica dos filmes de PCL biotratados reflete a suscetibilidade dos ésteres ao ataque microbiano, influenciada pelas enzimas dos fungos. Uma vez que utilizam componentes da superfície polimérica e produtos do próprio metabolismo, liberam metabólitos agressivos como ácidos orgânicos e esterases, crescendo profundamente no material, resultando no aumento da área danificada, acentuando a degradação (EL-AGHOURY et al. 2006; LUGAUSKAS et al. 2004).

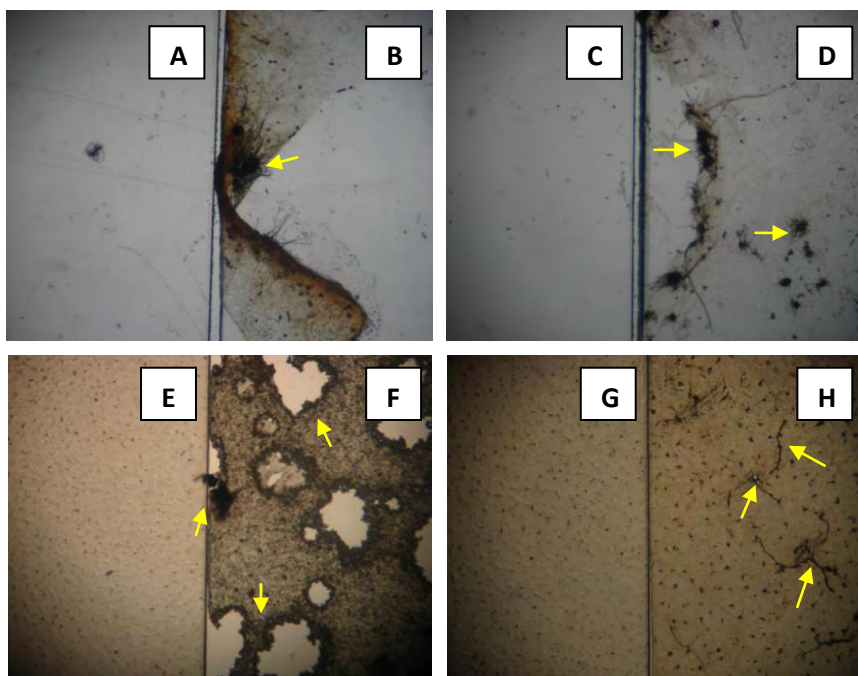


Figura 35. Micrografias ópticas de filmes de PVC (A-D) e PCL (E-H): (A, C, E, e G) original (sem tratamento) e (B e D) biotratados por 30 dias com deposição de pigmentos e peritécios de *C.globosum*, (F) biotratado por 30 dias com formação de poros e adesão de material microbiano e (H) biotratado por 30 dias com presença de microporos e rachaduras. Aumento de 20x. As setas indicam estruturas fúngicas aderidas e alterações morfológicas nos filmes.

Dos espécimes pertencentes ao consórcio proposto, houve adesão expressiva apenas de peritécios de *Chaetomium* nos filmes de PCL e em alguns de PVC. O ascomiceto *C. globosum* apresenta esporos sexuados maiores do que os conídios de *Penicillium* e demais anamórficos: *C. globosum* 8,5-11,0µm x 7,0-8,5µm x 6,5-7,5µm, *T. virens* 4,5-6,0µm x 3,5-4,0µm, *A. niger* 4,0-5,0µm, *P. variotii* 3,2-5,0µm x 2,0-4,0µm e *P. funiculosum* 2,5-3,5µm x 2,0-2,5µm (DOMSCH et al. 1993). Assim, infere-se que esporos com grandes áreas terão maiores ângulos de contato com a superfície e força de adesão. Consequentemente conídios pequenos terão ângulo de contato menor. A adesão de esporos em materiais poliméricos depende também da água contida nos mesmos (SEMENOV et al. 2003). A morfologia da célula germinativa também pode ter influenciado no processo de adesão. Enquanto os conídios são praticamente lisos, os esporos são repletos de apêndices que podem auxiliar na adesão ao substrato (CROUPS et al. 2009).

As Figuras 36 e 37 apresentam micrografias dos filmes de PVC e PCL original e após o biotratamento de 30 dias. Observou-se que o mecanismo de biodegradação da superfície do filme de PVC biotratado (Figura 36 B) procedeu por erosão superficial (setas). A susceptibilidade da superfície polimérica à ação microbiana foi mostrada pela presença de estruturas fúngicas reprodutivas (peritécios) de *C. globosum* (Figura 36 C) e esporos (Figura 36 D).

Sabe-se que a hidrólise enzimática de poliésteres biodegradáveis tais como PCL, procede principalmente por meio do mecanismo de erosão superficial. Nota-se na Figura 37 B (setas) várias camadas do filme que foram removidas, além da presença de rachaduras no filme. As setas da Figura 37 C indicam a presença de esporos, e formação de poros, bem como a erosão superficial dos esferulitos vistos em micrografias anteriores. A hidrólise no interior e na superfície dos filmes dá origem à formação de poros e consequente colonização como visto na Figura 37 D. A profundidade e extensão desses poros depende da composição do polímero (TAO et al. 2009).

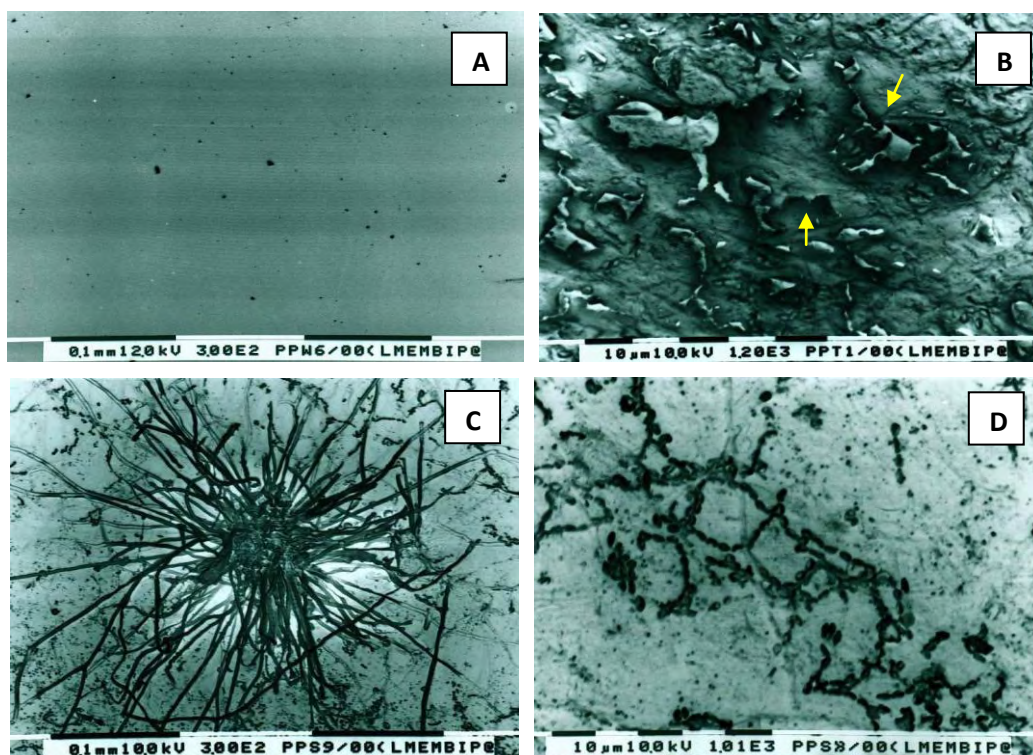


Figura 36. MEV dos filmes de PVC: (A) original e (B) biotratado por 30 dias com erosão superficial em escamas, (C) biotratado por 30 dias com peritécio de *Chaetomium* e (D) biotratado por 30 dias com esporos sob a superfície polimérica. Setas indicam superfície modificada.

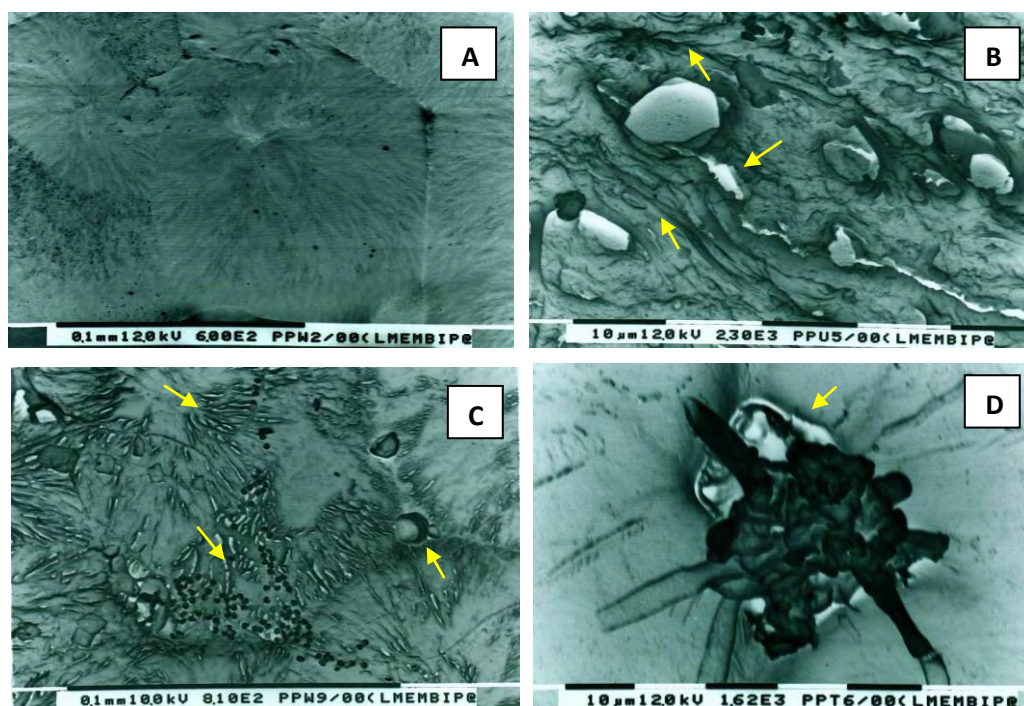


Figura 37. MEV dos filmes de PCL: (A) original e (B) biotratados por 30 dias apresentando rachaduras e remoção da superfície em camadas, (C) biotratado por 30 dias com erosão superficial de esferulitos, formação de poros e adesão de esporos e (D) biotratado por 30 dias com colonização fúngica no poro. Setas indicam modificações da superfície e adesão microbiana.

5.5 Ensaio 3

Em meio completo houve um crescimento discreto de *P. chrysosporium* sobre todo o ágar e próximo das bordas dos filmes de PVC (Figura 38 A) (setas) e colonização escassa nos filmes de PCL (Figura 38 B).

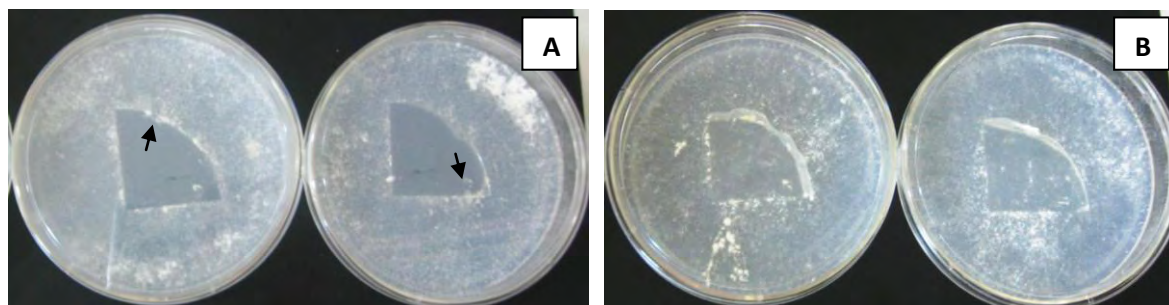


Figura 38. Filmes de PVC (A) e PCL (B) em meio completo com crescimento escasso de *Phanerochaete chrysosporium*. Setas indicam o crescimento margeando a borda.

