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

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

LUSIANE MALAFATTI PICCA

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

Outubro-2018

DESPOLIMERIZAÇÃO DE POLIETILENOTEREFTALATO (PET) MEDIADA POR FUNGOS FILAMENTOSOS

LUSIANE MALAFATTI PICCA

Orientadora: Profa. Dra. Derlene Attili de Angelis

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

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

Rio Claro-SP

Outubro-2018

P587d

Picca, Lusiane Malafatti

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

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Instituto de Biociências, Rio Claro

Orientadora: Derlene Attili de Angelis

Coorientadora: Dejanira de Franceschi de Angelis

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

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

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

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

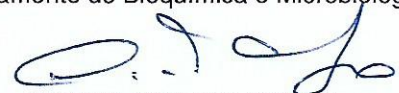
AUTORA: LUSIANE MALAFATTI PICCA

ORIENTADORA: DERLENE ATTILI DE ANGELIS

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


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


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


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


Profa. Dra. ADRIANA DE CAMPOS PASTRE
DCNME / UFSCar


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

Rio Claro, 08 de outubro de 2018

Dedico este trabalho,

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

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

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

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

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

À minha avó, Nica, pelas orações e torcida.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

(Madre Teresa de Calcutá)

RESUMO

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

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

ABSTRACT

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

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

LISTA DE TABELAS

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

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

Capítulo 1

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

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

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

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

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

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

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

Capítulo 2

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

Tabela 2. Características físicas obtidas por análises de DSC para as amostras de PET 1 e PET 2. T_m °C= temperatura de fusão; ΔH_m (J.g ⁻¹)= entalpia de fusão; X(%)= porcentagem de cristalinidade.	86
--	-----------

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

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

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

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

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

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

LISTA DE FIGURAS

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

Capítulo 1

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

LISTA DE FIGURAS

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

Capítulo 2

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

LISTA DE FIGURAS

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

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

SUMÁRIO

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

1. INTRODUÇÃO

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2. OBJETIVO GERAL

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

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

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

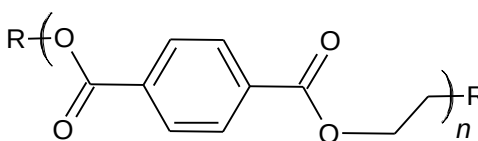
- Realizar ensaios para avaliação quantitativa de ácido tereftálico (PTA), bis-2 tereftalato de hidroxietila (BHET) e metil-2-hidroxietiltereftalato (MHET) utilizando os isolados selecionados promissores via processo fermentativo.
- Quantificar os analitos supracitados por Cromatografia Líquida de Alta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

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Polietilenotereftalato (PET)

Polietilenotereftalato (figura 1) é o nome dado ao poliéster termoplástico desenvolvido em 1941, nos Estados Unidos, pelo químico da indústria DuPont, John Rex Whinfield, que estudava polímeros com aplicação em fibras de tecido, a exemplo do náilon, cuja produção foi iniciada uma década antes. No começo dos anos 70, a tecnologia foi desenvolvida para a finalidade a qual é mais conhecida, o que permitiu a moldagem por sopro de PET em garrafas fortes, leves e inquebráveis.

Figura 1-Representação da estrutura química da molécula de PET



Fonte: adaptado de Al-Azzawi (2015).

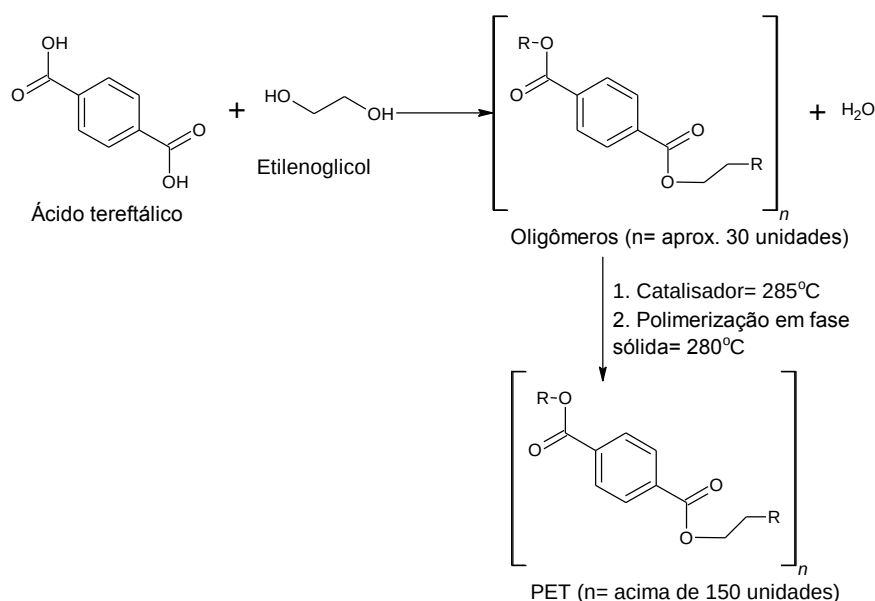
Em 1973, a garrafa PET foi patenteada e rapidamente ganhou aceitação no mercado (PETRA, 2016). Assim, as fibras de PET ganharam um importante papel em diversas áreas da indústria, de origem sintética têm sido utilizadas na produção de fios para tecelagem, fitas magnéticas, filmes para radiografias, laminados para impressão, embalagens para cozimento de alimentos, garrafas de bebidas carbonatadas, frascos para alimentos, cosméticos e produtos de limpeza, dentre outros (VERTOMMEN et al., 2005; ABIPET, 2017). Representam o maior volume de fibras sintéticas comercializadas até hoje. Sua persistência (não biodegradabilidade) no ambiente deve-se à alta cristalinidade e ao tipo de cadeia polimérica que o origina, conferindo alta lipofilicidade e estabilidade hidrolítica (COSTA, 2015), como destacado na Tabela 1, que indica que este polímero pode levar até 450 anos para se decompor no ambiente em condições naturais.

Tabela 1. Permanência de materiais poliméricos no ambiente.

Material	Tempo de permanência
Papel	3 a 6 meses
Madeira	6 meses
Poliestireno (copos descartáveis)	50 anos
Alumínio (latinhas de bebida)	200 a 500 anos
Polietilenotereftalato (garrafas e outras embalagens)	Até 450 anos
Poli-isopreno (borracha escolar)	Indeterminado

Fonte: adaptado de Unifesp (2015); UFSC (2018).

O PET é também termoplástico, maleável quando aquecido e rígido quando resfriado e não sofre transformação química durante este processo. É sintetizado através da reação de condensação de um ácido dicarboxílico com um álcool bi-hidroxilado, formando um éster. O grupo funcional restante reage gerando outra ligação éster, formando uma molécula maior, que por sua vez, também possui um grupo funcional livre que reage para gerar outra ligação éster e, assim sucessivamente (figura 2). Tal processo é denominado polimerização de crescimento por etapas ou polimerização gradual (SOLOMONS, FRYHLE, 2000).

Figura 2- Representação da reação de policondensação de Polietilenotereftalato

Fonte: adaptado de SINHA, PATEL, PATEL (2010).

Conforme demonstrado na figura 2 as reações de polimerização acontecem em duas etapas. Na primeira ocorre a esterificação direta, obtida pela reação do ácido tereftálico (PTA) com etilenoglicol (EG) ou pela transesterificação quando o PTA é substituído pelo éster tereftalato de dimetileno (DMT). Então, é formado o Bis-2-hidroxietil tereftalato (BHET), um oligômero que é polimerizado em aproximadamente 30 unidades de repetição (AWAJA; PAVEL, 2005; ROMÃO, SPINACÉ, DE PAOLI, 2009).

Na segunda etapa, para atingir um grau de polimerização acima de 100 unidades de repetição, a policondensação é realizada em temperaturas e pressão acima de 270 °C e 50 Pa (Pascal), respectivamente. Para a polimerização que origina as garrafas PET, é necessário que o polímero apresente acima de 150 unidades de repetição, os quais são mediados pela polimerização em estado sólido, um processo que requer temperaturas acima de 200 °C e pressões acima de 100 Pa, e um tempo de incubação maior que 15 horas (RAVINDRANATH; MASHELKAR, 1986).

Em 2015, a produção mundial de PET atingiu 20,6 milhões de toneladas que foram destinadas a diversas aplicações e em diferentes proporções, como: 26,4% destinadas a garrafas de refrigerante; 26% em garrafas de água; 18,4% para embalagens para outros tipos de bebidas; 13,9% em folhas e filmes; 9,3% nas embalagens de alimentos e 6% destinados a produtos sem finalidade alimentícia. Percebe-se que a maior parte da produção desta resina destina-se à produção de garrafas de bebidas (carbonatadas e água) (PLASTICS INSIGHTS, 2016).

De maneira geral, a indústria de fabricação de garrafas usa dois tipos de PET sendo que o primeiro tipo é um homopolímero, polimerizado numa proporção de 1: 1 de ácido tereftálico - PTA ou dimetil tereftalato - DMT e etilenoglicol – EG, e o segundo conhecido como copolímero de PET, sofre a polimerização com um excesso de PTA (não mais de 3% mol) ou 1,4-ciclo-hexanedimetanol (até 5% mol), sendo indicado com material mais adequado em moldagem por sopro de alta velocidade. O homopolímero de PET e seu copolímero apresentam as seguintes características: semi-cristalinidade com temperaturas de transição vítrea (T_g) e de fusão (T_m) por volta de 76 °C e 250 °C, respectivamente; densidade entre 1,3 e 1,4 g/cm³, a viscosidade mínima é de 0,7 dL/g, e têm espectros infravermelhos semelhantes (U.S.PHARMACOPEIA, 1995).

A produção global de garrafas PET em 2016 atingiu um montante de 488 bilhões de unidades, estima-se que até 2020, nesse número sejam acrescentados mais 83 bilhões (PACKAGING EUROPE, 2017). Por serem considerados materiais com ciclo de vida curto (compra, utilização e despejo rápidos), mundialmente existem movimentos que conscientizam as populações a prevenir o descarte, mediante reciclagem. Empresas produtoras destas embalagens vêm sendo estimuladas a redesenhá-las, para reduzir a quantidade de materiais utilizados (AMERICAN CHEMISTRY COUNCIL, 2013).

Os monômeros ácido tereftálico e etilenoglicol são obtidos de derivados do petróleo (um recurso natural não renovável); o primeiro advém da oxidação do *p*-xileno que tem a nafta como precursor e o segundo, deriva da oxidação do etileno (proveniente do gás-natural) (PACHECO; DAVIS, 2014; AMERICAN CHEMISTRY ASSOCIATION, 2017). Estima-se que aproximadamente 8% da produção global de combustíveis fósseis seja utilizada ou como matéria prima ou para fornecer energia no processo de produção de plásticos (HOPEWELL; DVORAK; KOSIOR, 2009).

Diante da atual demanda, a Coca-Cola® foi pioneira e trouxe para o mercado garrafas PET feitas com a tecnologia “Plantbottle”, cujo monoetilenoglicol (30%) utilizado é proveniente da cana-de-açúcar. Garrafas produzidas com esta tecnologia já são distribuídas por nove países: Dinamarca, Estados Unidos, Canadá, Japão, Brasil, México, Noruega, Suécia e Chile. Em 2010, a aplicação desta tecnologia reduziu 12 a 19% (30000 toneladas) da produção de dióxido de carbono e evitou o consumo de 60000 barris de petróleo. Entretanto, esta tecnologia conserva no polímero as características do material original mantendo baixa reciclabilidade (BYUN; KIM, 2013).

A petroquímica Suape (PQS) do grupo Petrobrás supria parte da demanda de ácido tereftálico purificado para a produção da resina PET consumida no Brasil, mas sua venda foi autorizada em fevereiro deste ano. O restante da demanda é importado do México, mas o atual contexto desse país não permite traçar perspectivas de como (ou se) essa demanda será eficientemente suprida (FALCÃO, 2018). Por isso, estratégias de reciclagem de PET vão ao encontro das atuais necessidades do país: suprir a demanda dos monômeros e proteger o meio ambiente do descarte de PET e dos encargos associados à produção desta resina.

3.2. Ácido tereftálico e a reciclagem de PET

A reciclagem de plásticos objetiva reduzir o impacto ambiental e o esgotamento de recursos. Maiores níveis de reciclagem, a redução no uso, a reutilização e reparo e o remanufaturamento do polímero resultam na economia de matérias-primas primárias (HOPEWELL, DVORAK, KOSIOR, 2009).

Segundo Auri Marçon, presidente da Associação Brasileira da Indústria de PET (ABIPET), 605 mil toneladas do polímero foram consumidas no Brasil em 2016 (SANTOMAURO, 2018). Dados recentes sobre classificação mundial do Brasil no ranking da reciclagem são escassos. Sabe-se que em 2009, o país encontrava-se em um destacado segundo lugar, com 55,6% de embalagens recicladas, e perdendo apenas para o Japão que reciclavam 77,9% (COELHO; CASTRO JR, 2011; ABIPET, 2013). Em 2015, o dado mais atual indica que a taxa de reciclagem no Brasil foi de 51% (ABIPET, 2014).

Observa-se que boa parte do PET consumido dentro e fora do país ainda tem destinação incorreta, sendo alocados no ambiente marinho ou em aterros (GEYER; JAMBECK; LAW, 2017). A poluição por esses polímeros no ambiente marinho é a causa de vários efeitos ecologicamente prejudiciais e perigosos. Inúmeras espécies são negativamente impactadas pelo contato direto com esses resíduos. O perigo principal é o emaranhamento e a ingestão destes itens. Animais jovens, em particular, frequentemente se enrolam nos resíduos resultando em sérios problemas, prejudicando o crescimento dos mesmos, restringindo seus movimentos impedindo que se alimentem ou respirem regularmente (GREGORY, 2009). O chamado “microplástico” pode aumentar a exposição de organismos aquáticos marinhos às substâncias químicas, tais como os poluentes orgânicos persistentes ou aditivos plásticos (GOUIN et al., 2011; HAMMER et al., 2012; BROWNE et al., 2013).

Nos últimos anos, o aumento dos polímeros na composição do resíduo sólido urbano reflete em maior lixiviação de compostos químicos perigosos para o solo, que em longo prazo pode contaminá-lo, assim bem como as águas subterrâneas. A quebra dos compostos presentes no plástico e seus aditivos, resultam em poluentes orgânicos persistentes (OEHLMANN et al. 2009; TEUTEN et al. 2009; CEMPRE, 2018). Tais poluentes podem incluir compostos orgânicos voláteis (benzeno, tolueno, xileno, etilbenzeno e trimetilbenzeno) liberados na forma de gases e como produtos de

lixiviação e disruptores endócrinos, em particular bisfenol-A (XU et al., 2011; TSUCHIDA et al., 2011).

A reciclagem de plásticos é classificada em quatro categorias: re-extrusão, (reciclagem primária), mecânica (reciclagem secundária), química (reciclagem terciária) e a de recuperação de energia (reciclagem quaternária). Cada método fornece um conjunto único de vantagens que a tornam particularmente benéfica para determinados locais ou aplicações (AL-SALEM, LETTIERI, BAEYENS, 2010; IGNATYEV; THIELEMANS; VANDERBEKE, 2014).

A reciclagem química ou terciária conduz à total despolimerização do PET aos monômeros, ou parcialmente aos oligômeros e a outros compostos. Pode ser realizada pelos processos de hidrólise, glicólise, metanólise e aminólise, sendo que destes métodos, apenas a hidrólise é capaz de produzir ácido tereftálico e etilenoglicol com apenas uma reação (DI SOUZA; TORRES; RUVOLO FILHO, 2008, FONSECA; ALMEIDA; VINHAS, 2014). De acordo com Valt (2014), as vias de reciclagem consideradas tradicionais geram aproximadamente oito vezes o peso de uma garrafa PET em resíduos, levando em conta as emissões atmosféricas, efluentes líquidos e resíduos sólidos. Além disso, somam-se o uso de altas temperaturas (200-250 °C) e pressão (1,4-2,0 MPa), levando bastante tempo nessas condições para a completa despolimerização (AL-SABAGH et al., 2016).

Na última década, observou-se um aumento no número de pesquisas que relacionam a biodegradação de polímeros como uma estratégia viável de reciclagem (COSTA, 2015). Esse tipo de reciclagem permite a obtenção de monômeros com possibilidade de sua utilização para produção do PET reciclado, sendo considerado uma opção para resolução do problema do uso de toneladas de PET virgem, para a produção de embalagens pouco utilizadas e ainda prejudiciais ao meio ambiente, pela alta persistência. Por tal mecanismo, os microrganismos com habilidade para adaptar a diversas e variáveis condições ambientais são capazes de degradar totalmente os polímeros orgânicos sintéticos (NOWAK et al., 2011).

Para este fim, a biocatálise vem se destacando nos últimos anos. Nesse processo, enzimas são utilizadas como uma alternativa verde às reações orgânicas tradicionais, apresentando vantagens, como atuar sob condições de operação mais brandas, aplicabilidade sobre moléculas térmica e quimicamente instáveis a altas temperaturas,

elevado controle estéreo-, quimio- e regiosseletivo e reduzida geração de subprodutos (RIBEIRO et al., 2011).

Enzimas microbianas podem ser aplicadas em uma ampla gama de processos industriais, isoladas ou produzidas *in situ*. A aplicação das enzimas em tecnologia petroquímica vem recebendo destaque nos últimos anos, área essa na qual a degradação de polímeros se encontra inserida (ALBUQUERQUE et al., 2014).

3.3. Biocatálise - enzimas envolvidas na degradação de PET

Diversas são as características que justificam a recalcitrância do polímero PET: o alto peso molecular prejudica a assimilação rápida pelos microrganismos; a alta hidrofobicidade assim como uma superfície lisa dificultam a formação de bio-filme, importante para a ação enzimática; a semi-cristalinidade, ou seja, a presença de PET amorfo e PET cristalino, sendo que a estrutura amorfa é mais propensa a sofrer a ação enzimática (RESTREPO-FLÓREZ; BASSI; THOMPSON, 2014; SAMMOND et al., 2014; WEI et al., 2014; KRUEGER; HARMS; SCHLOSSER, 2015). Além da estrutura cristalina ser mais estável, os segmentos da cadeia do polímero apresentam maior dificuldade de se soltar e se encaixar no sítio ativo da hidrolase. As diferenças entre a temperatura de ponto de fusão do poliéster e a temperatura em que ocorre a degradação do polímero, prejudica o acesso enzimático (MARTEN; MÜLLER; DECKWER, 2005).

A literatura reporta que microrganismos produtores de hidrolases dos tipos esterase (ALISCH et al., 2004) lipase (NOWAK et al., 2011) e cutinases (LIEBMINGER et al., 2007) ou homólogos destas enzimas (YOSHIDA et al., 2016) têm potencial para biodegradar/despolimerizar PET.

Carboxilesterases são enzimas capazes de catalisar a quebra ou formação de ligações do tipo éster. Estão presentes em animais, plantas e microrganismos e atuam sobre um grande número de substratos. A ação destas enzimas possibilita o acesso a fontes de carbono ou mesmo estão envolvidas em reações de catabolismo (LOPES et al., 2011). Existem dois grupos de carboxilesterases não específicas, denominadas esterases (EC 3.1.1.1) e lipases (EC 3.1.1.3.). O substrato em que atuam e a região de localização em organismos ou tecidos, as diferenciam (FOJAN et al., 2000). Esterases são ativas em ésteres hidrossolúveis de cadeia curta, enquanto que as lipases hidrolisam

ésteres de cadeia longa insolúveis em água e triacilglicerol, incluindo gorduras naturais (CHAHINIAN et al., 2002).

Cutinases (EC 3.1.1.74) constituem serina hidrolases que pertencem à superfamília das α/β hidrolases, e são ativas em substratos com alto peso molecular como a cutina (um polímero lipofílico encontrado nas cascas dos frutos). Algumas delas também são capazes de hidrolisar poliésteres sintéticos de alto peso molecular. Agem sobre diversos tipos de substratos como ésteres hidrossolúveis de cadeia curta e baixo peso molecular e triacilgliceróis de cadeias curta e longa. Também catalisam reações de esterificação e transesterificação (CHEN et al., 2013). Estudos recentes têm abordado a utilização de enzimas homólogas a cutinases com preferência pela degradação de PET a outros substratos, as denominadas PETases (HAN et al., 2017; AUSTIN et al., 2018).

Os microrganismos reconhecidos na literatura pela produção destas enzimas são *Bacillus* (MAZZUCOTELLI et al., 2013; LEE et al., 2015), *Pseudomonas* (BORKAR et al., 2009; MOBARAK-QAMSARI; KASRA-KERMANSHAHI; MOOSAVI-NEJAD, 2011; KHANNOUS et al., 2014), *Burkholderia* (RATHI; SAXENA; GUPTA, 2001; BOEKEMA et al., 2007) e espécies *Candida* (VAKHLU; KOUR, 2006).

A utilização dos fungos filamentosos e seus metabólitos nos processos de degradação vêm crescendo em virtude do alto potencial degradativo, biossortivo (metais pesados e corantes) e dos mecanismos de resistência em condições ambientais adversas (CONCEIÇÃO et al., 2004).

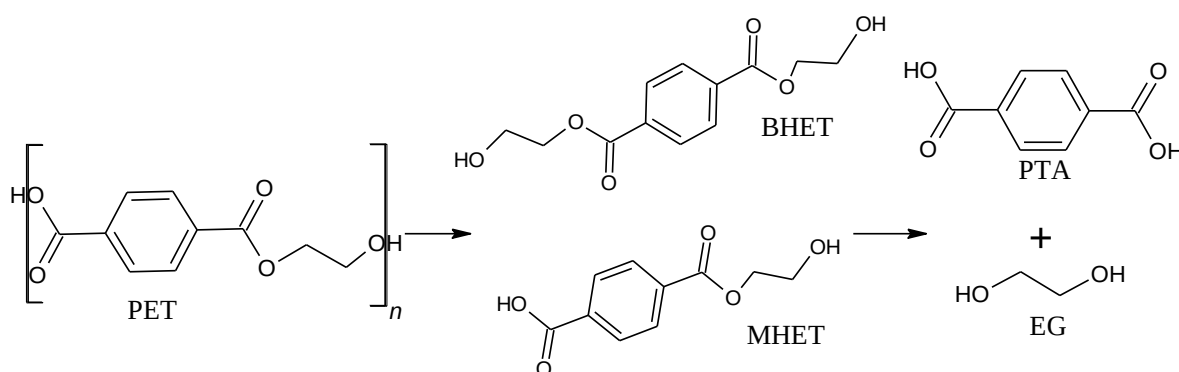
Os atributos que qualificam os fungos como bons biodegradadores estão relacionados ao crescimento micelial, que confere uma vantagem sobre as células unicelulares, bactérias e leveduras, especialmente no que concerne à colonização de substratos insolúveis. Os fungos ramificam-se rapidamente no substrato, digerindo-o através da secreção de enzimas extracelulares, disponibilizando, desta forma, o acesso para o ataque bacteriano. Em segundo lugar, os fungos, aparentemente, toleram maiores concentrações de produtos tóxicos no microambiente externo do que no seu interior. São capazes de crescer sob condições ambientais de estresse, como em meios com baixos valores de pH, por exemplo, e ainda suportar meios pobres em nutrientes. Por outro lado, apresentam uma capacidade de sobrevivência em meios com baixa atividade de água maior do que as bactérias e leveduras, propriedade esta que os apontam como

os mais apropriados para trabalhar em condições de baixa umidade relativa (LEMOS et al., 2008).

Alguns gêneros de fungos reconhecidos como produtores de enzimas com potencial para degradação de PET são *Fusarium* (VERTOMMEN et al., 2005), *Trichoderma* (ESPINO-RAMMER et al., 2013) e *Penicillium* (YAMADA-ONODERA et al., 2001).

Os subprodutos formados mediante hidrólise enzimática mediada por microrganismos são abordados na Figura 3. BHET e MHET são ésteres de baixo peso molecular liberados durante a degradação do polímero (VERTOMMEN et al., 2005; WEI et al., 2012).

Figura 3- Polietilenotereftalato (PET) e os subprodutos tereftalato de Bis-hidroxieta (BHET), ácido mono (2-hidroxieta) tereftálico (MHET), ácido tereftálico (PTA) e etilenoglicol (EG).



Fonte: Adaptado de Austin et al.(2018)

Vertommen et al (2005) promoveram a hidrólise enzimática de PET amorfo e cristalino por uma cutinase isolada de *Fusarium solani* e observaram que MHET foi produzido em maior quantidade que PTA e BHET. Sulaiman et al. (2012) utilizaram ferramentas de metagenoma e isolaram uma cutinase (LC-cutinase) que produziu PTA em maior quantidade que MHET, demonstrando o potencial desta enzima para degradar completamente PET a PTA e etilenoglicol.

Uma bactéria gram negativa *Ideonella sakaiensis* foi capaz de promover a completa degradação de PET amorfo. Esta ação foi relacionada a uma enzima homóloga de cutinase (PETase), entretanto, como a biodegradação foi executada em um processo

fermentativo, no qual, a célula do microrganismo estava inteira e viva, o intermediário MHET pode ter sido internalizado pela célula e hidrolisado por uma segunda enzima denominada MHETase (identificada) no genoma, permitindo assim a completa assimilação do PET (YOSHIDA et al., 2016). BHET também foi produzido neste processo.

Pellis et al. (2016) implementaram a ação de cutinases isoladas de *Termobifida fusca* sobre filmes e PET pulverizado com várias cristalinidades utilizando ultrassom, promovendo assim, um aumento na liberação de PTA e MHET. Por outro lado, De Castro et al. (2017) realizaram a triagem de 16 enzimas para avaliar o potencial de despolimerização sobre polímeros com diferentes cristalinidades, e observaram cutinases com comportamentos similares para a produção de PTA, BHET e MHET, com predominante produção do último. Dessas, um representante de *Humicola insolens* destacou-se como melhor biocatalisador e CALB, uma lipase de *Candida albicans* demonstrou maior potencial para conversão de MHET em PTA, atuando sinergicamente com a cutinase na degradação do polímero.

3.4. Estudos envolvendo despolimerização de PET por fungos

O número de trabalhos disponíveis na literatura que reportam a degradação de PET mediada por fungos em suas células completas é pequeno. O que se encontra com mais frequência são artigos que utilizam enzimas isoladas em tal finalidade, ou mesmo a utilização de ferramentas de biologia molecular na pesquisa do gene codificante das enzimas que já apresentaram alguma efetividade no processo. Entretanto, uma vez que os mecanismos por trás da modificação enzimática do PET ainda não estão bem esclarecidos, estudos desse tipo ainda são justificados. Costa (2015) realizou uma revisão de literatura sobre biodegradação de polímeros e afirmou que a degradação de PET necessitava de estudos mais profundos para elucidar seus mecanismos de reação e otimização de processo, o que é de grande interesse industrial.

A Tabela 2 reúne alguns dos trabalhos que foram realizados com fungos em suas células completas, o tipo de PET utilizado e os resultados observados.

Tabela 2. Estudos de despolimerização de PET mediada por fungos

Microrganismo	Tipo de PET Condições experimentais	Resultados	Referência
Sinergismo de <i>Phanerochaete chrysosporium</i> , <i>Trametes versicolor</i> , <i>Streptomyces</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Pleurotus ostentus</i> , <i>Geophyllum trabeum</i> , <i>Thermonospora</i> e <i>Actinomadura</i>	Meio mínimo mineral enriquecido líquido Fermentação por 14 dias	Modificações na superfície do PET avaliados por Microscopia Eletrônica de Varredura e liberação de ácido tereftálico avaliado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.	ZHANG et al., 2004)
<i>Pleurotus</i> 001 e <i>Pleurotus tailandia</i>	PET de garrafa e pellets Fermentação submersa e semi-sólida (90 dias)	Início de atividade respirométrica em 7 dias e aumento da atividade de laccase.	SILVA, 2009
<i>Penicillium funiculosum</i>	PET puro e blenda de PET com Bionolle® Fermentação em meio mínimo mineral por 7 dias	Espectros FTIR e XPS, redução na quantidade de anéis aromáticos derivados de ácido tereftálico.	NOWAK et al., 2011
<i>Penicillium</i> sp	Flocos de PET e PET em pó Fermentação em meio mínimo mineral por 30 dias	Alterações no padrão de crescimento micelial, espectros de FTIR e MEV	SEPPERUMAL; MARKANDAN; PALRAJA, 2013

3.5. Avaliação do processo de biodegradação

O acompanhamento da degradação de polímeros catalisada por microrganismos pode ser realizado por diferentes técnicas, seja na formação de subprodutos (HOLCAPEK et al., 1999; VERTOMMEN et al., 2005), alteração das propriedades (por exemplo, termodinâmicas, reológicas e mecânicas) do polímero (SHARON, SHARON, 2012) ou verificação da erosão do filme polimérico e da extensão de crescimento dos microrganismos sobre ele (UMAMAHESWARI, MARGANDAN, NATARAJAN 2013).

Sendo que as técnicas mais utilizadas para designar cada tipo de ação supracitada são:

- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), do inglês, HPLC
- Espectroscopia de absorção no Infravermelho (FTIR)
- Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), do inglês, SEM
- Determinação da atividade enzimática remanescente.

4. RESULTADOS

4.1. CAPÍTULO 1

Artigo 1

O artigo 1 contempla as análises de potencial enzimático, qualitativas e quantitativas, bem como a seleção de duas linhagens com potencial para despolimerização de PET. Este trabalho foi submetido à revista *Brazilian Journal of Microbiology* e encontra-se em fase de avaliação pelos revisores.

Hydrocarbon-associated substrates reveal promising fungi for Poly (ethylene terephthalate) (PET) depolymerization

Abstract

Recalcitrant characteristics and insolubility in water make the disposal of synthetic polymers a great environmental problem to be faced by modern society. Strategies towards the recycling of post-consumer polymers, like Poly (ethylene terephthalate- PET) degradation/depolymerization have been studied but still need improvement. To contribute with this purpose, 100 fungal strains from hydrocarbon-associated environments were screened for lipase and esterase activities by plate assays and high throughput screening (HTS), using short and long chain fluorogenic probes. Nine isolates were selected for their outstanding hydrolytic activity, comprising the genera *Microsphaeropsis*, *Mucor*, *Trichoderma*, *Westerdykella*, and *Pycnidophora*. Two strains of *Microsphaeropsis arundinis* were able to convert 2-3% of PET nanoparticle into terephthalic acid when cultured with two kinds of commercial PET bottle fragments. They also promoted weight loss, surface and chemical changes, increased lipase and esterase activities and led to PET depolymerization with release of terephthalic acid at concentrations above 20.0 ppm and other oligomers over 0.6 ppm. The results corroborate that hydrocarbon-associated areas are important source of microorganisms for application in environmental technologies, and the substrates investigated revealed important strains with potential for PET depolymerization.

Keywords: bioeconomy, enzymes, polymer biodegradation.

Introduction

Among the vast list of ecological problems caused by industrial activities, pollution by synthetic polymers is one of great concern. Ranging from thermoplastics to synthetic fibers, human-made polymers are found in an extensive variety of highly consumable products. Despite the many advantages and comfort their use bring to human society, they may also lead to the death of sea animals, persistent organic pollutants (POPs) secretion, landfill accumulation, aesthetical and economical losses. In its 1990 report, the Environmental Protection Agency (EPA-USA) recognized plastic recycling as one of the most promising methods for reducing waste ¹.

Synthetic polymers such as Poly (ethylene terephthalate) – PET are esterification products originated from petroleum and designed for environmental resistance, with very low

rates of (bio)degradation. In 2014, plastic production reached 311 million tons, which is expected to double in 20 years and almost to quadruplicate by around 2050 ². Brazil has a high recycling rate of PET, being considered one of the most developed in the world in this sense. According to 2016 PET recycling census, 51% of the 537 thousand tons of polymer used in the country were recycled³. In the United States, from about 2.5 million tons consumed in 2016, only 28.4% were collected for recycling ⁴.

PET fragment hydrolysis is a recycling strategy, although microorganisms can achieve the same results under greener conditions. PET depolymerization is desired because it yields terephthalic or isophthalic acid (and small oligomers, Bis(2-hydroxyethyl terephthalate (BHET), and 2-hydroxyethyl methyl terephthalate (MHET)) plus ethylene glycol^{5,6}, with lower energy consumption and environmental damage ^{7,8}. Searching microbial strains capable of producing active ester hydrolases against PET films is an important step in a worldwide recycling ⁹⁻¹².

Lipases and esterases represent the most widely used variety of enzymes in biotechnological applications and organic chemistry. Their use as a model for plastic biodegradation and chemical analyses have been reported in many studies ¹³⁻¹⁶. In nature, they are present in many catalytic processes and despite also produced by animals and plants, microorganism are considered the most important source for industrial application ¹⁷. Microbial enzymes are economically very attractive mainly due to their high cost-benefit ratio¹⁸.

Bacteria and yeasts are reported as important lipase-producers, such as *Bacillus* ^{19,20}, *Pseudomonas* ²¹, *Burkholderia* ²² and *Candida* ²³. However, its outstanding ability of adaption to adverse conditions make the filamentous fungi ideal agents for biodegradation studies. Firstly, mycelial growth confers an advantage over unicellular cells, especially regarding the colonization of insoluble substrates. Fungal hyphae branch rapidly into the substrate, digesting it through the extracellular enzymes and allowing bacterial attack access. Secondly, they are able to grow under stressing conditions such as low pH values and scarce nutrient availability ²⁴

Up to date, some of the most recognized fungal genera reported as lipase and esterase producers are: *Trichoderma* ²⁵; *Aspergillus* ²⁶; *Penicillium* ²⁷; *Alternaria* ²⁸ and *Fusarium* ²⁹. They were reported in substrates such as soil samples collected from different regions ^{25,30,31}, plant species of cerrado and Atlantic forest ³²; pig manure ³³; crude fragment of a chicken slaughterhouse ³⁴, and oil-contaminated soil³⁵. Investigations suggest that oil contaminated areas may be of scientific value in obtaining strains for application in environmental

biotechnology, such as *Aspergillus* sp.³⁶; *Trichoderma* and *Penicillium*³⁷; *Rhodococcus cercidiphylli*³⁸ and *Bacillus subtilis*³⁹.

The activity of lipases and esterases can be evaluated by qualitative and/or quantitative methods. Qualitative assays use color-changing when the esterified substrate is transformed into a short chain fatty acid. Phenol red is one of the most indicated dye and triglyceride tributyrin a widely used substrate^{40,41}. For esterase plate assay, α -naphthyl acetate is enzymatically hydrolyzed to α -naphthol, which couples to a diazonium salt (Fast Blue RR salt), forming a brown diazo dye complex^{42,43}. Conventional quantitative tests such as chromatography, spectrophotometry, and tensiometry, are time-consuming. High-Throughput Screening (HTS) methods are fast and can be accomplished by fluorescence analysis using synthetic chromogenic substrates (e.g. p-nitrophenyl, resorufin, umbelliferyl esters)⁴⁴. The measurement of released chromophore after enzymatic reaction is a tool that allows the selection of useful organisms in a wide range of biotechnological applications.

This research is part of a PET recycling program aiming the production of terephthalic acid and ethylene glycol by fungal strains isolated from different substrates. The isolation sources were considered to identify which one was able to reveal the most promising strains. Plate assays and HTS technique were employed for lipase and esterase pre-screening. The production of terephthalic acid by selected strains was evaluated on PET nanoparticles; thereafter, microbial performance on real condition (PET fragments of commercial bottles) was measured through PET loss weight, SEM and FTIR analysis and lipolytic/esterolytic activities after the fermentation process.

Material and methods

Microorganisms

One hundred fungal strains from different sources (Table 1) were screened. They were preserved by ultrafreezing method (-80°C) at the Laboratory of Environmental Microbiology (LMA), located at the Center of Environmental Studies–CEA, São Paulo State University (Unesp), Rio Claro, SP, Brazil. The best performing strains were also deposited at the Brazilian Collection of Environmental and Industrial Microorganisms, CBMAI/CPQBA/UNICAMP, Paulínia, SP, Brazil.

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

Source of isolation	Locality	Number of isolates/source	Taxa represented (number of isolates analysed)
Fresh water	22°41'48" S; 47° 08' 59" W	41	<i>Paecilomyces</i> (5), <i>Cladosporium</i> (1), <i>Penicillium</i> (6), <i>Curvularia</i> (2), <i>Trichoderma</i> (9), <i>Cylindrocladium</i> (1), <i>Aspergillus</i> (2), <i>Pycnidiophora</i> (2), <i>Phoma</i> (1), <i>Mucor</i> (2), Pleosporales(1), <i>Microsphaeropsis</i> (4), <i>Cochliobolus</i> (1), <i>Westerdykella</i> (3), Non sporulating fungus(1)
Treated waste water	22°44'26" S; 47° 07' 33" W	10	<i>Westerdykella</i> (1), <i>Penicillium</i> (2), <i>Pseudallescheria</i> (1), <i>Curvularia</i> (1), <i>Trichoderma</i> (4), Pleosporales (1)
Ant cuticle	22°23'58" S; 47° 32' 38" W	8	<i>Penicillium</i> (2), <i>Mucor</i> (2), <i>Fusarium</i> (4)
Fresh water	22°41'28" S; 47° 07' 22" W	7	<i>Penicillium</i> (1), <i>Paecilomyces</i> (1), <i>Aspergillus</i> (2), <i>Phoma</i> (1), <i>Trichoderma</i> (2)
Fresh water	22°44'25" S; 47° 07' 33" W	7	<i>Penicillium</i> (3), <i>Trichoderma</i> (4)
Soil (citrus plantation)	22°08'49,4" S; 47° 10' 47,6" W	8	<i>Aspergillus</i> (2), <i>Fusarium</i> (5), <i>Penicillium</i> (1)
Sewage sludge	22°44'02" S; 47° 07' 03" W	6	<i>Penicillium</i> (2), <i>Trichoderma</i> (1), <i>Fusarium</i> (1), <i>Pycnidiophora</i> (1), <i>Phoma</i> (1)
Treated effluent	22°41'28" S; 47° 07' 22" W	5	<i>Aspergillus</i> (2), <i>Trichoderma</i> (1), <i>Coletotrichum</i> (1), Pleosporales (1)
Fresh water	22°44'23" S; 47° 07' 40" W	5	<i>Penicillium</i> (1), <i>Trichoderma</i> (2), <i>Pycnidiophora</i> (1), <i>Paraconiothyrium</i> (1)
Clean PET Fragment	22°23'58" S; 47° 32' 38" W	2	<i>Cladosporium</i> (1), <i>Penicillium</i> (1)
Air	23°51'62,4" S; 46° 62' 40,1" W	1	<i>Penicillium</i> (1)

Molecular analysis and identification of fungal species

The fungal genomic DNA was extracted according to the method by Aamir *et al.*⁴⁵, using phenol, chloroform, and isopropyl alcohol. Ribosomal DNA, translation elongation factor-1 α (*tef1*) (for *Trichoderma*) and ITS regions (for other genera) were amplified. Table 2 lists the primers and amplification programs.

Table 2 Primers and conditions used for amplification.

Locus	Primer	Primer sequence 5' to 3'	Reference	Amplification program
ITS	ITS1 (forward)	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	White et al. ⁴⁶	Initial denaturation temperature at 94 °C/ 2 min, 30 cycles of denaturation at 94 °C/ 1 min, primer annealing at 55 °C/ 1 min, extension at 72 °C/3 min, final extension step at 72 °C/ 3 min and 4 °C.
	ITS4 (reverse)	TCCTCCGCTTATTGATATGC	White et al. ⁴⁶	
Translation elongation factor-1 α (<i>tef1</i>)	EF1-728F (forward)	CATCGAGAAGTTCGAGAAGG	Carbone and Kohn ⁴⁷	Initial denaturation temperature at 94°C/2 min, 15 cycles of denaturation at 94°C/30 s, primer annealing at 65°C/30 s; extension at 72°C/1 min, followed by 35 cycles at 94°C/30 s, 48°C/30 s; final extension step at 72°C/1 min .
	TEF1R (reverse)	GCCATCCTTGGAGATACCAGC	Carbone and Kohn ⁴⁷	

Polymerase chain reactions (PCRs) for ITS region were performed in a final volume of 25 μ L (0.2 μ L of dNTPs [25 mmol.L⁻¹]; 2.5 μ L of Taq buffer (10x-Invitrogen); 1.5 μ L of MgCl₂ [50 mmol.L⁻¹]; 0.5 μ L of each primer [20 mmol.L⁻¹]; 0.2 μ L of Taq polymerase [5 U. μ L⁻¹], 3.45 μ L of diluted genomic DNA [15 ng. μ L⁻¹], and 16.15 μ L of sterilized ultrapure water. For *Tef*PCR reactions, the final volume was 25 μ L (0.2 μ L of dNTPs [25 mmol.L⁻¹]; 2.5 μ L of Taq buffer (10x-invitrigen); 1.5 μ L of MgCl₂ [50 mmol.L⁻¹]; 1.0 μ L of each primer [10 mmol.L⁻¹]; Bovine Serum Albumine (BSA) [1 mg.mL⁻¹], 0.2 μ L of Taq polymerase [5 U. μ L⁻¹], 3.45 μ L of diluted genomic DNA [15 ng. μ L⁻¹] and 14.15 μ L of sterilized ultrapure water.

Amplicons were purified using GFX PCR DNA and the gel band purification kit (GE Healthcare, UK), and sequenced with the same primers and the following program: 95°C/1

min followed by 28 cycles at 95°C/15 s, 50°C/45 s, and 60°C. Afterwards, all samples were taken for further purification and sequenced with BigDye Terminator (Life Technologies, USA) at an ABI3500XL Series Sequencer (Applied Biosystems), according to the manufacturer's instructions.

The BioEdit Sequence Alignment Editor v. 7.0.5.3⁴⁸ was used to generate the consensus sequence, which was compared to the GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) and CBS (<http://www.cbs.knaw.nl>) nucleotide database. The most similar sequences to the one from the isolate were selected and combined. After alignment using the CLUSTAL X software⁴⁹, a phylogenetic tree was generated with MEGA software version 4.0⁵⁰. Neighbor-joining criteria⁵¹ were used in the analysis, and bootstrap values were calculated for 1000 replicates.

Agar plate methods

Lipase. A 3 mm inoculum from a 7-day old colony was transferred to a selective medium with the following composition per liter: phenol red (0.01%) with 1% lipidic substrate tributyrin, 10 mmol.L⁻¹ of CaCl₂ and 2% agar; pH was adjusted to 7.3–7.4, using 0.1 N NaOH. Fungal colonies that produced yellow halo after 7 days at 28°C were considered lipase positive⁵².

Esterase. Fungal colonies maintained for 7 days at 28°C in Potato Dextrose Agar (PDA, 20 g.L⁻¹, Sigma-Aldrich) were used to evaluate esterase activity. To reveal the esterase activity of isolates, 20 mL of 0.4% HEPES/NaOH buffered agarose at 50–60°C with 320 µL of Fast Blue RR (80 mg.mL⁻¹ in dimethylsulfoxide) and 320 µL α-naphthyl acetate (20 mg.mL⁻¹ in acetone) were added onto the plate. Colonies with positive results showed brown staining precipitates in a period of up to 15 min⁴².

Both plate assays were performed in duplicate.

High-throughput screening fluorescence assay (HTS)

Fungal taxa evaluated by HTS were cultivated for 7 days at 28°C in PDA. Fungal suspensions (1 mg.mL⁻¹) were prepared in borate buffer (pH 7.4). The assays were performed on 96-well flat bottom microtiter plates, as detailed below⁵³.

- Microbial Assay: 10 µL of 20 mmol.L⁻¹ NaIO₄ solution, 80 µL of 5 mg.mL⁻¹ BSA (Bovine serum albumine) solution in borate buffer (pH 7.4), and 10 µL of 2 mmol.L⁻¹ probe solution. Probe 1- short chain ester, namely 4-[(2-oxo-2H-1-benzopyran-7-yl)oxy]butane-1,2-diylacetate and probe 2- long chain ester 4-[(2-oxo-2H-1-benzopyran-7-yl)oxy]butane-1,2-

diyldioctanoate (Fig.1). An aliquot of 100 μL of 1.0 mg.mL^{-1} microbial cell suspension in the previous borate buffer was used in quadruplicate per well.

- Positive Control: assays containing 10 μL of 20 mmol.L^{-1} NaIO_4 solution, 80 μL of 5 mg.mL^{-1} BSA solution in borate buffer, 10 μL of 2 mmol.L^{-1} probe product solution 4-[(2-oxo-2H-1-benzopyran-7-yl)oxy]butane-1,2-diol and 100 μL of 1 mg.mL^{-1} cell suspension of the microorganism in borate buffer (pH 7.4) were performed in duplicate.

- Negative Control: duplicate reactions were carried out with 10 μL of 20 mmol.L^{-1} NaIO_4 solution, 80 μL of 5 mg.mL^{-1} BSA solution in borate buffer (pH 7.4), 10 μL of 2 mmol.L^{-1} solution of each probe and 100 μL of borate buffer (pH 7.4).

Fluorescence analyses were performed at 0, 24, 48 and 96 h in a 2300 EnSpire™ Multimodal Reader (PerkinElmer), with excitation filter at $\lambda_{\text{ex}} = 365 \text{ nm}$ and $\lambda_{\text{em}} = 460 \text{ nm}$ at 25°C. At the end of the reaction, the conversion was calculated according to equation 1.

$$\text{Conversion}(\%) = \left(\frac{\text{mean assay fluorescence} - \text{mean negative control fluorescence}}{\text{mean positive control fluorescence}} \right) \times 100 \quad (1)$$

The enzymatic hydrolysis process of fluorogenic probes 1 (short-chain ester) and 2 (long-chain ester) is shown in Figure 1.

Fig.1 Chain reaction for the fluorescence-based HTS assays with probes 1 and 2.

Source: Adapted from MANTOVANI; OLIVEIRA; MARSAIOLI ⁵¹

Fluorescence analysis for PET nanoparticle biodegradation

Fungi with promising conversion results obtained from HTS assays were evaluated regarding the potential of PET nanoparticles biodegradation based on a methodology developed by Chaves *et al.* ⁵⁴. Briefly, fungal cell suspensions (100 μL , 1.0 mg.mL^{-1} in borate buffer (pH 7.8), resulted from colonies with 7 day-growth were incubated with a solution of

PET nanoparticles (30 μL , 0.11 mg.mL^{-1}) for 15 days at 30°C and at 200 rpm. The terephthalic acid formed after PET hydrolysis was converted to the fluorescent 2-hydroxyterephthalate (HOTP) by adding (in this sequence): H_2O_2 (30 μL , 2% v/v), EDTA (20 μL , 3 mmol.L^{-1}) and $\text{FeSO}_4.7\text{H}_2\text{O}$ (20 μL , 3 mmol.L^{-1}) and incubating for 25 min at room temperature. The fluorescence data was analyzed in a 2300 EnSpire Multimodal Reader (Perkin Elmer), with excitation wavelength $\lambda_{\text{ex}} = 328 \text{ nm}$ and emission wavelength $\lambda_{\text{em}} = 421 \text{ nm}$.

Fungal assays were performed in triplicate, positive and negative controls, in duplicate and microbial control were executed only once. The components of the groups are listed below:

- positive control: containing terephthalic acid (30 μL , 2.6 mmol.L^{-1}) and microbial suspension (100 μL , 1.0 mg.mL^{-1} in borate buffer, pH 7.8).
- negative control: comprising PET nanoparticles (30 μL , 0.11 mg.mL^{-1}) and borate buffer (100 μL , 20 mmol.L^{-1}) pH 7.8.
- microbial control: using only 1 mg.mL^{-1} fungal suspension.

While the positive control determined the maximum fluorescence intensity for the assay, the negative control evaluated the spontaneous hydrolysis of the PET polymer and the microbial control provided the microorganism background fluorescence. The conversions were obtained according to equation 2.

$$C(\%) = \left(\frac{\text{mean fluoresc. assay} - \text{mean fluoresc. neg. control} - \text{fluoresc. microb. contr.}}{\text{mean fluoresc. pos. contr.}} \right) \times 100 \quad (2)$$

PET depolymerization test

PET bottles of Crystal[®] mineral water (500 mL) and Sprite[®] soft drink diet (2000 mL) were denominated as PET 1 and PET 2, respectively. They were commercially obtained and pretreated, besides undergoing labels and caps removal. Fragments of approximately 4.5 x 2.5 cm (500 mg) were cut with scissors and washed with tap water and neutral detergent, and rinsed in sterilized distilled water. The pieces were immersed in 2% hypochlorite for one hour, rinsed in sterilized distilled water, and then kept for 30 min under ultraviolet light in a laminar flow closet (lamp output of 492 W at a distance of 50 cm). The fragments were then oven dried at 50°C until water evaporation.

For evaluation of PET depolymerization potential, flasks with 40 mL of potato dextrose broth (PDB) containing three 0.5 cm^2 PDA fragments (of 7 day-old fungal colonies,

incubated at 28 °C) and two PET fragments (previously weighed in analytical scale) were used. The flasks were incubated at 100 rpm for 14 days at 28 °C. Cultures were centrifuged at 4,472 g in sterilized 50 mL-Falcon tubes and filtered through a 0.45 µm membrane to separate mycelium and PET fragments from the fermented broth.

PET fragments were subjected to a new disinfection process as previously mentioned, until no mycelial structure was observed. Control reactions (without inoculum) were carried out based on the same conditions used in each experiment. The percentage of weight loss of the PET fragments and SEM images were evaluated, as well as the lipolytic activity of the fermented broth.

Weight loss (WL) of PET fragments was calculated according to equation 3.

$$WL(\%) = \left(\frac{Wa - Wb}{Wb} \right) \times 100 \quad (3)$$

Where:

Wa: dry weight of the PET sample after the fermentation treatment.

Wb: dry weight of the PET sample before the fermentation treatment.

PET fragments Fourier Transformed Infrared by attenuated total reflectance (ATR-FTIR)

The fragments spectra were read by attenuated total reflectance in a Fourier Transform Infrared Spectrophotometer Shimadzu, model FTIR-8300 in the range of 4000-400 cm⁻¹ using 32 accumulations and 2 cm⁻¹ resolutions.

Scanning electron microscopy (SEM)

Scanning electron microscopy analyses were performed using a scanning electron microscope Hitachi model TM 3000. The medium accelerating voltage was 15 Kv (analy mode 1-30 Kv). The surface of the PET fragment was covered with gold by using the Balzers SCD 050 apparatus at a 25 milliamps for 40 seconds under 80 Pascal pressure.

Fermented broth analysis

Total proteins assays

Protein concentrations were measured with Bradford method⁵⁵. Bovine Serum Albumine (BSA), protein standard, was solubilized in distilled water to the concentration of 1 mg. mL⁻¹ and, this solution was used for preparation of a calibration curve, aim to 3.33- 33.3 µg. mL⁻¹. Total proteins of samples and BSA increasing amounts was staining using

Comassie Brilliant G-250 Blue in 30% perchloric acid. The complex protein-dye was assayed spectrometrically in 595 nm.

Evaluation of lipase activity

The lipolytic activity was evaluated according to Burkert, Maugeri and Rodrigues⁵⁶, where one gram of palm oil (lipid substrate) was added to 125 mL Erlenmeyer flasks containing 4 mL of distilled water and glass beads. Then, 1 mL of the mycelium-free fermented broth was added. The flasks were incubated at 50°C under agitation at 150 rpm for 30 min and then the reaction was interrupted by the addition of 10 mL of acetone/ethanol (1:1 v/v) solution. The released fatty acids were manually titrated with a standard NaOH (0.05 mol.L⁻¹) solution using 3 drops of phenolphthalein (0.1% in absolute ethanol) as indicator. The volume of NaOH solution spent in each titration was noted. The control (blank) was prepared by adding 1 mL of distilled water instead of the fermented broth. These assays were performed in triplicate and the lipolytic activity expressed in unit of lipolytic activity (UA), corresponding to the amount of enzyme capable of releasing one μmol of fatty acids per minute of reaction.

Evaluation of esterase activity⁵⁷

The activity was quantified using the potential enzymatic hydrolysis of 1.5 mMol.L⁻¹ α -naphthyl acetate (in phosphate buffer 300 mM containing isopropyl alcohol) to α -naphthol, coupling to diazonium salt Fast Blue RR (0.1 mg.mL⁻¹ in Dimethylsulfoxide and ethyl alcohol), forming adiazo complex. The quantification was performed against α -naphthol calibration curve in concentration between 10 to 250 $\mu\text{mol. L}^{-1}$.

Samples analysis were effectuated according to the following:

- 100 μL of fermented broth was added to 2 mL of α -naphthyl acetate and incubated to 37°C for one hour.
- The reaction was stopped with 1 mL of Sodium Dodecylsulfate 10% pH 7.0, in sterilized water.
- 1 mL of fast Blue RR revealed the quantity of converted α -naphthol, that was measured in 490 nm.

The results were expressed in mmol of α -naphthol converted by miligram of protein per hour.

Terephthalic acid and other oligomers quantification by High Performance Liquid Chromatography with UV detector (HPLC-UV)

The terephthalic acid (PTA), bis-hydroxyethyl terephthalate (BHET) and Methyl hydroxyethyl terephthalate (MHET) samples contents were partitioned liquid-liquid extraction using 2 mL of fermented broth with ammonium sulfate (0.5 g) and hexane; ethyl acetate and dichloromethane (5:4:1)- 3 mL (two times) after agitation for 40 seconds. To the end, the organic phase was separated and evaporated in a nitrogen stream at 40 °C and the residues were resuspended in 100 uL of 0.5% formic acid by agitation in the vortex for one minute. Three microlitres were injected into the equipment.

HPLC separations were performed by a Shim-pack VP-ODS C18 column (4.6 mm, 250 mm, 5 mm) with C18 pre-column (Shimadzu, USA). The mobile phase consisted of solvent A (Formic acid 0.5% (v/v): acetonitrile (90:10)) and solvent B (Formic acid 0.5% (v/v): acetonitrile (60:40)) with a flow rate of 0.5 mL.min⁻¹. The separation was accomplished by gradient elution, as shown in Table 3. Retention times were 10.450 (PTA); 12.505 (BHET) and 38.0 minutes (MHET). Benzoic acid was used as internal standard. The analytes were detected at 254 nm. The method range of linearity was 3 to 300 ppm for PTA and, 0,15 to 30 ppm for BHET and MHET. The correlation coefficient was higher than 0.99.

Table 3 Gradient program applied in HPLC separation

Time (minutes)	Mobile phase B (%)
0.01	80
5.0	40
13.0	50
16.0	0
24.0	0
25.0	80
30.0	80
35.0	80
40.0	80

Results

Qualitative and quantitative assays for lipase and esterase activity

Figure 2 shows the results for enzyme production. Lipase activity: (a) 39.0% high; (b) 35.0% average; (c) 19.0 % low, 7% have negative result. Esterase: before (d1) and after reaction (d2) with negative result; before (e1) and after reaction (e2) showing positive result. Outstanding, thirty-nine strains were considered of high capacity of conversion of tributyrin in fatty acids indicating lipase activity and 51 strains were revealed as esterase producers. Combining both results, 21 isolates were esterase and lipase positive.

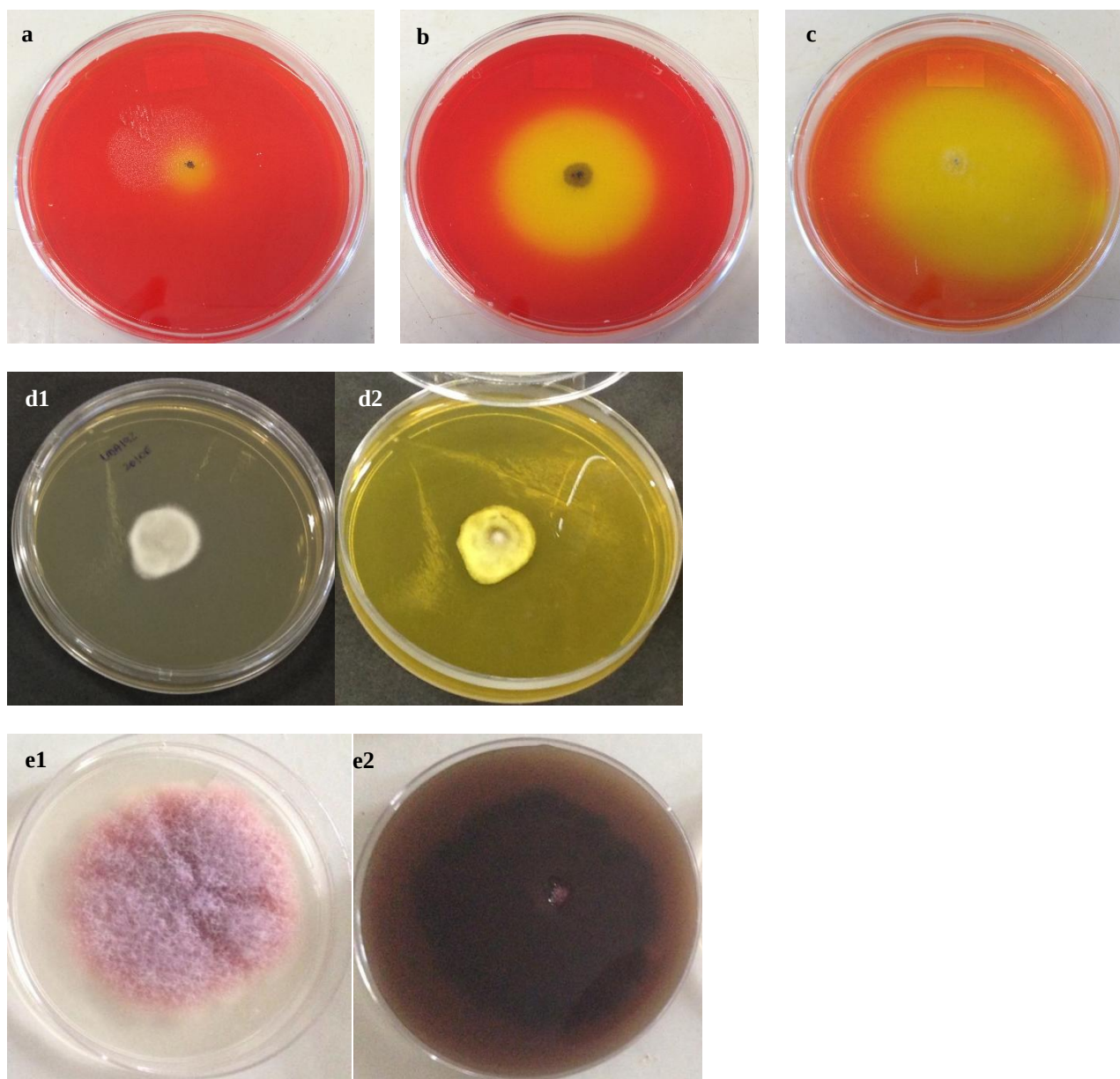


Fig.2 Plate assay for lipase and esterase activity. **a, b** and **c**. strain with low (*Aspergillus* sp. LMA 904), intermediate (*Curvularia* sp. LMA 1206) and high (*Penicillium* sp. LMA 1285) production of lipase, respectively. Culture medium with Tributyrin as sole source of carbon. **d1**. negative esterase strain, seven days old Microascaceae representative LMA 192 colony in potato dextrose agar. **d2**. after revelation for esterase

activity with α -naphthyl acetate and fast Blue RR. **e1.** positive esterase strain *Fusarium* sp. LMA 1144, colony before revelation. **e2.** after revelation test.

Twenty-one strains presented conversion extent of the short chain probe (1) above 50%, and 18 converted the long chain probe (2) into umbelliferone at levels higher than 50% (Figure 3 a and b). The taxa belong to *Mucor*, *Microsphaeropsis*, *Westerdykella*, *Pycnidiophora*, *Trichoderma*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Curvularia* and *Paecilomyces*. The expressed results in Figure 3 were obtained after 96 hours. Tables S1 and S2 (supporting information) show data from other analysis periods.

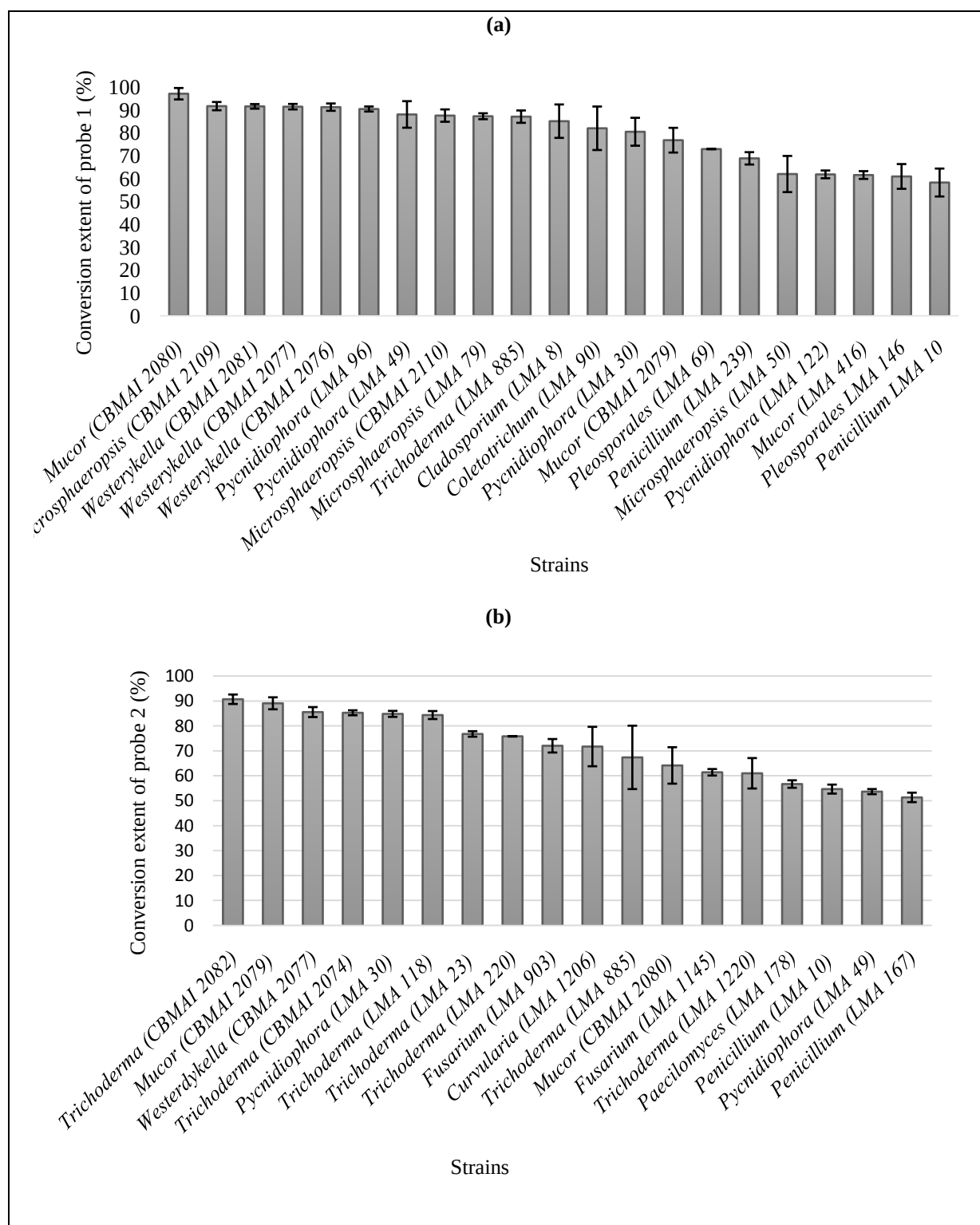


Fig.3 Conversion extent of probes by the most promising fungal strains: **a.** probe 1 **b.**probe 2. Data expressed as average $\pm$ standard deviation (n=4). Results for conversions after 96 hours.

In our results, all promising strains were recovered from hydrocarbon-associated substrates. *Mucor fragilis* CBMAI 2080, from leafcutter ants, revealed higher activity against short-chain probes and converted $64.18\% \pm 7.28$ of the long-chain probe. *M. arundinis* CBMAI

2109 and *W. dispersa* (CBMAI 2076, CBMAI 2077 and CBMAI 2081) came from water samples under the influence of an oil refinery.

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

Code	Identification/ Substrate	Plate assay *	Conversion of probe 1 (n=4, % media± Standard Deviation-SD)			
			0 h	24 h	48 h	96 h
CBMAI 2080	<i>Mucor cf. fragilis</i> / Ant cuticle	+	0.00 ± 0.00	54.09 ± 1.36	81.83 ± 1.07	97.00 ± 1.12
CBMAI 2109	<i>M. cf. arundinis</i> / Fresh water	+	92.64 ± 0.35	91.08 ± 1.42	86.38 ± 0.88	91.61 ± 0.92
CBMAI 2081	<i>W. cf dispersa</i> /Fresh water	+	93.78 ± 0.57	91.52 ± 1.49	84.59 ± 0.84	91.50 ± 1.46
CBMAI 2077	<i>W. cf. dispersa</i> / Fresh water	+	81.52 ± 10.49	91.80 ± 1.62	84.05 ± 1.55	91.37 ± 2.06
CBMAI 2076	<i>W. cf. dispersa</i> / Fresh water	+	67.87 ± 7.85	86.67 ± 2.73	84.45 ± 0.84	91.17 ± 0.89

*Esterase activity revealed using alpha naphthyl acetate (20 mg.mL⁻¹ in acetone) and fast blue RR (80 mg.mL⁻¹ in dimethylsulfoxide). Fig.1S containing example of strains with positive results by plate assay - CBMAI 2080, CBMAI 2109, CBMAI 2081 and CBMAI 2077 (see in supplementary material).

Similar results were observed in the octanoate ester probe (Table 5), by *Trichoderma cf. longibrachiatum* CBMAI 2082, *Westerdykella cf. dispersa* CBMAI 2077, *Pycnidophora cf. dispersa* LMA 30, and *Trichoderma cf. asperellum* CBMAI 2074, a isolated from water samples collected next to an oil refinery. *Mucor cf. ramosissimus* CBMAI 2079 was found on the cuticle of leafcutter ants.

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

Code	Identification/ Substrate	Plate assay (Tributyrin) *	Conversion of probe 2 (n= 4, %media± Standard Deviation-SD)			
			0 h	24 h	48 h	96 h
CBMAI 2082	<i>T. cf. longibrachiatum</i> / Fresh water	+++	1.63 ± 0.35	89.97 ± 0.50	89.94 ± 2.51	90.71 ± 1.87
CBMAI 2079	<i>M.cf. ramosissimus</i> / Ant cuticle	+++	0.00 ± 0.00	73.58 ± 5.09	86.09 ± 2.86	89.08 ± 2.43
CBMAI 2077	<i>W. cf. dispersa</i> / Fresh water	++	83.58 ± 2.02	86.01 ± 1.80	85.56 ± 2.34	83.03 ± 1.63
CBMAI 2074	<i>T. cf. asperellum</i> / Fresh water	+++	0.88 ± 0.05	85.69 ± 1.26	85.67 ± 1.48	85.27 ± 1.03
LMA 30	<i>P. cf. dispersa</i> / Fresh water	+++	82.16 ± 1.16	86.07 ± 0.79	88.84 ± 1.19	82.59 ± 0.96

*(+++)
fungi that changed completely the selective medium color (from pink to yellow), (++) fungi that partially altered color, classified as intermediate producers. Tributyrin as sole source of carbon. Fig. 2S containing the results of plate assays for the related strains in this table (see in supplementary material).

When analyzing results of plate assays *versus* fluorescent probes, one can say that *Trichoderma cf. longibrachiatum* CBMAI 2082 had positive results in all tests. However, activity in the probes was higher for probe 2 than for probe 1 (90.71%±1.87 and 40.88%±0.58, respectively).

In the supporting material, Figures S1 and S2 show examples of results for esterase and lipase plate assays of the above-cited strains.

Fungal activity on PET nanoparticles and commercial bottle fragments

Our screening of filamentous fungi pointed to nine strains with high hydrolytic activity, which were selected for subsequent tests. From these, only *M. cf. arundinis* CBMAI 2109 was able to convert 2.0±0.4% of the PET nanoparticle to the terephthalic acid (monomer), what was confirmed by the calculations from equation 2, which compares the fluorescence of the positive control (total fluorescence of HOTP) with that of the assay⁵⁴. This strain also converted 43.3±2.7% of long chain ester probe in umbelliferone. SEM analysis endorsed the action of this isolate on PET (Figure 4, b and c and Figure 5 b and c).

Another isolate of *M. cf. arundinis* (CBMAI 2110) obtained from the same region (fresh water- 22°41'48" S; 47° 08' 59" W) presented high conversion for probe 1 (84.0±0.88%) and low conversion rate for probe 2 (19.3±0.5%) after 96 h. The result of the

PET nanoparticle assay showed $2.7 \pm 0.9\%$ of terephthalic acid produced from the polymer. SEM images from PET fragments after the fermentation test CBMAI 2110 showed pieces with evidence for significant results (Figure 4, d and e and figure 5 d and e).

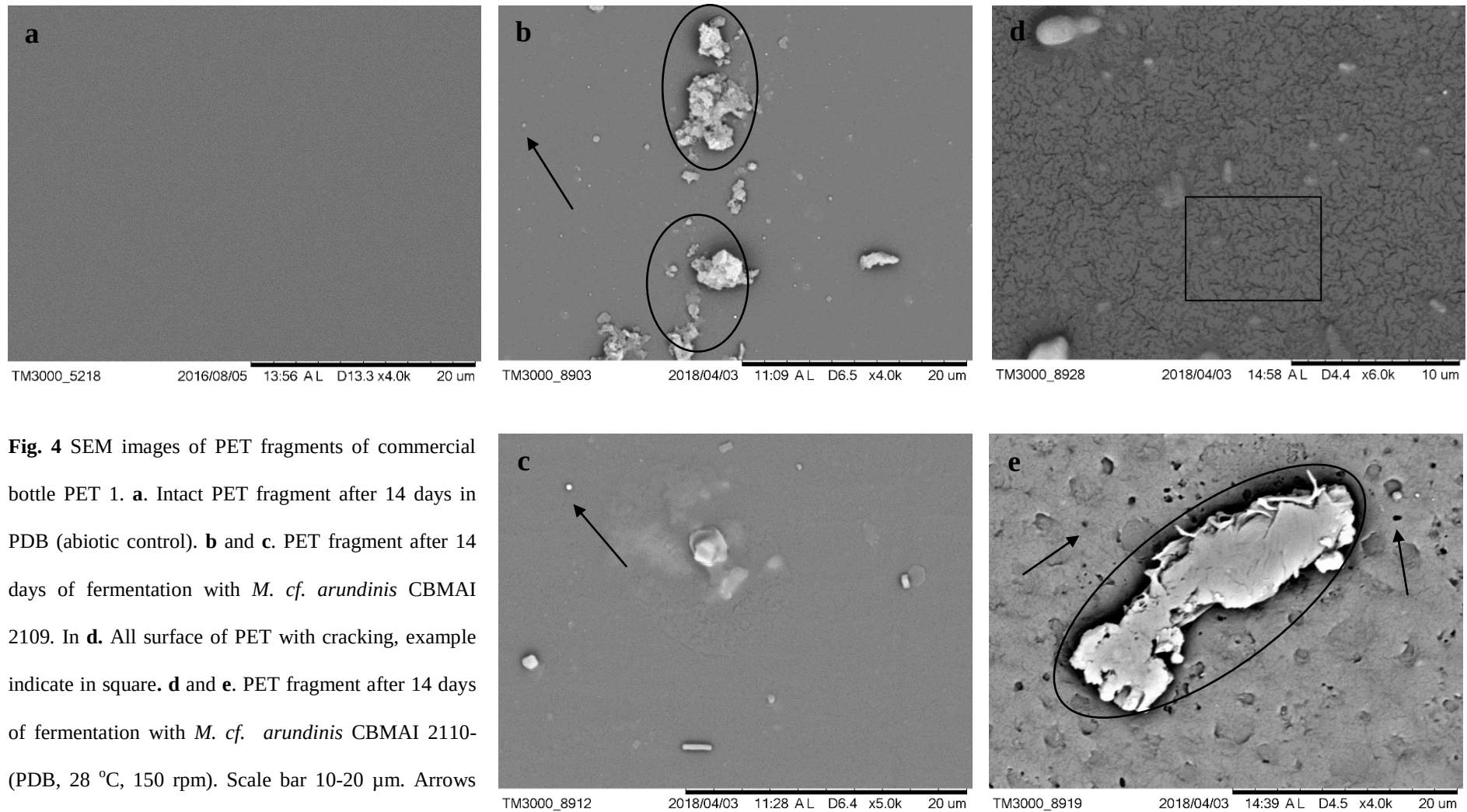


Fig. 4 SEM images of PET fragments of commercial bottle PET 1. **a**. Intact PET fragment after 14 days in PDB (abiotic control). **b** and **c**. PET fragment after 14 days of fermentation with *M. cf. arundinis* CBMAI 2109. In **d**. All surface of PET with cracking, example indicate in square. **d** and **e**. PET fragment after 14 days of fermentation with *M. cf. arundinis* CBMAI 2110- (PDB, 28 °C, 150 rpm). Scale bar 10-20 μm. Arrows indicate micro pitting, Circles indicate mycelial structure adhered even after cleaning procedure.