Há uma grande quantidade de estirpes fúngicas capazes de colonizar e possivelmente biodegradar os plásticos. Além das estirpes propostas pela norma, houve o crescimento de outros micro-organismos. Em alguns casos estes encontravam-se margeando os filmes de PVC (Figuras 39 A-C) (setas) e em PCL, colonizando toda a extensão dos filmes (Figuras 39 D-F).

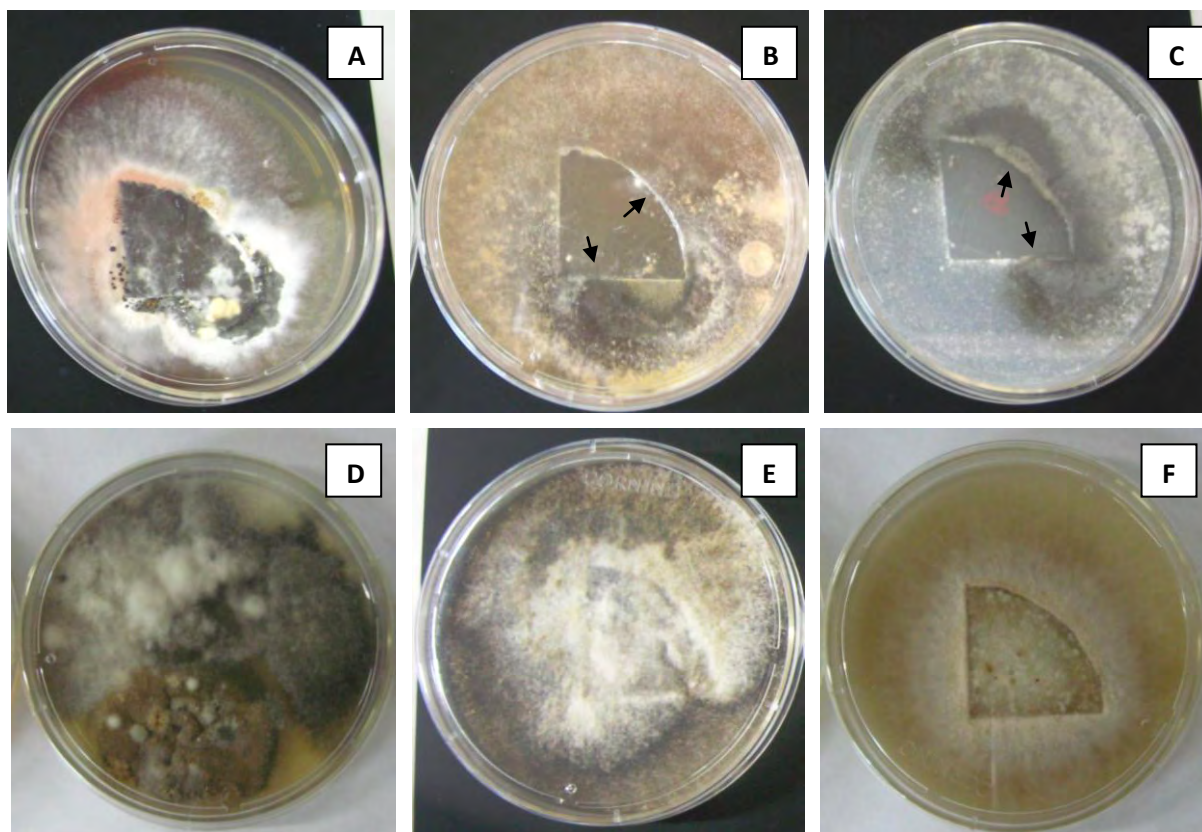


Figura 39. Crescimento de outros fungos durante o experimento em: (A-C) PVC e (D-F) em PCL. Setas indicam crescimento nas bordas dos filmes.

Novamente as observações macroscópicas dos filmes de PVC não apontaram indícios de biodegradação, ao contrário dos filmes de PCL que se apresentaram fragmentados, com perda de flexibilidade e na maioria dos casos, pigmentados. Ao longo de 30 dias de exposição ao tratamento, os filmes de PVC foram colonizados por hifas (setas) e estruturas fúngicas reprodutivas (Figura 40 B e C) e os de PCL apresentaram rachaduras, erosão de superfície (Figura 40 E), e adesão de hifas (Figuras 40 G).

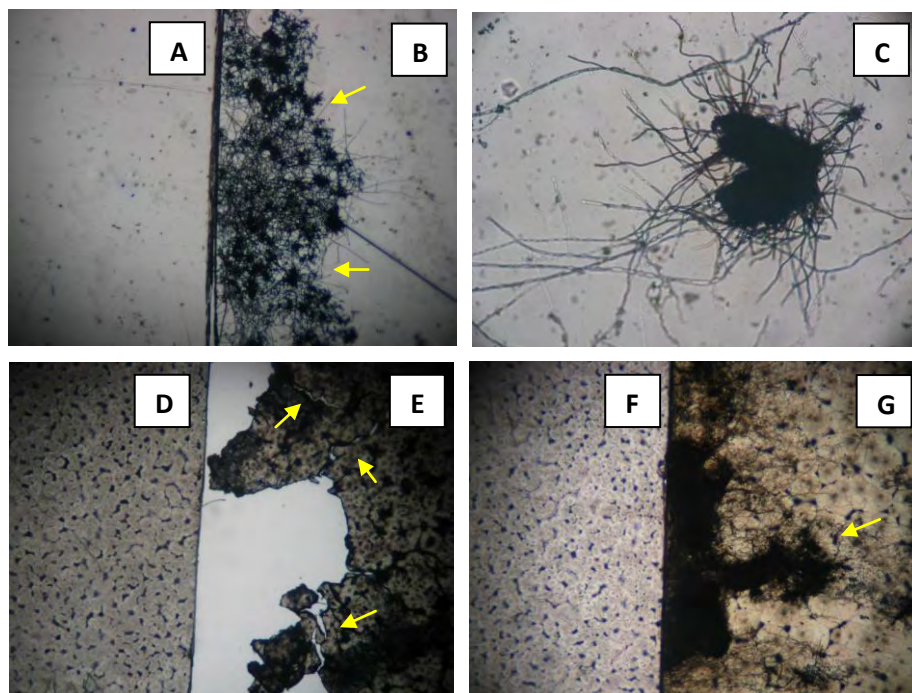


Figura 40. Micrografias ópticas de filmes de PVC (A e B) e PCL (D-G): (A, D e F) original (sem tratamento) e (B) biotratado por 30 dias com hifas e estruturas reprodutivas, (C) biotratado por 30 dias com peritécio de *Chaetomium*, (E) biotratado por 30 dias com rachaduras e (G) biotratado por 30 dias com adesão de hifas. Aumento de 20x. As setas indicam estruturas fúngicas aderidas e rachaduras nos filmes.

No caso do PVC a biodegradabilidade depende de algumas propriedades físico-químicas como aumento de massa molar e de ramificações na cadeia, que dificultam a biodegradação (KÜSTER, 1979; KUMAR et al. 1983). A maioria dos plásticos sintéticos é resistente ao ataque microbiano devido ao seu caráter hidrofóbico, o que inibe a atividade enzimática. Frequentemente estes requerem modificação seletiva de superfície, visando hidrofiliabilidade, adesão celular e biocompatibilidade (CHENG et al. 2004; KUMAR et al. 1983; ZHANG et al. 2001). Estudos de Webb e colaboradores (1999) provaram que as interações hidrofóbicas controlam a adesão dos blastóporos de *Aureobasidium pullulans* ao PVC.

Muitos estudos têm mostrado que existe uma estreita relação entre hidrofilicidade e a adesão celular (SANTOS JR et al. 2004; SANTOS JR; WADA, 2007; LUCCHESI et al. 2008). Dentro de certos parâmetros, substratos hidrofílicos (como o PCL) tendem a suportar uma melhor interação com as células. Dessa maneira espécies microbianas podem aderir às superfícies devido à secreção de um tipo de cola, composta de uma matriz complexa feita de polímeros (polissacarídeos e proteínas). Fungos filamentosos ao desenvolverem seu micélio nos materiais, como por exemplo em plásticos, penetram suas hifas aumentando o tamanho dos poros, provocando fissuras nos filmes (CAPITELLI et al. 2006).

No presente ensaio e nos anteriores observou-se macroscopicamente a capacidade dos fungos em formar colônias na superfície polimérica. Por meio das micrografias verificou-se a adesão do ascomiceto *Chaetomium* (Figura 41 B) e dos aglomerados de hifas e esporos (Figura 41 C e D) nas amostras de PVC submetidas ao biotratamento por 30 dias. Sabe-se que o processo de biodegradação envolve três etapas principais, das quais duas estão relacionadas aos micro-organismos: a adesão e o crescimento na superfície do material, que ocorrem por meio da colonização, estando a terceira etapa, relacionada às modificações na estrutura do material que sofre a biodegradação (SEMENOV et al. 2003).

As micrografias das amostras biotratadas apresentaram mudanças estruturais expressivas como: erosão da superfície em camadas e fragmentação (Figura 42 B) (setas); e formação de poros provocados pela ação dos micro-organismos (Figura 42 C) (setas), o que certamente facilitou o processo de biodegradação.

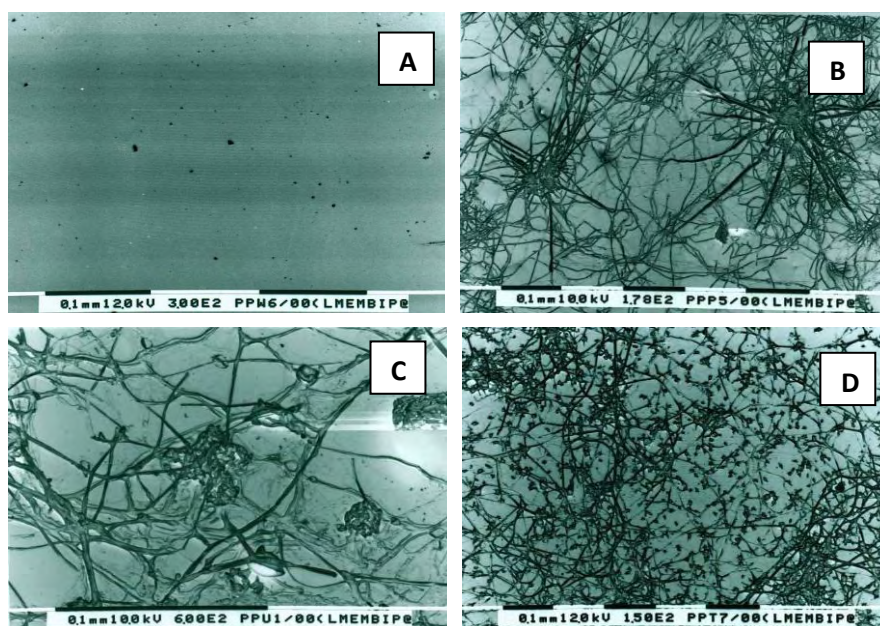


Figura 41. MEV dos filmes de PVC: (A) original e (B) biotratado por 30 dias apresentando peritécios de *Chaetomium* e (C e D) biotratados por 30 dias com aglomerados de hifas e esporos.