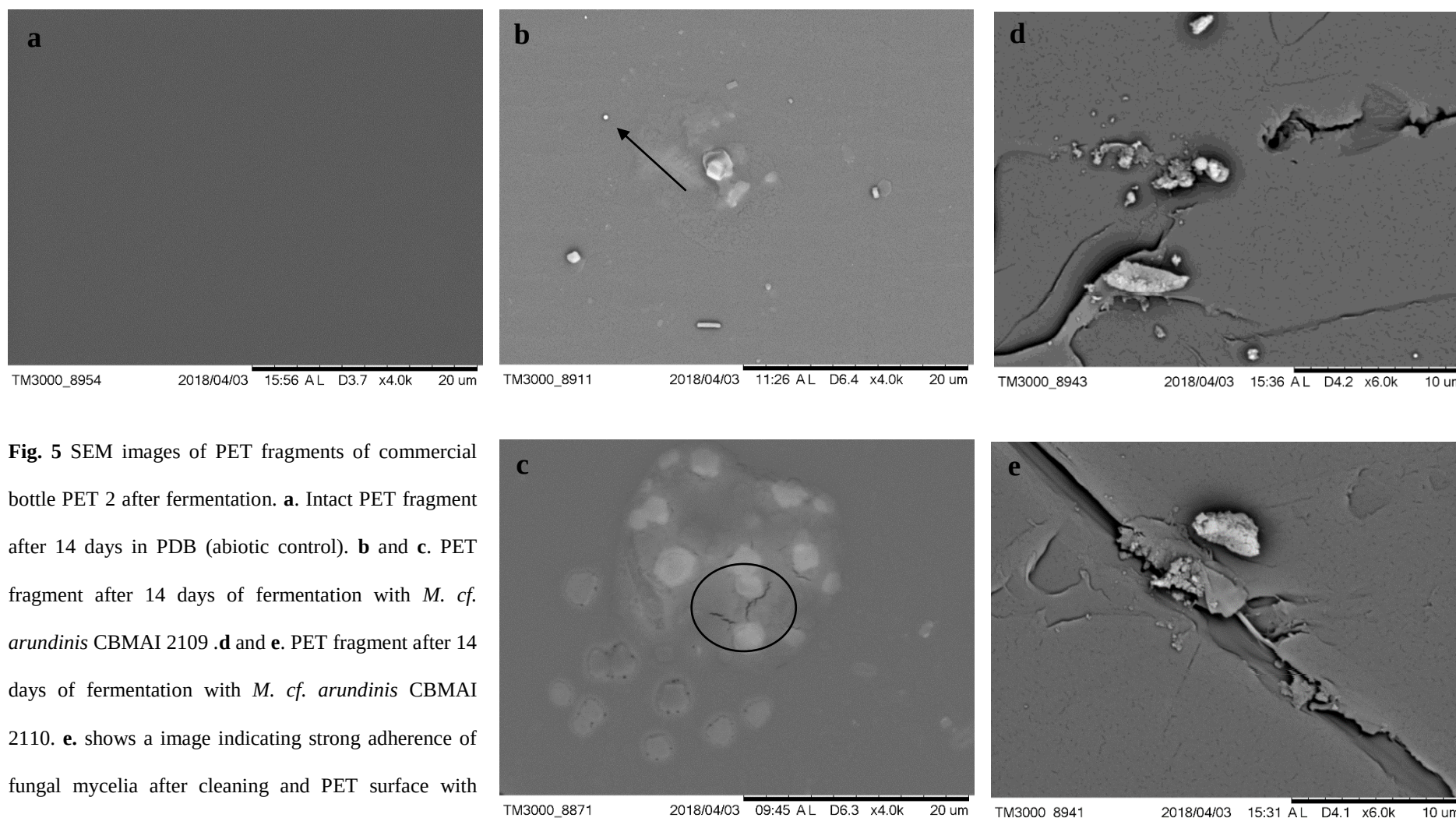


Fig. 5 SEM images of PET fragments of commercial bottle PET 2 after fermentation. **a**. Intact PET fragment after 14 days in PDB (abiotic control). **b** and **c**. PET fragment after 14 days of fermentation with *M. cf. arundinis* CBMAI 2109. **d** and **e**. PET fragment after 14 days of fermentation with *M. cf. arundinis* CBMAI 2110. **e**. shows a image indicating strong adherence of fungal mycelia after cleaning and PET surface with cracking (PDB, 28 °C, 150 rpm). Scale bar 10-20 μm. Arrows indicate pittings, Circle highlights micro-cracking.

Both strains of *M. cf. arundinis*, CBMAI 2109 and CBMAI 2110, showed promising results in the assays with fragments of different commercial PET bottles (figure 6). The lipase and esterase activities showed a moderated positive correlation; when there was an increase in lipolytic activity, the same was observed for esterase activity ($r = + 0.66$) in all analyzed samples (PET 1 and PET 2). In addition to the production capacity of hydrolytic enzymes, these isolates promoted the depolymerization of polyethyleneterephthalate and the weight loss of commercial fragments of PET bottles after 14 days, Figure 7.

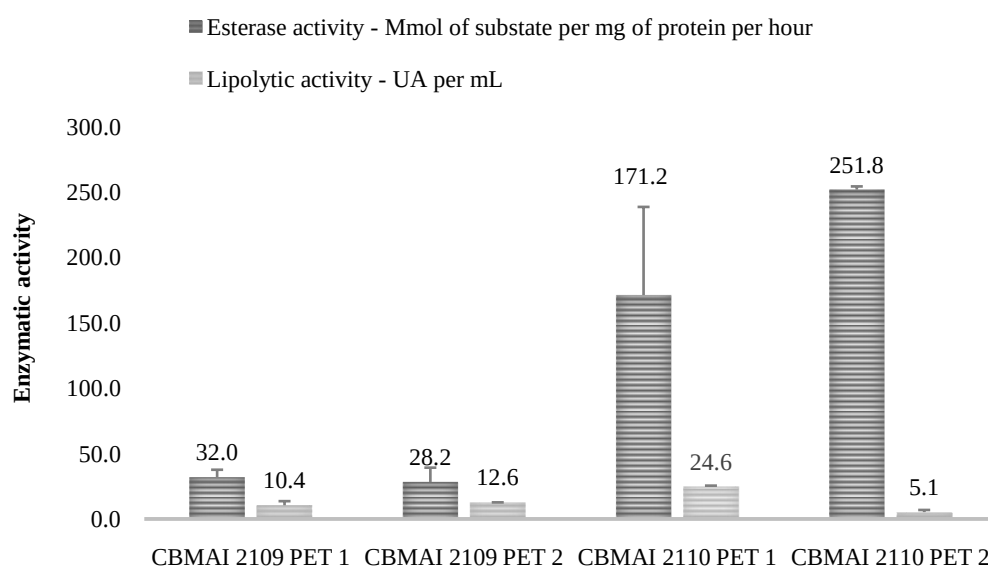


Fig. 6 Lipase and esterase activity after 14 days of fermentation in PDB with isolates *M. cf. arundinis* (CBMAI 2109 and CBMAI 2110). Study on PET from different commercial bottles. Data for lipase activity were expressed in Units of activity (UA) and for esterase are expressed in mmol of α -naphthol/ mg of protein. h^{-1} (average $\pm$ standard deviation, $n=3$).

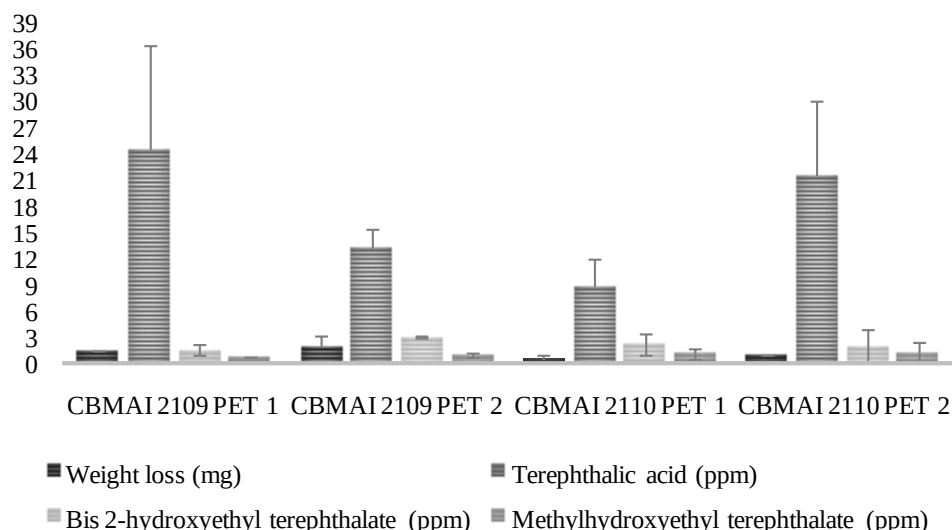


Fig. 7 Weight loss of PET fragments and terephthalic acid, Bis- 2 hydroxyethyl terephthalate (BHET) and Methylhydroxyethyl terephthalate (MHET) content in PDB after 14 days of fermentation with the isolates *M. cf. arundinis* (CBMAI 2109 and CBMAI 2110). Study on PET from different bottles. Data were expressed mg. L⁻¹ or ppm (media ± standard deviation, n=3). For quantification was used relative area (analyte area /benzoic acid ratio – IS area).

The terephthalic acid monomer (PTA), as well as the smaller oligomers, BHET and MHET, were quantified in concentrations above 0.6 ppm for all PET by-products, in the fermented broth. *M. cf. arundinis* CBMAI 2109 showed higher concentrations of terephthalic acid in PET 1 (24.4 ± 12.1 ppm) and CBMAI 2110 in PET 2 (21.4 ± 8.6 ppm).

Figures 8A and 8B compare the infrared spectra of PET 1 and PET 2 samples, respectively, relating the treated (CBMAI 2109 and CBMAI 2110) and untreated (abiotic control) fragments. The carbonyl indices showed no significant difference between the treatments, however in the microbiologically treated materials differences in absorption intensity were observed at specific points in the spectrum, as well as the appearance or disappearance of absorption bands, indicating possible molecular modification in the evaluated region.

Infrared spectrum sites in figures 8A and 8B with significant changes were in the regions of 3080 to 3050 cm⁻¹, relative to the symmetrical stretching of -CH; from 2900 to 2800 cm⁻¹, due to symmetrical C-H stretching; 1575 cm⁻¹ for vibrations with draw C = C of aromatic ring.

The different intensities of bands 1960 and 794 cm⁻¹ indicate vibrations of two hydrogens on para-substituted aromatic rings.

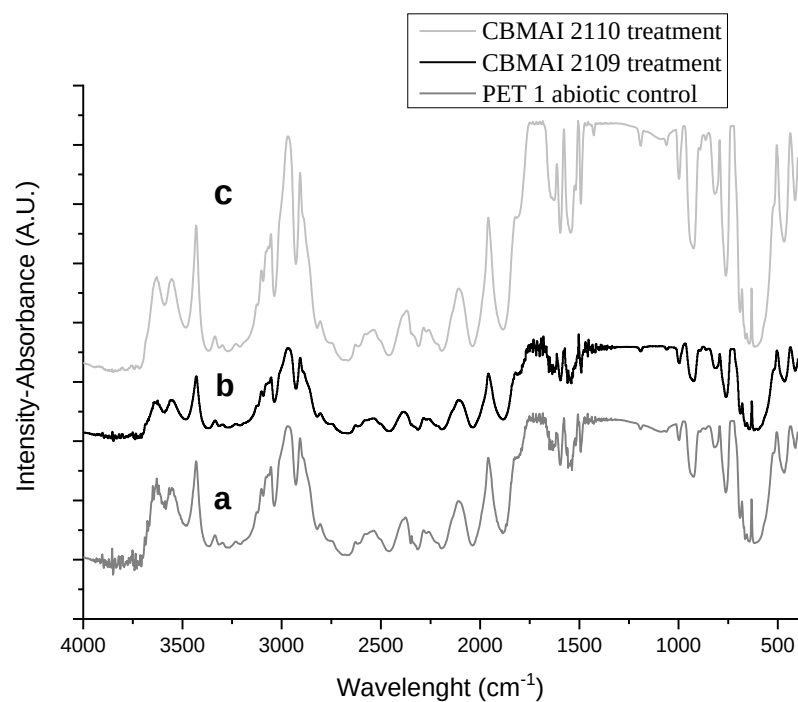
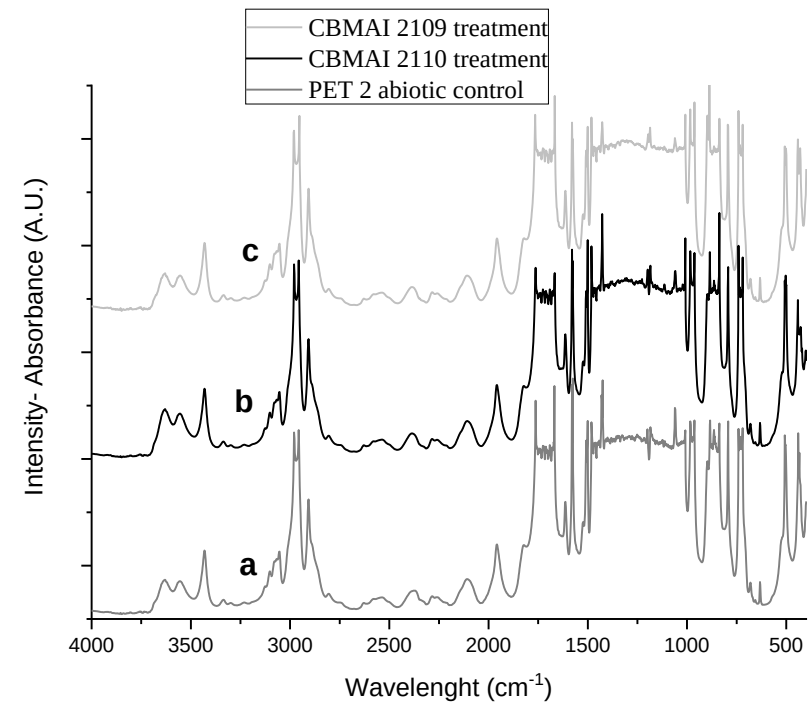
**A****B**

Fig. 8 FTIR graphs of PET 1 (A) and PET 2 (B) after 14 days of fermentation with the isolates *M. cf. arundinis* (CBMAI 2109 and CBMAI 2110). A) a. PET 1 abiotic control; b. CBMAI 2109 treatment; c. CBMAI 2110 treatment. B) a. PET 2 abiotic control; b. CBMAI 2110 treatment; c. CBMAI 2109 treatment.

Discussion

Substrates x fungal activity

Among the 100 isolates studied (Table 1), 34% belong to Eurotiales, mainly *Penicillium* and *Aspergillus*, 33% Hypocreales (*Trichoderma* and *Fusarium*) and 28% Pleosporales and Mucorales, (5%) minor group comprising Glomerellales, Microascales, Capnodiales and non esporulating fungus. The main groups are reported as stress-tolerants and able to grow under conditions of water and nutrient limitations, high temperature and low oxygen availability⁵⁸. Eurotiales and Hypocreales have been under extensive research in the evaluation of extracellular enzymatic profile because they usually present expressive results of enzyme production as lipase and esterase, for example⁵⁹.

The literature reports that the substrate may induce microbial gene expression^{60,61}. Gargouri *et al*⁶² concluded that the presence of hydrocarbons stimulates microorganisms to increase cell surface hydrophobicity. Other investigations also observed high hydrolytic activities (lipase/esterase) in strains isolated from hydrocarbon-associated environments⁶³. This hypothesis is based on the theory of directed evolution when the substrate of contact to which a strain or a wild enzyme is exposed, leads to genotypic alterations that allow the assimilation of previously unassimilated molecules, due to the increase in the enzymatic activities carried out by modifications in certain proteins^{54,64,65}. Thereby, Crecy *et al.*⁶⁶ obtained strains of *Metarhizium anisopliae* with a recognized thermotolerance increment, desired for the application of the strain as a biocontrol agent.

Based on our results, it is suitable to say that substrates where hydrocarbons are present, tend to be adequate for PET depolymeration researches. In this study, fungal strains of higher interest (Tables 4 and 5) were obtained from water samples under the influence of an oil refinery and leafcutter antbody. The presence of hydrocarbons on ant cuticles are well known. They provide an important ant-to-ant communication signal^{67,68}, besides working as a protective barrier against dehydration of the cuticle^{69,70}. Cervantes-Gonzalez *et al.*⁷¹ verified a positive influence of aromatic, heteroaromatic, and alkane hydrocarbons regarding the lipase activity of *Pseudomonas* sp. obtained from oil polluted soil. Kanwar and Goswani⁷² showed that lipases from *P.pseudomallei* were produced using pure *n*-hexadecane, as the sole source carbon.

Qualitative and quantitative assays for lipase and esterase activity

Several authors report the use of different substrates for to distinguish lipases from esterases. Substrates commonly used for identification or isolation of lipase-producing microorganisms

were tween 80 and phenol red⁷³, tributyrin^{74,75}, olive oil/tributyrin/phenol red⁷⁶ and trypropionin, tributyrin vinyl laurate, tryoctanoin and olive oil⁷⁷. Studies to detect esterase usually recommend alpha naphthyl acetate and short-chain vinyl esters (acetate and propionate)⁷⁷.

Consistent with scientific information, this investigation employed tributyrin and phenol red for lipase production and alpha-naphthyl acetate for esterase. Also, a large number of publications recommend these methods because they allow a better visualization and interpretation of the results obtained. The present study corroborates with this observation and states that the assays were very satisfactory enabling the identification of 18 “true lipases” which acted on the lipophilic substrate, while they were not active against alpha naphthyl acetate (more hydrophilic substrate).

The enzymatic activities of the selected strains were confirmed by HTS method, as a refinement of the results. Techniques able to detect fluorescent signals are more sensitive than the colorimetric ones to distinguish lipase-producing microorganisms from esterase ones⁷⁸. In this method, enzymatic hydrolysis results in a potentially fluorescent compound which signal may be detected following oxidation and β -elimination chain reactions, producing umbelliferone. Long chain ester (octanoate) fluorogenic probes indicate lipase production and the short chain (ethanoate) ones signalize esterase activity⁵³. Another study found esterase production using substrates with less than six carbons⁷⁹ and lipase employing 8-carbon substrates⁸⁰. According to Lopes *et al.*⁸¹ the reliability in the classification of lipolytic enzymes is only defined through the analysis of activity determination by multiple methods; what justifies why different methodologies were used here to differentiate lipases and esterases production in our strains.

Mucor cf. fragilis CBMAI 2080 showed the best results regarding the short-chain fluorescent probe activity (table 4), highlighting this strain as an important esterase producer for further studies, and contradicting Singh⁵⁸ who reports that Mucorales as an order of limited enzymatic activities. Fonzi and Sypherd⁸² ascribed *Mucor* sp. as resistance to Trichodermin (antifungal) thanks to its effective production of esterases. Our strain showed positive results in plate assays and the potential for conversion of 8-carbon probe, there is available information on esterases capable of converting long-chain substrates with low water-solubility^{83,84}. Papers on representatives Mucorales report their enzymes produced as esterase⁷⁷ and, sometimes as lipases⁸⁵. Indeed, there are few studies using this group of fungi, which we assumed good candidates for biotechnological applications, needing further studies.

A search in an American Culture Collection recovered no *Mucor* strain with evidenced esterase activity. This is a novel information, from the present research.

Trichoderma cf. longibrachiatum CBMAI 2082 was found as a promising extracellular lipase producer (table 5) with the long-chain esters probe assay. Other species, such as *T. viride*^{25,86} and *T. reesei*⁸⁷ are widely recognized by its lipase production. A strain of *T. longibrachiatum* with lipase activity was isolated from oil contaminated soil³⁷. While CBMAI 2082 showed 89,97% of conversion of the lipophilic probes after 24 h of analysis (table 5), Lima *et al.*⁸⁸ obtained conversion percentages of 0.4 and 4.3% in isolates of Hyphomycetes and Dematiaceous, respectively, working with fluorogenic probes to assess lipases activity at the same time of experiment. This demonstrate how promising our strain can be considered.

Fungal activity on nanoparticles and commercial bottle fragments

Two types of PET bottles were investigated: 1. from "Plantbottle" technology that uses 20% less PET and 30% PET made from sugarcane, namely PET 1⁸⁹, and another made by conventional method (PET 2). The aim was to test the performance of our strains to degrade both materials.

In general, PET biodegradation studies firstly evaluate lipase, esterase and cutinase activities of microbes considered potential degraders^{10,90,91}. So, the initial selection performed in this work highlighted the activity of nine strains, which belong to Mucorales and Hyphomycetes. The latter are widely recognized as efficient enzyme producers, but the former were considered of limited activity by Singh⁵⁸. This investigation showed strains of *Mucor* spp. of expressive potential for enzymatic screening.

M. cf. arundinis CBMAI 2109 also presented an excellent result on PET, despite its median enzymatic activity. It showed a relative action in long-chain ester probe (43.3 ± 2.7), even though Reddy and Reddy⁹² reported expressive lipase production for other strains belonging to the same fungal group. Yoshida *et al.*⁹³ evaluated the enzymatic activity of PETase (hydrolase with recognized catalytic action to PET) over different substrates, such as pNP-acetate (C2), pNP-caproate (C6), pNP-butyrate (C4), pNP-caprylate (C8) and observed that this ester hydrolase showed optimal activity in PET and the lowest catalytic activity in pre-related substrates when compared to other types of enzymes. Future studies will be carried out with this strain in an attempt to improve cultivation conditions and obtain greater enzymatic efficiency.

To establish the extent of microbial degradation, the monitoring of seven characteristics are usually recommended: surface functional group, hydrophobicity/hydrophilicity, crystallinity, surface topography, mechanical properties, molecular weight distribution ¹¹. The degree of *M. cf. arundinis* action on PET bottle fragments was evaluated by surface topography, weight loss, biodeterioration and biofragmentation.

Figures 4a and 5a evidence the SEM micrography of a PET 1 and 2 fragments after cleaning (abiotic control), subjected to the established fermentation conditions and no fungal inoculum. Homogenous and unspotted surface can be noted, demonstrating that no alterations occurred. On the other hand, stains and small spots similar to micropittings and pores can be observed in Figures 4 b, c, d, and e. Comparable images were reported by Nowak *et al.*⁹⁴ and Watanabe *et al.*⁹⁵ in their studies with low density polyethylene (LDPE). In Figures 4 b and e and, figure 5 d and e the penetration of hyphae structures into the PET was verified even after the cleaning procedure. Similar result was also found by Volke-Seplveda⁹⁶ in LPDE and by Sharon and Sharon¹⁰ and Yoshida *et al.*⁹³ in PET investigations.

The consumption of a substrate by microorganisms shows its assimilation and, which is a slow process. Previous studies employed gravimetric analyses, such as weight loss, to evaluate polymer consumption^{93,94}. *M. cf. arundinis* CBMAI 2109 reduced PET mass by 0.5% and CBMAI 2110, 0.16%, after 14 days (Fig 6). Nowak *et al.*⁹⁴ observed weight loss percentage of 0.08% in PET using *Penicillium funiculosum*, after 84 days, grown in minimal mineral medium (sucrose-free). This study, the medium employed PDB where a greater amount of carbon source is present, compared to other medium used for PET degradation studies, what might have favored the mycelial growth of the fungus and the consequent release of hydrolytic enzymes (Fig. 7). In experiments with dye discoloration employing *Phanerochaete chrysosporium*, Sem, Pakshirajan and Santra⁹⁷ reported that the maximum fungal growth increased with the raising of the initial glucose concentration as well as the lignin peroxidase activity.

Figure 7 also contains information about monomer (terephthalic acid) and smaller oligomers (BHET and MHET) comprising the potential of the produced enzymes by strains CBMAI 2109 and CBMAI 2110 to promote depolymerization. These results were confirmed when FTIR analysis was performed in PET 1 and 2, demonstrating modifications in important points of the spectra when biotic samples were compared to abiotic control. FTIR PET spectra obtained by Umamaheswari *et al.*⁹⁸ in soil experiment, presented the following: appearance of new absorption peaks at 2930 cm⁻¹ and 2869 cm⁻¹ reveals C-H bond stretching (CH₂), 2725

cm^{-1} and 2520 cm^{-1} has been assigned to C=O bond stretching (carbonyl group) and 2118 cm^{-1} and 877 cm^{-1} to C=C bond stretching (Benzene ring).

In our FTIR spectra it can be observed in PET 1, for both treatment, the disappearance of the peak at 2353 cm^{-1} and reduction in intensity of the peaks 1635 cm^{-1} and 877 cm^{-1} , related to H-bond of hydroxyl groups and aromatic CH out-of-plane bend, respectively⁹⁹. For PET 2 CBMAI 2109 treatment promoted the appearance of new absorption peaks in 2956 cm^{-1} and 1186 cm^{-1} , attributed to asymmetry stretching aliphatic vibration of C–H of the methylene (–CH₂– in ethylene glycol segment) and aromatic C-H in-plane bend^{99,100}. While, both strains led to disappearance of peak at 2330 cm^{-1} (characteristic of methyl C-H asymmetric) and; reduction in peak intensity at 1060 and 862 cm^{-1} (that to indicate 1,4-disubstitution in aromatic ring). The peak intensities were increased in 1480 cm^{-1} (Methylene C-H bend); 984 cm^{-1} and 964 cm^{-1} (trans unsaturation CH=CH) and 837 cm^{-1} (C-H out-of-plane bending of aromatic ring para-substituted). The Figures S3 A (1-4) and B (1-4), in the supplementary material, containing rescaled images of FTIR spectra of figures 8 A and B, respectively, that highlighting the modifications related above.

For Ioakeimidis *et al.*¹⁰¹ the creation of new functional groups consisting only of carbon and hydrogen represents a totally new surface, of unknown degradation. The above-mentioned data indicate that the biotreatments with the highlighted lineages for both types of PET were able to promote changes in the aromatic and aliphatic portions of the polymer.

A few studies report the use of whole-cell filamentous fungi (not only pure enzymes) for PET biodegradation. However, most papers evaluate the action of the isolated enzymes in the polymer. An enzyme S238F/W159H engineering developed by Austin *et al.*¹⁰² promoted the liberation of proximately 190 ppm and 175 ppm of TPA and MHET, respectively, the two strains assayed in this study mobilized PET to PTA in quantities of approximately 20 ppm.

Considering the initial proposal of this study, nine filamentous fungi with high hydrolytic activity were obtained. In addition to, another strain that did not fit the criteria, the isolate *M. cf. arundinis* CBMAI 2110 also showed good results in nanoparticles and commercial fragment of PET bottles such as, maintenance of lipase/esterase activities after fermentation process and demonstrating a good potential for PET depolymerization.

This is the first report of application of *M. arundinis* strains (CBMAI 2109 and CBMAI 2110) in studies of PET biodegradation/depolymerization from commercial bottles (real condition). Chaves *et al.*⁵⁴ obtained promising results with strains of these fungi on PET nanoparticles and reported the importance of subsequent studies with these strains. These

analyses showed that the isolates can be considered sources of enzymes with potential application in PET degradation.

Kumari, Tiwari and Yadav¹⁰³ emphasized the importance of a microbial consortium to improve biodegradation process of LDPE; thus, the employment of both strains in further assays may be a relevant suggestion aiming at more promising results for PET depolymerization. These data reinforce that sites associated with hydrocarbons may be an important source of microorganisms with great potential for biodegradation and should be studied.

Conclusions

Nine isolates with high conversions for long and short chain fluorogenic probes esters and positive results in plate assays were obtained from water samples and another environments associated with hydrocarbons, suggesting that this is, indeed, a promising and still few-prospected source for the search of strains with recognized biotechnological potential. Since that, Brazil presents a great biodiversity and must be exploited for the production of different enzymes for application in several industrial areas.

Mucor spp strains presenting a considered enzymatic activity, unlike what is found in scientific data indicating that representatives of the order of Mucorales have limited enzymatic activities. This demonstrates that studies of this type are still important to prove or to supplement pre-existing information.

Two important strains of *M. cf. arundinis* CBMAI 2109 and CBMAI 2110 with potential to promote the depolymerization of PET, a recalcitrant and ubiquitous polymer. The conversion of the fluorogenic ester probe with two carbons and the low conversion of the probe with eight carbons suggest there is need to carry out a deeper approach to qualify what type of enzyme (lipase, esterases or cutinases) is produced by such strains. It is assumed that a research focused in the attempt to use a consortium of the selected strains can promote more effective PET depolymerization.

Acknowledgements

The authors thank PETROBRAS for its financial support (2012/00327-7) and authorization to publish this study, and to MSc. Tulio de Lucca Capelini for technical support. We thank the Center for Environmental Studies (CEA) for providing site and infrastructure to carry out part of this work. One of the authors (L.M.P.) received a support grant from the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES).

Conflicts of interest

The authors declare that they had no conflicts of interest.

References

1. United States Environmental Protection Agency (USEPA). The facts on recycling plastics. 1990 (February) .
2. Ellen MacArthur Foundation. The New Plastics Economy: Rethinking the future of plastics. *Ellen MacArthur Found.* 2016;(January):120.doi:10.1103/Physrevb.74.035409
3. Associação Brasileira da Indústria do PET (ABIPET). 10º Censo da reciclagem do PET no Brasil. 2016 (November). <http://www.abipet.org.br/index.html?method=mostrarDownloads&categoria.id=3>. Accessed 10 January 2018.
4. National Association for PET Container Resources (NAPCOR). Report on Postconsumer PET Container Recycling Activity in 2012. 2013:13. http://www.napcor.com/pdf/NAPCOR_2012RateReport.pdf. Accessed 10 January 2018.
5. Di Souza L, Torres MCM, Ruvolo Filho AC. Despolimerização do poli (tereftalato de etileno) - PET: efeitos de tensoativos e excesso de solução alcalina. *Polímeros*. 2008;18(4):334-341. doi:10.1590/S0104-14282008000400013
6. Pellis A, Gamerith C, Ghazaryan G, Ortner A, Herrero E, Guebitz GM. Bioresource Technology Ultrasound-enhanced enzymatic hydrolysis of Poly(ethylene terephthalate). *Bioresour Technol.* 2016;1-5. doi:10.1016/j.biortech.2016.07.106
7. de Castro AM, Carniel A, Nicomedes Junior J, da Conceição Gomes A, Valoni É. Screening of commercial enzymes for poly (ethylene terephthalate) (PET) hydrolysis and synergy studies on different substrate sources. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2017;44(6):835-844. doi:10.1007/s10295-017-1942-z
8. Ronkvist ÅM, Xie W, Lu W, Gross RA. *Cutinase-Catalyzed Hydrolysis of Poly(Ethylene Terephthalate)*. Vol 42.; 2009:5128-5138. doi:10.1021/ma9005318
9. Tokiwa Y, Calabia BP, Ugwu CU, Aiba S. Biodegradability of plastics. *Int J Mol Sci.* 2009;10(9):3722-3742. doi:10.3390/ijms10093722
10. Sharon C, Sharon M. Studies on Biodegradation of Polyethylene terephthalate: A synthetic polymer. *J Microbiol Biotechnol Res Sch Res Libr J Microbiol Biotech Res.* 2012;2(2):248-257. <http://scholarsresearchlibrary.com/archive.html>.

11. Restrepo-Flórez JM, Bassi A, Thompson MR. Microbial degradation and deterioration of polyethylene - A review. *Int Biodeterior Biodegrad.* 2014;88:83-90. doi:10.1016/j.ibiod.2013.12.014
12. Wei R, Zimmermann W. Microbial enzymes for the recycling of recalcitrant petroleum-based plastics: how far are we? *Microb Biotechnol.* 2017;10(6):1308-1322. doi:10.1111/1751-7915.12710
13. Sharma R, Chisti Y, Chand U, Banerjee UC. Production, Purification, Characterization, and Applications of Lipases. *Biotechnol Adv.* 2001;19(8):627-662. doi:10.1016/S0734-9750(01)00086-6
14. Hasan F, Shah AA, Hameed A. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme Microb Technol.* 2006;39(2):235-251. doi:10.1016/j.enzmictec.2005.10.016
15. Trincone A. Marine biocatalysts: Enzymatic features and applications. *Mar Drugs.* 2011;9(4):478-499. doi:10.3390/md9040478
16. Zafar U, Houlden A, Robson GD. Fungal communities associated with the biodegradation of polyester polyurethane buried under compost at different temperatures. *Appl Environ Microbiol.* 2013;79(23):7313-7324. doi:10.1128/AEM.02536-13
17. Adrio JL, Demain AL. Microbial enzymes: tools for biotechnological processes. *Biomolecules.* 2014;4(1):117-139. doi:10.3390/biom4010117
18. Sayali K, Sadichha P, Surekha S. Microbial Esterases : An overview. *Int J Curr Microbiol Appl Sci.* 2013;2(7):135-146.
19. Mazzucotelli CA, Ponce AG, Kotlar CE, Moreira M del R. Isolation and characterization of bacterial strains with a hydrolytic profile with potential use in bioconversion of agroindustrial by-products and waste. *Food Sci Technol.* 2013;33(2):295-303. doi:10.1590/S0101-20612013005000038
20. Lee LP, Karbul HM, Citartan M, Gopinath SCB, Lakshmipriya T, Tang TH. Lipase-secreting *Bacillus* species in an oil-contaminated habitat: Promising strains to alleviate oil pollution. *Biomed Res Int.* 2015;2015. doi:10.1155/2015/820575
21. Khannous L, Jrad M, Dammak M, et al. Isolation of a novel amylase and lipase-producing *Pseudomonas luteola* strain: study of amylase production conditions. *Lipids Health Dis.* 2014;13(1):9. doi:10.1186/1476-511X-13-9
22. Boekema BKHL, Beselin A, Breuer M, et al. Hexadecane and Tween 80 stimulate lipase production in *Burkholderia glumae* by different mechanisms. *Appl Environ Microbiol.* 2007;73(12):3838-3844. doi:10.1128/AEM.00097-07

23. Vakhlu J, Kour A. Yeast lipases: Enzyme purification, biochemical properties and gene cloning. *Electron J Biotechnol.* 2006;9(1):69-85. doi:10.2225/vol9-issue1-fulltext-9
24. Wiseman, A. Introduction to principles. In: Wiseman, A (ed.,) Handbook of enzyme biotechnology 3rd edition. Padstow, Cornwall, U.K: Ellis Horwood Ltd., T.J Press; 1995: 3 -8.
25. Kashmiri MA, Adnan A, Butt BW. Production, Purification and Partial Characterization of Lipase from *Trichoderma Viride*. *Biotechnology.* 2006;5(10):878-882. doi:10.1016/j.procbio.2005.10.017
26. Contesini FJ, Calzado F, Valdo J, et al. Fungal Metabolites. 2017:1-28. doi:10.1007/978-3-319-25001-4
27. Schneider WDH, Gonçalves TA, Uchima CA, et al. *Penicillium echinulatum* secretome analysis reveals the fungi potential for degradation of lignocellulosic biomass. *Biotechnol Biofuels.* 2016;9(1):66. doi:10.1186/s13068-016-0476-3
28. Iftikhar T, Abdullah R, Iqtedar M, Kaleem A, et al. Production of lipases by *Alternaria* sp .(MBL 2810) through optimization of environmental conditions using submerged fermentation technique. *Int. J. Biosci.* 2015;6655:178-186.
29. Rodrigues C, Cassini STA, Antunes PWP, Pinotti LM, Keller RP, Gonçalves RF. Lipase-producing fungi for potential wastewater treatment and bioenergy production. *African J Biotechnol.* 2016;15(18):759-767. doi:10.5897/AJB2015.14666
30. Nwuche CO, Ogbonna JC. Isolation of lipase producing fungi from palm oil mill effluent (POME) dump sites at Nsukka. *Brazilian Arch Biol Technol.* 2011;54(1):113-116. doi:10.1590/S1516-89132011000100015
31. Cihangir N, Sarikaya E. Investigation of lipase production by a new isolate of *Aspergillus* sp. *World J Microbiol Biotechnol.* 2004;20(2):193-197. doi:10.1023/B:WIBI.00000021781.61031.3a
32. Lisboa HCF, Biasetto CR, de Medeiros JB, et al. Endophytic fungi producing of esterases: Evaluation in vitro of the enzymatic activity using pH indicator. *Brazilian J Microbiol.* 2013;44(3):923-926. doi:10.1590/S1517-83822013005000067
33. Pereira MG, Vici AC, Facchini FDA, et al. Screening of filamentous fungi for lipase production: *Hypocrea pseudokoningii* a new producer with a high biotechnological potential. *Biocatal Biotransformation.* 2014;32(1):74-83. doi:10.3109/10242422.2013.873417
34. Moro S, Pacheco V, Júnior AC, Morgado AF. Isolation and Screening of Filamentous Fungi Producing Extracellular Lipase with Potential in Biodiesel Production. *Adv*

- Enzym Res.* 2015;(December):101-114.
35. Hombalimath VS, Udupudi BB, Patil LR, Shet AN, Yaraguppi DA, Tennalli G. Isolation and characterization of lipolytic microorganisms from oil contaminated soil. *Int J Adv Sci Eng Technol.* 2012; 2(3): 293-297.
 36. Colla LM, Ficanha AMM, Rizzardi J, Bertolin TE, Reinehr CO, Costa JAV. Production and characterization of lipases by two new isolates of *Aspergillus* through solid-state and submerged fermentation. *Biomed Res Int.* 2015;2015. doi:10.1155/2015/725959
 37. Kiama C. Isolation and Characterization of Hydrocarbon Biodegrading Fungi from oil contaminated soils in Thika, Kenya. 2015. <http://ir.jkuat.ac.ke:8080/handle/123456789/1830>.
 38. Yu D, Margesin R. Partial characterization of a crude cold-active lipase from *Rhodococcus cercidiphylli* BZ22. *Folia Microbiol (Praha).* 2014;59(5):439-445. doi:10.1007/s12223-014-0318-2
 39. Iqbal SA, Rehman A. Characterization of lipase from *Bacillus subtilis* I-4 and its potential use in oil contaminated wastewater. *Brazilian Arch Biol Technol.* 2015;58(5):789-797. doi:10.1590/S1516-89132015050318
 40. Mobarak-Qamsari E, Kasra-Kermanshahi R, Moosavi-Nejad Z. Isolation and identification of a novel, lipase-producing bacterium, *Pseudomonas aeruginosa* KM110. *Iran J Microbiol.* 2011;3(2):92-98.
 41. Veerapagu M, Sankara Narayanan A, Ponmurugan K, Jeya KR. Screening selection identification production and optimization of Bacterial Lipase from oil spilled soil. *Asian J Pharm Clin Res.* 2013;6(SUPPL.3):62-67. doi:10.20546/ijcmas.2016.503.087
 42. Reyes-duarte D, Ferrer M, García-arellano H. Lipases and Phospholipases. 2012;861:101-113. doi:10.1007/978-1-61779-600-5
 43. Sánchez-Carbente M del R, Batista-García RA, Sánchez-Reyes A, et al. The first description of a hormone-sensitive lipase from a basidiomycete: Structural insights and biochemical characterization revealed *Bjerkandera adusta* BaEstB as a novel esterase. *Microbiologyopen.* 2017;6(4):1-15. doi:10.1002/mbo3.463
 44. Ramírez L, Arrizon J, Sandoval G, et al. A new microplate screening method for the simultaneous activity quantification of feruloyl esterases, tannases, and chlorogenate esterases. *Appl Biochem Biotechnol.* 2008;151(2-3):711-723. doi:10.1007/s12010-008-8319-8
 45. Aamir S. A rapid and efficient method of fungal genomic DNA extraction, suitable for

- PCR based molecular methods. *Plant Pathol Quar.* 2015;5(2):74-81. doi:10.5943/ppq/5/2/6
46. White T J, Bruns TD, Lee SB, Taylor JW. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA Genes for phylogenetics. In: PCR Protocols. Cambridge: Massachusetts :Academic Press, Inc; 1990: 315-322
 47. Carbone I, Kohn LM. A Method for Designing Primer Sets for Speciation Studies in Filamentous Ascomycetes. *Mycologia*, 1999; 91(3): 553-556
 48. Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser.* 1999;41:95-98. doi:citeulike-article-id:691774
 49. Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, et al. Clustal W and Clustal X version 2 . 0. 2018;23(21):2947-2948. doi:10.1093/bioinformatics/btm404
 50. Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol.* 2007;24(8):1596-1599. doi:10.1093/molbev/msm092
 51. Saitou N, Nei M, Saitou N NM. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol.* 1987;4(4):406-425. doi:citeulike-article-id:93683
 52. Singh R, Gupta N, Goswami VK, Gupta R. A simple activity staining protocol for lipases and esterases. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2006;70(6):679-682. doi:10.1007/s00253-005-0138-z
 53. Mantovani SM, De Oliveira LG, Marsaioli AJ. Esterase screening using whole cells of Brazilian soil microorganisms. *J Braz Chem Soc.* 2010;21(8):1484-1489. doi:10.1590/S0103-50532010000800011
 54. Chaves MRB, Lima ML SO, Malafatti-Picca L, et al. A practical fluorescence-based screening protocol for polyethylene terephthalate degrading microorganisms. *J Braz Chem Soc.* 2018;29(6):1278-1285. doi:10.21577/0103-5053.20170224
 55. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72(1-2):248-254. doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3
 56. El-shafei HA, El-nasser NHA, Kansoh AL, Ali AM. Biodegradation of disposable polyethylene by fungi and Streptomyces species. 1998;3910(98):361-365.
 57. He X. A continuous spectrophotometric assay for the determination of diamondback moth esterase activity. *Arch Insect Biochem Physiol.* 2003;54(2):68-76.

doi:10.1002/arch.10103

58. Singh H. Mycoremediation :Fungal Bioremediation. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.;2006.
59. Mehta A, Bodh U, Gupta R. Fungal lipases: A review. *J Biotech Res.* 2017;8(1):58-77.
60. Uchiyama T, Abe T, Ikemura T, Watanabe K. Substrate-induced gene-expression screening of environmental metagenome libraries for isolation of catabolic genes. *Nat Biotechnol.* 2005;23(1):88-93. doi:10.1038/nbt1048
61. Meier MJ, Paterson ES, Lambert IB. Use of substrate-induced gene expression in metagenomic analysis of an aromatic hydrocarbon-contaminated soil. *Appl Environ Microbiol.* 2015;82(3):897-909. doi:10.1128/AEM.03306-15
62. Gargouri B, Mhiri N, Karray F, Aloui F, Sayadi S. Isolation and Characterization of Hydrocarbon-Degrading Yeast Strains from Petroleum Contaminated Industrial Wastewater. *Biomed Res Int.* 2015;2015. doi:10.1155/2015/929424
63. Ugochukwu KC, Agha NC, Ogbulie JN. Lipase activities of microbial isolates from soil contaminated with crude oil after bioremediation. *African J Biotechnol.* 2008;7(16):2881-2884. doi:10.5897/AJB08.093
64. Hibbert EG, Dalby PA. Directed evolution strategies for improved enzymatic performance. *Microb Cell Fact.* 2005;4:1-6. doi:10.1186/1475-2859-4-29
65. Nannemann DP, Birmingham WR, Scism RA, Bachmann BO. Assessing directed evolution methods for the generation of biosynthetic enzymes with potential in drug biosynthesis. *Future Med Chem.* 2011; 3(7): 809–819. doi:10.4155/fmc.11.48.
66. de Crecy E, Jaronski S, Lyons B, Lyons T, Keyhani N. Directed evolution of a filamentous fungus for thermotolerance. *BMC Biotechnol.* 2009;9:74. doi:10.1186/1472-6750-9-74
67. Vander Meer RK, Morel L. Nestmate recognition in ants. In: Vander Meer RK, Breed M, Winston M, Espelie L. Pheromone communication in social insects. Westview Press: Boulder: Colo; 1998: 70-103.
68. Chomicki G, Renner SS. The interactions of ants with their biotic environment. *Proc R Soc B Biol Sci.* 2017;284(1850):20170013. doi:10.1098/rspb.2017.0013
69. Gibbs AG. Water-Proofing Properties of Cuticular Lipids Author (s): Allen G . Gibbs Published by : Oxford University Press Stable URL : <http://www.jstor.org/stable/4620168> REFERENCES Linked references are available on JSTOR for this article : You may need to log . 2016;38(3):471-482.
70. Menzel F, Blaimer BB, Schmitt T. How do cuticular hydrocarbons evolve?