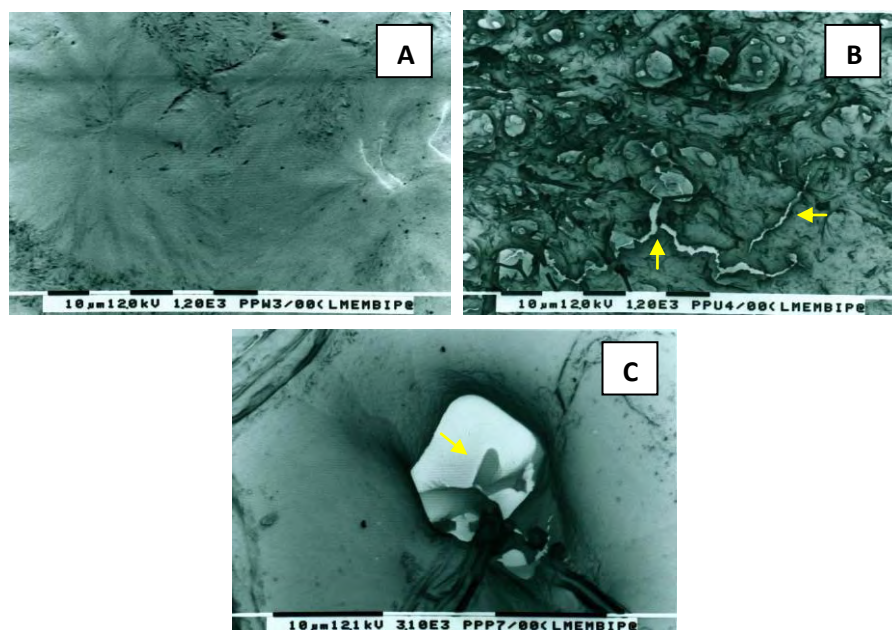


Figura 42. MEV dos filmes de PCL: (A) original e (B) biotratado por 30 dias com rachaduras e erosão em camadas e (C) biotratado por 30 dias com colonização do poro. Setas indicam modificações na superfície e efeito biofísico no polímero.

5.6 Ensaio 4

Os filmes incubados em meio incompleto apresentaram contaminações por espécimes fúngicas similares que limitaram seu crescimento às bordas do PVC (Figura 43 A) (setas) e pela extensão dos filmes de PCL (Figura 43 B).

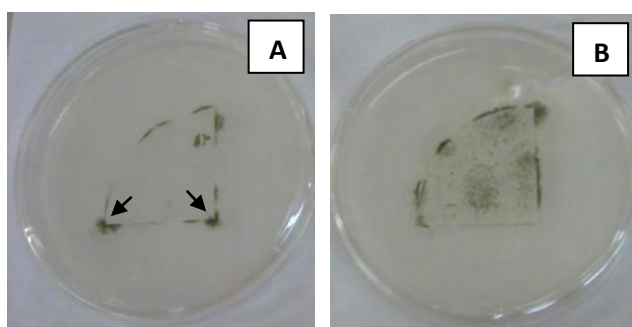


Figura 43. Contaminação em filme de PVC (A) e PCL (B). Setas indicando crescimento nas bordas.

O exame a olho nu mostrou hifas aderindo-se à superfície polimérica em filmes de PVC (Figura 44 A-C) e formando esporos nos filmes de PCL (Figura 44 D-F) nas amostras biotratadas.

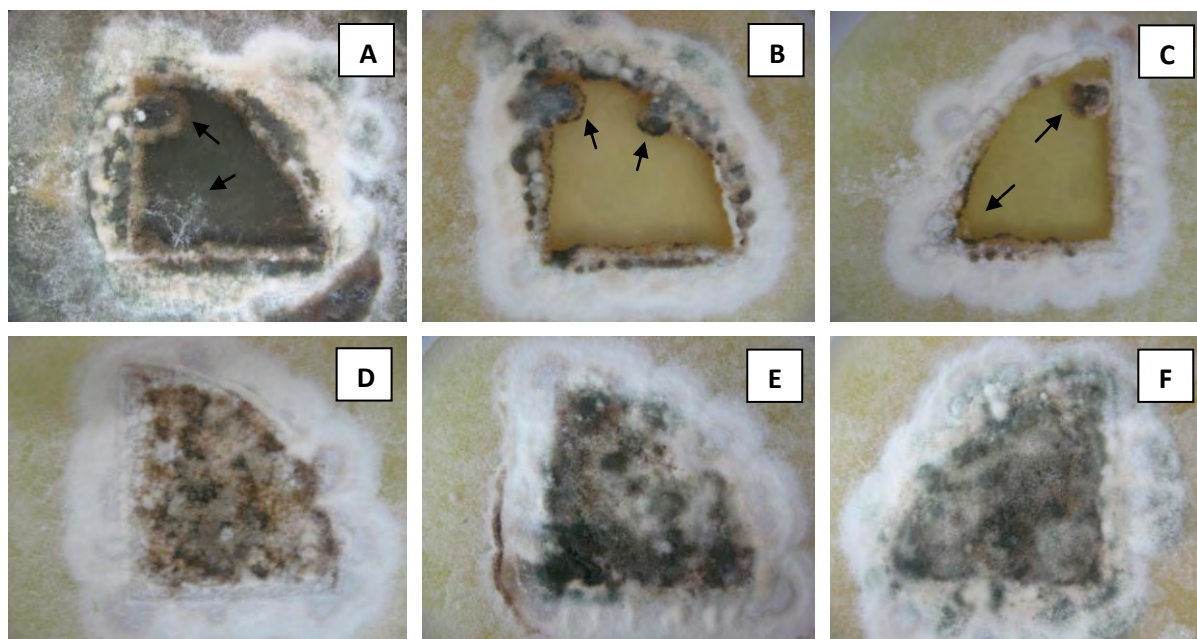


Figura 44. Crescimento de outros fungos durante o experimento em PVC (A-C) e em PCL (D-F). Setas indicam crescimento de hifas sobre e nas bordas dos filmes.

Os resultados obtidos neste ensaio convergiram com os de Massardier-Nageotte et al. (2006) que estudaram a biodegradação do PCL em condições aeróbicas concluindo que polímeros incubados em meios sólidos apresentam densa colonização por micro-organismos, o que leva à biodeterioração dos polímeros. A biodeterioração é um processo no qual os micro-organismos atacam e colonizam as superfícies na forma de biofilmes, que em contato com o polímero causam algumas modificações, dentre elas: cobertura da superfície, aumento da dessorção de aditivos e monômeros para fora da matriz, ataque ao polímero por enzimas, acúmulo de água, penetração de filamentos microbianos na matriz e, excreção de pigmentos microbianos lipofílicos que colorem o meio (FLEMMING, 1998).

Não houve crescimento microbiano expressivo sobre os filmes de PVC. Para o mesmo polímero no último ensaio, houve crescimento de hifas e esporos em uma pequena extensão da borda dos filmes. De maneira semelhante ao que se verifica com bactérias, a adesão de fungos também parece ser dependente do caráter hidrofóbico dos propágulos. Em experimento para avaliação da capacidade adesiva de *Botrytis cinerea*, observou-se que os conídios do fungo eram capazes de aderir à superfície de tomates ou outros substratos imediatamente após a etapa de hidratação, estando os conídios vivos ou mortos, apesar da adesão ser comparativamente maior entre os conídios viáveis. Nesse caso, como a adesão não envolve estruturas ou ligações específicas, os autores acreditaram na capacidade adesiva e na hidrofobicidade existente entre os conídios e os substratos (DOSS et al. 1993).

Com os resultados obtidos, sugere-se que os filmes tornaram-se mais hidrofílicos após os 30 dias de incubação permitindo o crescimento microbiano (setas) tanto em filmes de PVC (Figuras 45 B e D) quanto no de PCL (Figura 45 H). Pequenos poros, que podem ser devido à ação microbiana, são visualizados na Figura 45 F (setas).

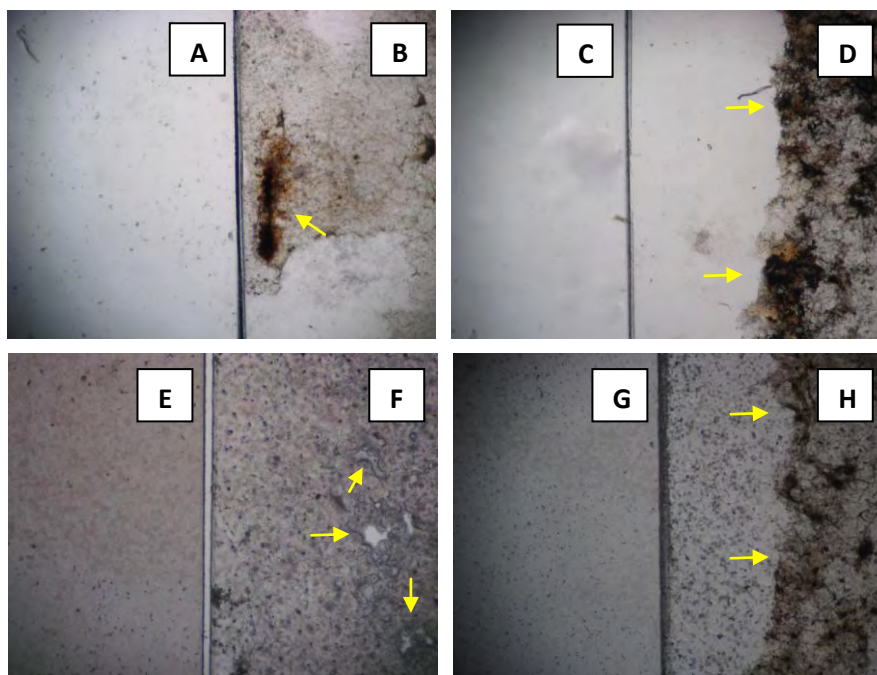


Figura 45. Micrografias ópticas de filmes de PVC (A-D) e PCL (E-H): (A, C, E e G) original (sem tratamento) e (B, D e H) biotratado por 30 dias apresentando hifas e pigmentos e (F) biotratados por 30 dias com a presença de poros. Aumento final de 20x. Setas indicam estruturas fúngicas aderidas e poros formados na superfície.

Em todos os ensaios relatados nessa dissertação verificou-se o crescimento microbiano em filmes de PVC biotratados, inferindo que o material foi suscetível à ação dos fungos, fornecendo nutrientes que levaram ao desenvolvimento destes micro-organismos. As Figuras 46 B e C ilustram claramente a biodegradação das amostras de PVC devido às enzimas secretadas pelos micro-organismos. Com auxílio das setas observa-se a grande quantidade de rachaduras nas regiões onde ocorreram as erosões na superfície do polímero, apresentando-se rugosa quando comparada à amostra original (Figura 46 A). Os resultados pertinentes às Figuras 46 D, E e F reportam a grande colonização e presença de esporos de estirpes diferentes. Grisa et al. (2007), encontraram densa colonização, formação de biofilme e de poros em filmes de PVC incubados 4 semanas com *Aspergillus niger* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Se analisarmos de modo geral os resultados obtidos com os filmes de PCL, pode-se concluir que estes apresentaram maior biodegradação. Este fato está intimamente relacionado

à estrutura química do PCL composta de grupos ésteres, que são facilmente biodegradáveis (PACIA, 2002). A Figura 47 B revela que o biotratamento produziu um padrão de erosão na forma esferulítica. Esse mesmo padrão também foi observado por Eldsäter et al. (2000) ao estudarem a erosão superficial dos filmes de PCL em meio compostado (período de 45 dias), em lodo de esgoto anaeróbio e em meio líquido com cultura pura contendo o fungo *Aspergillus fumigatus* (período de 49 dias). Nos filmes de PCL biotratados, os esporos de *Aspergillus* ocorreram em grande parte do polímero (Figura 47 C). A degradação progressiva causada pela adesão microbiana no polímero muda a microestrutura do mesmo, levando a formação de rachaduras, como apontado por setas na Figura 47 D.

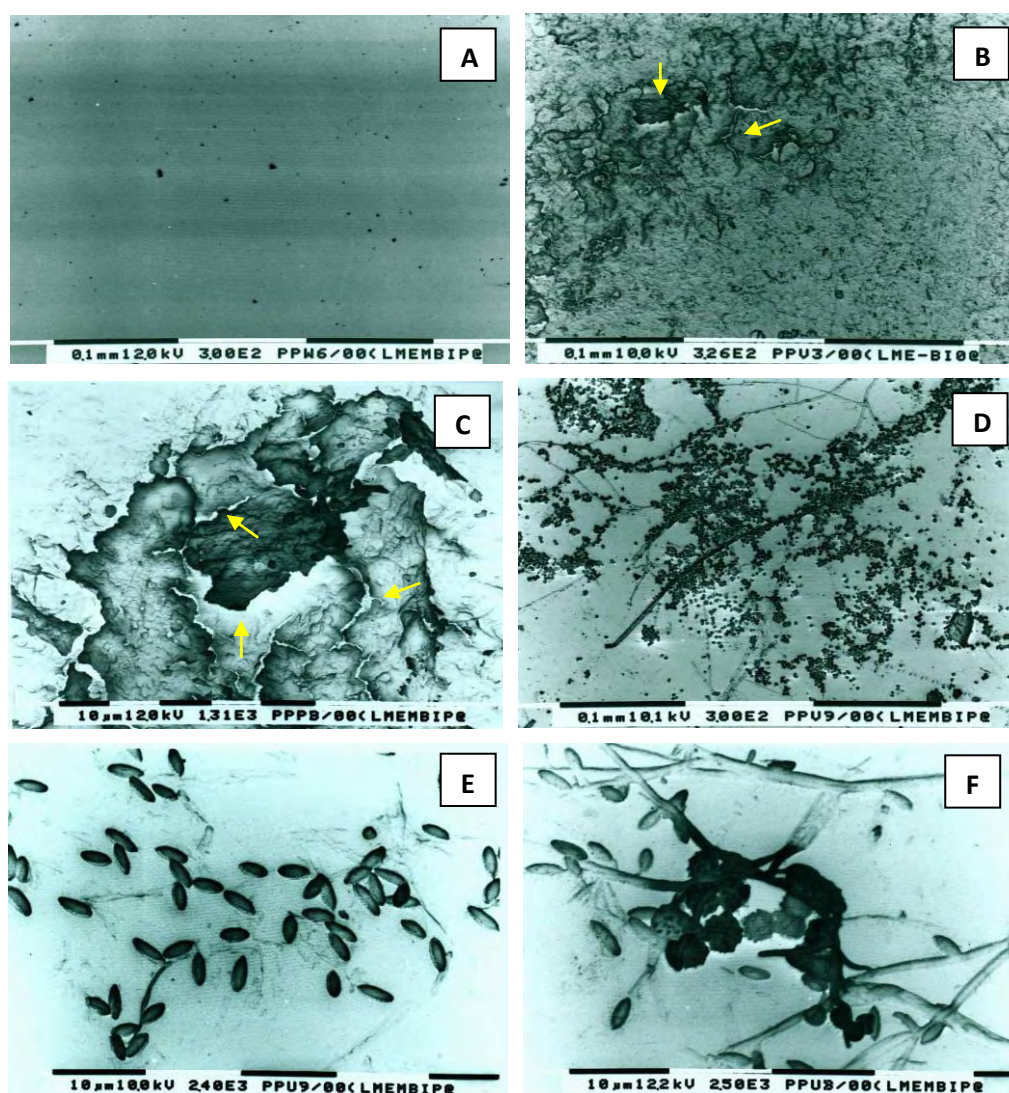


Figura 46. MEV dos filmes de PVC: (A) original e (B e C) biotratados por 30 dias contendo rachaduras nas regiões de erosão e (D, E e F) biotratados por 30 dias apresentando esporos de diferentes estirpes. Setas apontam regiões biodegradadas.

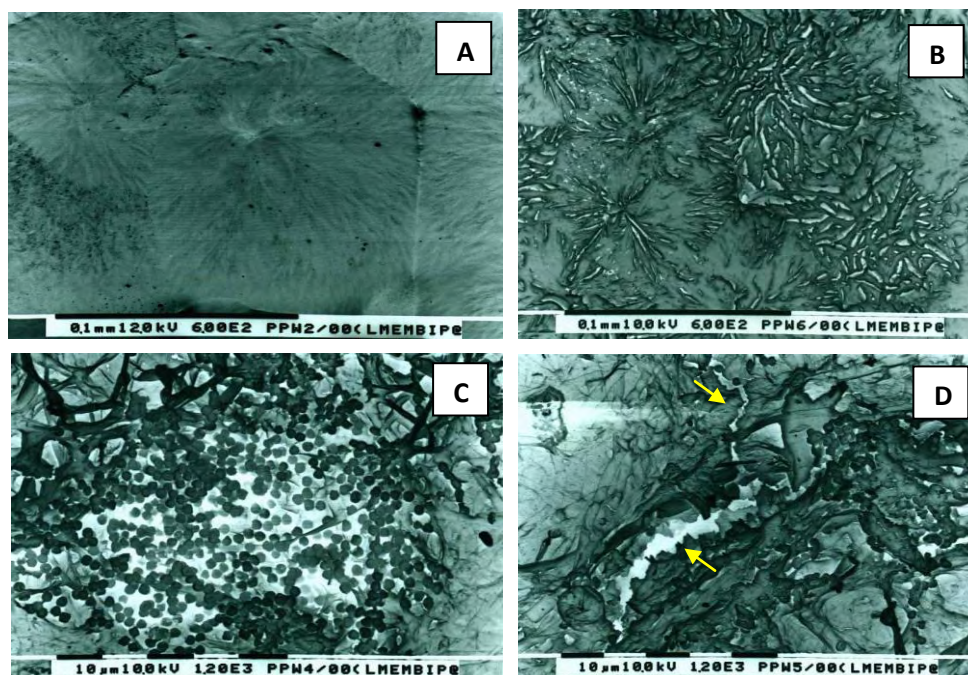


Figura 47. MEV dos filmes de PCL: (A) original e (B) biotratado por 30 dias apresentando erosão superficial dos esferulitos, (C) biotratado por 30 dias com esporos de *Aspergillus* e (D) biotratado por 30 dias com rachaduras (setas).

A Tabela 7 apresenta a identificação das espécies fúngicas isoladas das amostras de polímeros (PVC e PCL).

Tabela 7. Relação dos fungos isolados de amostras de PVC e PCL

Cultura	Micro-organismo
1	<i>Aspergillus fumigatus</i>
2	<i>Aspergillus versicolor</i>
3	<i>Aspergillus</i> cf. <i>penicillioides</i>
4	<i>Penicillium simplicissimum</i>
5	<i>Penicillium</i> sp. seção <i>Divaricatum</i>
6	<i>Penicillium</i> sp. seção <i>Furcatum</i>
7	<i>Penicillium</i> sp. 1
8	<i>Penicillium</i> sp. 2
9	<i>Penicillium</i> sp. 3
10	<i>Bipolaris heveae</i>

Como pode ser observado na Tabela 7, a maioria dos fungos isolados pertence aos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*. A literatura relata uma enorme quantidade de trabalhos que citam tais gêneros como promissores em estudos relacionados à biodegradação de polímeros e outros compostos persistentes (GRISA et al. 2009; LEITÃO, 2009; KURAKOV et al. 2008; YAMADA-ONODERA et al. 2001). Sanyal et al. 2006, analisaram a biodegradação de PHB e PHB-V (16%HV) por 6 fungos isolados de solo, sendo todos *Aspergillus* spp. Gaboardi

(2007) estudou a biodegradação de blendas de PHB e PEBD, obtendo como maioria dos fungos isolados os pertencentes aos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*.

Aspergillus fumigatus é um fungo termotolerante, apresentando temperatura ótima de crescimento de 40°C. Pode ser encontrado com grande facilidade no solo, em vegetais, em matéria orgânica em decomposição, poeira doméstica e adubos. É capaz de degradar hidrocarbonetos, pesticidas clorados (DDT e atrazina), e materiais de PVC flexível. Produz ácido cítrico, riboflavina, gliotoxina, fumigacina, amilase, lipase, fosfatase, PHB depolimerase e toxinas como aflatoxinas e nefrotoxinas (DOMSCH et al.1993; KIM et al. 2000; SAMSON et al. 1995). Estudos realizados com as espécies *A. fumigatus*, *A. terreus* mostrou que essas são capazes de degradar polímeros sintéticos como ácido poliglicólico (PGA), PLA e PCL (CHIELLINI et al. 1996).

Aspergillus versicolor trata-se de um fungo xerofílico, comumente encontrado no solo, em sementes, queijos, cereais, amendoim, temperos, produtos industrializados e à base de carne seca. Pode ser isolado também em ambientes internos e em lodo ativado. Seu crescimento ótimo varia entre 21°C-30°C. É conhecido por produzir toxinas de interesse farmacêutico ou agropecuário, como a esterigmatocistina, nidulotoxina, versicolorina, riboflavina, e o ácido ciclopiazônico, além de pigmentos, como as antracnonas (DOMSCH et al.1993; SAMSON et al. 1995)

Aspergillus penicillioides pode ser isolado de produtos com baixa umidade como temperos, frutas secas, amendoim, cascas de arroz cilados e ambientes como padarias. Pode estar presente também em ambientes internos como museus, arquivos, em móveis e na poeira doméstica (DOMSCH et al.1993).

Várias espécies de *Penicillium* estão envolvidas em estudos de biodegradação de polímeros como: *P. funiculosum*, *P. janthinellum*, *P. minioluteum*, *P. notatum*, *P. purpurogenum* e *P. simplicissimum*, capazes de degradar PHB e PEBD. A linhagem *P. simplicissimum* YK mostrou-se promissora na degradação de PE, bem como a estirpe de *P. roquefort*, na de PLA (GABOARDI, 2007; KIM et al. 2000; TORRES et al. 1996; YAMADA-ONODERA et al. 2001).

Penicillium simplicissimum pode ser encontrado em solos de florestas, solos pouco cultivados, em terrenos áridos onde há apenas vegetação arbustiva e rasteira. Apresenta crescimento ótimo a 37°C. Este fungo foi relatado como produtor de carboxipeptidase e de utilizar nitrito como fonte de nitrogênio (DOMSCH et al.1993). Estudos recentes de Bergsten-Torralba et al. (2009) relataram resultados promissores na remoção de diferentes tipos de corantes têxteis pela linhagem de *P. simplicissimum* INCQS 40211.

Bipolaris sp. pertence ao grupo dos dematiáceos, fungos de parede melanizada, encontrados em ambientes com pouca umidade. Geralmente seus esporos são distribuídos pelo vento ou carregados por insetos (DOMSCH et al. 1993). *Bipolaris heveae* apresenta espécies comumente isoladas de restos de plantas, solos, gramíneas e outras superfícies. Em ambientes internos são capazes de crescer sobre tintas, madeiramento e em dutos de ar. As colônias apresentam crescimento rápido e textura aveludada (DRIRITE, 2011).

5.7 Perdas de massa

A determinação da perda de massa é o método mais comumente aplicado e relativamente sensível para determinar mudanças causadas pela ação microbiana nos polímeros (FLEMMING, 1998). Estes por sua vez diferem nos valores ou mecanismos de degradação, determinado pela localização e energia requerida para quebrar as ligações. As moléculas com grupos hidrolisáveis, como ésteres, são rapidamente degradadas se comparadas às que contem outros grupos (GRACIDA et al. 2004).

Os valores da porcentagem de perda de massa dos filmes de PVC e PCL durante os ensaios de biodegradação estão apresentados no ANEXO A. É importante salientar que as amostras controle, incubadas sem a presença de micro-organismos não apresentaram perda de massa (resultados não apresentados).