- Physiological constraints and climatic and biotic selection pressures act on a complex functional trait. *Proc R Soc B Biol Sci.* 2017;284(1850):20161727. doi:10.1098/rspb.2016.1727
71. Cervantes-gonzález E, Zambrano-monroy B, Ovando-medina VM, Briones-gallardo R, Ventura-suarez A. Influence of Aromatic, Heteroaromatic, and Alkane Hydrocarbons on the Lipase Activity of *Pseudomonas* sp. in Batch Culture. 2014;23(5):1507-1513.
 72. Kanwar L, Goswami P. Isolation of a *Pseudomonas* lipase produced in pure hydrocarbon substrate and its application in the synthesis of isoamyl acetate using membrane-immobilised lipase. *Enzyme Microb Technol.* 2002;31(6):727-735. doi:10.1016/S0141-0229(02)00191-6
 73. Rai B, Shrestha A, Sharma S, Joshi J. Screening, Optimization and Process Scale up for Pilot Scale Production of Lipase by *Aspergillus niger*. *Biomed Biotechnol.* 2014;2(3):54-59. doi:10.12691/bb-2-3-3
 74. Gupta P. Studies on lipase isolated from suitable microbial sources. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences.* 2016; 6(1): 1555-1566. DOI: 10.20959/wjpps20171-8450
 75. Kumar D, Kumar L, Nagar S, Raina C, Parshad R, Gupta VK. Screening, isolation and production of lipase/esterase producing *Bacillus* sp. strain DVL2 and its potential evaluation in esterification and resolution reactions. *Arch Appl Sci Res.* 2012;4(4):1763-1770.
 76. Ramnath L, Sithole B, Govinden R. Classification of Lipolytic Enzymes and their Biotechnological Applications in the Pulping Industry. *Can J Microbiol.* 2017;63(October 2016):1-14. doi:10.1139/cjm-2016-0447
 77. Chahinian H, Nini L, Boitard E, Dubès J-P, Comeau L-C, Sarda L. Distinction between esterases and lipases: a kinetic study with vinyl esters and TAG. *Lipids.* 2002;37(7):653-662. doi:10.1007/s11745-002-0946-7
 78. Gonçalves CDCS, Marsaioli AJ. Monitorando atividades enzimáticas com sondas fluorogênicas. *Quim Nova.* 2014;37(6):1028-1036. doi:10.5935/0100-4042.20140142
 79. Kulkarni N, Gadre R V. Production and properties of an alkaline, thermophilic lipase from *Pseudomonas fluorescens* NS2W. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2002;28(6):344-348. doi:10.1038/sj.jim.7000254
 80. Sicart R, Collin MP, Reymond JL. Fluorogenic substrates for lipases, esterases, and acylases using a TIM-mechanism for signal release. *Biotechnol J.* 2007;2(2):221-231. doi:10.1002/biot.200600181

81. Lopes DB, Fraga LP, Fleuri LF, Macedo GA. Lipase and esterase: to what extent can this classification be applied accurately? *Ciência e Tecnol Aliment*. 2011;31(3):603-613. doi:10.1590/S0101-20612011000300009
82. Fonzi WA, Sypherd PS. Trichodermin esterase activity and trichodermin resistance in *Mucor racemosus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1986;29(4):570-575. doi:10.1128/AAC.29.4.570
83. Moskowitz GJ, Shen T, West IR, Cassaigne R, Feldman LI. Properties of the Esterase Produced by *Mucor miehei* to Develop Flavor in Dairy Products. *J Dairy Sci*. 1977;60(8):1260-1265. doi:10.3168/jds.S0022-0302(77)84020-4
84. Lopez-Lopez O, Cerdan M, Siso M. New Extremophilic Lipases and Esterases from Metagenomics. *Curr Protein Pept Sci*. 2014;15(5):445-455. doi:10.2174/1389203715666140228153801
85. Alves MH, Campos-Takaki GM, Figueiredo Porto AL, Milanez AI. Screening of *Mucor* spp. for the production of amylase, lipase, polygalacturonase and protease. *Brazilian J Microbiol*. 2002;33(4):325-330. doi:10.1590/S1517-83822002000400009
86. Rajendiran R, Gayathri S, Sureshkumar BT, Priya VA. Screening of Process Variables for the Production of Extracellular Lipase from Palm Oil by *Trichoderma Viride* using Plackett- Burman Design. *World Acad Sci Eng Technol*. 2011;75:743-746.
87. Rajesh EM, Arthe R, Rajendran R, Balakumar C, Pradeepa N, Anitha S. Investigation of lipase production by *Trichoderma Reesei* and optimization of production parameters. 2010;9(7):1177-1189.
88. Lima MLSO, Chaves MRB, do Nascimento RMC, Gonçalves CCS, Marsaioli AJ. Simultaneous multienzymatic screening with fluorogenic probes. *J. Braz. Chem. Soc*. 2018; 29(5), 1149-1156. DOI: <http://dx.doi.org/10.21577/0103-5053.20170188>
89. Plant Bottle : uma PET mais verde. 2017:1-5.
90. Mueller RJ. Biological degradation of synthetic polyesters-Enzymes as potential catalysts for polyester recycling. *Process Biochem*. 2006;41(10):2124-2128. doi:10.1016/j.procbio.2006.05.018
91. Wei R, Zimmermann W. Biocatalysis as a green route for recycling the recalcitrant plastic polyethylene terephthalate. *Microb Biotechnol*. 2017;10(6):1302-1307. doi:10.1111/1751-7915.12714
92. Reddy AS, Reddy SM. Lipase activity of two seed-borne fungi of sesamum (*Sesamum indicum* Linn.). *Folia Microbiol (Praha)*. 1983;28(6):463-466. doi:10.1007/BF02879683

93. Yoshida S, Hiraga K, Takehana T, et al. Response to Comment on “A bacterium that degrades and assimilates poly(ethylene terephthalate).” *Science* (80-). 2016;353(6301):759-759. doi:10.1126/science.aaf8625
94. Nowak B, Pajak J, Drozd-Bratkowicz M, Rymarz G. Microorganisms participating in the biodegradation of modified polyethylene films in different soils under laboratory conditions. *Int Biodeterior Biodegrad.* 2011;65(6):757-767. doi:10.1016/j.ibiod.2011.04.007
95. Watanabe T, Ohtake Y, Asabe H, Murakami N, Furukawa M. Biodegradability and Degrading Microbes of Low-Density Polyethylene. *Journal of Applied Polymer Science*. 2009; 111:551–559. doi: 10.1002/app.29102
96. Volke-Sepúlveda T, Saucedo-Castaeda G, Gutierrez-Rojas M, Manzur A, Favela-Torres E. Thermally treated low density polyethylene biodegradation by *Penicillium pinophilum* and *Aspergillus niger*. *J Appl Polym Sci*. 2002;83(2):305-314. doi:10.1002/app.2245
97. Sen K, Pakshirajan K, Santra SB. Modelling the Biomass Growth and Enzyme Secretion by the White Rot Fungus *Phanerochaete chrysosporium* in Presence of a Toxic Pollutant. *J Environ Prot (Irvine, Calif)*. 2012;3(January):114-119. doi:10.4236/jep.2012.31014
98. Sepperumal U, Markandan M, Palraja I. Micromorphological and chemical changes during biodegradation of Polyethylene terephthalate (PET) by *Penicillium* sp . *J Microbiol Biotechnol Res*. 2013;3(4):47-53.
99. Coates J. Interpretation of Infrared Spectra, A Practical Approach. *Encycl Anal Chem*. 2006:1-23. doi:10.1002/9780470027318.a5606
100. Al-Azzawi F. Degradation studies on recycled Polyethylene terephthalate 2015. London Metropolitan University.
<http://ethos.bl.uk/OrderDetails.do?uin=uk.bl.ethos.681923>. Accessed 15 may 2018.
101. Ioakeimidis C, Fotopoulou KN, Karapanagioti HK, et al. The degradation potential of PET bottles in the marine environment: An ATR-FTIR based approach. *Sci Rep*. 2016;6(October 2015):1-8. doi:10.1038/srep23501
102. Austin HP, Allen MD, Donohoe BS, et al. Characterization and engineering of a plastic-degrading aromatic polyestherase. *Proc Natl Acad Sci*. 2018:201718804. doi:10.1073/pnas.1718804115
103. Kumari G, Tiwari A, Yadav M. " LDPE-biodegradation using microbial consortium by the incorporation of Cobalt Ferrite Nanoparticle as the enhancer for biodegradation ".

Supplementary material

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

Code	Identification	Plate assay *	Conversion of probe 1 (n=4, % media±SD)			
			0 h	24 h	48 h	96 h
LMA 96	<i>Pycnidiophora dispersa</i>	+	60.91±1.07	84.54±1.36	86.61±0.88	90.35±1.02
LMA 49	<i>Pycnidiophora dispersa</i>	+	62.65±6.92	83.78±2.43	80.93±1.32	87.97±1.67
CBMAI 2110	<i>M. arundinis</i>	+	67.51±2.73	80.14±2.93	84.01±0.88	87.48±2.14
LMA 79	<i>M. arundinis</i>	+	91.25±3.54	88.75±3.39	78.71±4.66	87.19±7.04
LMA 885	<i>Trichoderma</i> sp.	+	0.12±0.025	69.19±3.37	82.47±1.84	87.01±0.79
LMA 8	<i>Cladosporium</i> sp.	+	0.07±0.03	69.65±9.47	85.91±6.64	85.03±2.57
LMA 90	<i>Coletotrichum</i> sp.	+	60.91±1.07	83.22±6.75	81.57±6.65	81.96±1.06
LMA 30	<i>Pycnidiophora dispersa</i>	+	47.66±3.42	73.19±7.11	80.41±5.26	82.11±2.04
CBMAI 2079	<i>Mucor</i> sp.	+	0.08±0.02	25.77±0.91	48.49±2.02	76.72±2.33
LMA 69	Pleosporales	+	49.75±2.32	65.34±6.73	72.85±6.26	74.22±5.98
LMA 239	<i>Penicillium</i> sp.	+	0.07±0.21	21.12±0.76	39.34±0.68	66.28±0.99
LMA 50	<i>M. arundinis</i>	+	53.21±1.80	59.05±2.24	55.38±2.39	61.95±2.16
LMA 122	<i>Pycnidiophora dispersa</i>	+	26.20±1.52	48.66±2.47	61.38±1.72	61.79±2.07
LMA 416	<i>Mucor</i> sp.	+	0.11±0.10	26.59±1.80	47.42±2.06	59.78±1.07
LMA 146	Pleosporales	+	0.15±0.25	71.59±5.23	71.56±4.74	60.89±3.69
LMA 10	<i>Penicillium</i> sp.	+	0.07±0.04	23.43±1.35	40.52±1.99	58.23±1.19

*Esterase activity revealed using alpha naphthyl acetate (20 mg.mL⁻¹ in acetone) and fast blue RR (80 mg.mL⁻¹ in dimethylsulfoxide).

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

Code	Identification	Plate assay (Tributiryn)*	Conversion of probe 2 (n= 4, %media± Standard Deviation-SD)			
			0 h	24 h	48 h	96 h
LMA 118	<i>Trichoderma</i> sp.	+++	12.91± 9.05	84.13 ± 1.39	85.32 ± 1.47	84.57 ± 1.59
LMA 23	<i>T. longibrachiatum</i>	++	74.66 ± 1.11	77.24 ± 0.77	75.98 ± 1.41	76.80 ± 1.21
LMA 220	<i>Trichoderma</i>	++	0.42± 0.02	54.39 ± 7.32	75.85 ± 0.11	76.85 ± 0.12
LMA 903	<i>Fusarium oxysporum</i>	++	0.00 ± 0.00	54.38 ± 3.10	65.56 ± 2.79	72.06 ± 2.69
LMA 1206	<i>Curvularia</i> sp.	++	0.00 ± 0.00	34.63 ± 4.38	56.60 ± 7.88	71.74 ± 7.91
LMA 885	<i>Trichoderma</i>	+++	0.00 ± 0.00	33.50 ± 10.76	52.28 ± 11.89	67.41 ± 12.7
CBMAI 2080	<i>Mucor fragilis</i>	+++	0.00 ± 0.00	26.85 ± 5.17	43.07 ± 6.78	64.18 ± 7.31
LMA 1145	<i>Fusarium</i> sp.	++	0.00 ± 0.00	24.76 ± 1.33	43.23 ± 1.20	61.44 ± 1.32
LMA 1220	<i>Trichoderma</i> sp.	+++	0.00± 0.00	53.20 ± 1.94	61.00 ± 2.38	61.03 ± 6.01
LMA 178	<i>Paecilomyces</i> sp.	+++	0.58 ± 0.08	49.38 ± 7.21	55.42 ± 1.61	56.72 ± 1.51
LMA 10	<i>Penicillium</i> sp.	+++	0.00± 0.00	23.69 ± 1.00	37.99 ± 1.22	54.70 ± 1.79
LMA 49	<i>Pycnidophora dispersa</i>	++	35.43 ± 1.03	49.69 ± 2.38	52.87 ± 0.77	53.69 ± 1.03
LMA 167	<i>Penicillium</i> sp.	++	0.21± 0.02	47.70 ± 2.26	50.89± 1.86	51.37 ± 1.91

*(+++)
altered color, classified as intermediate producers. Tributyrin as sole source of carbon.

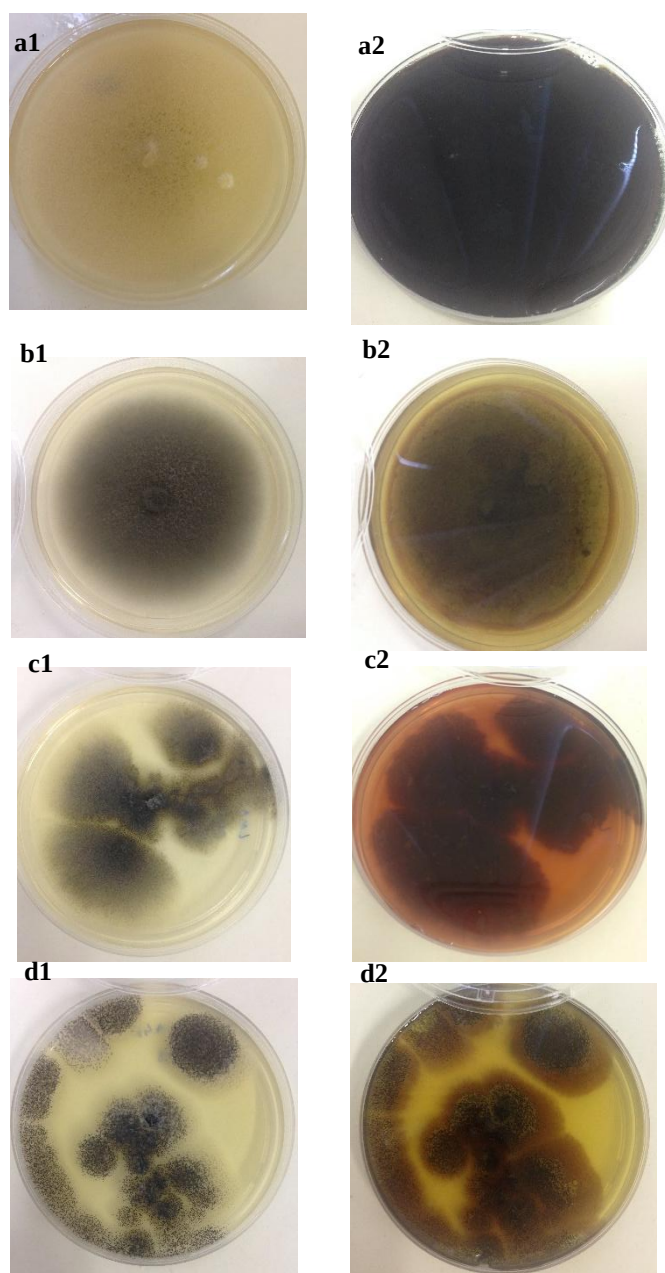


Figure S1 Plate assay for esterase activity. **a1.** seven-days-old *Mucor fragilis* CBMAI 2080 colonies, before revelation. **a2.** positive result for *Mucor fragilis* CBMAI 2080, after revelation. **b1.** seven-days-old *Microsphaeropsis arundinis* CBMAI 2109 colonies, before revelation. **b2.** *Microsphaeropsis arundinis* CBMAI 2109, after revelation. **c1.** seven-days-old *Westerdykella dispersa* CBMAI 2081 colonies, before revelation. **c2.** *Westerdykella dispersa* CBMAI 2081, after revelation. **d1.** seven-days-old *Westerdykella dispersa* CBMAI 2077 colonies, before revelation. **d2.** *Westerdykella dispersa* CBMAI 2077, after revelation. Esterase activity determined using alpha-naphthyl acetate (20 mg.mL^{-1} in acetone) and fast blue RR (80 mg.mL^{-1} in dimethylsulfoxide). All fungal colonies were cultured in potato dextrose agar (PDA, 20 mg.L^{-1}).

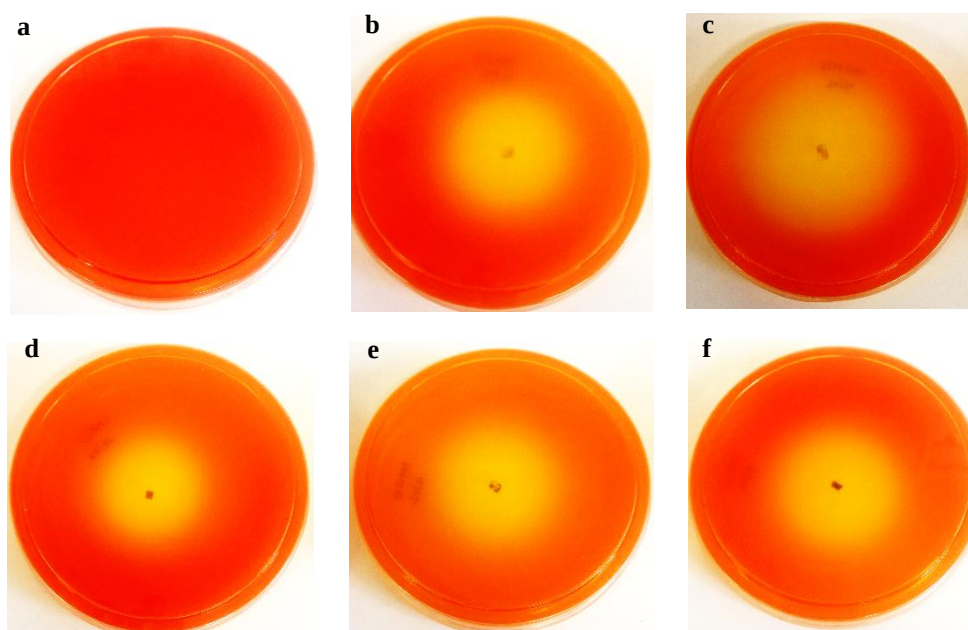


Figure S2 Plate assay for lipase activity. **a.**, **b.**, **c.**, **d.**, **e.** and **f.** are images of minimal medium without inoculum for *Trichoderma longibrachiatum* CBMAI 2082, *Mucor ramosissimus* CBMAI 2079, *Westerdykella dispersa* CBMAI 2077, *Trichoderma asperellum* CBMAI 2074 and *Pycnidiophora dispersa* LMA 30, respectively. Culture medium with tributiryn, as the only source of carbon, supplemented with phenol red.

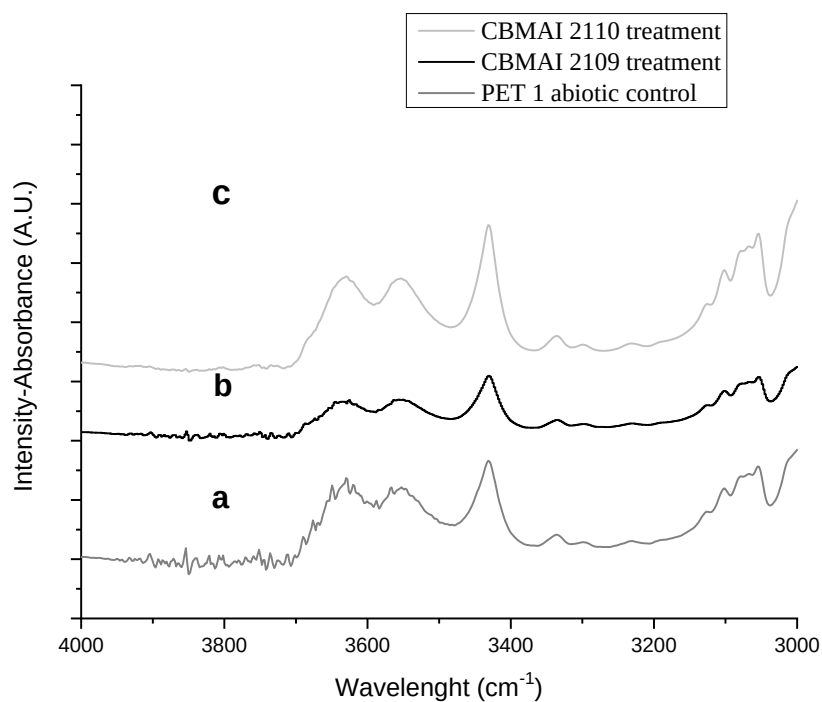


Figure S3 A 1. Figure 8 A rescaled region of 4000-3000 cm^{-1}

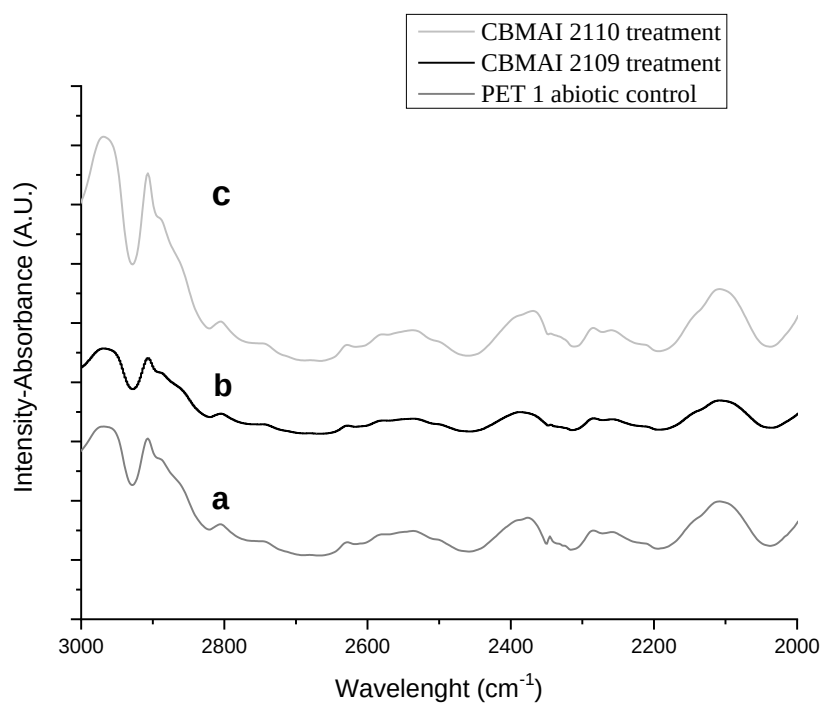


Figure S3 A 2. Figure 8 A rescaled region of 3000-2000 cm^{-1}

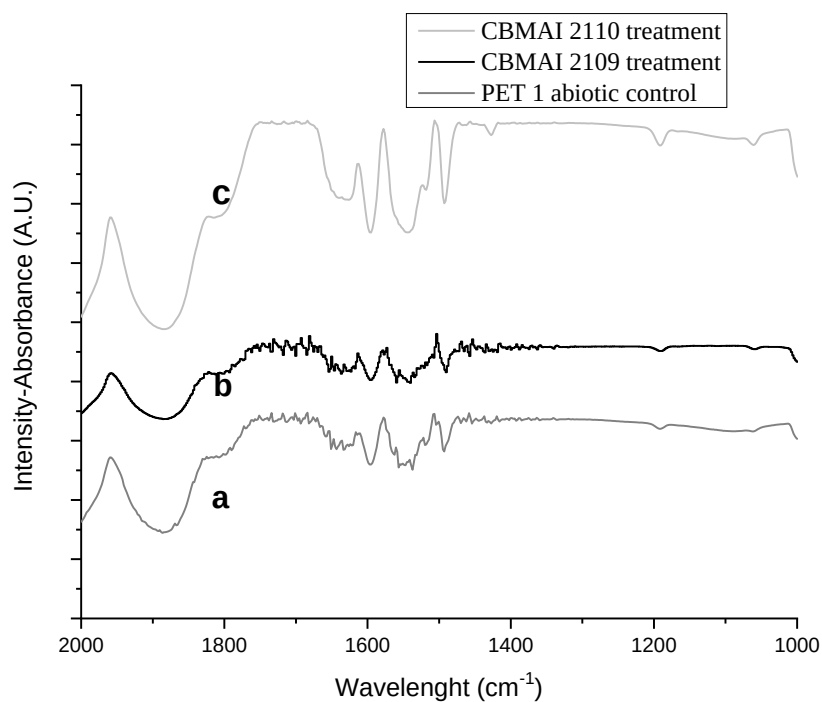


Figure S3 A 3. Figure 8 A rescaled region of 2000-1000 cm^{-1}

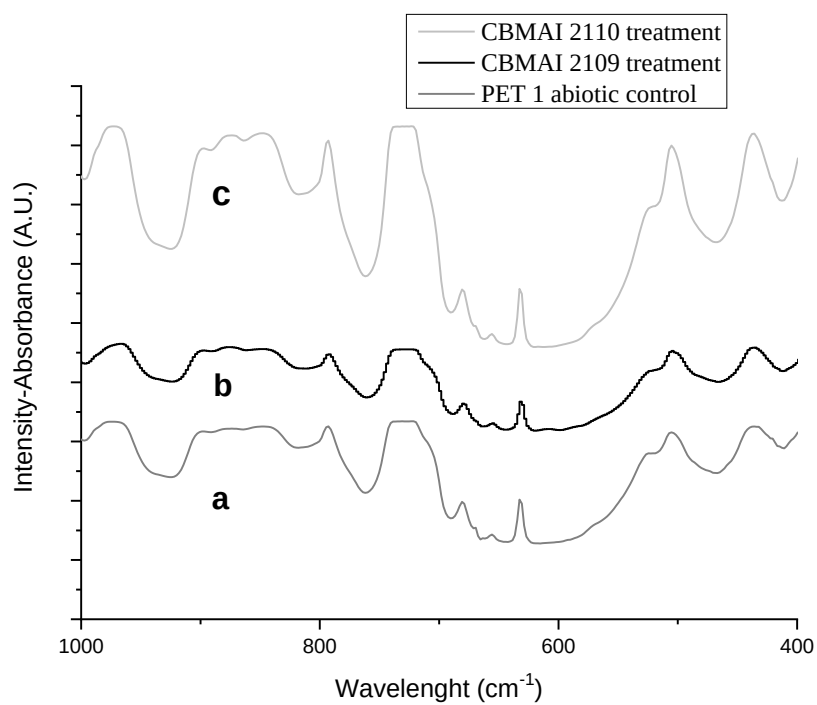


Figure S3 A 4. Figure 8 A rescaled region of 1000-400 cm^{-1}

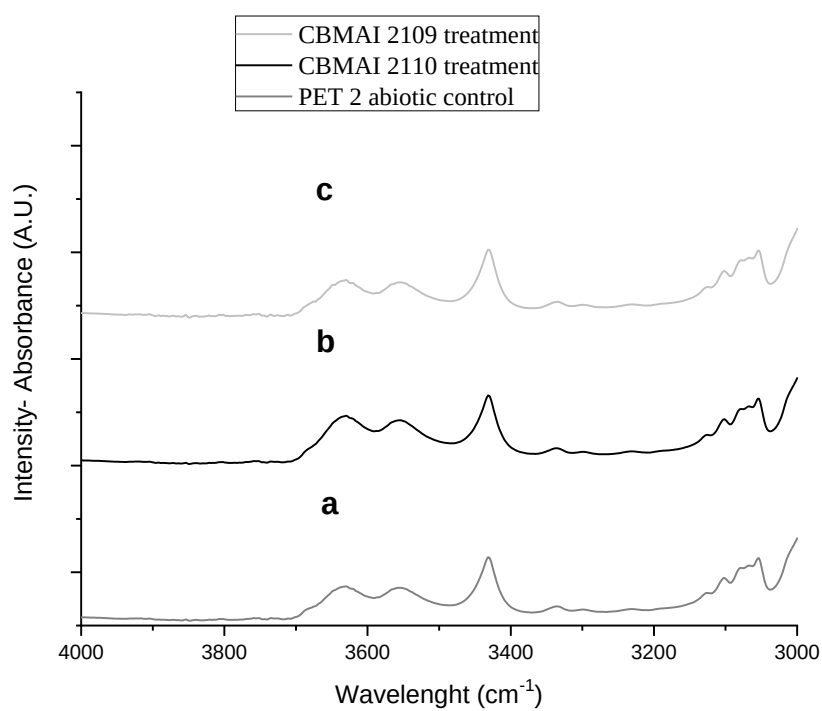


Figure S3 B 1. Figure 8 B rescaled region of 4000-3000 cm^{-1}

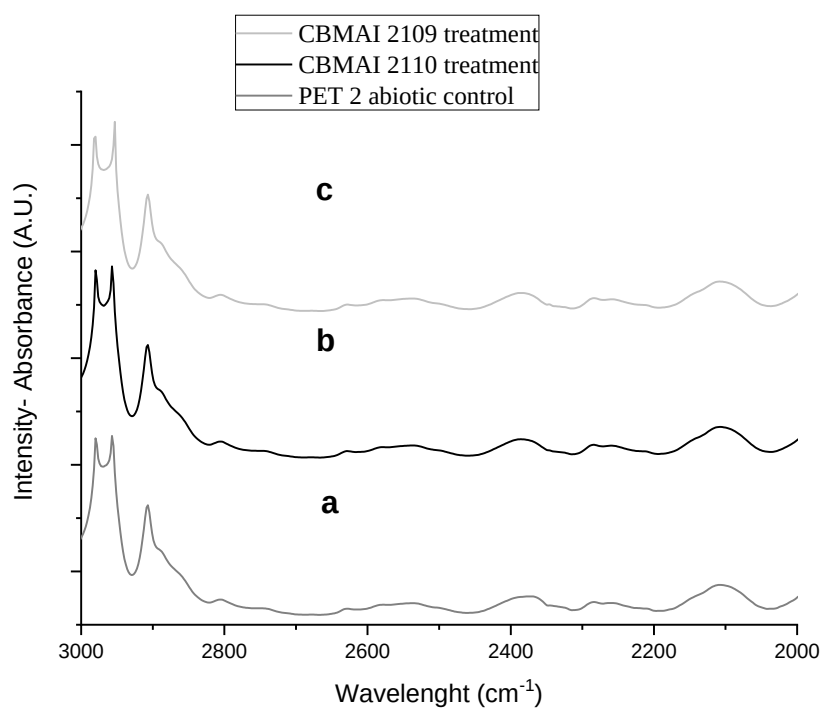


Figure S3 B 2. Figure 8 B rescaled region of 3000-4000 cm^{-1}

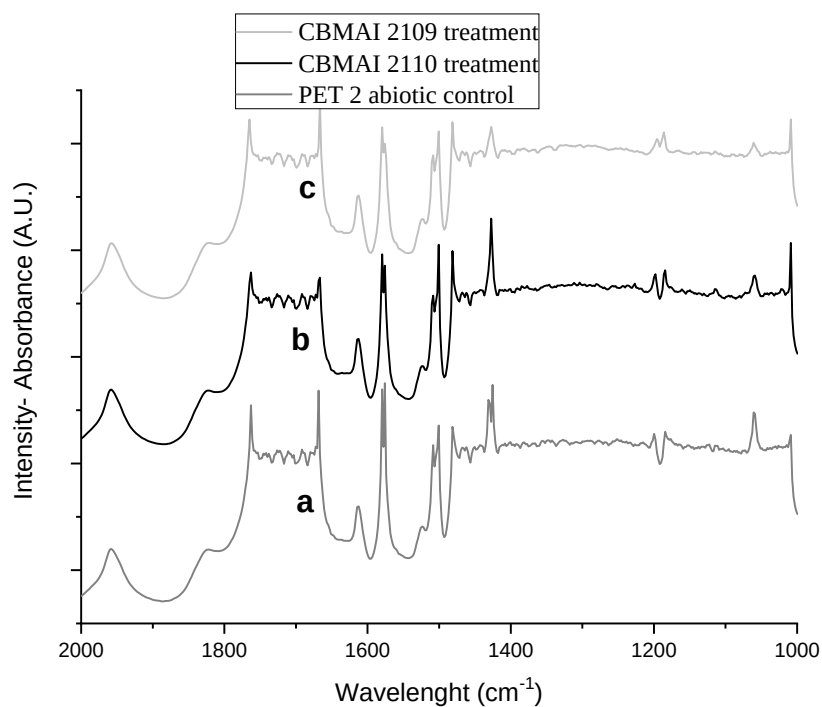


Figure S3 B 3. Figure 8 B rescaled region of 2000-1000 cm⁻¹

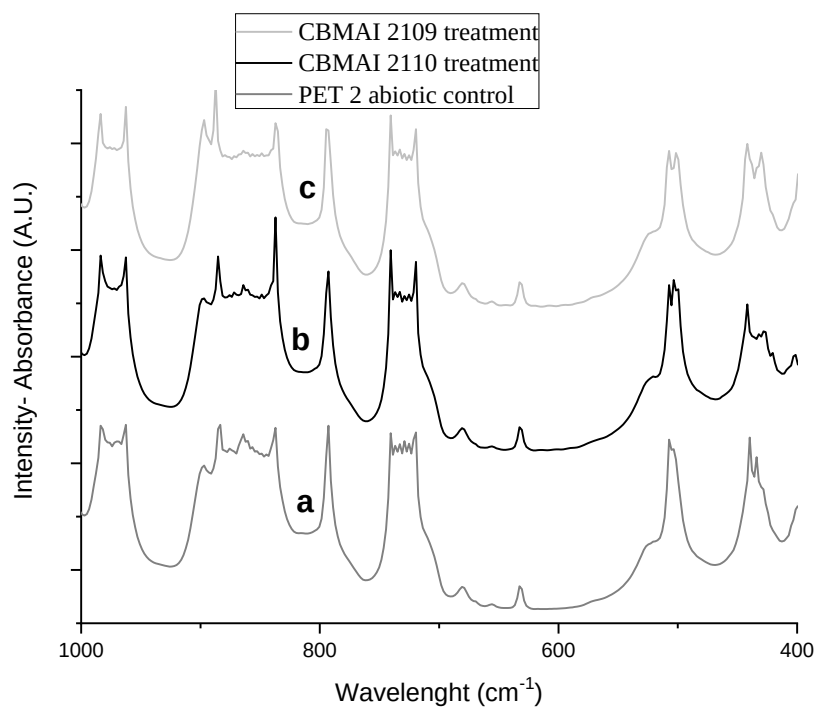


Figure S3 B 4. Figure 8 B rescaled region of 1000-400 cm⁻¹

4.2. CAPÍTULO 2

Artigo 2

O artigo 2 consiste nos resultados que contemplam as análises de potencial enzimático das linhagens estudadas frente à degradação das nanopartículas de PET, e seleção do meio de cultivo que proporcionou maior despolimerização de PET, assim como os resultados de 4 linhagens promissoras.