Não houve diferença estatística no que diz respeito à perda de massa das amostras de PVC expostas aos tratamentos microbianos nos diferentes meios de cultivo. Concordando com nosso resultado, CAMPOS (2008) ao estudar filmes de PVC tratados com micro-organismos de solo e de chorume, também verificou que a perda de massa dos filmes de PVC foi insignificante. Como anteriormente descrito na Tabela 1, há alguns parâmetros e fatores envolvidos no processo de degradação. Acredita-se que a degradação em níveis expressivos do PVC neste trabalho não foi alcançada devido a pouca porosidade e hidrofobicidade do polímero, ou ainda devido ao pouco tempo ao qual o mesmo foi exposto aos fungos.

A degradação dos filmes de PCL pelo consórcio foi mais eficiente do que pelos micro-organismos isolados, obtendo-se valores de $p=0,0008$, para testes realizados em meio completo e $p=0,0003$ em meio incompleto. No que diz respeito ao meio de cultivo utilizado, observa-se resultados significativos para o PCL em meio incompleto: $p=0,0001$ para o tratamento com os fungos do consórcio e $p<0,0001$ para as estirpes contaminantes. Estes valores provam que os fungos foram capazes de metabolizar os componentes do polímero, uma vez que o meio não proporcionava nenhuma fonte de carbono.

A perda de massa obtida pela ação do consórcio em nosso estudo foi de até 75% para filmes de PCL e 9% para filmes de PVC, ambos em meio incompleto e biotratados por 30 dias. Quanto aos fungos filamentosos isolados, os resultados demonstraram perdas sutis de até 6,9% em filmes de PCL e 4,7% nos de PVC no mesmo período de tempo. Massardier-Nageotte et al. (2006), observaram a completa colonização do PCL por micro-organismos, obtendo uma degradação de 35% ao final de 28 dias em condições aeróbias. Outro estudo com o mesmo polímero verificou perdas de 30% em 60 dias usando *Bacillus* sp. PG01 (WU et al. 2007).

Em alguns filmes de PCL do presente estudo, incubados em meio incompleto, ao qual foi observada a adesão apenas do *C. globosum*, a biodegradação da amostra foi total. CAMPOS (2008) verificou que houve grande perda de massa, principalmente quando os filmes de PCL foram tratados por 60 dias em solo, chegando a 90% de perda de massa. Com 90 dias de tratamento, os filmes de PCL foram totalmente biodegradados.

Portanto, a perda de massa foi um parâmetro importante para mensurar a degradação dos filmes de PCL no presente trabalho.

6 CONCLUSÕES

Concluiu-se que:

- ⇒ O ascomiceto *Chaetomium globosum* apresentou grande potencial para degradação do PCL e do PVC;
- ⇒ Perdas de massa estatisticamente significativas ocorreram nos filmes de PCL incubados em meio incompleto com a espécie *Chaetomium globosum*;
- ⇒ A degradação dos filmes de PCL pelo consórcio foi mais eficiente do que pelos micro-organismos isolados, nos dois meios testados;
- ⇒ O consórcio utilizou o polímero como nutriente no meio incompleto mais eficientemente que os fungos isolados e pela linhagem *Phanerochaete chrysosporium* CCB 478;
- ⇒ A adesão microbiana ocorreu tanto no polímero hidrofílico (PCL) como no hidrofóbico (PVC), sendo este o primeiro passo para a biodegradação ou biodeterioração do polímero;
- ⇒ O processo de biodegradação das amostras submetidas aos biotratamentos foi dependente do contato e da adesão dos micro-organismos na superfície dos polímeros;
- ⇒ As mudanças morfológicas tanto no PVC como no PCL foram importantes na avaliação do processo biodegradativo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABD EL-NASSER, N.H.; HELMY, S.M.; EL-GAMMAL, A. A. Formation of enzymes by biodegradation of agricultural wastes with white rot fungi. **Polym. Degrad. Stabil.**, v.55, p. 249-255, 1997.

ABIPLAST. Perfil da Indústria Brasileira de Transformação de Plásticos. Apresenta texto sobre: Anuário da Indústria Química Brasileira 2009. São Paulo. 2009. Disponível em: <<http://www.abiplast.org.br/index.php?page=conteudo&id=00038&cat=men&sub=00038>>. Acesso em: 06 dez. 2009.

ABIQUIM. Resinas Termoplásticas - Consumo per capita no Brasil. Disponível em: <http://www.abiquim.org.br/resinastermoplasticas/estatisticas_33.asp> Acesso em: 10 out. 2010

ABOU-ZEID, D.-M.; MÜLLER, R.-J.; DECKWER, W.-D. Degradation of natural and synthetic polyester under anaerobic conditions. **J. Biotechnol.**, Amsterdam, v.86, p.113-126, 2001.

ABRELPE Panorama dos resíduos sólidos no Brasil e no mundo. 2009. Disponível em: <<http://www.abrelpe.org.br/downloads/rioambiente/Lancto%20Panorama%202009%20-RJ%2026mai2010.pdf>> Acesso em: 10 out. 2010.

AGGARWAL, R.; TEWARI, A.K.; SRIVASTAVA, K.D.; SINGH, D.V. Role of antibiosis in the biological control of spot blotch (*Cochliobolus sativus*) of wheat by *Chaetomium globosum*. **Mycopathol.** v.157, p.369-377, 2004.

AMASS, W.; AMASS, A.; TIGHE, B. A review of biodegradable polymers: uses, current developments in the synthesis and characterization of biodegradable polyesters, blends of biodegradable polymers and recent advances in biodegradation studies. **Polym. Internat.**, v.47, p.89-144, 1998.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS, Philadelphia. Standard Practice for Determining Resistance of Synthetic Polymeric Materials to Fungi: ASTM G21-96 (2002). **Annual Book of ASTM Standard**, v.14.04, 2002.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS - D- 6288-98 “Standard Practice for Separation Washing of Recycled Plastics Prior Testing” (1998).

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS D-5488- 94D “Terminology for compostable and biodegradable packaging” (1994).

AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION – ATCC. Disponível em: <www.atcc.org>. Acesso em: 09 Nov. 2010

AHN, B.D.; KIM, S.H.; YANG, J.S. Synthesis and characterization of the biodegradable copolymers from succinic acid and adipic acid with 1,4-butanediol. **J. Appl. Pol. Sci. and Tech.** v.82, p.2808-2826, 2001.

ARGÔLO, E.J.; LINS, M.C.M.; PEREZ, M.L.A.; PALHA, F.; ALMEIDA, Y.M.B.; LIMA, M.A.G.A. Biodegradação de Filmes Poliméricos por Ação dos Fungos *Talaromyces wortmannii* e *Phanerochaete crysosporyum*. In: XIV Simpósio Nacional de Fermentações, 2003. CD-ROM. Florianópolis : Universidade Federal de Santa Catarina, 2003.

BALAJEE, S.A.; HOUBRAKEN, J. VERWEIJ, P.E.; HONG, S-B.; YAGHUCHI, T.; VARGA, J.; SAMSON, R.A. *Aspergillus* species identification in the clinical setting. **Studies in mycology.** v.59, p. 39-46, 2007.

BANKE, S.; FRISVAD, J.C.; ROSENDHAL, S. Taxonomy of *Penicillium chrysogenum* and related xerophilic species, based on isozyme analysis. **Mycol. Res.** v.101, p.617-624, 1997.

BARDI, M.A.G.; ROSA, D.S. Avaliação da biodegradação em solo simulado de poli (ε-caprolactona), acetato de celulose e suas blends. **Revista Brasileira de Aplicações de Vácuo**, v.26, p. 43-47, 2007.

BATTESTIN, V.; MACEDO, G.A. Tannase production by *Paecilomyces variotii*. **Bioresour.** v.98, p.1832-1837, 2007.

BENEDICT, C.V.; COOK, W.J.; JARRET, P.; CAMERON, J.A.; HUANG, S. J.; BELL, J.P. **J. Appl. Polym. Sci.**, v.28, p.327, 1983.

BERGSTEN-TORRALBA, L.R. et al . Decolorization of different textile dyes by *Penicillium simplicissimum* and toxicity evaluation after fungal treatment. **Braz. J. Microbiol.**, v. 40, n.4, 2009.

BIDOKI, S.M.; WITTLINGER, R. Environmental e economical acceptance of polyvinyl chloride (PVC) coating agents. **J. of Cleaner Production.** v.18, p.219-225, 2010.

BONONI, V.L.R.; MACHADO, K.M.G.; MATHEUS, D.R.; VITALI, V.M. Biodegradação de organoclorados no solo por basidiomicetos lignocelulolíticos. In: MELO, I.S e AZEVEDO, J.L. Microbiologia Ambiental, 2ª ed., São Paulo: EMBRAPA, 647 p. 2008.

BOSNA, T. N.P., HARMS, H. & ZEHNDER, A. J. B. 2001. Biodegradation of xenobiotics in environment and technosphere. *In: The handbook of environmental chemistry: Biodegradation and Persistence*. Beek, B. (ed.). Berlin, v.2, 163-202.

BRANDL, H.; GROSS, R.A.; LENZ R.W.; FULLER R.C. Plastics from bacteria and for bacteria: Poly (hydroxyalkanoates) as natural, biocompatible, and biodegradable polyesters. **Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.** v.41, p.77-93, 1990.

CALIL, M.R.; GARBOARDI, F.; GUEDES, C.G.F.; ROSA, D.S. Comparison of the biodegradation of poly(E-caprolactone), cellulose acetate and their blends by the Sturm test and selected cultured fungi. **Polim. Test.** v.25, p.597-604, 2006.

CALLISTER Jr, W.D. Fundamentals of Material Science and Engineering. John Wiley & Sons, Inc. New York, 2001, 524p.

CAMPOS, A. Degradação de blendas poliméricas por micro-organismo de solo e chorume. 2008. 132p. Tese de doutorado apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Rio Claro – SP, Brasil.

CAPITELLI, F.; PRINCIPI, P.; SORLINI, C. Biodeterioration of modern materials in contemporary collections: can biotechnology help? **Trends Biotechnol.** v.24, p.350–354, 2006.

CBS – CENTRAALBUREAU VOOR SCHIMMELCULTURES. **CBS yeast collections**. Disponível em: <<http://www.cbs.knaw.nl/yeast/Defaultpage.aspx>>. Acesso em: 07 set. 2010.

CHENG, Z; TEOH, S. H. Surface modification of ultra thin poly (ε-caprolactone) films using acrylic acid and collagen. **Biomaterials**, v.25,p.1991-2001, 2004.

CHIELLINI, E.; CORTI, A.; GIOVANNINI, A.; NARDUCCI, P.; PAPARELLA, A.M.; SOLARO, R. Evaluation of biodegradability of poly(ε-caprolactone)/poly(ethylene terephthalate) blends. **Journal of Polymers and Environment**, v. 4, n. 1, p. 37-50, 1996.

CHIELLINI, E.; SOLARO, R. Biodegradable polymeric materials. **Advanced Materials**, 8, n.4, 1996.

CHUNG, T.W.; YANG, M.C.; TSENG, C.C.; SHEU, S.H.; WANG, S.S.; HUANG, Y.Y.; CHEN, S.D. Promoting regeneration of peripheral nerves in-vivo using new PCL-NGF/Tirofiban nerve conduits. **Biomaterials**. v.32, p. 734-743, 2011.

CLAYDON, N.; ALLAN, M.; HANSON, J.R.; AVENT, A.G. Antifungal alkyl pyrones of *T.harzianum*. **Trans. Br. Mycol. Soc.** v.88, p.503-513, 1987.

CROUS, P.W. et al. **Fungal biodiversity**. CBS Laboratory Manual Series. Utrecht: CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre. 2009. 269 p.

DARWIS, D.; MITOMO, H.; ENJOJI, T.; YOSHII, F.; MAKUUCHI, K.. Enzymatic degradation of radiation crosslinked poly (ϵ -caprolactone). **Polym. Degrad. Stabil.**, Essex, v.62, p.259-265, 1998.

DOMSCH, K. H.; GAMS, W.; ANDERSON, T.H. **Compendium of soil fungi**. London: Academic Press. v. 1, 1993.