Isolados fúngicos eficazes na despolimerização de Polietileno tereftalato (PET) proveniente de garrafas.

Resumo

O PET apresenta características físico-químicas como hidrofobicidade, resistência, transparência e leveza, que o tornam um material de grande interesse industrial para produção de embalagens. Atualmente, as atividades antropogênicas têm feito deste polímero um elemento indispensável e onipresente. Ele é proveniente de subprodutos do petróleo, um recurso natural não-renovável, o que reforça a importância em se estabelecer estratégias para seu reuso. A reciclagem química pode ser efetuada mediante a hidrólise do polímero, liberando monômeros e oligômeros e pode ser efetuada pela ação de enzimas hidrolases provenientes de microrganismos. O estudo de enzimas produzidas por fungos filamentosos merece destaque, uma vez que permite a redução de polímeros do meio ambiente e a produção de monômeros de uma maneira ambientalmente correta. O objetivo desse trabalho foi selecionar linhagens com potencial para despolimerização de garrafas PET de diferentes fabricantes e tipos. Para isso, 100 isolados fúngicos foram testados mediante análises preliminares com nanopartículas de PET (NPPET) visando avaliar a conversão das mesmas em ácido tereftálico. Quatro linhagens foram selecionadas por essa metodologia: *Curvularia* sp. CBMAI 2111, *Trichoderma* spp. CBMAI 2071 e CBMAI 2073 e *Cladosporium* sp. CBMAI 2075. Os resultados indicaram que o meio caldo batata dextrose proporcionou melhor produção de monômeros. Os isolados selecionados mostraram-se eficientes e promissores. As fermentações levaram à mobilização de ácido tereftálico em concentrações acima de 12 ppm. A despolimerização também foi confirmada por análises de variação de massa, microscopia eletrônica de varredura (MEV), por análises de FTIR, além de quantificação de atividades de lipase e esterase no líquido fermentado.

Palavras-chave: biodegradação; polímeros; catálise enzimática; ácido tereftálico

Introdução

Existem aproximadamente cem diferentes tipos de plásticos que apresentam uma ampla variedade de propriedades e aplicações. No Brasil, o dado mais recente da Associação Brasileira da Indústria de PET indicou que 515 mil toneladas desse polímero foram usadas para a produção de garrafas, sendo 90% reservadas para água e refrigerantes (ABIPET, 2012; ABIPET, 2014). Em 2016, sua produção mundial foi de 335 milhões de toneladas, dos quais 60 milhões foram produzidas no continente Europeu. Onde cerca de 7,4% do total de plásticos foi constituído de polietilenotereftalato (PET), também na forma de garrafas de água e refrigerantes, além de embalagens para produtos de limpeza (PLASTICS EUROPE, 2017). No mesmo ano, 2,79 milhões de toneladas desse polímero foram igualmente destinados à produção de garrafas, nos EUA (NAPCOR, 2013).

A embalagem é um elemento fundamental de qualquer produto industrializado. Xie, Qiao e Sun (2011) relataram que por apresentarem um ciclo de vida relativamente curto, rapidamente, o número de embalagens existentes no mercado será igual à quantidade descartada. Estima-se que no ano de 2021, o número unidades de garrafas produzidas atingirá 583,3 bilhões em todo o mundo. Nonne (2008) afirmou que apenas 10% de todo PET recolhido originou novas garrafas (PARK; KIM, 2014). Em 2016, para cada 2 garrafas produzidas apenas uma foi reciclada, o restante foi depositado de forma inadequada no meio ambiente (PLASTICS EUROPE, 2017).

O impacto ambiental associado à utilização e deposição inadequada de PET se dá pelo fato desse ser um polímero derivado do petróleo (um recurso não renovável) com características físico-químicas que o tornam um material de grande persistência e baixa (bio)degradabilidade em condições ambientais, o que o leva a permanecer no meio ambiente por até milhares de anos (BARNES et al., 2009; KOELMANS et al., 2014; EUNOMIA, 2016).

O polietilenotereftalato é um polímero obtido pela condensação em altas temperaturas do ácido tereftálico (PTA) com etilenoglicol (EG), ambos monômeros oriundos dos subprodutos do petróleo, xileno e eteno (RAGHAVENDRACHAR; RAMACHANDRAN, 1992; CANN, 2018) (óleo e gás natural). Dados do continente europeu indicam que aproximadamente 6% do gás natural e do combustível fóssil explorados são utilizados para produção de garrafas PET (PLASTICS EUROPE, 2017). Sabe-se que tais recursos naturais são finitos e que o tempo necessário para o seu esgotamento ainda é incerto (FRUMKIN; HESS; VINDIGNI, 2009; SPEIRS; MCGLADE;

SLADE, 2015).

O cenário de escassez de recursos de produção, associado ao consumo excessivo e o mínimo reaproveitamento de garrafas PET reforça a importância em se estabelecer estratégias de reciclagem deste material recalcitrante. Os mecanismos de reciclagem de PET se dividem em: mecânicos, químicos e energéticos e consistem, respectivamente, no reprocessamento de resíduos da indústria ou PET pós-consumo para reintrodução no processo de produção de garrafas ou embalagens com menor exigência tecnológica; na obtenção de insumos químicos ou combustíveis a partir de resíduos poliméricos e, na recuperação de energia de resíduos poliméricos por incineração controlada (SPINACÉ; DE PAOLI; 2005).

Neste contexto, a reciclagem química se coloca como alternativa viável, pois permite a não deposição do resíduo sólido no ambiente, além de prover a produção de monômeros para a obtenção de novas garrafas e embalagens. Os tipos de reciclagem química existentes são: glicólise, metanólise, aminólise, amonólise e hidrólise, sendo a primeira técnica a mais utilizada pela indústria apesar de apresentar desvantagens como alto custo associado à separação e refinamento dos produtos em mistura (BARTOLOME et al., 2012; KHOONKARI et al., 2015; AL-SABAGH et al., 2016). A hidrólise de polímeros pode ser mediada por microrganismos, com a vantagem de não exigir solventes e reagentes que elevem os custos com a purificação do PTA (DI SOUZA; TORRES; RUVOLO FILHO, 2008).

Enzimas com capacidade hidrolítica, lipases, esterases e cutinases produzidas por diferentes classes de microrganismos auxiliam na biodegradação do polímero hidrofóbico (EBERL et al., 2009; BILLIG et al., 2010; GUO; ZHOU; LV, 2013). Alguns estudos abordam a utilização de microrganismos ou suas enzimas isoladas em processos de despolimerização de PET (NIMCHUA; EVELEIGH; PUNNAPAYAK, 2008; RIBITSCH et al., 2012; ZIMMERMANN; BILLIG, 2011). Recentemente a bactéria *Ideonella sakaiensis* (201-F6) isolada no Japão produziu enzimas que se destacaram pela seletividade e eficiência em 18 horas de atividade (YOSHIDA et al., 2016).

Embora algumas hidrolases de PET já apresentem atividade efetiva, a conversão microbiana deste polímero ainda é pouco significativa, pois não se sabe em quais linhagens estas enzimas são encontradas ou em quais filos são mais frequentes. Portanto, estudos visando a despolimerização do PET apresentam aspectos inovadores e são de grande importância científica (DANSO; SCHMEISSER; CHOW, 2018).

Os fungos, em detrimento a outros grupos de microrganismos, são considerados excelentes degradadores de matéria orgânica, especialmente polímeros naturais, pois crescem em condições adversas de pH e umidade, além disso o desenvolvimento micelial permite a fácil colonização do substrato que, em conjunto ao seu sistema multienzimático auxilia na degradação do composto (MATAVULJ; MOLITORIS, 2009). A literatura destaca cutinases de *Fusarium solani* (RONKVIST et al., 2009); esterases de *Cladosporium cladosporioides* (SATO, 1983) e de *Penicillium citrinum* (LIEBMINGER et al., 2007) bem como, lipases de *Aspergillus oryzae* (WANG et al., 2008) que incrementam a hidrofilicidade, ou melhor “biofuncionalizam” o PET.

Vários são os métodos utilizados para avaliar a atividade microbiana sobre o polímero. A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), por exemplo, permite a quantificação dos monômeros ácido tereftálico (PTA) e oligômeros bis-2-hidroxietil tereftalato (BHET) e mono-hidroxietil tereftalato (MHET) liberados. Contudo, a realização dessa metodologia envolve bastante espaço e tempo (WANG et al., 2008; RONKVIST et al., 2009), pois implica em estimular o crescimento do microrganismo em meio de cultura contendo fragmentos do polímero, para posterior isolamento dos subprodutos e então quantificá-los.

Neste sentido, técnicas que revelem previamente o potencial de despolimerização do PET com rapidez, possibilitam a avaliação de um maior número de linhagens. Ferramentas de triagem miniaturizadas para detectar poliéster hidrolases são de grande valia para o desenvolvimento de metodologias sustentáveis. Wei et al. (2012) implementaram uma técnica de triagem de alto desempenho com detecção por fluorescência (HTS-fluorescência) para quantificação de ácido tereftálico proveniente de nanopartículas de PET (NPPET), mediante conversão de PTA no radical livre 2-hidroxitereftalato (HOTP). Os ensaios desse trabalho foram realizados com cutinases recombinantes de *Termobifida fusca*. Chaves et al. (2018) abordando o mesmo princípio elencaram bactérias, fungos filamentosos e leveduras com potencial para a despolimerização de NPPET em PTA, porém utilizando-se de toda a estrutura celular dos isolados testados, e não apenas as enzimas isoladas.

O presente trabalho avaliou 100 linhagens fúngicas, isoladas de diferentes ambientes, quanto à capacidade de produzir hidrolases aptas a assimilar NPPET, mediante ensaios realizados em microescala, valendo-se da metodologia implementada por Chaves et al. (2018). Posteriormente, foi efetuado um ranqueamento das linhagens com melhor

efetividade na conversão de NPPET. Para avaliar o efeito das cepas com melhores resultados nos ensaios preliminares realizados em microescala, fermentações foram realizadas utilizando-se fragmentos de garrafas PET de duas marcas e tecnologias de produção diferentes, PET “plant-bottle” e PET convencional. Com isso, foi possível definir um meio de cultura que proporcionasse maior conversão de PET em PTA e oligômeros.

Finalmente, a contribuição desse trabalho foi levantar informações acerca do potencial de despolimerização das linhagens elencadas sobre fragmentos de garrafas PET comerciais. Os resultados se referem às seguintes análises realizadas nos líquidos fermentados (isentos de micélio): PTA, BHET e MHET por CLAE-UV, proteínas totais e atividade de hidrolases (lipase e esterase); e nos fragmentos de PET: variação de massa, análises por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia por infravermelho (FTIR).

Métodos

Microrganismos

As 100 linhagens de fungos filamentosos utilizadas neste trabalho foram isoladas de diferentes ambientes, conforme apresentado na Tabela 1, e atualmente pertencem ao acervo do Laboratório de Microbiologia Ambiental, localizado no Centro de Estudos Ambientais (CEA) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), campus de Rio Claro, SP. Encontram-se preservadas por três métodos: Castellani (blocos de ágar em água); Agar inclinado em geladeira (6 °C); e criopreservação (às temperaturas de -20 °C e -80 °C). As linhagens mais promissoras para aplicação industrial foram depositadas na Coleção Brasileira de Microrganismos de Ambiente e Indústria (CBMAI), localizada no Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA), Unicamp, Paulínia.

Os fungos foram reativados para verificação de viabilidade e pureza, utilizando placas Petri descartáveis (90 x 15 mm) contendo aproximadamente 20 mL de Agar Batata-dextrose (BDA, 20 g.L⁻¹ de dextrose, 4 g.L⁻¹ de extrato de batata), Sigma Aldrich.

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

Amostra de isolamento	Localização	Número de isolados/amostra	Táxons correspondentes (número de isolados analisados)
Água de Rio	22°41'48"S; 47° 08' 59"W	41	<i>Paecilomyces</i> (5), <i>Cladosporium</i> (1), <i>Penicillium</i> (6), <i>Curvularia</i> (2), <i>Trichoderma</i> (9), <i>Cylindrocladium</i> (1), <i>Aspergillus</i> (2), <i>Pycnidophora</i> (2), <i>Phoma</i> (1), <i>Mucor</i> (2), Pleosporales(1), <i>Microsphaeropsis</i> (4), <i>Cochliobolus</i> (1), <i>Westerdykella</i> (3), fungo não esporulante(1)
Água residual tratada	22°44'26" S; 47° 07' 33" W	10	<i>Westerdykella</i> (1), <i>Penicillium</i> (2), <i>Pseudallescheria</i> (1), <i>Curvularia</i> (1), <i>Trichoderma</i> (4), Pleosporales (1)
Cutícula de formiga	22°23'58" S; 47° 32' 38" W	8	<i>Penicillium</i> (2), <i>Mucor</i> (2), <i>Fusarium</i> (4)
Água de Rio	22°41'28" S; 47° 07' 22" W	7	<i>Penicillium</i> (1), <i>Paecilomyces</i> (1), <i>Aspergillus</i> (2), <i>Phoma</i> (1), <i>Trichoderma</i> (2)
Água de Rio	22°44'25" S; 47° 07' 33" W	7	<i>Penicillium</i> (3), <i>Trichoderma</i> (4)
Solo sob o plantio de <i>Citrus</i>	22°08'49,4" S; 47° 10' 47,6" W	8	<i>Aspergillus</i> (2), <i>Fusarium</i> (5), <i>Penicillium</i> (1)
Lodo de Esgoto	22°44'02" S; 47° 07' 03" W	6	<i>Penicillium</i> (2), <i>Trichoderma</i> (1), <i>Fusarium</i> (1), <i>Pycnidophora</i> (1), <i>Phoma</i> (1)
Efluentetratado	22°41'28" S; 47° 07' 22" W	5	<i>Aspergillus</i> (2), <i>Trichoderma</i> (1), <i>Coletotrichum</i> (1), Pleosporales (1)
Água de Rio	22°44'23" S; 47° 07' 40" W	5	<i>Penicillium</i> (1), <i>Trichoderma</i> (2), <i>Pycnidophora</i> (1), <i>Paraconiothyrium</i> (1)
Fragmento de PET pós limpeza	22°23'58" S; 47° 32' 38" W	2	<i>Cladosporium</i> (1), <i>Penicillium</i> (1)
Ar	23°51'62,4" S; 46° 62' 40,1" W	1	<i>Penicillium</i> (1)

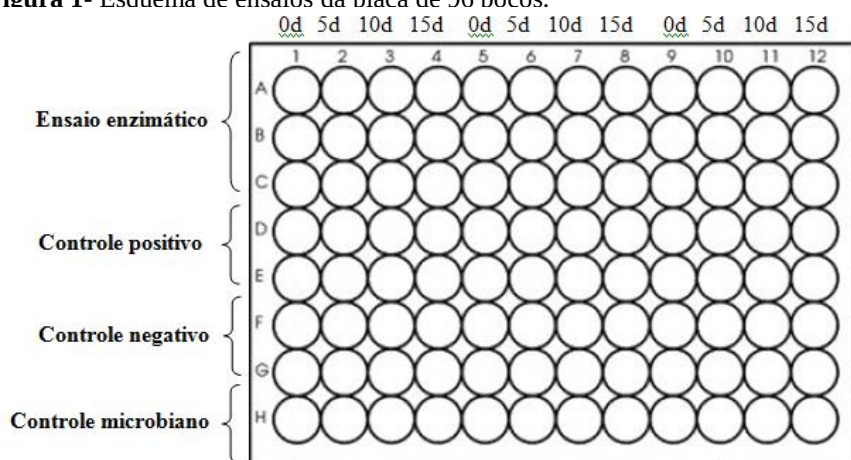
Ensaio enzimáticos com Nanopartículas de PET (CHAVES et al., 2018)

As colônias fúngicas utilizadas nestas análises foram cultivadas por 07 dias em BDA à temperatura de 28 °C. Os ensaios foram executados em placas de 96 poços com fundo preto e divididos em enzimáticos, controle negativo, controle positivo e microbiano. Os reagentes adicionados por poço para cada tipo de análise estão relacionados a seguir:

- enzimático: 100 μL de suspensão de células fúngicas (1 mg.mL^{-1} , em tampão borato 20 mM- pH 7,8) e 30 μL de uma solução de nanopartículas de PET ($0,11 \text{ mg.mL}^{-1}$, aproximadamente 60 nm de diâmetro).
- Controle positivo: 100 μL de suspensão de células fúngicas (1 mg.mL^{-1} , em tampão borato 20 mM- pH 7,8) e 30 μL de solução de ácido tereftálico (2,6mM).
- Controle negativo: 30 μL da solução de nanopartículas de PET ($0,11 \text{ mg.mL}^{-1}$) e 100 μL de tampão borato 20 mM, pH 7,8.
- Controle microbiano: 100 μL de suspensão de células fúngicas (1 mg.mL^{-1} , em tampão borato 20 mM- pH 7,8) e 30 μL de tampão borato 20 mM, pH 7,8.

Após o preenchimento das placas, conforme esquema da Figura 1, as mesmas foram incubadas a 28 °C sob agitação a 200 rpm e o monitoramento das atividades enzimáticas foram efetuados nos tempos 0, 5, 10 e 15 dias, sendo que ao final destes, adicionou-se por poço e respeitando a ordem, os seguintes reagentes: 30 μL de uma solução de H_2O_2 a 2%; 20 μL de EDTA a 2mM e 20 μL de $\text{Fe}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ a 3 mM para completar a reação. Posteriormente, as placas foram incubadas à temperatura ambiente por 25 min visando a conversão do ácido tereftálico em 2-hidroxitereftalato (HOTP) e então, a fluorescência foi revelada.

Figura 1- Esquema de ensaios da placa de 96 pocos.



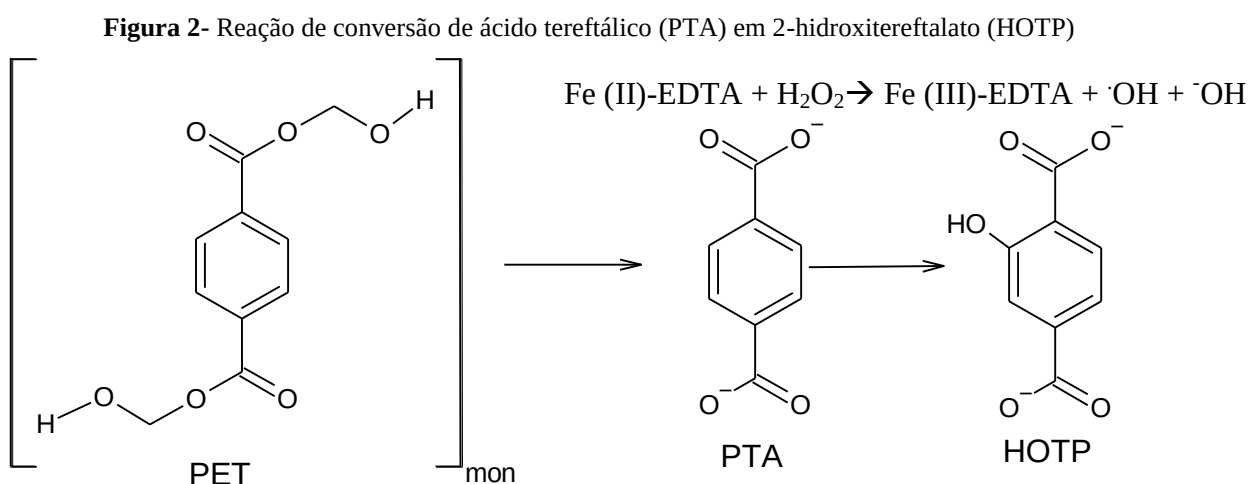
Nota. Três linhagens foram analisadas por placa. d=dias de contato da suspensão fúngica ($100 \mu\text{L}$, 1 mg.mL^{-1}) com nanopartícula de PET ($30 \mu\text{L}$, $0,11 \text{ mg.mL}^{-1}$), 28°C, 200 rpm.

A observação da fluorescência foi efetuada nos comprimentos de onda, λ_{ex} = 328nm e λ_{em} = 421nm, em um leitor de placas multimodal EnSpire™ 2300 PerkinElmer®.

Os cálculos de conversão do PTA em HOTP foram executados utilizando a equação 1:

$$C\% = \left[\frac{(Fluorescência\ média\ (FM)_{ensaio}) - (FM_{controlneg}) - (FM_{controlmic})}{FM_{controlopositivo}} \right] \times 100 \quad (1)$$

A Figura 2 representa o esquema de modificação do PTA em HOTP após adição dos reveladores de fluorescência.



Nota. Reagentes a adição de 30 µL de H₂O₂ 2%; 20 µL de EDTA 2mM e 20 µL de Fe₂SO₄. 7H₂O 3 mM.
Adaptado de Chaves et al. (2018).

Ensaio para detecção de produtores de cutinase

Teste em placas utilizando cutina e policaprolactona (PCL) como únicas fontes de carbono

Fragmentsos de 3,0 mm² de micélio dos isolados fúngicos com 7 dias de crescimento em BDA a 28°C foram transferidos para o centro de placas de Petri (90x 15 mm) contendo meio mineral mínimo suplementado com cutina (extraída de cascas de maçã Fuji, de acordo com metodologia proposta por Macedo e Pio (2005) e suspensão de policaprolactona (Sigma Aldrich® - massa molar média 10000 g.mol⁻¹). As formulações dos meios de cultura estão a seguir:

- *Cutina*: 3,0 g NaNO₃; 1,0g K₂HPO₄; 0,5 g KCl; 0,01 g FeSO₄.7H₂O, 0,2% de cutina, 17 g de ágar bacteriológico, 1000 mL de água destilada (DICKMAN; PATIL, 1986; CHEN et

al., 2007).

- *Policaprolactona*: 4 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 6 g KH_2PO_4 ; 0,2 g Na_2HPO_4 ; 1 mg $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1mg CaCl_2 ; 10 μg H_3BO_3 ; 10 μg MnSO_4 ; 70 μg ZnSO_4 ; 50 μg CuSO_4 ; 10 μg MoO_3 ; 500 mg de suspensão de PCL (acetona:água)e 1L de água destilada (SCHA, 1996).

Os resultados foram mensurados pelas medidas de diâmetro das colônias em centímetros nos dois meios de cultivo, além da formação de zona de clareamento no centro da colônia no meio com PCL.

Ensaio de despolimerização de PET

Os ensaios de biodegradação foram realizados por fermentação em meio líquido com filmes poliméricos provenientes de produtos e marcas diferentes, PET1= fragmento de garrafa de água mineral da marca Crystal[®] de 500 mL, e PET2= fragmento de garrafa de refrigerante diet da marca Sprite[®] de 2 L. Essas garrafas foram adquiridas no comércio local e após remoção de gargalos, tampas e etiquetas, fragmentos de aproximadamente 4,5 x 2,5 cm (500 mg) foram cortados com tesoura esterilizada, e transferidos para placas de Petri descartáveis. As espessuras dos filmes de PET foram medidas com micrômetro digital da marca RoHS[®] e realizadas análises térmicas de calorimetria exploratória diferencial (DSC) para determinação da temperatura de fusão e porcentagem de cristalinidade das amostras de PET (Tabela 2).

As análises de calorimetria exploratória diferencial (DSC) para obtenção dos termogramas foram executadas em um equipamento Netzsch DSC 200 PC, utilizando 38,3 mg dos polímeros PET 1 e PET 2 e estudados na faixa de temperatura de 30 a 350 °C, com rampa de aquecimento de 10 °C.min⁻¹, sob um fluxo de nitrogênio (N₂) de 50 mL.min⁻¹ (DE CASTRO et al., 2017).

Tabela 2. Características físicas obtidas por análises de DSC para as amostras de PET 1 e PET 2. T_m °C= temperatura de fusão; ΔH_m (J.g⁻¹)= entalpia de fusão; X(%)= porcentagem de cristalinidade.

Amostra	Espessura (mm)	T_m °C	ΔH_m (J.g ⁻¹)	X(%)
PET 1	0,1±0,01	251,12	49,66	35,47
PET 2	0,21±0,01	253,41	14,57	10,41

Referência: PET 100% Cristalino ΔH_m = 140 J.g⁻¹(KHANNA; KUHN, 1997)

A Figura S1 do material suplementar contém os termogramas das amostras. A equação S1 do material suplementar contém os dados para obtenção de % de cristalinidade.

Os fragmentos foram pesados em balança analítica (e = 0,001 g), lavados com água de torneira e detergente neutro, e enxaguados com água destilada esterilizada. Os mesmos foram imersos em hipoclorito 2% durante 1 hora, enxaguados novamente com água destilada esterilizada e então mantidos por 30 minutos em luz ultravioleta na cabine de segurança biológica (492 watts de potência a 50 cm de distância). Os fragmentos foram deixados na estufa de secagem a 40 °C até completa evaporação da água.

As linhagens fúngicas utilizadas neste experimento foram mantidas em crescimento por 07 dias a 28 °C em câmara BOD, acondicionadas em tubos de ensaio contendo agar inclinado BDA (20 g.L⁻¹ de glicose) com aproximadamente 100 mg de fragmentos de 0,5 x 0,5 cm de garrafa PET1. A quantidade de 10⁶ esporos ou a massa micelial (para fungos não esporulantes) presente em dois tubos de ágar inclinado foi transferida assepticamente, com auxílio de 1 mL de água destilada esterilizada, para frascos Erlenmeyers de 125 mL contendo 40 mL de meio líquido (Tabela 3) junto com aproximadamente 500 mg de fragmentos de PET, previamente higienizados.

Os frascos foram incubados à temperatura de 28 °C com agitação de 150 rpm em agitador rotativo por 15 ou 40 dias. As culturas foram centrifugadas a 4.472 g à 8 °C em tubos tipo Falcon (50 mL) esterilizados e as suspensões foram filtradas em membrana de celulose de 0,45 µm para separar os fragmentos de PET do micélio presente no líquido fermentado. Cada experimento foi executado em triplicata acompanhado de controle abiótico (meio de cultura contendo fragmentos de PET, isentos de microrganismo).

Os fragmentos de PET pós-fermentação foram submetidos a um novo processo de desinfecção, conforme mencionado anteriormente, até que nenhum micélio fosse visualizado. Após, foram secos em estufa a 40 °C. A variação de massa dos fragmentos foi

calculada utilizando a equação 2.

$$\text{variação de massa \%} = \left(\frac{\text{massa}_{PETAF} - \text{massa}_{PETPF}}{\text{massa}_{PETAF}} \right) \times 100 \quad (2)$$

Nos quais,

AF= fragmento antes da fermentação

PF= fragmento após a fermentação.

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

Meio de cultura líquido			Componentes e quantidades em g.L ⁻¹	
Meio mínimo mineral (MM1)			KH ₂ PO ₄	1,0
GAMS, HOEKSTRA, APTOOT (1998)			KNO ₃	1,0
			MgSO ₄	0,5
			KCl	0,5
			Extrato de levedura	0,2
			Sacarose	0,2
			Glicose	0,2
			H ₂ O destilada	1000 mL
Meio mínimo mineral suplementado com azeite de dendê (MM2)			KH ₂ PO ₄	1,0
GAMS, HOEKSTRA, APTOOT (1998)			KNO ₃	1,0
			MgSO ₄	0,5
			KCl	0,5
			Extrato de levedura	0,2
			Azeite de dendê	0,4
			H ₂ O destilada	1000 mL
Caldo Batata Dextrose (CBD) marca Sigma-Aldrich®			Glicose (Dextrose)	20,0
			Infusão de batata	4,0

Indicadores de Despolimerização

Testes realizados nos fragmentos de PET

Espectroscopia de absorção no Infravermelho por refletância total atenuada (FTIR-ATR)

As amostras de PET 1 e 2 foram caracterizadas por espectroscopia de infravermelho em um espectrômetro da marca Shimadzu modelo IR-Prestige-21, na faixa de 4000-400 cm⁻¹ com 32 acumulações e resolução de 2 cm⁻¹.

Microscopia eletrônica de Varredura (MEV)

Os fragmentos de PET foram recobertos com ouro utilizando um aparato da marca Balzers SCD 050 a 25 miliamperes por 40 segundos, sob pressão de 80 pascal. As imagens

foram obtidas em um Microscópio Eletrônico de Varredura da marca Hitachi modelo TM 3000, com aceleração de voltagem de 15 k (modo analy 1 – 30 Kv).

Testes realizados no caldo pós-fermentação

Proteínas totais

O conteúdo de proteínas totais do caldo fermentado foi determinado utilizando método de Bradford (1976), e as concentrações obtidas utilizando uma curva padrão de soroalbumina bovina (BSA-Sigma[®]), de faixa linear entre 3,33 e 33,33 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ($R^2=0.994$, 06 calibradores, $n=3$). As leituras de absorbância foram realizadas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 595 nm, correspondente à forma aniônica do Comassie Brillante Blue G-250 quando associado às proteínas.

Atividade de lipase

A atividade lipolítica foi determinada por titulação dos ácidos graxos liberados pela hidrólise do azeite de dendê (SHAFEI; MOHAMED; ELSALAM, 2011). Para isso, um grama do azeite (substrato lipídico), 4 mL de água destilada esterilizada e 5-10 pérolas de vidro foram adicionados a um Erlenmeyer (125 mL) e então, 1 mL do caldo fermentado livre de micélio foi incorporado a esta mistura.

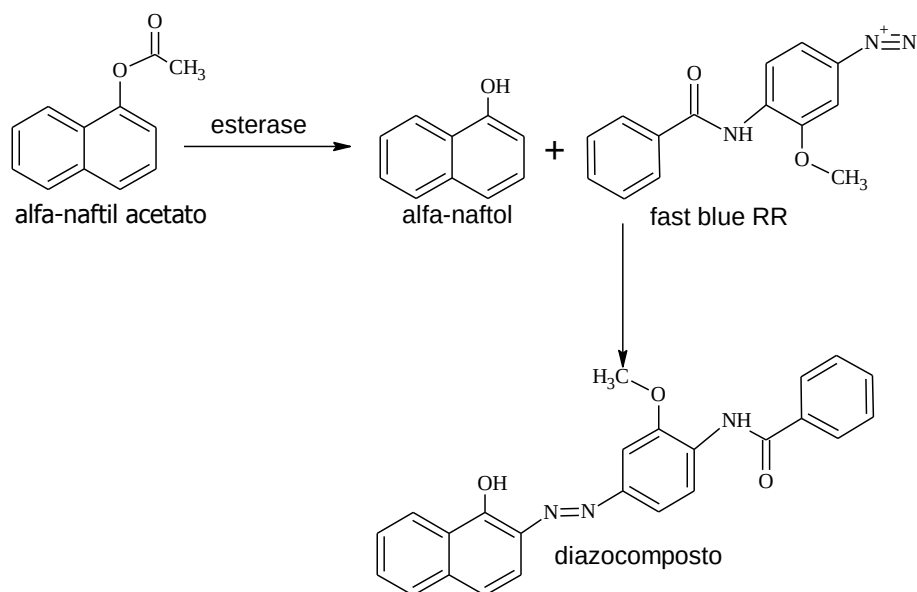
Os frascos foram incubados à temperatura de 50 °C sob agitação a 150 rpm por 30 minutos, a reação foi interrompida pela adição de 10 mL de uma solução de acetona:etanol (1:1). Os ácidos graxos liberados foram quantificados pela titulação com solução padronizada de NaOH ($0,05 \text{ mol.L}^{-1}$), utilizando como indicador, 3 gotas de fenolftaleína (0,1% em etanol absoluto). Um branco de reação foi preparado com 1 mL de água destilada, no lugar da amostra. Esses ensaios foram processados em triplicata e a atividade de lipase foi expressa em unidades de atividade lipolítica (UA) correspondente à quantidade de enzima capaz de disponibilizar um micromol de ácidos graxos por minuto de reação.

Atividade de esterase

A atividade foi estimada pela hidrólise enzimática de uma solução a $1,5 \text{ mMol.L}^{-1}$ α -naftil acetato (em tampão fosfato 300 mM contendo álcool isopropílico) visando a quantificação de α -naftol, revelado mediante a formação de um diazo-complexo após a adição de Fast Blue RR ($0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ em dimetilsulfóxido e etanol), como demonstrado na

figura 3. A quantificação foi determinada contra uma curva de calibração de α -naftol nas concentrações entre 10 a 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ (5 calibradores, $n=3$, $R^2=0,999$). As leituras espectrofotométricas foram realizadas em um espectrofotômetro no comprimento de onda de 490 nm (HE, 2003).