DOSS, R.P.; POTTER, S.W.; CHASTAGNER, G.A.; CHRISTIAN, J.K. Adhesion of non-germinated *Botrytis cinerea* conidia to several substrata. **App. and Envir. Microbiol.** v.59, p.1786-1791, 1993.

DERITE A Pathogenic Species of Mold Found in and Around Tampa Bay. 2011. Disponível em: <<http://www.driritetampa.com/mold-remediation/types-of-mold/pathogenic/bipolaris>> Acesso em: 22 fev. 2011.

DUPONT, R.R.; BRUELL, C.J.; MARLEY, M.C.; DOWNEY, D.C.; NORRIS, R.D.; HULLING, S.G.; PIVETS, B. Bioremediation. Annapolis: American Academy of Environmental Engineers and USEPA. 1998.596p.

EGGINS, H.O.W.; OXLEY, T.A. Biodeterioration and biodegradation. **Int. Biodeter and Biodegr.** v.48, p.12-15, 2001.

EL-AGHOURY, A.; VASUDEVA, R.K.; BANU, D.; ELEKTOROWICZ, M.; FELDMAN, D. Contribution to the study of fungal attack on some plasticized vinyl formulations . **J. Polym. Environ.**, v.14, p.135-147, 2006.

ELDSÄTER, C.; ERLANDSSON, B.; RENSTAD, R.; ALBERTSSON, A.-C. KARLSSON, S. **Polymer**, v.41, p.1297, 2000.

ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. **Fungos, Uma Introdução à Biologia, Bioquímica e Biotecnologia**. Caxias do Sul. EDUCS, 2004, 210p.

FALCONE, D. M. B.; AGNELLI, J. A. M.; FARIA, L.I.L. Panorama setorial e perspectivas na área de polímeros biodegradáveis. **Polímeros Ciência e Tecnologia** v.17, p.5-9, 2007.

FALCONI, F.A. Bioconversão de compostos fenólicos por fungos ligninolíticos. 1998. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas.

FAN, T.; LIU, Y.; FENG, B.; ZENG, G.; YANG, C.; ZHOU, M.; ZHOU, H.; TAN, Z.; WANG, X. Biosorption of cadmium(II), zinc(III) and lead(II) by *Penicillium simplicissimum*: isotherms, kinetics and thermodynamics. **J. Hazard. Mater.** v.160, p.655-661, 2008.

FAULL, J.L.; GRAEMECOOK, K.A.; PILKINGTON, B.L. Production of an isonitrile antibiotic by an UV-induced mutant *Trichoderma harzianum*. **Phytochemistry**, v. 36, p.1273-1276, 1994.

FLEMMING, H-C. Relevance of biofilms for the biodeterioration of surfaces of polymeric materials. **Polym. Degrad. Stabil.**, Essex, v.59, p.309-15, 1998.

FOGLE, M.R.; DOUGLAS, D.R.; JUMPER, C.A.; STRAUS, D.C. Growth and mycotoxin production by *Chaetomium globosum* is favored in neutral pH. **Int. J. Mol. Sci.** v.9, p.2357-2365, 2008.

FRISVAD, J.C.; THRANE, U. Mycotoxin production by common filamentous fungi. In: SAMSON, R.A.; HOEKSTRA, E.S.; FRISVAD, J.C.; FILTENBORG, O. Introduction to food and air-borne fungi. 6a ed, Utrecht, p.321-330, 2002.

FUJII, K.; TAKESHI, K. *Penicillium* strains as dominant degraders in soil for coffee residue, a biological waste unsuitable for fertilization. **J. Appl. Microbiol.** v.103, p.2713-2720, 2007.

GABOARDI, F. Avaliação das propriedades mecânicas, térmicas e de biodegradação de blendas de PHB e PEBD com e sem aditivos pró-oxidantes. 2007. 117 p. Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Engenharia e Ciência dos Materiais da Universidade São Francisco, Itatiba – SP, Brasil.

GASSNER, F.; OWEN, A.J. Physical properties of poly (b-hidroxybutyrate)-poly (ε-caprolactone) blends. **Polymer Report**, v.35, p.2233-2236, 1994.

GOÉS NETO, A.; GUSMÃO, L. F. P. **Micologia**. Laboratório de Pesquisa em Microbiologia – LAPEM. Feira e Santana-BA: 2004. Disponível em: <http://www.uefs.br/disciplinas/bio221/aula_03-versao_02.rtf> Acesso em: 26 jun. 2009.

GRACIDA, J.; ALBA, J.; CARDOSO, J.; PEREZ-GUEVARA, F. Studies of biodegradation of binary blends of poly (3- hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV) with (poly-2-hydroxyethylmetacrilate) (PHEMA). **Pol Degrad Stab.** v.83, p.247-253, 2004.

GRIFFIN, D.H. **Fungal physiology**. 2 ed. New York: John Wiley, 1994. 428p.

GRISA, A.M.C.; ZENI, M. Recent Advances on Biodegradable Polymers and Sustainable Composites, 2008, Nova Publisher, Hardcover (vol.3).

GRISA, A.M.C.; KAULING, A.P.; ZENI, M. Avaliação da degradação do poli (cloreto de vinila) (PVC) no meio ambiente. In: Anais 9º Congresso Brasileiro de Polímeros – Campina Grande, PB – Outubro/2007

GRISA, A.M.C.; SIMIONI, T.; ZENI, M.; BRANDALISE, R.N. Biodegradação do PVC flexível em aterro sanitário. In: Anais 10º Congresso Brasileiro de Polímeros – Foz do Iguaçu PR – Outubro/2009.

GU. J-D. Microbiological deterioration and degradation of synthetic polymeric materials: recent research advances. **Intern. Biodet. & Biodegrad.** v.52, p.69-91, 2003.

GU. J-D.; FORD, T.; THORP, K.; MICHELL, R. Microbial Growth on Fibre-Reinforced Composite Materials. **Intern. Biodet. & Biodegrad.**, v.37, p.197-204. 1996.

GUMARGALIEVA, K.Z.; ZAIKOV, G.E.; SEMENOV, S.A.; ZHDANOVA, O.A. The influence of biodegradation on the loss of a plasticiser from poly(vinyl chloride). **Polym Degrad Stab** v.63, p.111–112, 1999.

GUNATILLAKE, P.A.; ADHIKARI, R. Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering. **European Cells and Materials**, v. 5, p.1, 2003.

HARMAN, G.E.; LORITO, M.; YNCH, J.M. Uses of *Trichoderma* spp. to alleviate or remediate soil and water pollution. **Advances in Applied Microbiology**, v.56, p.313–330, 2004.

HARMAN, G.E. Overview of mechanism and uses of *Trichoderma* spp. **Phytopathology**, v.96, p.190–194, 2006.

HOUBRAKEN, J.; SAMSON, R.A.; FRISVAD, J.C. *Byssosclamis*:significance of heat resistance and mycotoxin production. p.211-224. In: HOCKING, A.D.; PITT, J.I.; SAMSOM,

R.A.; THRANE, U. Advances in food mycology: advances in experimental medicine and biology, v. 571, 2006, Springer Science-BusinessMedia, Inc., NY.

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 *Byssoschlamyus spectabilis* (Anamorph *Paecilomyces variotii*). **Applied and Environmental Microbiology**, v.74, p.1613-1619, 2008.

INSTITUTO DO PVC. **PVC: Lado a lado com as conquistas da medicina**. Disponível em: <http://www.institutodopvc.org/publico/?a=conteudo_link&co_id=79> Acesso em: 10 out. 2010.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION - ISO 846:1978 Plastics: Determination of behaviour under the action of fungi and bacteria - Evaluation by visual examination or measurement of change in mass or physical properties.

JARA, A.M.A.T. Biofilmes e enzimas sintetizados no processo de degradação do tereftalato de polietileno (PET) por *Bacillus subtilis* e *Phanerochaete chrysosporium*. 100p. 2007. Dissertação em Desenvolvimento de Processos Ambientais, Universidade Católica do Pernambuco, Recife-PE, Brasil.

JIMÉNEZ, A.M.; BORJA, R.; MARTÍN, A.; RAPOSO, F. Kinetic analysis of the anaerobic digestion of untreated vinasses and vinasses previously treated with *Penicillium decumbens*. **J. Environ. Manage.** v.80, p.303-310, 2006.

JOBARD, D.; RASCONI, S.; SIME-NGANDO, T. Diversity and functions of microscopic fungi: a missing component in pelagic food webs. **Aquatic Sciences**. v. 72, p. 255-268, 2010.

JONES, E.B.G. Fungal adhesion. **Mycological Research**, v.98, p.961-981, 1994.

KAMO, T.; KODERA, Y.; SATO, Y.; KUSHIYAMA, S. Effects of pressure on the degradation of poly (vinyl chloride). **Pol. Degr. and Stab.** v.84, p.79-85, 2004.

KANOKMEDHAKUL, S.; KANOKMEDHAKUL, K.; PHONKERD, N.; SOYTONG, K.; KONGSAEREE, P.; SUKSAMRARN, A. Anti mycobacterial anthraquinone-chromanone compound and diketopiperazine alkaloid from fungus *Chaetomium globosum* KMITL-N0802. **Planta Medica**, v.68, 834-836, 2001.

KANOKMEDHAKUL, S.; KANOKMEDHAKUL, K.; NASOMJAI, P., LOUNGSYPOUPHANH, S., SOYTONG, K., ISOBE, M., KONGSAEREE, P., PRABPAI, S.S. AND SUKSAMRARN, A. Antifungal Azaphilones from the Fungus, *Chaetomium cupreum* CC300. **Natural Products** v.69, p.891-895, 2006.

KELEN, T. **Polymer Degradation**. New York, Van Nostrand Reinhold Company, 1983.

KERN, M.E.; BLEVINS, K.S. **Micologia Médica**. 2. ed. São Paulo: Editora Premier, 1999. 256 p.

KHATIWALA, V.K.; SHEKHAR, N.; AGGARWAL, S.; MANDAL, U.K. Biodegradation of poly(e-caprolactone) (PCL) film by *Alcaligenes faecalis*. **J. Polim. Environ.** v.16, p.61-67, 2008.

KIM, H.; JU, H-S.; KIM, J. Characterization of an extracellular poly (3-hydroxy-5-phenylvalerate) depolymerase from *Xanthomonas* sp. JS02. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v.53 p.323–27, 2000.

KIRBAS, Z.; KESKIN, N; GÜNER, A. Biodegradation of Polyvinylchloride (PVC) by White Rot Fungi. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.** v.63, p.335-342, 1999.

KLEIN, D.; EVELIGH, D.E. Ecology of *Trichoderma*. In: HARMAM, G.E.; KUBICEK, C.P. editors. *Trichoderma e Gliocladium*. Bristol, PA: Taylor & Francis, p.57-74, 1998.

KLEMCHUK, P.P. Degradable plastics: a critical review. **Polym. Degrad. Stabil.**, v.21, p.183-202, 1990.

KLUN U.; FRIEDRICH J.; KRZAN A. Polyamide-6 fibre degradation by a lignolytic fungus. **Polymer Degrad Stab** v.79, p.99-104, 2003.

KRUPP L. R.; JEWELL, W. J. Biodegradability of modified plastics film in controlled biological environments. **Environmental Science & Technology**. v.26, p.193-198, 1992.

KUMAR, G. S.; KALPAGAM, V. AND NANDI, U. S. Biodegradable polymers: prospects, problems and progress. **J. Mat. Sci. Macromol. Chem. Phys.**, v.C22, p.225-260, 1983.

KUNIOKA, M.; NINOMIYA, F.; FUNABASHI, M. Novel evaluation method of biodegradabilities for oil-based polycaprolactone by naturally occurring radiocarbon-14 concentration using accelerator mass spectrometry based on ISO 14855-2 in controlled compost. **Polymer Degradation and Stability**. v.92, p.1279-1288, 2007.