Figura 3- Formação de diazocomplexo pela ação de esterases sobre alfa-naftil acetato

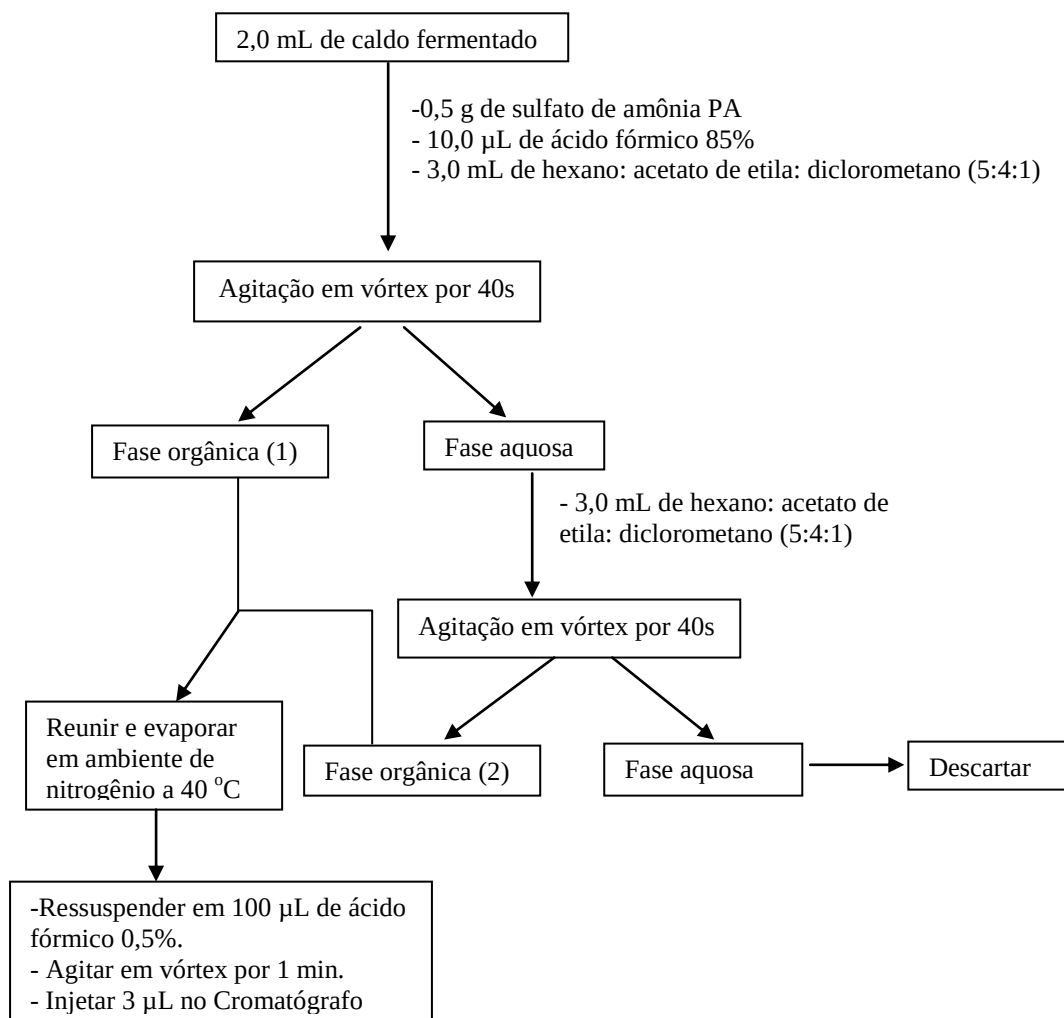


As amostras foram analisadas de acordo com o procedimento a seguir:

- Em tubos de ensaio, foi adicionado 100 μL do caldo fermentado em 2 mL de α -naftil acetato e incubados em banho-maria a 37 °C por uma hora,
- A reação foi interrompida pela adição de 1,0 mL de dodecilssulfato de sódio (10% em água esterilizada, pH 7,0) e,
- Foi adicionado 1,0 mL de fast blue RR para revelar o α -naftol formado.
- As absorbâncias foram determinadas contra um branco de reação contendo 100 μL de água esterilizada.

Ácido tereftálico (PTA) e oligômeros BHET e MHET por CLAE-UV

PTA, BHET e MHET presentes no caldo fermentado foram obtidos por extração líquido-líquido de acordo com o fluxograma (Figura 4) abaixo:

Figura 4- Fluxograma da extração líquido-líquido de PTA, BHET e MHET do caldo fermentado.

As separações cromatográficas foram realizadas em um cromatógrafo Shimadzu equipado com coluna octadecilsilano (C18) Shim-pack VP-ODS (4,6 mm x 250 mm, 5 µm) acoplada a uma pré-coluna de mesmo material (Shimadzu, USA), com injetor manual, utilizando as seguintes fases móveis:

- Solvente A: ácido fórmico 0,5 % (v/v): acetonitrila grau HPLC na proporção 90:10.
- Solvente B: ácido fórmico 0,5 % (v/v): acetonitrila grau HPLC na proporção 60:40.

Estas fases móveis foram acompanhadas de gradiente de eluição, de acordo com a Tabela 4 em um fluxo de 0,5 mL.min⁻¹. Os analitos foram detectados no comprimento de onda de 254 nm, sendo que os tempos de retenção foram: 10,450 min (PTA); 12,505 min (BHET) e 38,0 min (MHET). O ácido benzóico (23,4 min) foi utilizado como padrão interno, as concentrações dos analitos em ppm foram determinadas pelas equações de regressão linear de curvas analíticas construídas pela plotagem da média das áreas relativas

(área do analito/área do padrão interno) *versus* concentrações de padrão correspondentes (ppm).

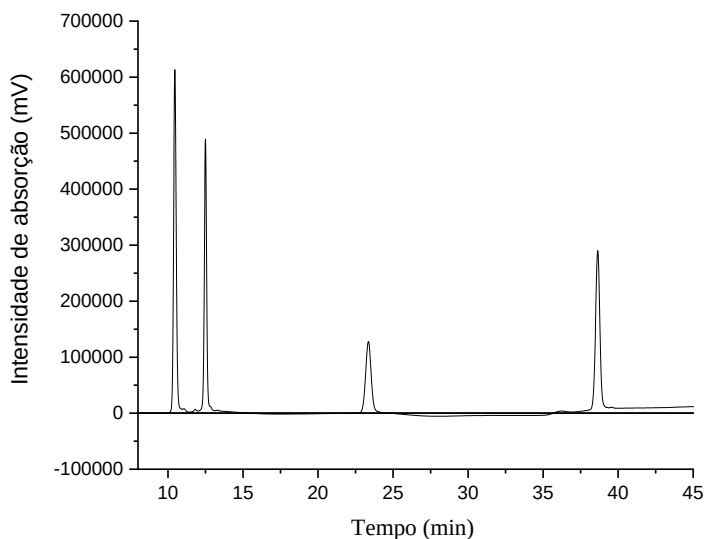
As figuras de mérito do método foram: linearidade de 0,15 a 300,0 ppm para PTA, BHET e MHET, com coeficiente de correlação 0,999 para os três analitos (6 calibradores, $n=3$), precisão determinada pelo desvio padrão relativo (coeficiente de variação, %) entre 1,1 e 31,1%, sendo o último valor para a menor concentração da curva.

Tabela 4. Programação de gradiente aplicado nas separações cromatográficas

Tempo (minutos)	Fasemóvel B (%)
0,01	80
5,0	40
13,0	50
16,0	0
24,0	0
25,0	80
30,0	80
35,0	80
40,0	80

A Figura 4 contém o cromatograma demonstrando a eficiência de separação da metodologia utilizada:

Figura 5- Cromatograma de separação dos analitos ácido tereftálico, bis-2-hidroxiethyltereftalato, ácido benzóico e metil-2-hidroxiethyltereftalato (soluções padrões 240 ppm, volume de injeção = 3 μ L)



Análises estatísticas

Os dados assumiram distribuição não-paramétrica e foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido de estudos de comparação de médias com ensaio de Student-Newman-Keuls. As análises foram executadas utilizando o software Bioestat 5.3®, considerando o intervalo de confiança de 95%, $p \leq 0,05$.

Resultados

Ensaio enzimático com Nanopartículas de PET

Dos 100 isolados fúngicos estudados, 27 apresentaram produção enzimática extracelular, capaz de converter as nanopartículas do polímero em ácido tereftálico (Tabela 5), destas 06 linhagens exibiram porcentagens de conversão acima de 2% e pertencem aos gêneros *Microsphaeropsis* (2), *Trichoderma* (2), *Curvularia* (1) e um representante da família Microasceae. Em negrito, na Tabela 3 estão as linhagens que fazem parte deste trabalho.

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

Código	Identificação	Conversão NPPET (%)*
CBMAI 2111	<i>Curvularia</i> sp.	9,0±1,1
CBMAI 2073	<i>Trichoderma</i> sp.	6,1±0,2
CBMAI 2071	<i>Trichoderma</i> sp.	3,6±0,8
LMA 192	Representante da família Microasceae	3,1±0,8
CBMAI 2111	<i>Microsphaeropsis arundinis</i>	2,7±0,9
CBMAI 2109	<i>Microsphaeropsis arundinis</i>	2,0±0,4
LMA 1269	<i>Fusarium</i> sp.	1,9±0,5
LMA 180	Pleosporales	1,9±1,0
CBMAI 2083	<i>Paecilomyces</i> sp.	1,7±0,7
LMA 269	<i>Aspergillus</i> sp.	0,8±0,6
CBMAI 2075	<i>Cladosporium</i> sp.	0,8±0,6
LMA1251	<i>Trichoderma</i> sp.	0,7±0,4
LMA 146	Pleosporales	0,7±0,1
LMA 271	<i>Penicillium</i> sp.	0,7±0,1
LMA 79	<i>Microsphaeropsis arundinis</i>	0,6±0,3
LMA 216	<i>Phoma herbarum</i>	0,6±0,6
LMA 28	<i>Aspergillus fumigatus</i>	0,5±0,0
LMA 1825	<i>Fusarium</i> sp.	0,4±0,0
LMA 1172	<i>Fusarium</i> sp.	0,4±0,0
LMA 141	<i>Aspergillus</i> sp.	0,4±0,2

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

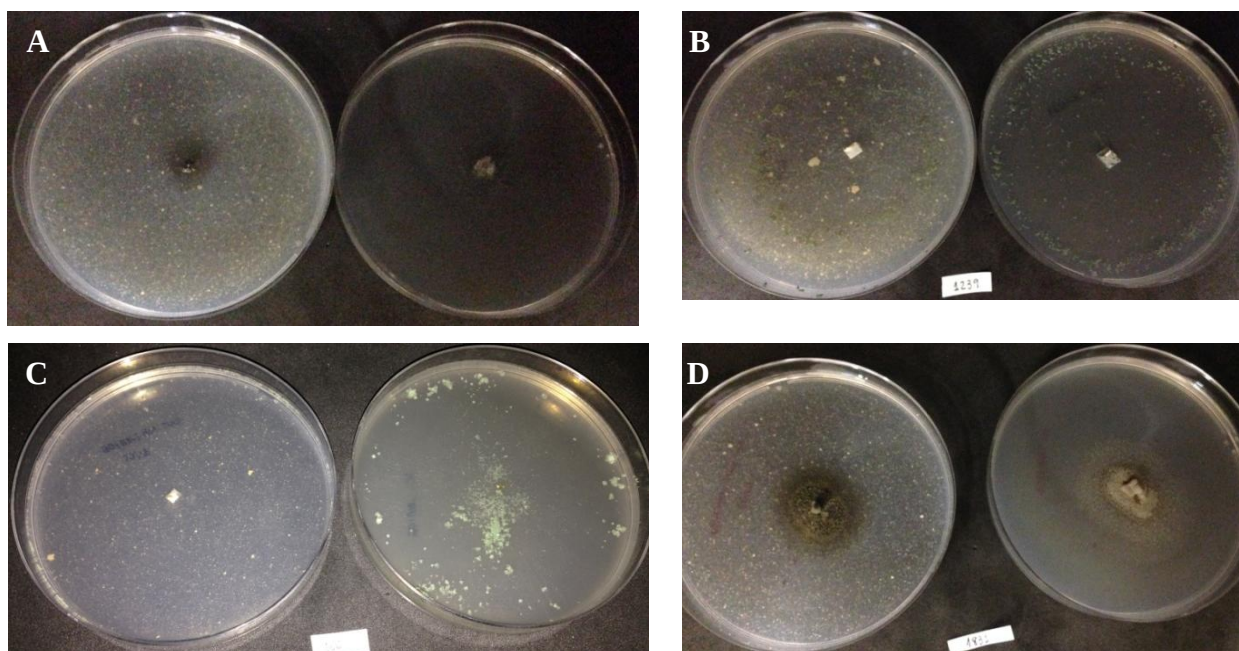
LMA 239	<i>Penicillium</i> sp.	0,3±0,2
LMA 249	<i>Penicillium</i> sp.	0,3±0,3
LMA 1220	<i>Trichoderma</i> sp.	0,3±0,0
LMA 69	<i>Pleosporales</i> sp.	0,3±0,2
LMA 167	<i>Penicillium</i> sp.	0,3±0,1
LMA 11	<i>Paecilomyces-like</i>	0,2±0,0
LMA 1145	<i>Fusarium</i> sp.	0,1±0,0

*resultados de conversão de NPPEm HOTP expressos em porcentagem média $\pm$ desvio padrão (n=3)

Produção de cutinase

A Figura 6 mostra que os isolados selecionados foram capazes de assimilar cutina e policaprolactona, como única fonte de carbono, demonstrada pelo crescimento evidente por quase toda a placa com meio mínimo mineral. *Curvularia* sp CBMAI 2111 e *Cladosporium* sp CBMAI 2075 exibiram colônias com menor crescimento, 1,5 e 1,8 cm; 3,5 cm e 4,5 cm de diâmetro para meio com cutina e PCL, respectivamente, no entanto, zonas de clareamento no centro da colônia da placa com PCL, indicaram degradação do polímero. A Figura S2 do material suplementar apresenta sobreposições de imagens de FTIR dos polímeros cutina e PCL.

Figura 6- Ensaio qualitativo para avaliação de linhagens produtoras de cutinase.



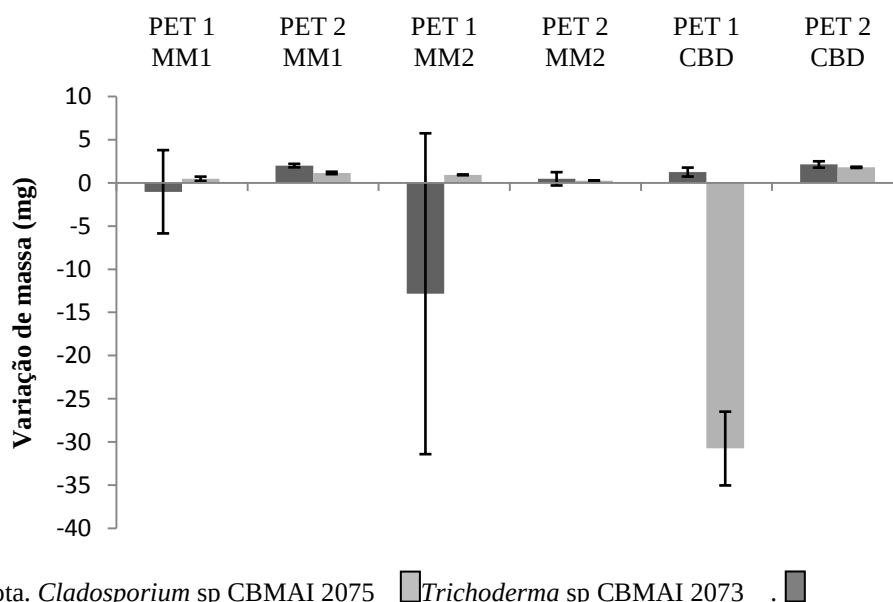
Nota. **A.** *Curvularia* sp CBMAI 2111; **B.** *Trichoderma* sp CBMAI 2073; **C.** *Trichoderma* sp. CBMAI 2071; **D.** *Cladosporium* sp. CBMAI 2075. Placas com meio mineral mínimo contendo cutina e policaprolactona como única fonte de carbono, esquerda e direita, respectivamente.

Ensaio de despolimerização de PET

As linhagens *Trichoderma* sp CBMAI 2073 e *Cladosporium* sp CBMAI 2075 foram escolhidas para testes com meios de cultivo contendo diferentes proporções de glicose e azeite, como única fonte de carbono.

Após 40 dias de fermentação, observou-se uma tendência ao ganho de massa dos fragmentos de PET 1, enquanto que os fragmentos de PET 2 tiveram perda de massa nos três meios de cultura testados (Figura 7). MM1 e CBD revelaram maior redução de massa dos polímeros PET 2 para ambos isolados estudados, essa variação esteve entre 1,2 e 2,2 mg.

Figura 7- Variação de massa dos fragmentos de PET pós-fermentação.



Dados abaixo do eixo x (valores negativos) indicam ganho de massa ao final do processo.

As atividades de lipase e esterase foram avaliadas no caldo fermentado (Tabela 6). Observou-se que para a linhagem *Trichoderma* sp CBMAI 2073 o meio de cultivo MM2 proporcionou maior atividade esterásica (fragmentos de PET 1) e lipolítica (PET 2). O isolado *Cladosporium* sp CBMAI 2075, entretanto, teve sua atividade de esterase evidenciada nos meios de cultivo MM1 e CBD (PET 1), enquanto que para lipase o MM2 (PET 2) apresentou maior valor.

Os isolados *Trichoderma* sp CBMAI 2073 e *Cladosporium* sp CBMAI 2075 foram capazes de despolimerizar PET nos subprodutos ácido tereftálico, bis-2-hidroxietil tereftalato e metil 2-hidroxietil tereftalato (Figura 8). Análises estatísticas aplicadas nas concentrações obtidas com a primeira linhagem indicaram que, no meio de cultura CBD

houve maior liberação do monômero PTA para os dois tipos de PET ($p < 0,05$). No estudo com PET 1 o oligômero BHET foi disponibilizado em maior quantidade em CBD ($p < 0,05$); já para o MHET as quantidades liberadas não apresentaram diferença significativa quanto ao tratamento aplicado nos dois tipos de polímeros ($p > 0,05$).

A Figura 9 contém os espectros de infravermelho dos dois tipos de PET estudados. De maneira geral, as duas linhagens selecionadas para estes ensaios, *Trichoderma* sp CBMAI 2073 e *Cladosporium* sp CBMAI 2075 revelaram maior número de modificações moleculares no PET 2 e estão resumidas a seguir:

Com *Trichoderma* sp CBMAI 2073

- aumento da intensidade de absorção com desaparecimento de picos entre 2980 e 2953 cm^{-1} ;
- desaparecimento dos picos 1764, 1666, 1481, 1008, 983, 962, 835, 507, 499, 437 e 428 cm^{-1} ;
- redução na intensidade de picos 1579 e 1427 cm^{-1}
- aumento na intensidade de absorção de picos 1502 e 1500 cm^{-1}

Com *Cladosporium* sp CBMAI 2075

- aumento na intensidade de absorção dos seguintes picos 1579, 1573, 1510, 1508 e 740 cm^{-1} ;
- redução na intensidade de pico em 860 cm^{-1}
- desaparecimento dos picos em 437 cm^{-1}

Já no PET 1, CBMAI 2073 promoveu aumento na intensidade de picos em 1579 e 1573 cm^{-1} ; deslocamento de pico de 630 para 632 cm^{-1} ; aparecimento de pico em 613 cm^{-1} e desaparecimento de pico em 656 cm^{-1} . E CBMAI 2075 apenas incrementou a intensidade de picos em 1579 e 1573 cm^{-1} .

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

<i>Trichoderma</i> sp CBMAI 2073	PET 1			PET 2		
	MM1	MM2	CBD	MM1	MM2	CBD
Lipase (UA)	0,69 $\pm$ 0,0	0,64 $\pm$ 0,2	0,47 $\pm$ 0,1	0,58 $\pm$ 0,1	0,87 $\pm$ 0,3	0,18 $\pm$ 0,3
Esterase (μ mol α -naftol/ μ g proteína)	535,6 $\pm$ 310,8	1968,2 $\pm$ 772,8	761,03,0 $\pm$ 384,9	1635,8 $\pm$ 681,0	631,7 $\pm$ 230,2	860,5 $\pm$ 341,5
<i>Cladosporium</i> sp CBMAI 2075	PET 1			PET 2		
	MM1	MM2	CBD	MM1	MM2	CBD
Lipase (UA)	0,97 $\pm$ 0,4	0,64 $\pm$ 0,3	0,83 $\pm$ 0,0	0,69 $\pm$ 0,2	1,47 $\pm$ 0,4	0,87 $\pm$ 0,0
Esterase (μ mol α -naftol/ μ g proteína)	1239,78 $\pm$ 727,3	1,91 $\pm$ 1,49	1034,1 $\pm$ 437,28	392,3 $\pm$ 278,4	30,35 $\pm$ 28,83	139,1 $\pm$ 75,9

Tempo de fermentação= 40 dias, 28°C a 150 rpm.

PET1= fragmentos de garrafa PET de água da marca Crystal®; PET2= fragmentos de garrafa PET de refrigerante da marca Sprite®; MM1= meio mineral suplementado com glicose e sacarose; MM2= meio mineral suplementado com azeite de Dendê; CBD= Caldo Batata Dextrose marca Sigma®.

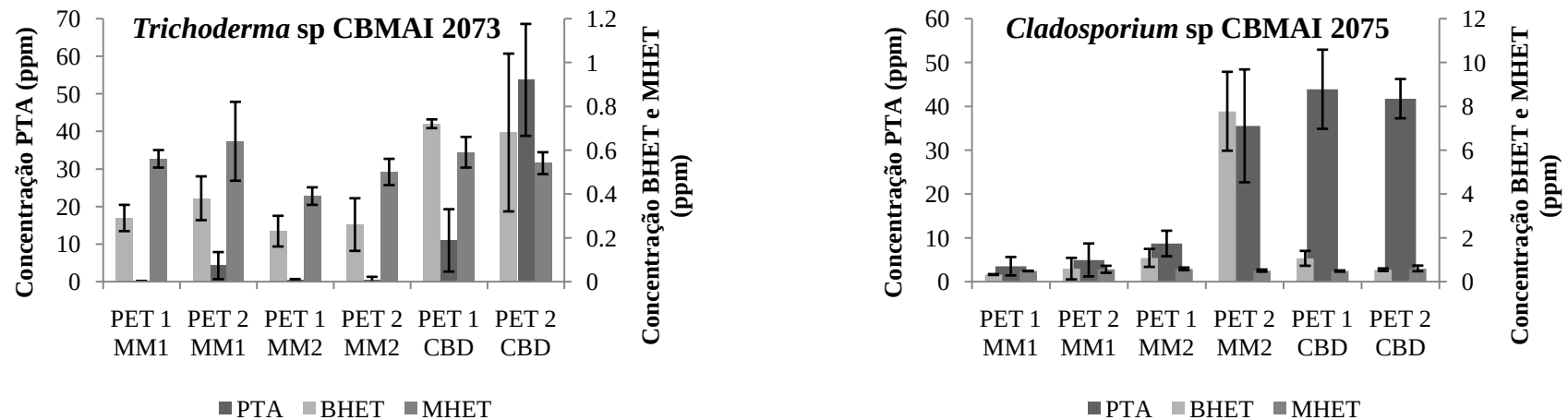
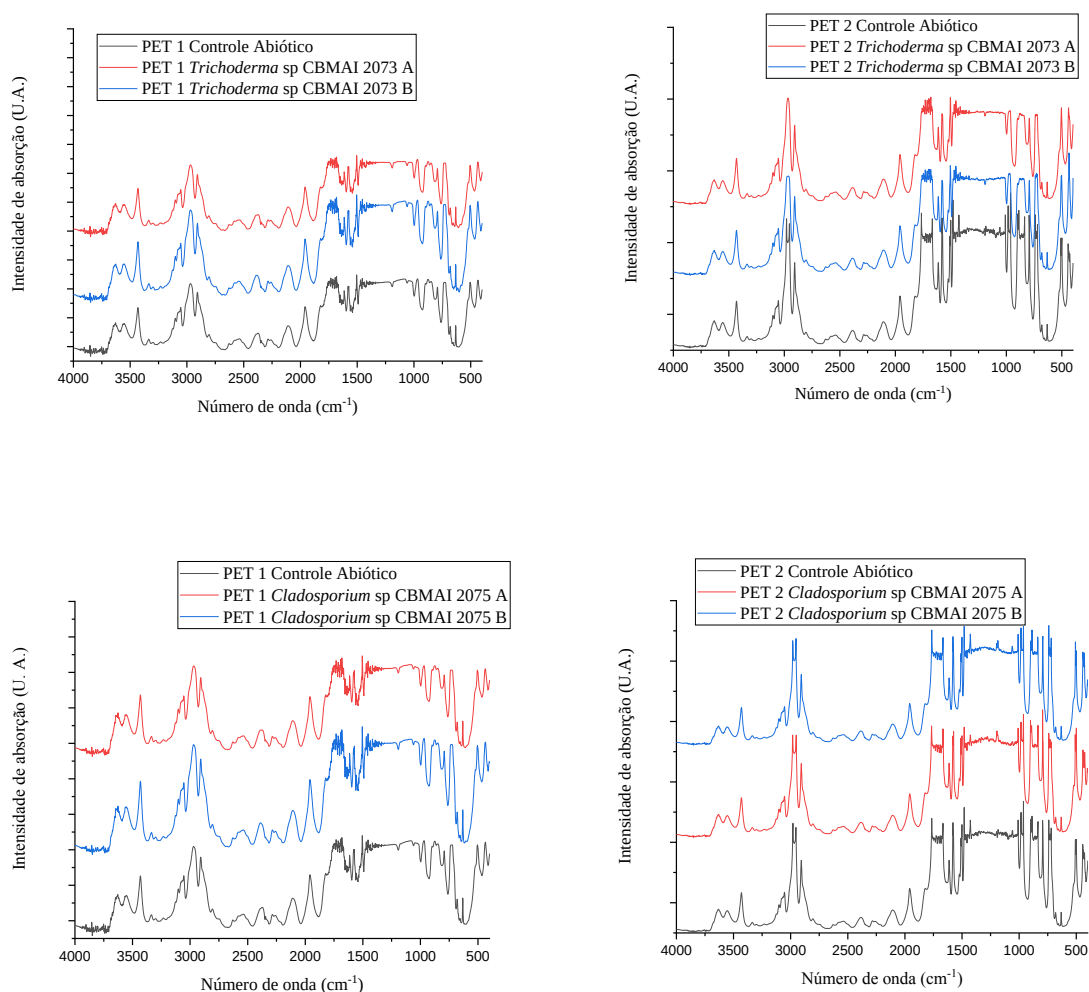
Figura 8- Concentrações em ppm de PTA, MHET e BHET liberados de PET 1 e PET2 com 3 meios de cultivo diferentes (tempo= 40 dias).

Figura 9- Espectros de Absorção de Infravermelho (FTIR) dos polímeros PET 1 e PET 2 após 40 dias de contato com os isolados *Trichoderma* sp CBMAI 2073 e *Cladosporium* sp CBMAI 2075.

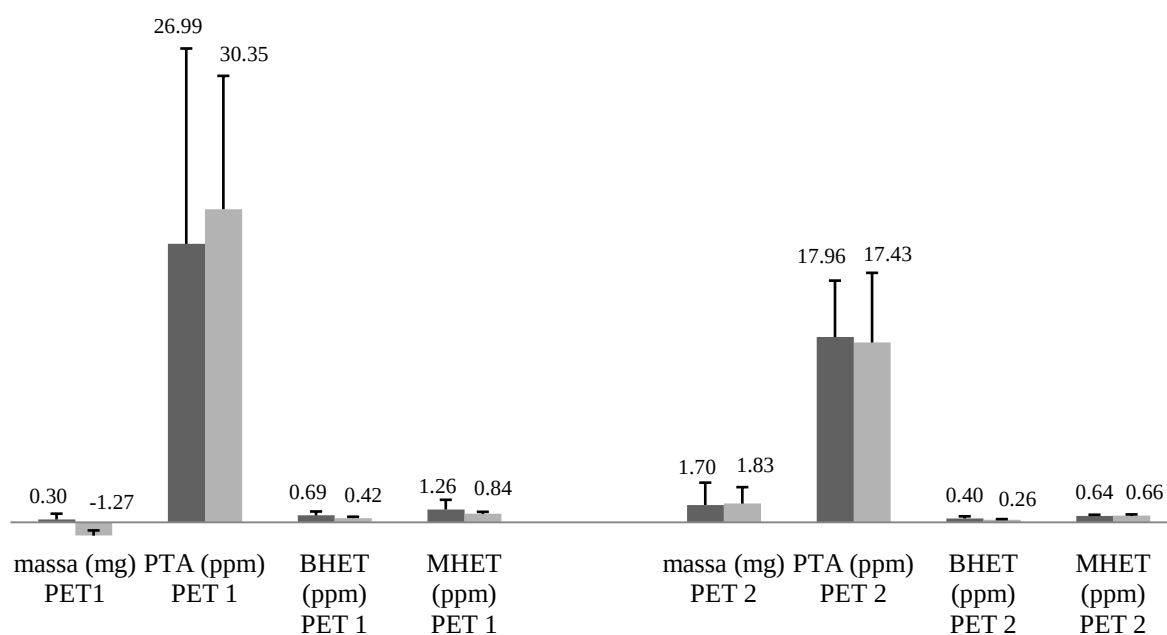


Nota. Meio de cultura CBD, $t = 28^\circ\text{C}$, agitação 150 rpm. A e B, duplicata de análise para o tratamento.

A figura S3 (A-P) do material suplementar contém imagens dos espectros de FTIR aumentadas para melhor observação das alterações frente aos tratamentos aplicados.

O meio de cultura CBD foi selecionado para testes de despolimerização com as linhagens *Curvularia* sp CBMAI 2111 e *Trichoderma* sp CBMAI 2071 e para isso, foram realizadas fermentações com 15 dias de duração. A Figura 10 contém os dados de variação das massas de PET, bem como as concentrações de monômeros e oligômeros liberadas pela ação enzimática.

Figura 10- Variação de massa em miligramas e concentrações de PTA, BHET e MHET obtidas com as linhagens *Curvularia* sp CBMAI 2111 *Trichoderma* sp CBMAI 2071 .



Nota. Tempo de fermentação 15 dias, $t = 28^{\circ}\text{C}$, 150 rpm. (Dados expressos em média + desvio padrão, $n=3$. Os valores abaixo do eixo x indicam ganho de massa do fragmento.

Os dados da Tabela 7 indicam que hidrolases extra-celulares foram produzidas pelas linhagens estudadas na presença dos fragmentos de PET.

Tabela 7. Atividades de lipase e esterase no líquido fermentado

<i>Curvularia</i> sp CBMAI 2111	PET 1	PET 2
Lipase (UA)	0,31±0,2	0,47±0,1
Esterase (μmol α-naftol/μg proteína)	0,55±0,2	1,04±0,4
<i>Trichoderma</i> sp CBMAI 2071	PET 1	PET 2
Lipase (UA)	0,6±0,1	0,42±0,1
Esterase (μmol α-naftol/μg proteína)	0,48±0,1	2,37±0,5

Tempo de fermentação= 15 dias, 28°C a 150 rpm; meio de cultura: Caldo Batata Dextrose; resultados expressos em média ±desvio padrão, $n=3$

Espectros de infravermelho dos fragmentos de PET 1 e 2 (Figura 11) com as linhagens *Curvularia* sp CBMAI 2111 e *Trichoderma* sp CBMAI 2071, quando comparados ao controle abiótico, apresentaram as seguintes alterações:

Em PET 1, *Curvularia* sp CBMAI 2111 e *Trichoderma* sp CBMAI 2071 promoveram:

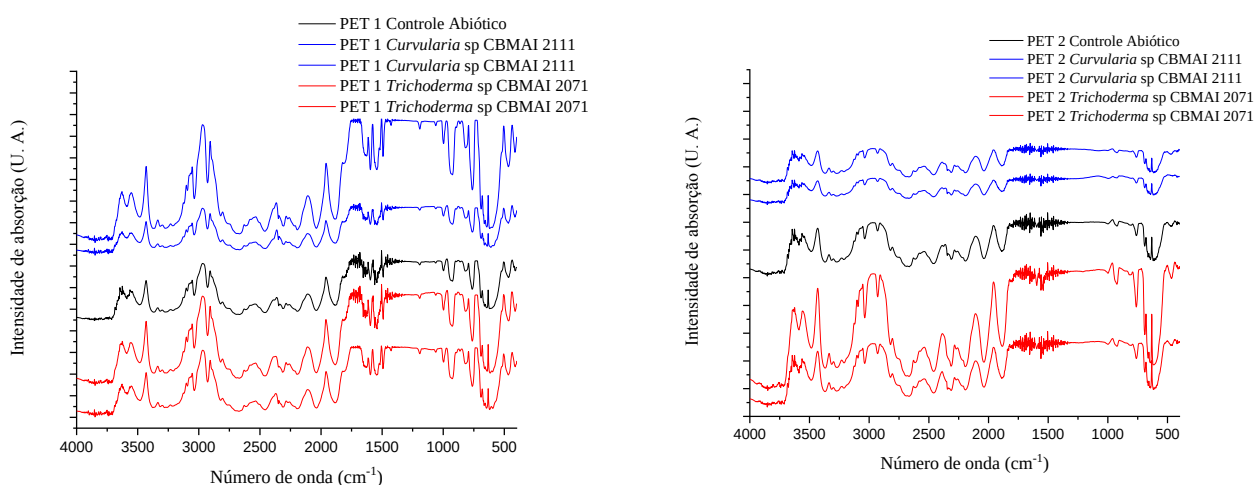
- desaparecimento do pico em 3645 e 3626 cm^{-1}
- Aumento na intensidade de absorção dos picos 3341 , 3334 , 3226 , 2974 ; 2904 ; 2276 ; 2389 , 2340 e 1504 cm^{-1}

O tratamento com a linhagem de *Curvularia* sp levou ao aparecimento de um novo pico em 2540 cm^{-1} , enquanto que para o isolado *Trichoderma* sp o novo pico surgiu em 658 cm^{-1} .

No PET 2 os efeitos dos tratamentos foram os seguintes:

- Curvularia* sp CBMAI 2111: redução na intensidade de absorção dos picos 2740 , 956 e 630 cm^{-1} e desaparecimento dos picos 2264 e 656 cm^{-1} .
- *Trichoderma* sp CBMAI 2071: aumento na intensidade de absorção dos picos em 3646 , 2380 , 2264 , 2112 , 1960 , 1502 , 956 , e 630 cm^{-1} e desaparecimento do pico em 656 cm^{-1} .

Figura 11- Espectros de Infravermelho (FTIR) dos polímeros PET 1 e PET 2 após 15 dias de contato com os isolados *Curvularia* sp CBMAI 2111 e *Trichoderma* sp CBMAI 2073.

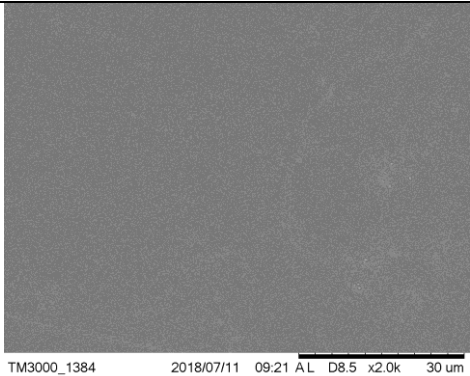
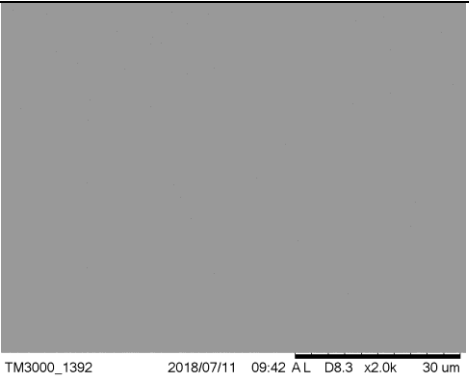
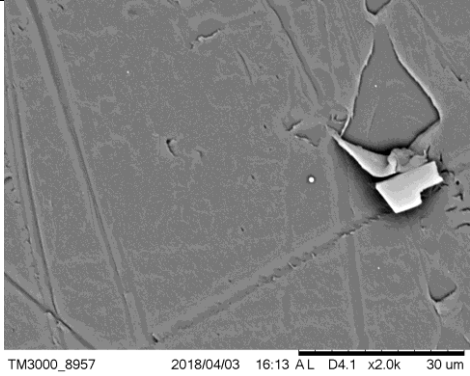
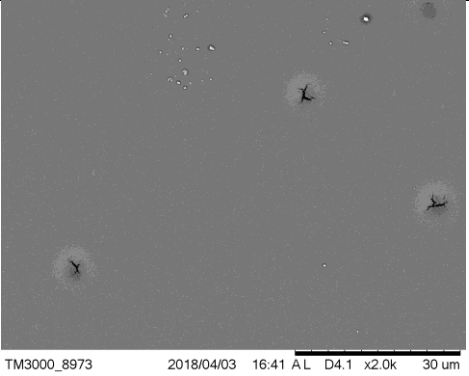
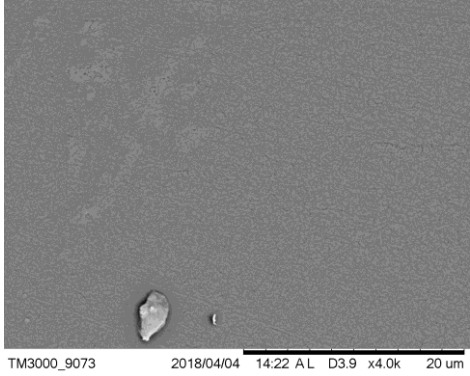
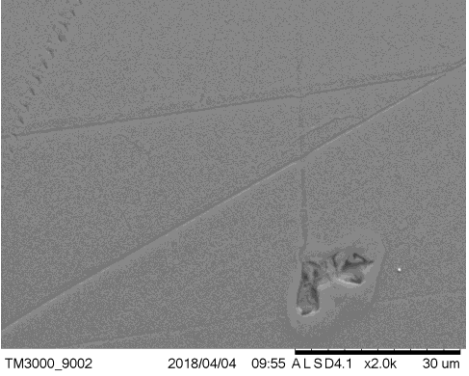


Nota. Meio de cultura CBD, $t = 28\text{ }^{\circ}\text{C}$, agitação 150 rpm.

A figura S4 (A-H) do material suplementar contém imagens dos espectros de FTIR aumentadas para melhor observação das alterações frente aos tratamentos aplicados.

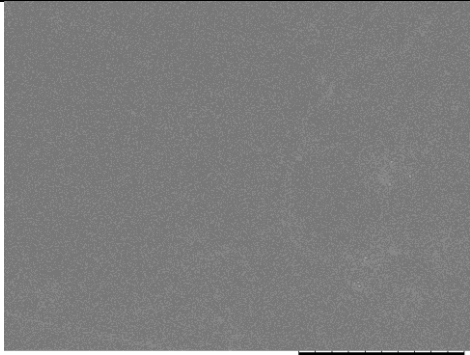
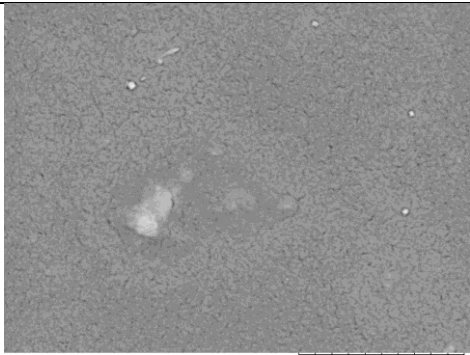
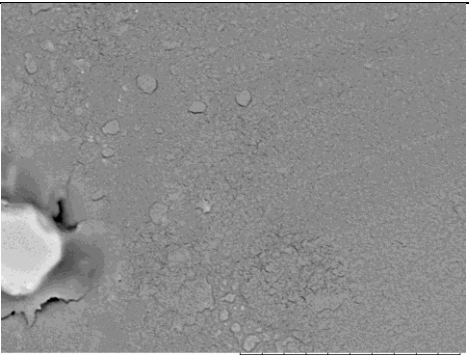
A Figura 12 contém as micrografias por MEV dos fragmentos de PET 1 e PET 2 após fermentação no meio CBD e apresenta ação sobre os polímeros para todos os tratamentos testados.

Figura 12- Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) demonstrando ação dos isolados *Trichoderma* sp CBMAI 2073 e *Cladosporium* sp CBMAI 2075 sobre as amostras de PET 1 e PET 2, em comparação ao controle abiótico (meio caldo CBD, sem inóculo).

Ensaio	PET 1	PET 2
Controle abiótico		
<i>Trichoderma</i> sp CBMAI 2073		
<i>Cladosporium</i> sp CBMAI 2075		

Nota. As imagens foram obtidas após limpeza dos fragmentos de PET que ficaram por 40 ou 14 dias em caldo CBD, 28°C, 150 rpm.

Continuação Figura 12- Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) demonstrando ação dos isolados *Curvularia* sp CBMAI 2111 e *Trichoderma* sp CBMAI 2071 sobre as amostras de PET 1 e PET 2, em comparação ao controle abiótico (meio caldo CBD, sem inóculo).

Ensaio	PET 1	PET 2
Controle abiótico		
<i>Curvularia</i> sp CBMAI 2111		
<i>Trichoderma</i> sp CBMAI 2071		

Nota. As imagens foram obtidas após limpeza dos fragmentos de PET que ficaram por 40 ou 14 dias em caldo CBD, 28°C, 150 rpm.

Discussão

Fungos filamentosos isolados de diferentes amostras ambientais foram investigados neste trabalho (Tabela 1). Desses, um total de 27 linhagens apresentou potencial para hidrolizar enzimaticamente as nanopartículas de PET liberando ácido tereftálico em concentrações acima de 0,1%. Sabe-se que linhagens com habilidade para mobilizar

polímeros são reconhecidamente boas produtoras de hidrolases dos tipos lipases, esterases e cutinases (BARTH et al., 2015).

A utilização preliminar de NPPET para testar a atividade enzimática foi abordada visando selecionar representantes produtores de poliéster-hidrolases. Em geral, as nanopartículas apresentam alta razão de superfície exposta em relação ao volume ocupado, o que permite maior acesso enzimático quando comparado a outras formas estruturais tais como, filmes ou fibras (WALTER et al., 1995). Utilizando o teste de HTS, este trabalho identificou seis linhagens com valores acima de 2% de conversão de NPPET, enquanto em outra pesquisa os melhores resultados ficaram por volta de 1% (CHAVES et al., 2018). Nesta triagem, quatro isolados foram selecionados para análises mais aprofundadas, *Curvularia* sp (CBMAI 2111), duas linhagens de *Trichoderma* spp (CBMAI 2071 e CBMAI 2073) e *Cladosporium* sp (CBMAI 2075) (Tabela 2).

As avaliações das atividades enzimáticas com sondas esterificadas fluorescentes de cadeia curta (2 carbonos) e longa (8 carbonos) previamente realizadas com estas linhagens são abordadas na Tabela S1 do material suplementar. Em geral, observou-se que as linhagens não apresentaram bons resultados com as sondas. O isolado *Trichoderma* sp CBMAI 2071, por exemplo, não foi capaz de convertê-las nas condições testadas. Yoshida et al. (2016) recentemente identificaram uma nova bactéria, a qual chamaram *Ideonella sakaiensis*, capaz de aderir à superfície do PET e secretar enzimas caracterizadas como *cutinases-like* e denominadas PETases, que assimilaram o polímero PET ao invés de outros substratos.

Ensaio em placas com meio mínimo mineral contendo os substratos cutina e policaprolactona ($\text{MM } 10000 \text{ g.mol}^{-1}$) foram executados com os isolados eleitos (Figura 6), e revelaram capacidade das linhagens de assimilar ambos os polímeros. Nimchua; Eveleigh; Punnapayak (2008) utilizaram meio mínimo com PCL no isolamento de fungos filamentosos produtores de enzimas, que implementaram a hidrofiliabilidade das fibras de PET. A policaprolactona é considerada um análogo da cutina, um biopoliéster insolúvel e componente estrutural da cutícula das plantas (SCHA, 1996). A Figura S2 do material suplementar sobrepõe espectros de FTIR destes polímeros e indica similaridade entre os dois.

Os gêneros *Curvularia* (DOS SANTOS et al., 2018), *Cladosporium* (BENSCH et al., 2012) e *Trichoderma* (VERMA et al., 2013) contêm representantes que são patógenos de plantas e na literatura, há relatos de genes codificadores de cutinase no genoma de

espécies como *Curvularia lunata*, *Trichoderma reesei* e *Cladosporium fulvum* (DE WIT et al., 2012; ROUSSEL et al., 2014; LIU et al., 2016). Portanto, os resultados obtidos pelo teste qualitativo em placas foram consistentes e por hora, justificam a afinidade destas enzimas ao substrato NPPET e baixa afinidade pelas sondas fluorgênicas esterificadas.

Apesar de as nanopartículas serem consideradas estruturalmente favoráveis à ação enzimática quando se visa a despolimerização do PET, estas não condizem com a disposição final do polímero. Considerar a transformação de todo o PET a ser reciclado em nanopartículas para submeter hidrólise enzimática também seria uma boa alternativa, uma vez que este processo pode fazer uso de solventes orgânicos halogenados ou metálicos, miscíveis em água e pouco seguros ao meio ambiente e ao homem, devido à sua toxicidade (WURM; WEISS, 2014). Por isso, optou-se por realizar os testes com as linhagens mais promissoras em fragmentos de garrafas PET, uma estrutura mais comumente encontrada.

O presente trabalho utilizou dois tipos de polímeros: PET 1 que é produzido com a tecnologia “plantbottle” e utiliza 30% do PET proveniente da cana-de-açúcar, sendo que este montante refere-se ao monoetilenoglicol (MEG), denominado BioMEG (THE COCA-COLA COMPANY, 2012), enquanto que PET 2 utiliza as tecnologias convencionais de produção, tendo recursos fósseis não renováveis como precursores. A Tabela 2 indica que os polímeros possuíam diferentes porcentagens de cristalinidade, determinadas em análises por DSC, 35,47 e 10,41%, para PET 1 e 2, respectivamente. Wei e Zimmerman (2017) relatam que PET de garrafas e fibras com alto grau de cristalinidade (acima de 30%) compõe o tipo mais abundante do polímero pós-consumo e pode não ser prontamente hidrolisado com eficiência em processos enzimáticos.

O fabricante da tecnologia patenteada “plantbottle” relata que a biodegradação do polímero não difere em relação às tecnologias convencionais, no entanto, alguns trabalhos comprovam maior eficiência de degradação enzimática para polímeros com cristalinidade em torno de 10% (MÜLLER et al., 2005; RONKVIST et al., 2009).

As linhagens *Trichoderma* sp CBMAI 2073 e *Cladosporium* sp CBMAI 2075 foram escolhidas para testar o meio de cultivo que favoreceu a despolimerização de PET. Dentre os meios de cultivo testados (MM1, MM2 e CBD- Tabela 3) ambas linhagens mostraram melhores atividades no CBD, promovendo maior despolimerização do PET em PTA e BHET, com diferença significativa ao nível de confiança de 95% ($P < 0,05$). Na literatura, tanto o meio mineral mínimo (BONHOMME et al., 2003; SHAH et al., 2007;

BELAL, 2013) como aqueles mais ricos em glicose (AWASTHI; SRIVASTAVA; SINGH, 2017) já foram utilizados em estudos de biodegradação/despolimerização de polímeros, no entanto, as informações são escassas e inconclusivas, o que nos levou a incluir essa abordagem em nossas análises.

Os parâmetros avaliados para verificar a degradação nos polímeros foram variação de massa, espectros por FTIR e imagens por microscopia eletrônica de varredura. Já no caldo fermentado foram tomadas as concentrações de monômeros (PTA) e oligômeros (BHET e MHET), bem como as atividades enzimáticas.

Quanto à variação de massa, como observado nas figuras 7 e 10, os resultados foram inconsistentes, visto que algumas amostras apresentaram ganho, enquanto outras perderam massa. Entretanto, a maioria dos trabalhos que testam a biodegradação aplica este parâmetro para avaliação do efeito das linhagens no polímero (NOWAK et al., 2011; SHARON; SHARON, 2012; DAS; KUMAR, 2015). El-Saffei et al (1998) consideraram esta abordagem inconclusiva, já que o ganho de massa pode ocorrer tanto pela adesão do micélio sobre o fragmento, como pela oxidação ou absorção de água do meio de cultivo. Esta abordagem também foi eleita neste trabalho, no entanto, a inconclusividade destes dados foi comprovada.

Devido às características de recalcitrância do PET, o que desencoraja estudos desse tipo, faz com que tenha pouca informação disponível na literatura sobre análises do polímero por FTIR. De acordo com Holland e Hay (2002) e Vijayakumar e Rajakumar (2012), os espectros provenientes de garrafas devem conter algumas vibrações de grupos que confirmem a presença de ligações químicas importantes, funcionando como “impressão digital” daquele material, que são: 1713 cm^{-1} (presença de grupo carbonila $\text{C}=\text{O}$ conjugado a anel aromático); 1234 cm^{-1} (estiramento assimétrico $\text{C}-\text{C}-\text{O}$ envolvendo o carbono em anel aromático); 728 cm^{-1} (movimentação de $\text{C}-\text{H}$ de anel aromático fora do plano); 872 cm^{-1} (estiramento de $\text{C}-\text{H}$ de anel aromático fora do plano); 1128 e 1091 cm^{-1} ($\text{O}-\text{C}-\text{C}$, divisão de alongamento assimétrico); 2960 cm^{-1} (estiramento assimétrico de $\text{C}-\text{H}$); 1505 cm^{-1} (estiramento $\text{C}-\text{C}$ de anel aromático); 1453 cm^{-1} (desvio/dobramento de $\text{C}-\text{H}$) e picos em 1408 cm^{-1} e 1339 cm^{-1} (deformação de $\text{C}-\text{H}$ de alcano). Vibrações, estiramentos e dobramentos podem variar de $0,5$ a $1,5\text{ cm}^{-1}$ em média.

Como verificado nas figuras 9 e 11, os tratamentos com as linhagens *Curvularia* sp CBMAI 2111, *Trichoderma* spp CBMAI 2071 e CBMAI 2073 e *Cladosporium* sp CBMAI 2075 promoveram alterações em vários pontos do espectro nas regiões supracitadas.

Nowak et al (NOWAK et al., 2011) e Yamada-Onodera et al (2001) em trabalhos com linhagens de *Penicillium* spp e PET obtiveram resultados similares aos que foram obtidos em nosso trabalho.

Jumaah (2015) estudando a biodegradação de polímeros do tipo polietileno, concluíram que algumas modificações observadas por FTIR no material são indicativos da ação do microrganismo sobre o elemento recalcitrante. Isso pode ser considerado um bom resultado, pois um microrganismo capaz de promover tais modificações (mesmo que pequenas) também poderá atuar sinergicamente com outros microrganismos aproximando-se da mineralização deste composto.

Visivelmente, os espectros de FTIR do PET 2 nos tratamentos com as linhagens mais promissoras (*Trichoderma* spp CBMAI 2071 e CBMAI 2073, *Cladosporium* sp CBMAI 2075 e *Curvularia* sp CBMAI 2111) apresentaram maior propensão às modificações do que as amostras de PET 1, sendo portanto, melhor degradadas pelas linhagens. Resultados da Tabela 4 destacam a alta cristalinidade do PET 1, o que proporcionalmente teria uma menor quantidade do polímero em sua forma amorfa, preferida para ação enzimática das hidrolases (WEBB et al., 2013).

As atividades enzimáticas quantificadas após o processo fermentativo para PET 1 e PET 2, com todas as linhagens abordadas neste estudo (Tabelas 6 e 8), demonstram a produção de enzimas extracelulares, lipases e esterases ou mesmo cutinases, que podem atuar sobre o polímero. Segundo Yamada-Onodera (2001) catalisadores biológicos extracelulares produzidos pelas hifas podem ajudar na rápida degradação de polímeros.

Dos parâmetros avaliados, no sentido de confirmar a despolimerização de PET, a determinação de monômeros e oligômeros é certamente a mais importante, visto que são estes os subprodutos que originarão novas garrafas. Salientamos que essa abordagem vai de encontro às necessidades do contexto atual da reciclagem e nos permite eleger linhagens com maior efetividade na despolimerização deste material.

A quantificação de monômeros e oligômeros constitui uma difícil tarefa, uma vez que consegue evidenciar um processo lento como a assimilação de um polímero pelo microrganismo (RESTREPO-FLÓREZ; BASSI; THOMPSON, 2014). Experimentos anteriores realizados por determinações cromatográficas de PTA no caldo fermentado sem pré-concentração, levou a resultados de quantificação abaixo do limite estabelecido para separação cromatográfica nas condições estabelecidas para este trabalho (dados não apresentados). Frequentemente, estratégias de pré-concentração, como a extração líquido-

líquido são necessárias para aumentar a recuperação dos analitos e confiabilidade dos resultados (KIM; LEE, 2012).

Nessa pesquisa, a separação cromatográfica dos analitos PTA, BHET e MHET foi determinada após extração líquido-líquido, por cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa. Os resultados mostraram que as linhagens estudadas foram capazes de converter os fragmentos de PET 1 e PET 2 em concentrações de monômero ácido tereftálico (PTA) entre 12 e 45 ppm para PET 1 e entre 17 e 55 ppm para PET 2. Os trabalhos que avaliam a biodegradação/despolimerização de PET frequentemente utilizam enzimas isoladas. Danso et al. (2018) avaliaram o potencial de biodegradação de uma enzima obtida em ambiente marinho por abordagem metagenômica (em seu trabalho denominada como PET 2) sobre 14 mg de PET amorfo (0% de cristalinidade) e obtiveram 900 µM (149 ppm) de ácido tereftálico após 24 horas de ação. Em outra análise, Zhang et al (2004) demonstraram a degradação de fibras de PET mediada por microrganismos não identificados (sinergismo por bactérias e fungos) com conversões para ácido tereftálico em concentrações entre 0,3 e 3,0 ppm. Quando comparamos nossos resultados com os da literatura, evidenciamos que as linhagens aqui estudadas podem ser apontadas como altamente promissoras na produção de enzimas para estudos de despolimerização de PET.

Apesar das análises por microscopia eletrônica de varredura (MEV) serem consideradas apenas qualitativas para avaliação dos efeitos do crescimento microbiano sobre polímeros (SHAH et al., 2008), consideramos seu emprego válido. As imagens obtidas (Figura 12) indicaram claramente que as 4 linhagens selecionadas foram capazes de promover alterações estruturais sobre o material, e corroboraram com os resultados obtidos nas demais análises realizadas na presente investigação.

O trabalho com as linhagens selecionadas permitiram vislumbrar importantes aplicações das mesmas na despolimerização de PET, entretanto, abordagens mais aprofundadas podem ser implementadas, por isso, estudos posteriores devem focar no isolamento, identificação e utilização destas enzimas em ensaios de biodegradação, além de promover a interação sinérgica entre estes microrganismos para avaliar na tentativa de incrementar este processo.

Conclusões

Trichoderma spp CBMAI 2071 e CBMAI 2073, *Cladosporium* sp CBMAI 2075 e *Curvularia* sp CBMAI 2111 são capazes de crescer em meio de cultura com cutina e

policaprolactona como única fonte de carbono. As análises qualitativas demonstram que as mesmas são possíveis produtoras de cutinases.

O meio de cultura caldo Batata Dextrose favorece a conversão de Polietilenotereftalato em PTA, BHET e MHET no cultivo com as linhagens *Trichoderma* sp CBMAI 2071 e *Cladosporium* sp CBMAI 2075.

As linhagens estudadas promovem resultados satisfatórios na despolimerização, de acordo as análises de atividades enzimáticas e liberação de monômeros (concentrações acima de 12 ppm) e oligômeros (concentrações acima de 0,6 ppm) no líquido fermentado. Elas também são capazes de evidenciar modificações importantes na estrutura química e superfície do polímero (por FTIR e MEV). Já a avaliação de variação de massa se dá como um parâmetro inconclusivo, uma vez que apresenta resultados bastante inconstantes.

Em comparação aos dois tipos de PET abordados neste estudo, o material com maior porcentagem de cristalinidade, aqui chamado de PET 1 demonstrou maior resistência à ação enzimática.

A metodologia utilizada para quantificação de monômeros e oligômeros é eficiente, uma vez que permite diferenciar linhagens capazes de atuar sobre o PET na forma estrutural em que o mesmo se encontra disponível no mercado.

Referências

- AL-SABAGH, A. M. et al. Greener routes for recycling of polyethylene terephthalate. **Egyptian Journal of Petroleum**. v. 25, n. 1, p. 53–64, 2016.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE PET (ABIPET). 9º Censo da Reciclagem de PET – Brasil O Ano 2012 PET no Brasil. 2013. Disponível em: <http://www.abipet.org.br/index.html?method=mostrarDownloads&categoria.id=3> Acesso em: 15 jun. 2018.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE PET (ABIPET). 10º Censo da Reciclagem de PET no Brasil. n. 32, 2014. Disponível em: <http://www.abipet.org.br/index.html?method=mostrarDownloads&categoria.id=3> Acesso em: 15 jun. 2018
- AWASTHI, S.; SRIVASTAVA, N.; SINGH, T. Biodegradation of thermally treated low density polyethylene by fungus *Rhizopus oryzae* NS 5. **3 Biotech**, v. 7, n. 1, p. 1–8, 2017.
- BARNES, D. K. A. et al. Accumulation and fragmentation of plastic debris in global environments. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 364, n. 1526, p. 1985–1998, 2009.
- BARTH, M. et al. Effect of hydrolysis products on the enzymatic degradation of polyethylene terephthalate nanoparticles. **Biochemical Engineering Journal**, v. 93, p. 222–228, 2015.

- BARTOLOME, L. et al. Recent developments in the chemical recycling of PET. In: D. ACHILIAS, D. Material Recycling—Trends and Perspectives, Ed.InTech, 2012.
- BELAL, E. B. Biodegradation of Aliphatic-aromatic Copolyester under Thermophilic Conditions. **Research Journal of Environmental and Earth Sciences**, v. 5, n. 11, p. 677–690, 2013.
- BENSCH, K. et al. The genus *Cladosporium*. **Studies in Mycology**, v. 72, p. 1–401, 2012.
- BILLIG, S. et al. Hydrolysis of cyclic Poly(ethylene terephthalate) trimers by a carboxylesterase from *Thermobifida fusca* KW3. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, n. 5, p. 1753–1764, 2010.
- BONHOMME, S. et al. Environmental biodegradation of polyethylene. **Polymer Degradation and Stability**, v. 81, n. 3, p. 441–452, 2003.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976.
- CANN, M. C. Green Chemistry Petretec – Dupont 's Technology For Polyester Regeneration. p. 1–22, 2018.
- CHAVES, M. R. B. et al. A practical fluorescence-based screening protocol for polyethylene terephthalate degrading microorganisms. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 29, n. 6, p. 1278–1285, 2018.
- CHEN, Z. et al. Purification and identification of cutinases from *Colletotrichum kahawae* and *Colletotrichum gloeosporioides*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 73, n. 6, p. 1306–1313, 2007.
- DANSO, D. et al. New insights into the function and global distribution of polyethylene terephthalate (PET)-degrading bacteria and enzymes in marine and terrestrial metagenomes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 84, n. 8, 2018.
- DAS, M. P.; KUMAR, S. An approach to low-density polyethylene biodegradation by *Bacillus amyloliquefaciens*. **3 Biotech**, v. 5, n. 1, p. 81–86, 2015.
- DE CASTRO, A. M. et al. Screening of commercial enzymes for poly(ethylene terephthalate) (PET) hydrolysis and synergy studies on different substrate sources. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 44, n. 6, p. 835–844, 2017.
- DE WIT, P. J. G. M. et al. The genomes of the fungal plant pathogens *Cladosporium fulvum* and *Dothistroma septosporum* reveal adaptation to different hosts and lifestyles but also signatures of common ancestry. **PLoS Genetics**, v. 8, n. 11, 2012.
- DI SOUZA, L.; TORRES, M. C. M.; RUVOLO FILHO, A. C. Despolimerização do poli(tereftalato de etileno) - PET: efeitos de tensoativos e excesso de solução alcalina. **Polímeros**, v. 18, n. 4, p. 334–341, 2008.
- DICKMAN, M.; PATIL, S. A rapid plate assay for detection of cutinases produced by plant pathogenic fungi. **Phytopathology**, v. 76, n. 5, p. 473–475, 1986.
- DOS SANTOS, P. R. R. et al. Morphological and molecular characterization of *Curvularia lunata* pathogenic to andropogon grass. **Bragantia**, v. 77, n. 2, p. 326–332, 2018.
- EBERL, A. et al. Enzymatic surface hydrolysis of Poly(ethylene terephthalate) and bis(benzoyloxyethyl) terephthalate by lipase and cutinase in the presence of surface active

molecules. **Journal of Biotechnology**, v. 143, n. 3, p. 207–212, 2009.

EL-SHAFEI, H. A. et al. Biodegradation of disposable polyethylene by fungi and *Streptomyces* species. v. 3910, n. 98, p. 361–365, 1998.

EUNOMIA. Plastics in the Marine Environment. **Biogeosciences**, v. 6, n. June, p. 1–13, 2016.

FRUMKIN, H.; HESS, J.; VINDIGNI, S. Energy and public health: The challenge of peak petroleum. **Public Health Reports**, v. 124, n. 1, p. 5–19, 2009.

GAMS, W.; HOEKSTRA, E.S.; APTOOT, A. CBS-Course of Mycology, 4. ed. The Netherlands: Baarn, 1998, 165p.

GUO, C.; ZHOU, L.; LV, J. Effects of expandable graphite and modified ammonium polyphosphate on the flame-retardant and mechanical properties of wood flour-polypropylene composites. **Polymers and Polymer Composites**, v. 21, n. 7, p. 449–456, 2013.

HE, X. A continuous spectrophotometric assay for the determination of diamondback moth esterase activity. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 54, n. 2, p. 68–76, 2003.

HOLLAND, B. J.; HAY, J. N. The thermal degradation of poly(vinyl acetate) measured by thermal analysis-Fourier transform infrared spectroscopy. **Polymer**, v. 43, n. 8, p. 2207–2211, 2002.

JUMAAH, O. S. Screening of plastic degrading bacteria from dumped soil area. **IOSR Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology**, v. 11, n. 05, p. 93–98, 2017.

KHANNA, Y. P.; KUHN, W. P. Measurement of crystalline index in nylons by DSC: Complexities and recommendations. **Journal of Polymer Science, Part B: Polymer Physics**, v. 35, n. 14, p. 2219–2231, 1997.

KHOONKARI, M. et al. Chemical Recycling of PET Wastes with Different Catalysts. **International Journal of Polymer Science**, v. 2015, 2015.

KOELMANS, A. A. et al. Plastics in the marine environment. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 33, n. 1, p. 5–10, 2014.

KIM, D. J.; LEE, K. T. Determination of monomers and oligomers in polyethylene terephthalate trays and bottles for food use by using high performance liquid chromatography- electrospray ionization-mass spectrometry. **Polymer Testing**, v. 31, n. 3, p. 490–499, 2012.

LIEBMINGER, S. et al. Hydrolysis of PET and bis-(benzoyloxyethyl) terephthalate with a new polyesterase from *Penicillium citrinum*. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 25, n. 2–4, p. 171–177, 2007.

LIU, T. et al. Genome-wide identification, classification and expression analysis in fungal-plant interactions of cutinase gene family and functional analysis of a putative ClCUT7 in *Curvularia lunata*. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 291, n. 3, p. 1105–1115, 2016.

MACEDO, G. A.; PIO, T. F. A rapid screening method for cutinase producing microorganisms. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, n. 4, p. 388–394, 2005.

MATAVULJ, M.; MOLITORIS, H. Marine fungi: Degradars of poly-3-hydroxyalkanoate

based plastic materials. **Zbornik Matice srpske za prirodne nauke**, n. 116, p. 253–265, 2009.

MÜLLER, R. J. et al. Enzymatic degradation of poly(ethylene terephthalate): Rapid hydrolyse using a hydrolase from *T. fusca*. **Macromolecular Rapid Communications**, v. 26, n. 17, p. 1400–1405, 2005.

NAPCOR. Report on Postconsumer PET Container Recycling Activity in 2012. p. 13, 2013.

NIMCHUA, T.; EVELEIGH, D. E.; PUNNAPAYAK, H. Screening of tropical fungi producing polyethylene terephthalate-hydrolyzing enzyme for fabric modification. **J Ind Microbiol Biotechnol**, p. 843–850, 2008.

NOONE, A. Collected PET bottles. In: Proceedings of 13th International Polyester Recycling Forum; 2008. Disponível em: <https://textination.de/en/presscomp/The%2013th%20International%20Polyester%20Recycling%20Symposium.pdf?PHPSESSID=3ffdf0d3ad5dabed9520082801b9df22>. Acesso em: 20 jul. 2018.

NOWAK, B. et al. Biodegradation of poly(ethylene terephthalate) modified with polyester “Bionolle®” by *Penicillium funiculosum*. **Polimery/Polymers**, v. 56, n. 1, p. 35–44, 2011.

PARK, S.; KIM, S. Poly (ethylene terephthalate) recycling for high value added textiles. **Fashion and Textiles**, v. 1, p. 1–17, 2014.

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

RAGHAVENDRACHAR, P.; RAMACHANDRAN, S. Liquid-Phase Catalytic Oxidation of *p*-xylene. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 31, p. 453–462, 1992.

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

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

RONKVIST, Å. M. et al. Cutinase-Catalyzed hydrolysis of poly(ethylene terephthalate). **Macromolecules**, n.42, p. 5128–5138, 2009.

ROUSSEL, A. et al. A Cutinase from *Trichoderma reesei* with a Lid-Covered Active Site and Kinetic Properties of True Lipases. **Journal of Molecular Biology**, v. 426, n. 22, p. 3757–3772, 2014.

SATO, M. Deterioration of filaments and films of Polyethyleneterephthalate with enzyme of *Cladosporium cladoporioides* FERM J-8. **Sen-I Gakkaishi**, v.39, n.5, p.67-77, 1983.

SCHA, W. Polycaprolactone Depolymerase Is Cutinase. **Microbiology**, v. 62, n. 2, p. 456–460, 1996.

SHAFEI, M. S.; MOHAMED, T. A.; ELSALAM, I. S. A. Optimization of extracellular lipase production by *Penicillium chrysogenum* using factorial design. **Malaysian Journal of Microbiology**, v. 7, n. 2, p. 71–77, 2011.

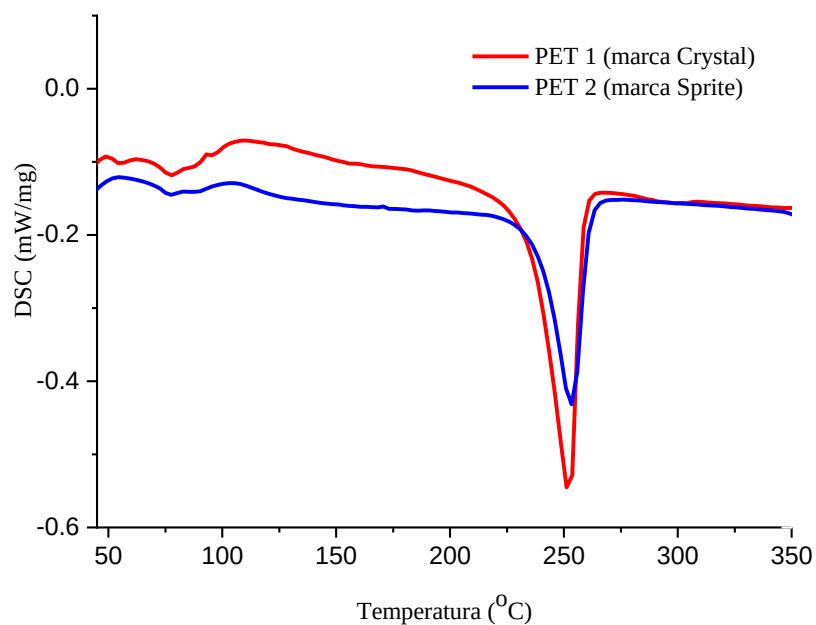
- SHAH, A. A. et al. Isolation and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) degrading bacteria and purification of PHBV depolymerase from newly isolated *Bacillus* sp. AF3. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 60, n. 2, p. 109–115, 2007.
- SHAH, A. A. et al. Biological degradation of plastics: A comprehensive review. **Biotechnology Advances**, v. 26, n. 3, p. 246–265, 2008.
- SHARON, C.; SHARON, M. Studies on Biodegradation of Polyethylene terephthalate: A synthetic polymer. **Journal of Microbiology and Biotechnology Research Scholars Research Library J. Microbiol. Biotech. Res.**, v. 2, n. 2, p. 248–257, 2012.
- SPEIRS, J.; MCGLADE, C.; SLADE, R. Uncertainty in the availability of natural resources: Fossil fuels, critical metals and biomass. **Energy Policy**, v. 87, p. 654–664, 2015.
- SPINACÉ, M. A. S; DE PAOLI, M.A. A tecnologia da reciclagem de polímeros. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 65–72, 2005.
- THE COCA-COLA COMPANY. PlantBottle Frequently Asked Questions: The Coca-Cola Company, 2012. Disponível em: <<http://www.coca-colacompany.com/stories/plantbottle-frequently-asked-questions>>. Acesso em: 02 ago. 2018
- VERMA, D. et al. Expression of fungal cutinase and swollenin in Tobacco chloroplasts reveals novel enzyme functions and/or substrates. **PLoS ONE**, v. 8, n. 2, p. 1–13, 2013.
- VIJAYAKUMAR, S.; RAJAKUMAR, P. R. Infrared spectral analysis of waste pet samples. **International Letters of Chemistry Physics and Astronomy**, v. 4, p. 58–65, 2012.
- WALTER, T. et al. Enzymatic degradation of a model polyester by lipase from *Rhizopus Delemar*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 17, n. 3, p. 218–224, 1995.
- WANG, X. et al. Preparation of a PET-hydrolyzing lipase from *Aspergillus oryzae* by the addition of bis(2-hydroxyethyl) terephthalate to the culture medium and enzymatic modification of PET fabrics. **Engineering in Life Sciences**, v. 8, n. 3, p. 268–276, 2008.
- WEBB, H. K. et al. Plastic degradation and its environmental implications with special reference to poly(ethylene terephthalate). **Polymers**, v. 5, n. 1, p. 1–18, 2013.
- WEI, R. et al. A high-throughput assay for enzymatic polyester hydrolysis activity by fluorimetric detection. **Biotechnology Journal**, v. 7, n. 12, p. 1517–1521, 2012.
- WEI, R.; ZIMMERMANN, W. Microbial enzymes for the recycling of recalcitrant petroleum-based plastics: how far are we? **Microbial Biotechnology**, v. 10, n. 6, p. 1308–1322, 2017.
- WURM, F. R.; WEISS, C. K. Nanoparticles from renewable polymers. **Frontiers in Chemistry**, v. 2, n. July, p. 1–13, 2014.
- XIE, M.; QIAO, Q.; SUN, Q. Environmental Impacts from PET Packaging Waste Management Using Life Cycle Assessment : A Case Study in China. n. 2006, p. 2–5, 2011.
- YAMADA-ONODERA, K. et al. Degradation of polyethylene by a fungus, *Penicillium simplicissimum* YK. **Polymer degradation and stability**, v. 72, n. 2, p. 323–327, 2001.
- YOSHIDA, S. et al. Response to Comment on “A bacterium that degrades and assimilates poly(ethylene terephthalate)”. **Science**, v. 353, n. 6301, p. 759–759, 2016.

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

ZIMMERMANN, W.; BILLIG, S. Enzymes for the Biofunctionalization of Poly (Ethylene Terephthalate). **Adv Biochem Eng Biotechnol**. v. 125, p. 97–120, 2011.

Material suplementar

Figura S1. Termogramas dos fragmentos de PET 1 (marca Crystal) e PET 2 (marca Sprite), temperaturas de fusão- PET1= 251,12 °C e PET 2= 253,41 °C.



$$X_c = \frac{\Delta H_m}{\Delta H_{mc}} \times 100$$

Equação S1. Cálculo da porcentagem de Cristalinidade das amostras

Onde: ΔH_m = entalpia de fusão para a amostra

ΔH_{mc} = calor de fusão do PET cristalino

Figura S2. Espectros de absorção no Infravermelho para Policaprolactona (em diclorometano) e cutina em pó extraída das cascas de maçã *Fuji*. As amostras foram preparadas em pastilhas de KBr.

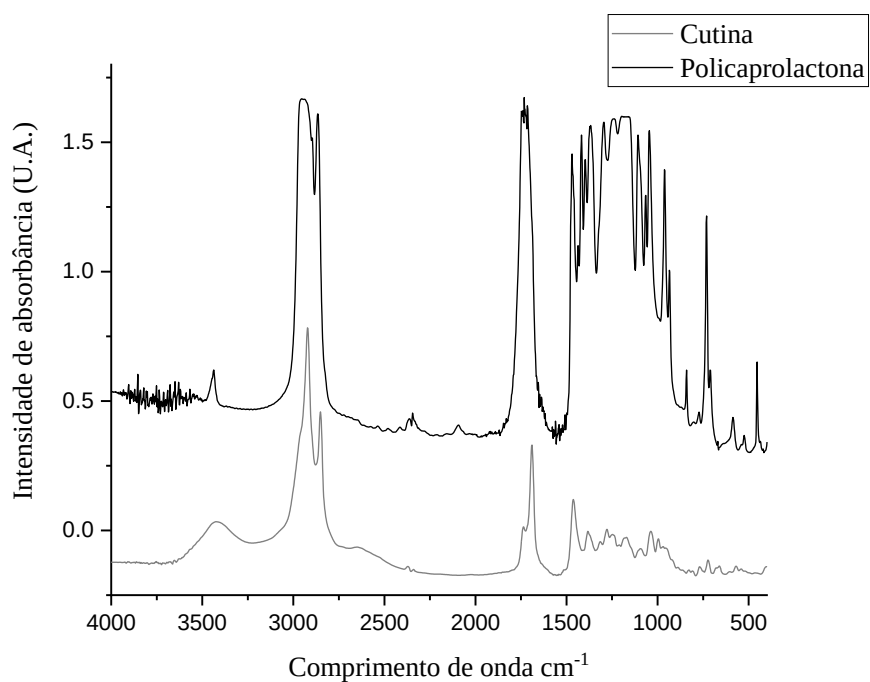


Figura S3 A. Espectros de FTIR da região 4000- 3000 cm^{-1} do tratamento com o isolado *Trichoderma* sp CBMAI 2073 em PET 1.

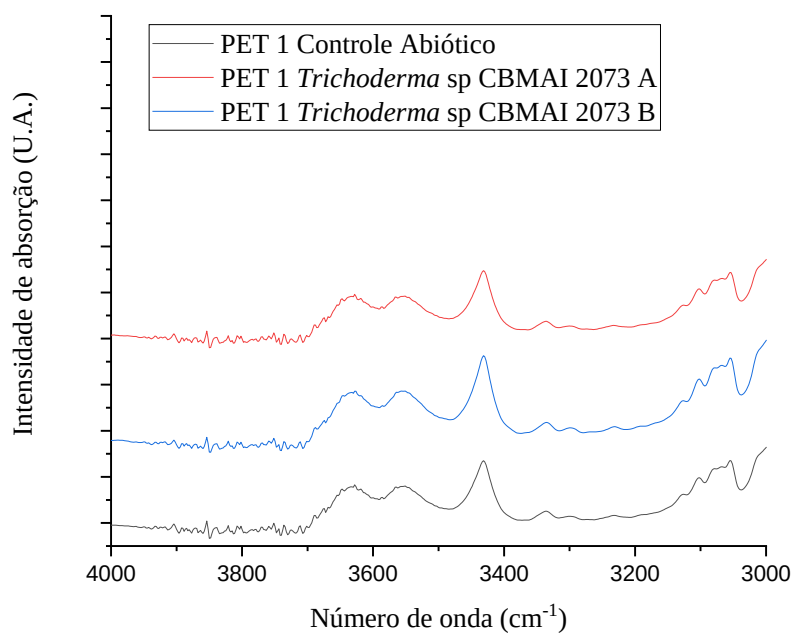


Figura S3 B. Espectros de FTIR da região 3000- 2000 cm^{-1} do tratamento com o isolado *Trichoderma* sp CBMAI 2073 em PET 1.