KURAKOV, A.V.; GEVORKYAN, S. A.; GOGINYAN, V. B.; OZERSKAYA, S. M. Diversity and specific composition of microscopic fungi on synthetic polymeric materials. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v.44, p. 210-212, 2008.

KÜSTER, E. Biological degradation of synthetic polymers. **J. Appl. Polym. Sci. Appl. Polym. Symp.**, v.35, p.395-404, 1979.

LEITÃO, A.L. Potential of *Penicillium* species in the bioremediation field. **International J. Env. Res. Public Health**, v.6, p.1393-1417, 2009.

LEITÃO, A.L.; DUARTE, M.P.; OLIVEIRA, J.S. Degradation of phenol by halotolerant strain *Penicillium chrysogenum*. **Int Biodeter. Biodeg.** v.59, p.220-225, 2007.

LIN, A.; CHEN, C.K.; CHEN, Y.J. Molecular action of tricholin, a ribosome-inactivating protein isolated from *Trichoderma viride*. **Mol. Microbiol.** v.5, p.3013, 1991.

LUCAS, N.; BIENAIME, C.; BELLOY, C.; QUENEUDEC, M.; SILVESTRE, F.; NAVA-SAUCEDO, J.E. Polymer biodegradation: mechanisms and estimation techniques – A review. **Chemosphere**, 2008.

LUCCHESI, C.; FERREIRA, B. M. P.; DUEK, E. A. R.; SANTOS JR, A. R.; JOAZEIRO, P. P. Increased response of Vero cells to PHBV matrices treated by plasma. **J Mater Sci: Mater Med.**, v.19, p.635-643, 2008.

LUGAUSKAS, A.; LEVINSKAITE, E.; PEEIULYTE, D. Micromycetes as deterioration agents of polymeric materials. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.52, p.233-242, 2003.

LUGAUSKAS, A.; JASKELEVICIUS, B.; LEVINSKAITE, E.; PROSYCEVAS, I. Influence of biological factors in aging of polymeric materials under natural environmental conditions. **Material Science**, v. 10, p.24-28, 2004.

MACHADO, K.M.G.; MATHEUS, D.R.; BONONI, V.L. Ligninolytic enzymes production and Remazol brilliant blue R decolorization by tropical Brazilian basidiomycetes fungi. **Braz. J. Microbiol.** v.36, p. 246-252, 2005.

MADDEVER, W. J.; CHAPMAN, G. M. Modified starch-based biodegradable plastics. **Plastics Eng.** v.45, p.31-34, 1989.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. Microbiologia de Brock. São Paulo, Prentice Hall, 579 p., 2004.

MARTINS, M. A. M. ; FERREIRA, I. C.; SANTOS, I. M.; QUEIROZ, M. J.; LIMA, N. Biodegradation of bioaccessible textile azo dyes by *Phanerochaete cryosporium*. **J. Biotechnology**, v.89, p.91-98, 2001.

MARTINS-FRANCHETTI, S.M.; MARCONATO, J.C. Polímeros biodegradáveis – Uma solução para diminuir a quantidade de resíduos plásticos. **Química Nova**, v.29, p.811-816, 2006.

MARTINS-FRANCHETTI, S.M.; CAMPOS, A. EGERTON, T.A.; WHITE, J.R. Structural and morphological changes in Poly(caprolactone)/poly(vinyl chloride) blends caused by UV irradiation. **J.Mater. Sci.**, Norwell, v.43, p.1063-1069, 2008.

MARTINS-FRANCHETTI, S.M.; EGERTON, T.A.; WHITE, J.R. **J.of Pol. And Environ.** 2010, DOI: 10.1007/s10924-009-0158-3 et al. 2010

MARONGIU, A.; FARAVELLI, T.; BOZZANO, D.; DENTE, M.; RANZI, E. Thermal degradation of poly (vinyl chloride). **J. of Analytical and Applied Pyrolysis** v.70, p.519-553, 2004.

MASSARDIER-NAGEOTTE, V.; PESTRE, C.; CRUARD-PRADET, T.; BAYARD, R. Aerobic and anaerobic biodegradability of polymer films and physic-chemical characterization. **Polymer Degradation and Stability**, v.91, p.620-627, 2006.

MELÉNDEZ-ESTRADA, J.; AMEZCUA-ALLIERI, M.A.; ALVAREZ, P.J.J.; RODRÍGUEZ-VÁRZQUEZ, R. Phenanthrene removal by *Penicillium frequentans* grown on a solid-state culture: effect of oxygen concentration. **Environ. Technol.** v.27, p.1073-1080, 2006.

MERGAERT, J.; WEBB, A.; ANDERSON, C.; WOUTERS, A.; SWINGS, J. Microbial degradation of P(3HB) e P(3HB)-co-3HV in soils. **Applied and Environmental Microbiology**, p.3233-3238, 1993.

MIDDLETON J.C.; TIPTON A.J. Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices. **Biomaterials**, Surrey, v.21, p.2335-2346, 2000.

MIKULASOVA, M.; KOSIKOVÁ, B.; ALEXY, P.; KACIK, F.; URGELOVÁ, E. effect of blending lignin biopolymer on the biodegradability of polyolefin plastics. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.17, p.601-607, 2001.

MOMESSO, L.S. et al. Chaetoglobosinas produzidas por *Chaetomium globosum*, fungo endofítico associado a *Viguiera robusta* Gardn. (Asteraceae). **Quím. Nova**, v. 31, 2008.

MORAES, M.F.V. **A redução de resíduos sólidos no meio ambiente pelo estudo da aplicação do polihidroxibutirato (PHB) em embalagens moldadas pelo processo de termoformação a vácuo.** V Congresso de estudantes de ciência e engenharia de materiais. Florianópolis, 2003. 1p.

MORAES, M.F.V. Produção e caracterização da blenda biodegradável poli(hidroxibutirato)[PHB] / co-poliéster alifático aromático [Ecoflex®] para aplicações em embalagens. 2004. 134f. Dissertação de Mestrado em Rede Temática em Engenharia de Materiais da Universidade Federal de Ouro Preto, da Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais e da Universidade do Estado de Minas Gerais.

NAIR, L. S.; LAURENCIN, C. T. Biodegradable polymers as biomaterials. **Progress in Polymer Science**, v. 32, p. 762–798, 2007.

NUNES, L.R. Tecnologia do PVC, São Paulo, 2ª edição, ProEditores/Braskem, 2006, 448 p.

ODA, Y.; ASARI, H.; URAKAMI, T. TONOMURA, K.J. Microbial degradation of poly(3-hydroxybutyrate) and polycaprolactone by filamentous fungi. **J Ferm Bioenerg** 80, p.265-269, 1995.

OHURA, T.; KASUYA, K.; DOI, Y. Cloning and characterization of the polyhydroxybutyrate depolymerase gene of *Pseudomonas stutzeri* and analysis of the function of substrate-binding domains. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 65 p.189–97, 1999.

OKADA M. Chemical syntheses of biodegradable polymers. **Progr Polym Sci.** v.27, p.87–133, 2002.

PACIA Plastics and chemicals industries association. **Biodegradable plastics – developments and environmental impacts.** Environm. Australia. Australia, 2002, 66p.

PACI, M.; LA MANTIA, F. P. Influence of small amounts of polyvinylchloride on the recycling of polyethyleneterephthalate. **Polymer Degradation and Stability.** v. 63, p. 11-14, 1999.

PAPAVIZAS, G.E. *Trichoderma* and *Gliocladium*: Biology, ecology and potential biocontrol. **Ann. Rev. Phytophatol.** v.23, p.23-54, 1985.

PITT J.I. A laboratory guide to common *Penicillium* species. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, Division of Food Processing, 1991.

PLASTIVIDA 2010. **Monitoramento dos índices de reciclagem mecânica de plásticos no Brasil (IRmP)** Disponível em: <<http://www.plastivida.org.br/2009/pdfs/IRmP/IndiceReciclagem2007.pdf>> Acesso em: 10 out. 2010

PREMRAJ, R.; DOBLE, M. Biodegradation of polymers. **Indian J. of Biotechnol.** v.4, p.186-193, 2005.

RABINOVICH, M.L.; BOLOBOVA, A.V.; VASIL'CHENKO, L.G. Fungal decomposition of natural aromatic structures and xenobiotics: a review. **Applied Bichem. and Microbiology**, v.40, p.5-23, 2004.

RIPPEL-BALDES, A. Grundzuge der Mikrobiologie, 3a ed. Springer, Berlin Heidelberg. New York, 1955.

ROAF, S.; FUENTES, M.; THOMAS, S. **ECOHOUSE** 3^a ed. Architectural Press, 2007, 479p.

ROBLES, A.; LUCAS, R.; de CIENFUEGOS, G.A. Biomass production and detoxification of wastewaters from the olive oil industry by strains of *Penicillium* isolated from wastewater disposal ponds. **Biores. Technol.** v.74, p.217-221, 2000.

RODOLFO JR. A.; MEI, L.H. Mecanismos de degradação e estabilização térmica do PVC. **Polímeros**, v.17, p.3. 2007.

RODRÍGUEZ, K.; STCHIGEL, A. GUARRO, J. Three new species of *Chaetomium globosum* from soil. **Mycologia**. v.94, p.116-126, 2002.

ROKAS, A. et al. What can comparative genomics tell us about species concepts in the genus *Aspergillus*? **Stud. Mycol.** V.59, p.11–17, 2007.

ROSA, D.S.; PANTANO FILHO, R. **Biodegradação: um ensaio com polímeros**. Itatiba-SP, Moara; Bragança Paulista-SP, Universidade São Francisco, 2003.

ROSA, D.S.; BARDI, M.A.G; GUEDES, C.G.F.; ANGELIS, D.A. Role of polyethylene-graft-glycidyl methacrylate compatibilizer on the biodegradation of poly (ε-caprolactone)/cellulose acetate blends. **Pol. Advanced Technol.** v.20, p.863-870, 2009.

SAMSON, R.A.; HOEKSTRA, E.S.; FRISVAD, J.C.; FILTENBORG, O. Introduction to food-borne fungi. CBS, 1995, 322p.

SANCHEZ JG, TSUCHII A, TOKIWA Y. Degradation of polycaprolactone at 50 °C by a thermotolerant *Aspergillus* sp. **Biotechnol. Lett.** v.22, p.849–853, 2000.

SANTAELLA, S.T.; SILVA JUNIOR, F.C.G.; GADELHA, D.A.C.; COSTA, K.O.; AGUIAR, R.; ARTHAUD, I.D.B.; LEITÃO, R.C. Tratamento de efluentes de refinaria de petróleo em reatores com *Aspergillus niger*. **Eng. Sanit. Ambient.** v.14, 139-148, 2009.

SANTOS JR., A. R.; FERREIRA, B. M. P.; DUEK, E. A. R.; DOLDER, H.; WADA, R. S.; WADA, M. L. F. Differentiation Patter of Vero Cells Cultured on Poly(L-lactic acid)/Poly(Hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) Blends, **Artif. Organs.** v.28, p.381-389, 2004.

SANTOS JR., A. R.; WADA, M. L. F. Polímeros biorreabsorvíveis como substrato para cultura de células e engenharia tecidual. **Polímeros: Ciência e Tecnologia.** v.17, p.308-317, 2007.

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 York, v. 14, p. 257-263, 2006.

SAPONARO, S.; SEZENNA, E.; INNOCENTI, F. D.; MEZZANOTTE, V.; BONOMO, L. A screening model for fate and transport of biodegradable polyesters in soil. **Journal of Environmental Management.** v.88, p.1078-1087, 2008.

SCHUSTER, E.; DUNN-COLEMAN, N.; FRISVAD, J.C. On the safety of *Aspergillus niger* – a review. **Appl. Microbiol. Biotech.** v.59, p.426-435, 2002.

SEMENOV, S.A.; GUMARGALIEVA, K.Z.; ZAIKOV, G.E. Biodegradation and durability of materials under the effect of microorganisms. VSP BV, Utrecht, Boston. 2003. 232p. (New Concepts in Polymer Science, 14).

SETH, H.K. Amonograph of the genus *Chaetomium*. Nova Hedwigia, v.37, p.1-133, 1970.

SHAH, A. A.; HASAN, F.; HAMEED, A.; AHMED, S. Biological degradation of plastics: A comprehensive review. **Biotechnology Advances** v.26 p.246–265, 2008.

SINGH, B.; SHARMA, N. Mechanistic implications of plastic degradation. **Pol. Degr. and Stab.** v.93, p.561-584, 2008.

SINGH, D.; CHEN, S. The white-rot *fungus* *Phanerochaete chrysosporium*: Conditions for the production of lignin-degrading enzymes. **Appl Microbiol.** v.81, p.399-417, 2008.

SOMRITHIPOL, S. Coprophilous fungi: Thai fungal diversity. In: JONES, E.B.G.; TANTICHAROEN, M.; HYDE, K.D. BIOTEC, Thailand p.119-128, 2004.

SOYTONG, K.; KANOKMEDHAKUL, S.; KUKONGVIRIYAPA, V.; ISOBE, M. Application of *Chaetomium* species (Ketomium®) as a new broad spectrum biological fungicide for plant disease control: A review article. **Fungal Diversity.** v.7, p.1-15, 2001.

STERFLINGER, K. Fungi: their role in deterioration of cultural heritage. **Fungal Biology Reviews**, v. 24, p.47-55, 2010.

TAO J.; SONG C.; CAO M.; HU D.; LIU L.; LIU N.; WANG S. Thermal properties and degradability of poly(propylene carbonate)/poly(β -hydroxybutyrate-co- β -hydroxyvalerate) (PPC/PHBV) blends. **Pol. Degrad. and Stab.**, v.94, p.575-583, 2009.

TOKIWA, Y.; CALABIA, B. P. Biodegradability and Biodegradation of Polyesters. **J Polym Environ.** v.15, p.259-267, 2007.

TOKIWA, Y.; CALABIA, B. P.; UGWU, C.U.; AIBA, S. Biodegradability of plastics. **Int. J. Mol. Sci.** v.10, p.3722-3742, 2009.

TORRES, A.; LI, S.; ROUSSOS, S.; VERT, M. Screening of microorganisms for biodegradation of poly (lactic acid) and lactic acid-containing polymers. **Appl Environ Microbiol** v.62, p.2393–2397, 1996.

TSENG, M.; HOANG, K-C.; YANG, M-K.; YANG, S-F.; CHU, W.S. Polyester-ddegrading thermophilic actinomycetes isolated from differen environmental in Taiwan. **Biodegradation**, v.18, p.579-583, 2007.

TSUJI, H.; SUZUYOSHI, K. Environmental degradation of biodegradable polyesters. Poly(ϵ -caprolactone), poly[(R)-3-hydroxybutyrate], and poly(L-lactide) films in controlled static seawater. **Polym. Degrad. Stabil.**, v.76, p. 347-365, 2002.

UENO, Y. Toxicology of mycotoxins. **Crit. Rev. Toxicol.** v.14, p.99-132, 1985.

UREK, R.O.; PAZARLIOGLU, N.K. Enhanced Production of Manganese Peroxidase by *Phanerochaete chrysosporium*. **Brazilian Archives of Biology and Technology** v.50, p.913-920, 2007

VÉRAS, S.M.; GASPARROTO, L.; MENEZES, M. Variabilidade fisiomorfológica de *Colletotrichum guaranicola* em diferentes substratos. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, Curitiba, v.40, n.2, p.297-305, 1997.

VON ARX, J.A.; GUARRO, J.; FIGUERAS, M.J. The ascomycete genus *Chaetomium*. Beihefte zur Nova Hedwigia. v.84, p.1-162, 1986.

YAMADA, M.M.; MEDEIROS, L.A.; ERLO, L.F.; PALLU, A.P.S. Polpação da casca de coco verde por *Phanerochaete Chrysosporium* In: 13º Jornada Nacional de Iniciação Científica, 2006, Florianópolis. Anais da 13ª Jornada Nacional de Iniciação Científica, 2006.

YAMADA-ONODERA K, MUKUMOTO H, KATSUYAYA Y, SAIGANJI A, TANI Y. Degradation of polyethylene by a fungus, *Penicillium simplicissimum* YK. **Polym. Degrad. Stab.** v.72, p.323-327, 2001.

YANG, H-S.; YOON, J-S.; KIM, M-N.; Effects of storage of a mature compost on its potential for biodegradation of plastics. **Pol. Degr. and Stab.** v.84, p.411-417, 2004.

YONG LU, L. Y.; YINGWANG, S. Z.; JIAJUN FU, J. Z. Biodegradation of phenolic compounds from coking wastewater by immobilized white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. **Journal of Hazardous Materials**, v.165, p.1091–1097, 2009.

YU, Z-N.; QIAO, M.; ZHANG, Y.; ZHANG, K-Q. Two new species of *Trichoderma* from Yunnan, China. **Anton. Van Leeuwenhoek**, v.92, p.101-108, 2007.

WALSH, J.H. Ecological considerations of biodeterioration. **Int. Biodet. And Biodegr.** v.48, p.16-25, 2001.

WEAVER, M.A.; KENERLEY, C.M. Competitiveness of a genetically engineered strain of *Trichoderma virens*. **Mycopathol.** v.166, p.51-59, 2008.

WEBB, J.S.; VANDER MEI, H.C.; NIXON, M.; EASTWOOD, I.M.; GREENHALAGH, I.M.; READ, S.J.; ROBSON, D.; HANDLEY, P.S. **Appl Environ Microbiol** v.65, p.3575, 1999

WEILAND, M.; DARO, A.; DAVID, C. Biodegradation of thermally oxidized polyethylene. **Pol. Degr. and Stab.** v.48, p.275-289, 1995.

WOODRUFF, M.A.; HUTMACHER, D.W. The return of a forgotten polymer-Polycaprolactone in the 21st century. **Progress in Polymer Science**, v.35, p.127-1256, 2010.

WOOLARD, C.R.; IRVINE, R.L. Treatment of hypersaline wastewater in the sequencing bath reactor. **Water Res.** v.29, p.1159-1168, 1995.

WOODWARD, S.C.; BREWER, P.S.; MOATAMED, F.; SCHINDLER, A.; PITT, C.G. The intracellular degradation of poly(epsilon-caprolactone). **J. Biomed. Mater. Res** v.19, p.437-444, 1985.

WU, K-J.; WU, C-S.; CHANG, J-S. Biodegradability and mechanical properties of polycaprolactone composites encapsulating phosphate-solubilizing bacterium *Bacillus* sp. PG01. **Process Biochemistry** v.42, p.669-675, 2007.

ZHANG, F.; KANG, E. T.; NEO, K. G.; WANG, P.; TAN, K. L. Surface modification of stainless steel by grafting of poly (ethylene glycol) for reduction in protein adsorption. **Biomaterials** v.22, p.1541-1548, 2001.

ZHAO, J.; GUO, L.Y.; YANG, X. B.; WENG, J. Preparation of bioactive porous HA/PCL composite scaffolds. **Applied Surface Science.** v.255, p.2942-2946, 2008.

ANEXO A

Perdas de massa e estatística

% de perda de massa dos filmes biotratados

CONSÓRCIO				FUNGOS FILAMENTOSOS			
PVC MC (A)	PVC MI (B)	PCL MC (C)	PCL MI (D)	PVC MC (E)	PVC MI (F)	PCL MC (G)	PCL MI (H)
2,4193	2,1052	2,9498	2,9776	1,3404	1,1494	-0,8645	3,3734
2,3157	2,1929	2,8011	13	1,7391	1,0752	0,9925	3,6082
2,1686	2,0231	2,7855	17,8921	2,5404	1,2345	1,5151	4,7146
0,5128	1,8595	-10,6666	67,2025	3,0023	4,7197	0,5235	3,9087
1,1204	2,2988	17,0560	42,2651	2,3696	3,4782	0,7246	2,2471
1,4957	1,9531	1,8018	35,8090	2,9411	3,9351	0,2398	6,9536
1,1857	0,7722	2,2556	54,9418	2,8888	2,2540	0,9411	3,9426
0,2096	9,6774	4,4943	75,6521	1,5151	2,4096	1,25	1,8475
1,5873	1,0695	4,3147	43,3628	2,7272	1,7857	2,1739	3,5377
0,5361	1,3574	2,5882	54,8888	-7,5471	2,7027	-1,5706	4,3583
1,4925	1,7766	3,6144	45,3367	0,9174	2,3684	-4,3103	4,5454
1,3812	1,5873	2,1212	29,1666	0,2531	2,5688	-2,8368	4,3604

Comparações entre consórcio de fungos X estirpes contaminantes

A-E H = 2,0833 Graus de liberdade = 1 (p) Kruskal-Wallis = 0,1489	B-F H = 2,2533 Graus de liberdade = 1 (p) Kruskal-Wallis = 0,1333	C-G H = 11,2133 Graus de liberdade = 1 (p) Kruskal-Wallis = 0,0008	D-H H = 12,8133 Graus de liberdade = 1 (p) Kruskal-Wallis = 0,0003
Comparações entre meio completo X incompleto			
A-B H = 2,0017 Graus de liberdade = 1 (p) Kruskal-Wallis = 0,1571	C-D H = 14,9633 Graus de liberdade = 1 (p) Kruskal-Wallis = 0,0001	E-F H = 0,6533 Graus de liberdade = 1 (p) Kruskal-Wallis = 0,4189	G-H H = 16,8033 Graus de liberdade = 1 (p) Kruskal-Wallis = < 0,0001

ANEXO B

Meios de cultivo e soluções

Agar estoque

20g de farinha de aveia
10g de extrato de malte
20g de ágar nutriente
1000 mL de água destilada

Potato Dextrose Agar

39 g
1000 mL água destilada

Solução dispersante de sais minerais

2,0g NaNO_3 ,
0,7 g KH_2PO_4 ,
0,3g K_2HPO_4 ,
0,5g KCl ,
0,5g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,
0,01g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,
0,1g Tween 80
1000 mL água destilada

Solução dispersante de sais minerais + glicose

30g dextrose anidra
2,0g NaNO_3 ,
0,7 g KH_2PO_4 ,
0,3g K_2HPO_4 ,
0,5g KCl ,
0,5g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,
0,01g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,
0,1g Tween 80
1000 mL água destilada

Meio incompleto

2,0g NaNO_3 ,
0,7 g KH_2PO_4 ,
0,3g K_2HPO_4 ,
0,5g KCl ,
0,5g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,
0,01g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,
0,1g Tween 80
20 g agar
1000 mL água destilada

Meio completo

30g dextrose anidra
2,0g NaNO_3 ,
0,7 g KH_2PO_4 ,
0,3g K_2HPO_4 ,
0,5g KCl ,
0,5g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,
0,01g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,
0,1g Tween 80
20 g agar
1000 mL água destilada

PUBLICAÇÕES GERADAS DURANTE O DESENVOLVIMENTO DESTA DISSERTAÇÃO

Trabalhos publicados em anais de eventos científicos:

VIVI, V. K. ; MARTINS-FRANCHETTI, S. M. ; ATTILI-ANGELIS, D. . ADHESION AND BIODEGRADATION ACTIVITY OF *Chaetomium globosum* ATCC 16021 ON PVC AND PCL FILMS. In: ISNaPol - 7th International Symposium on Natural Polymers and Composites, 2010, Gramado. Anais do ISNaPol - 7th International Symposium on Natural Polymers and Composites, 2010.

VIVI, V. K. ; MARTINS-FRANCHETTI, S. M. ; ATTILI-ANGELIS, D. . BIODEGRADAÇÃO DE FILMES POLIMÉRICOS POR PHANEROCHAETE CHRYSOSPORIUM CCB 478. In: XII Encontro Nacional de Microbiologia Ambiental – ENAMA, 2010. Anais do ENAMA, 2010.