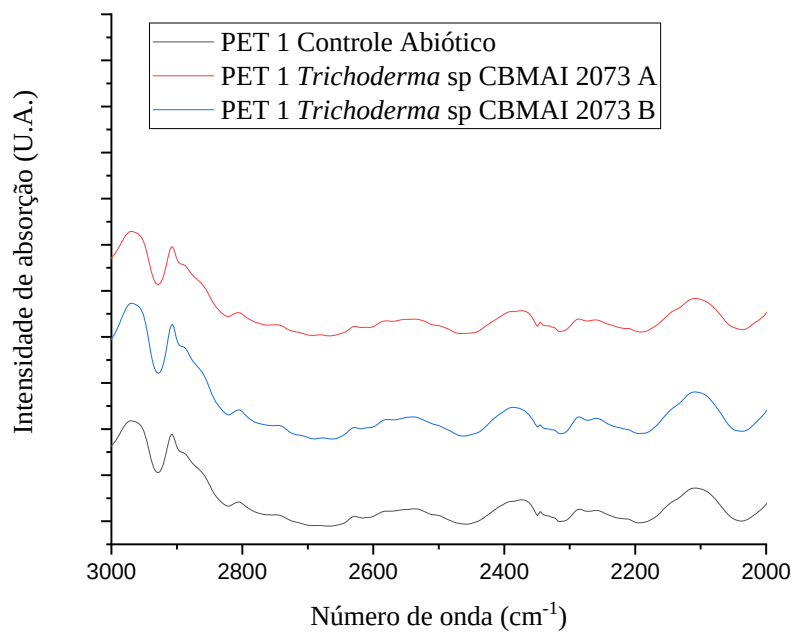


Figura S3 C. Espectros de FTIR da região 2000- 1000 cm^{-1} do tratamento com o isolado *Trichoderma* sp CBMAI 2073 em PET 1.

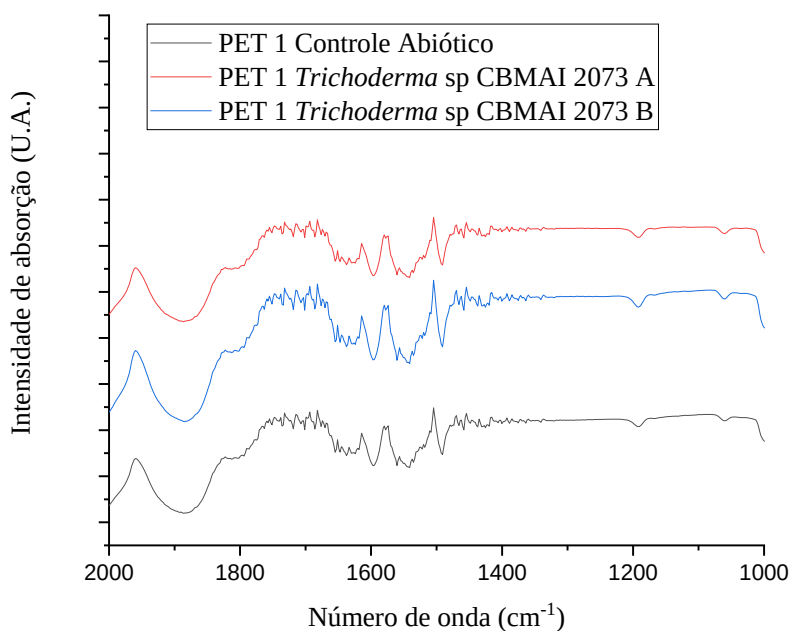


Figura S3 D. Espectros de FTIR da região 1000- 400 cm^{-1} do tratamento com o isolado *Trichoderma* sp CBMAI 2073 em PET 1.

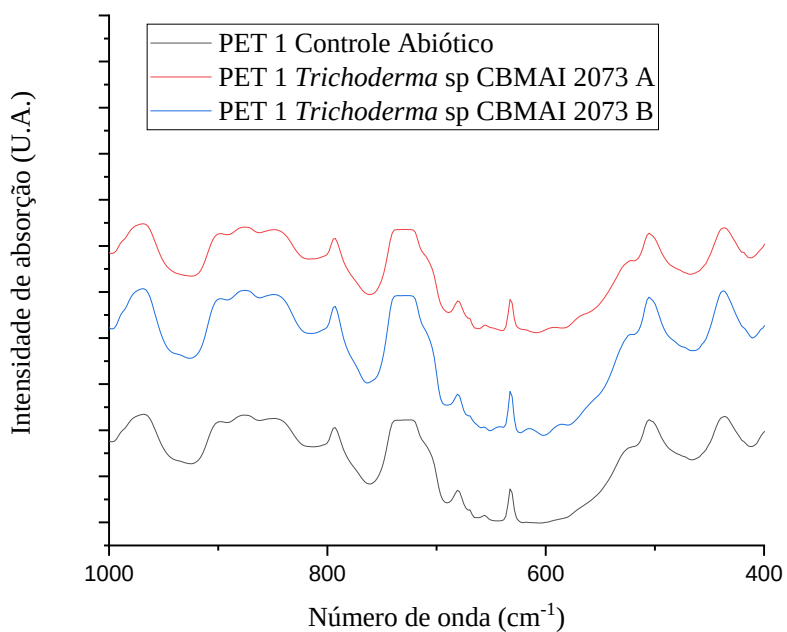


Figura S3 E. Espectros de FTIR da região 4000- 3000 cm^{-1} do tratamento com o isolado *Trichoderma* sp CBMAI 2073 em PET 2.

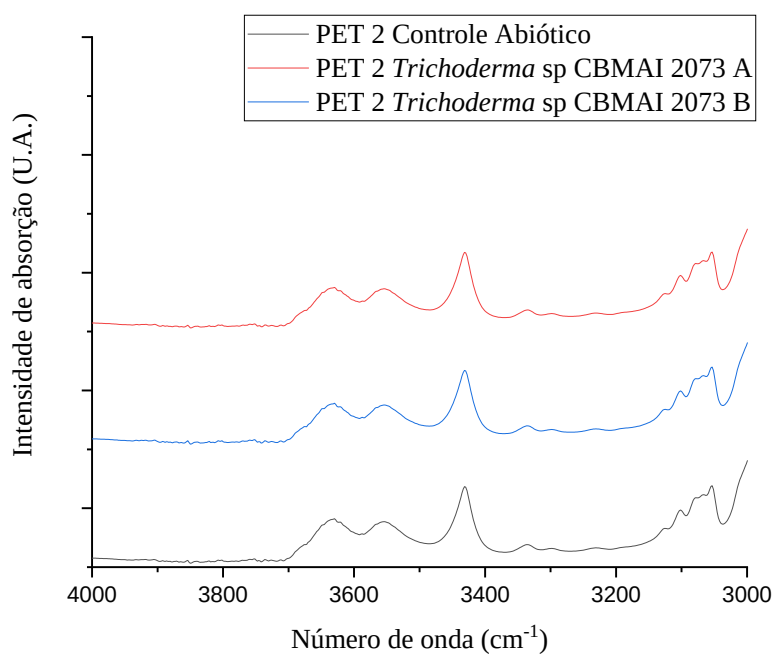


Figura S3 F. Espectros de FTIR da região 3000- 2000 cm^{-1} do tratamento com o isolado *Trichoderma* sp CBMAI 2073 em PET 2.

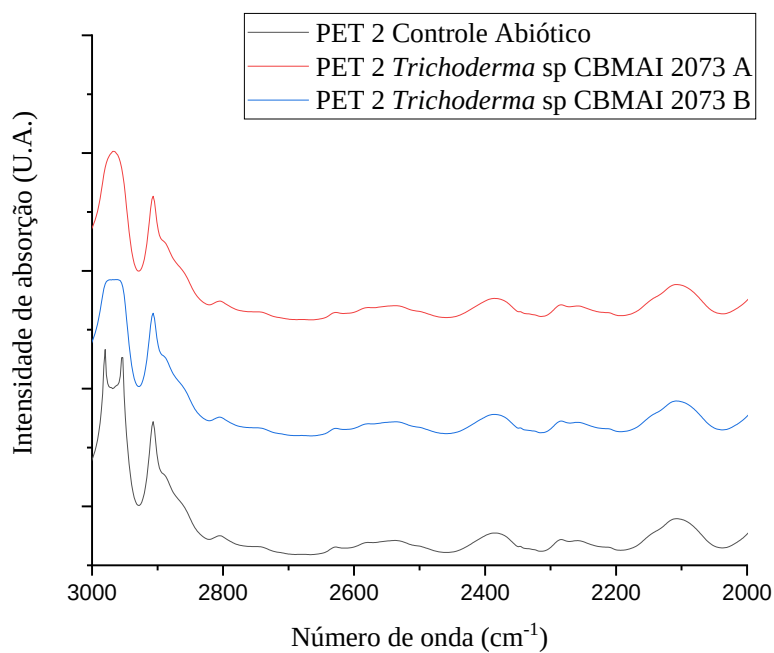


Figura S3 G. Espectros de FTIR da região 2000- 1000 cm^{-1} do tratamento com o isolado *Trichoderma* sp CBMAI 2073 em PET 2.

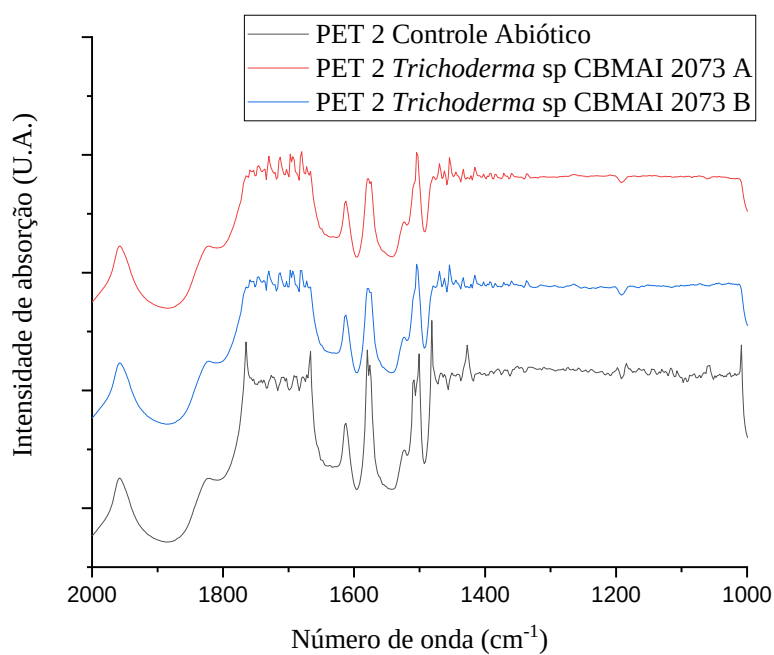


Figura S3 H. Espectros de FTIR da região 1000- 400 cm^{-1} do tratamento com o isolado *Trichoderma* sp CBMAI 2073 em PET 2.

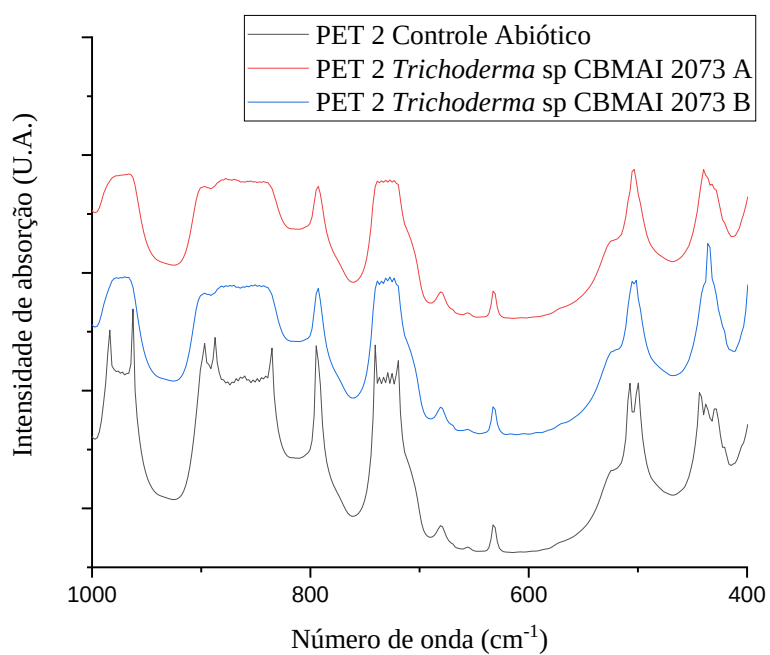


Figura S3 I. Espectros de FTIR da região 4000- 3000 cm^{-1} do tratamento com o isolado *Cladosporium* sp CBMAI 2075 em PET 1.

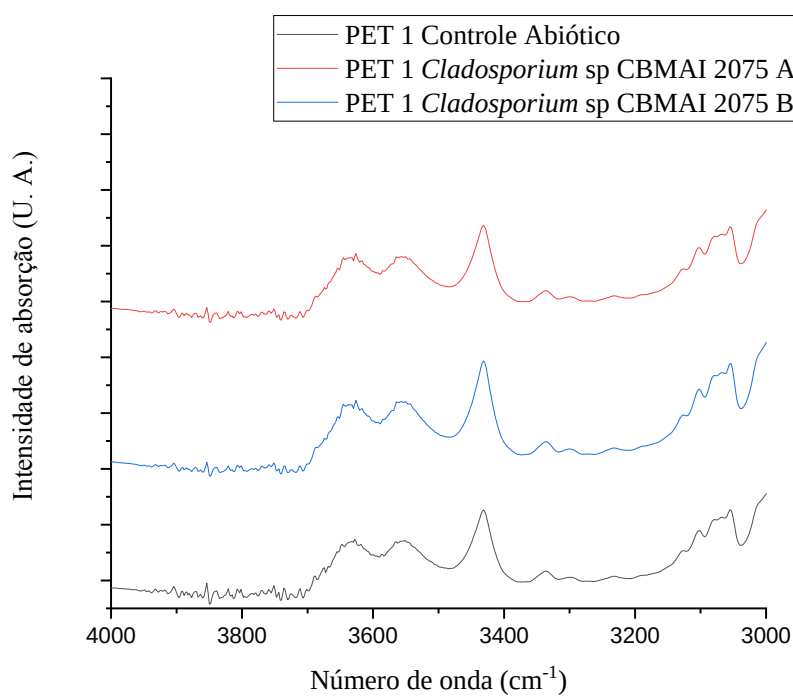


Figura S3 J. Espectros de FTIR da região 3000- 2000 cm^{-1} do tratamento com o isolado *Cladosporium* sp CBMAI 2075 em PET 1.

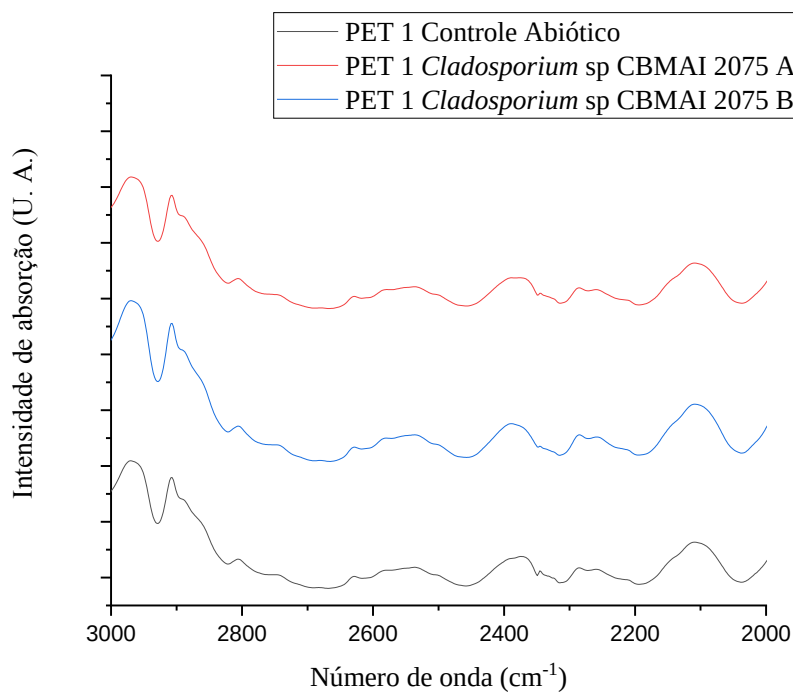


Figura S3 K. Espectros de FTIR da região 2000- 1000 cm^{-1} do tratamento com o isolado *Cladosporium* sp CBMAI 2075 em PET 1.

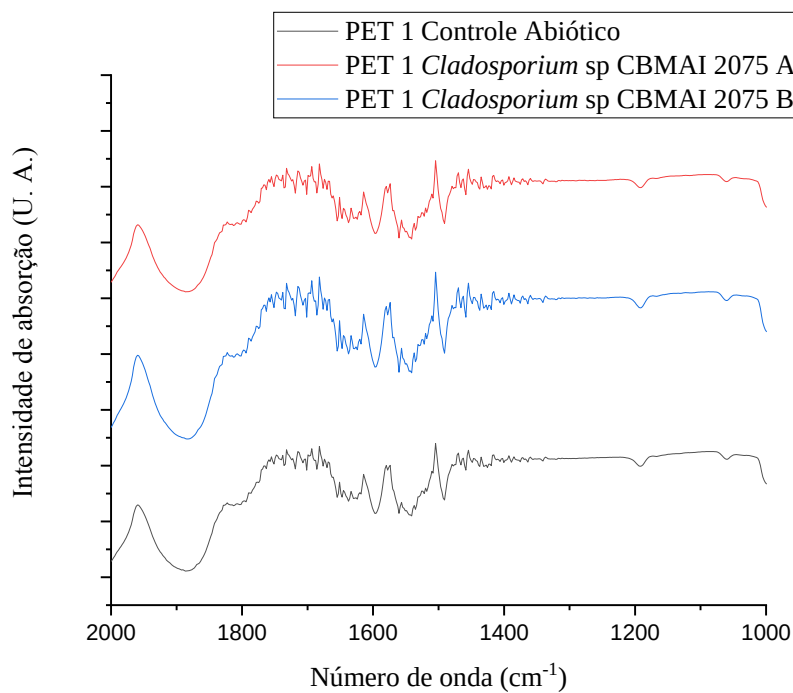


Figura S3 L. Espectros de FTIR da região 1000- 400 cm^{-1} do tratamento com o isolado *Cladosporium* sp CBMAI 2075 em PET 1.

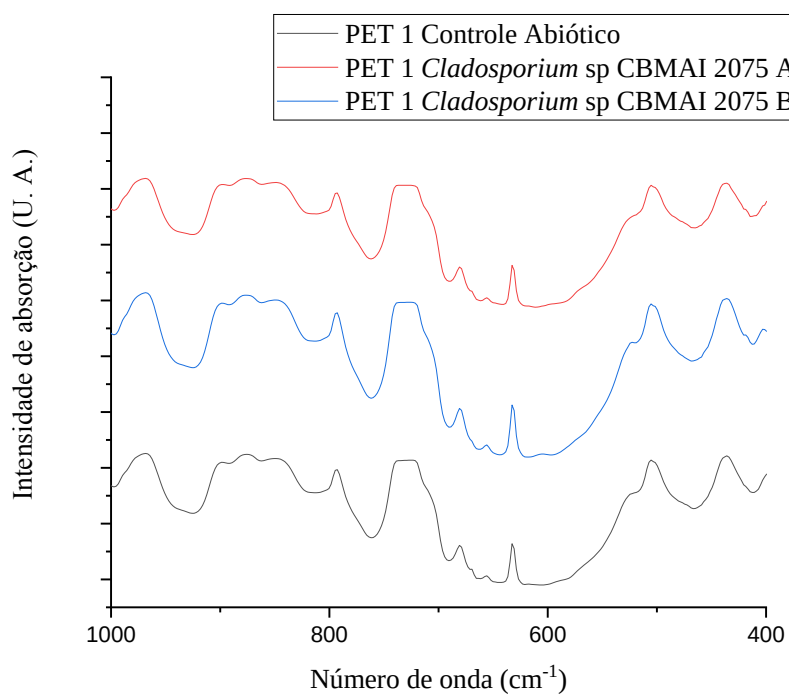


Figura S3 M. Espectros de FTIR da região 4000- 3000 cm^{-1} do tratamento com o isolado *Cladosporium* sp CBMAI 2075 em PET 2.

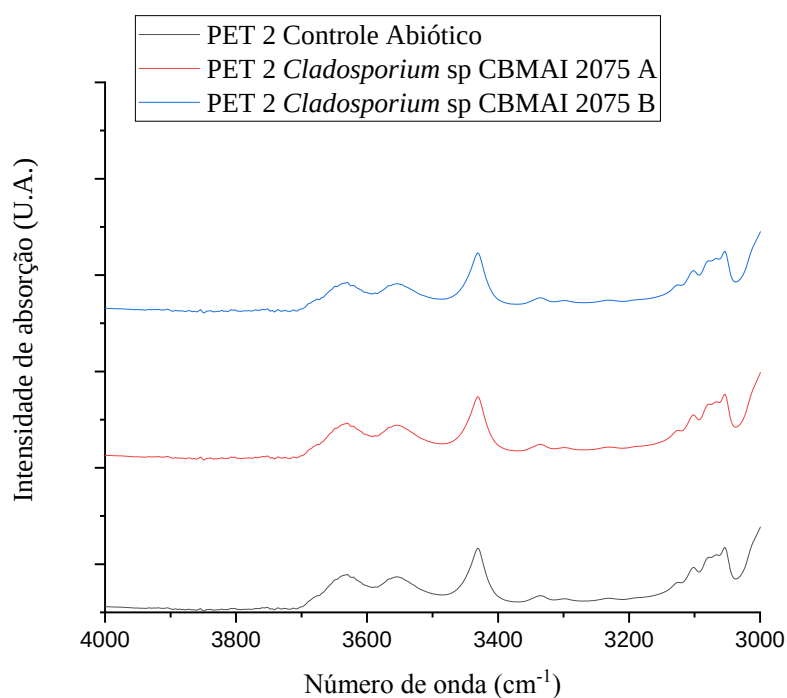


Figura S3 N. Espectros de FTIR da região 3000- 2000 cm^{-1} do tratamento com o isolado *Cladosporium* sp CBMAI 2075 em PET 2.

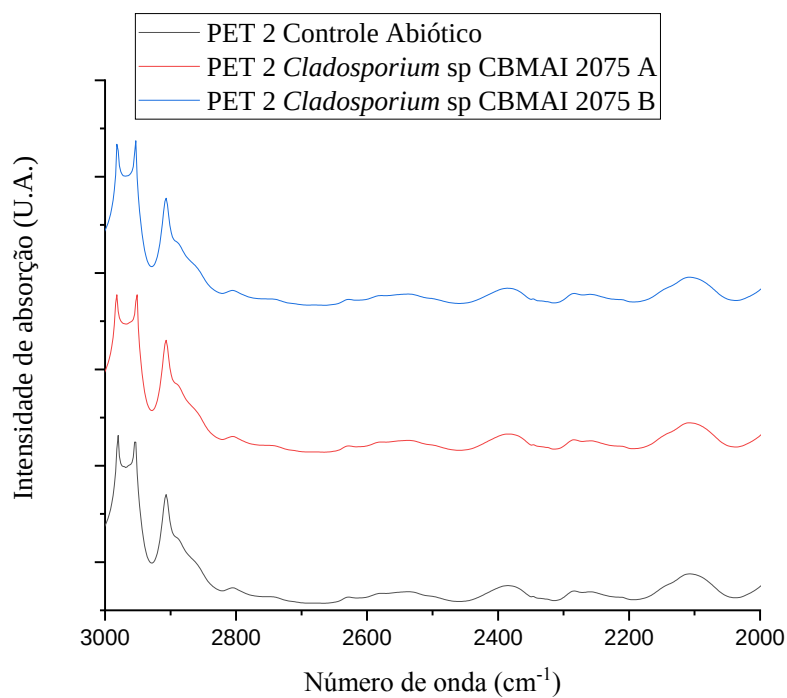


Figura S3 O. Espectros de FTIR da região 2000- 1000 cm^{-1} do tratamento com o isolado *Cladosporium* sp CBMAI 2075 em PET 2.

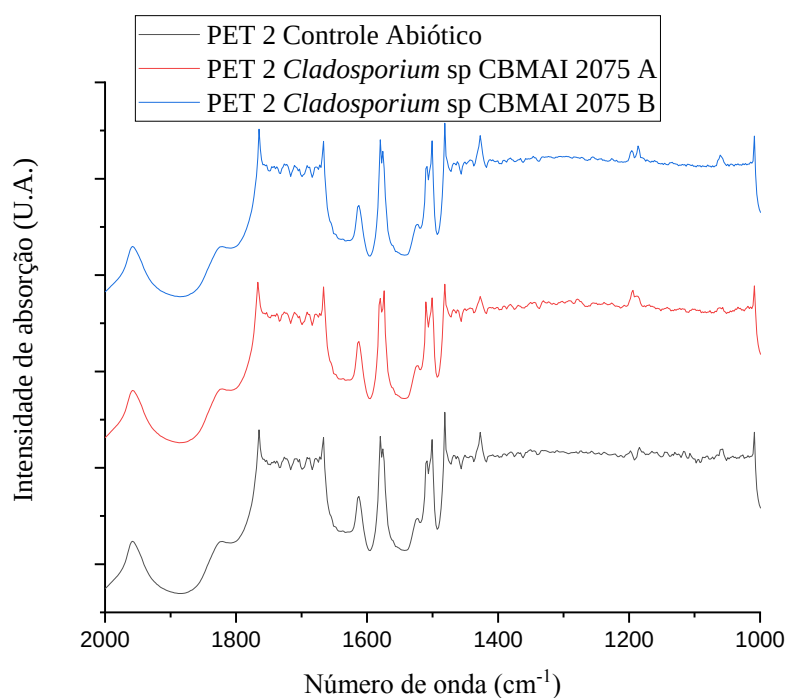


Figura S3 P. Espectros de FTIR da região 1000- 400 cm^{-1} do tratamento com o isolado *Cladosporium* sp CBMAI 2075 em PET 2.

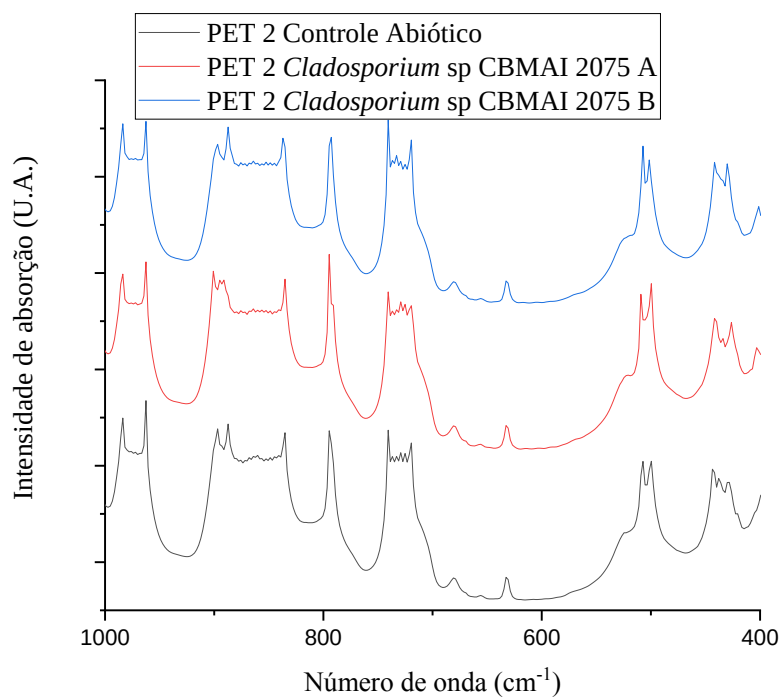


Figura S4 A. Espectros de FTIR da região 4000- 3000 cm^{-1} dos tratamentos com os isolados *Curvularia* sp CBMAI 2111 e *Trichoderma* sp CBMAI 2071 em PET 1.

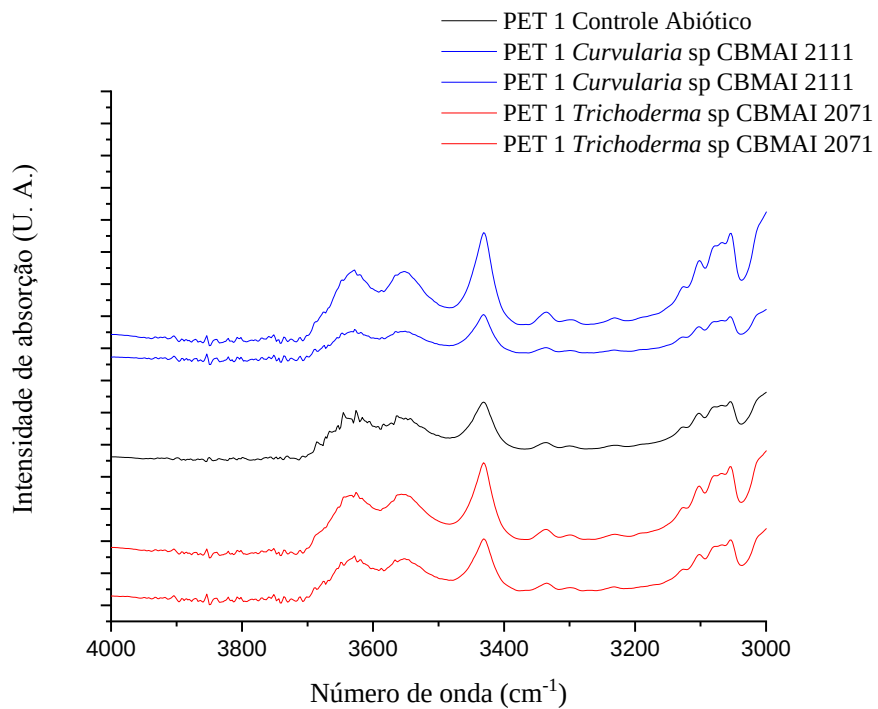


Figura S4 B. Espectros de FTIR da região 3000- 2000 cm^{-1} dos tratamentos com os isolados *Curvularia* sp CBMAI 2111 e *Trichoderma* sp CBMAI 2071 em PET 1.

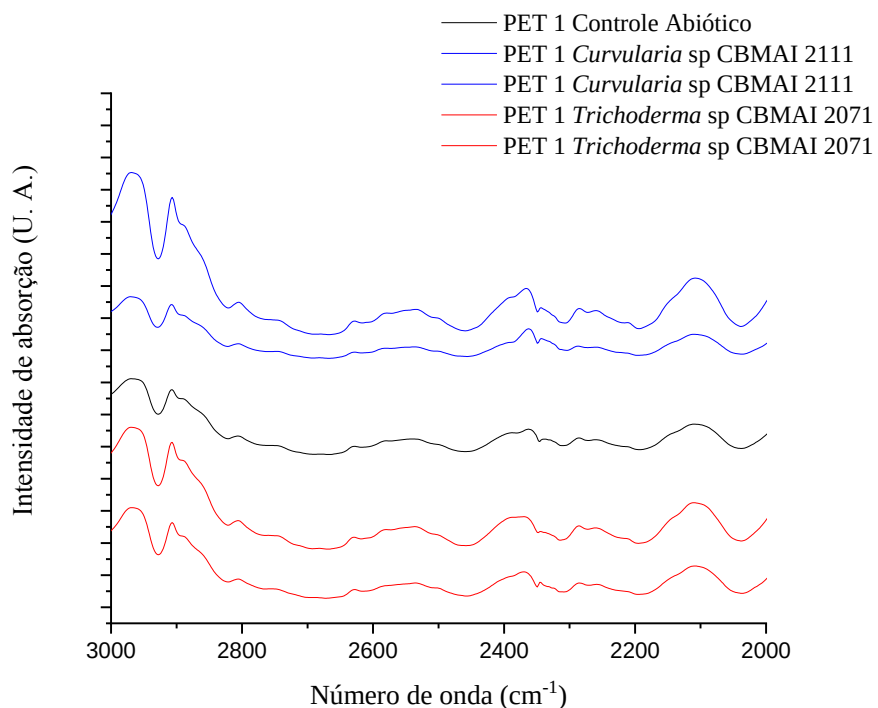


Figura S4 C. Espectros de FTIR da região 2000- 1000 cm^{-1} dos tratamentos com os isolados *Curvularia* sp CBMAI 2111 e *Trichoderma* sp CBMAI 2071 em PET 1.

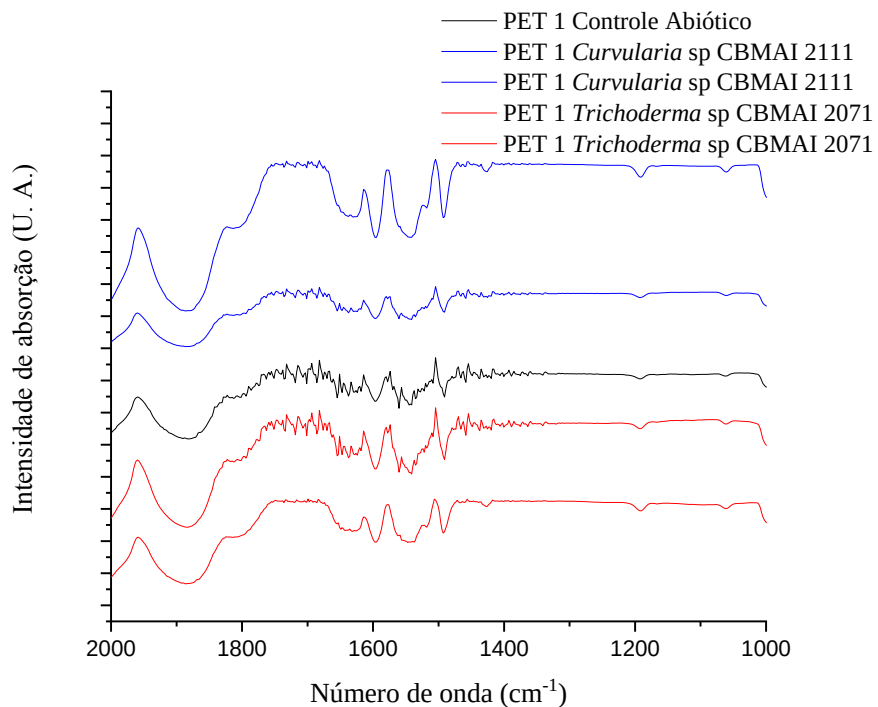


Figura S4 D. Espectros de FTIR da região 1000- 400 cm^{-1} dos tratamentos com os isolados *Curvularia* sp CBMAI 2111 e *Trichoderma* sp CBMAI 2071 em PET 1.

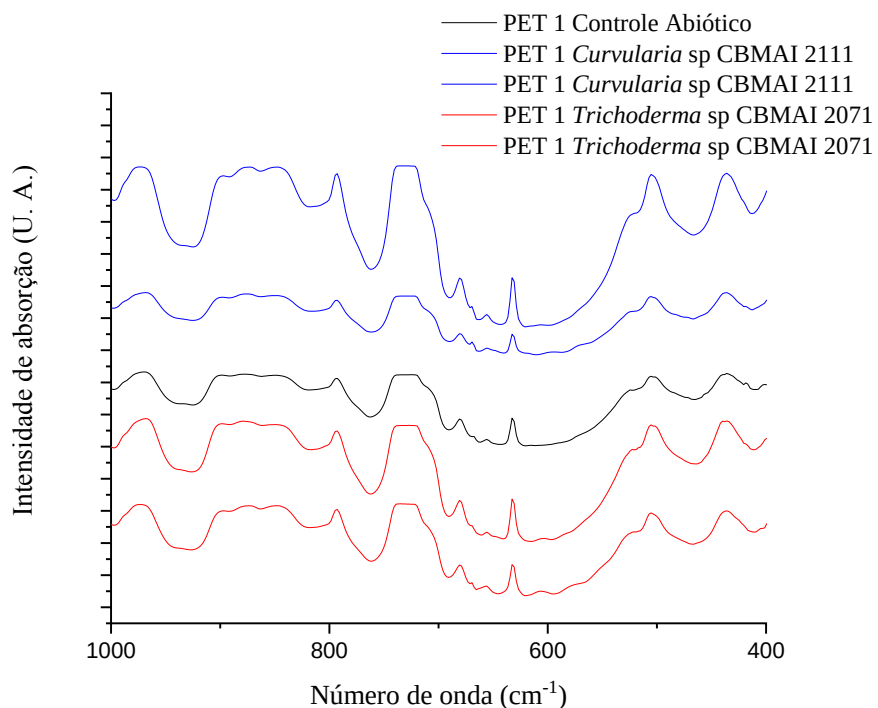


Figura S4 E. Espectros de FTIR da região 4000- 3000 cm^{-1} dos tratamentos com os isolados *Curvularia* sp CBMAI 2111 e *Trichoderma* sp CBMAI 2071 em PET 2.

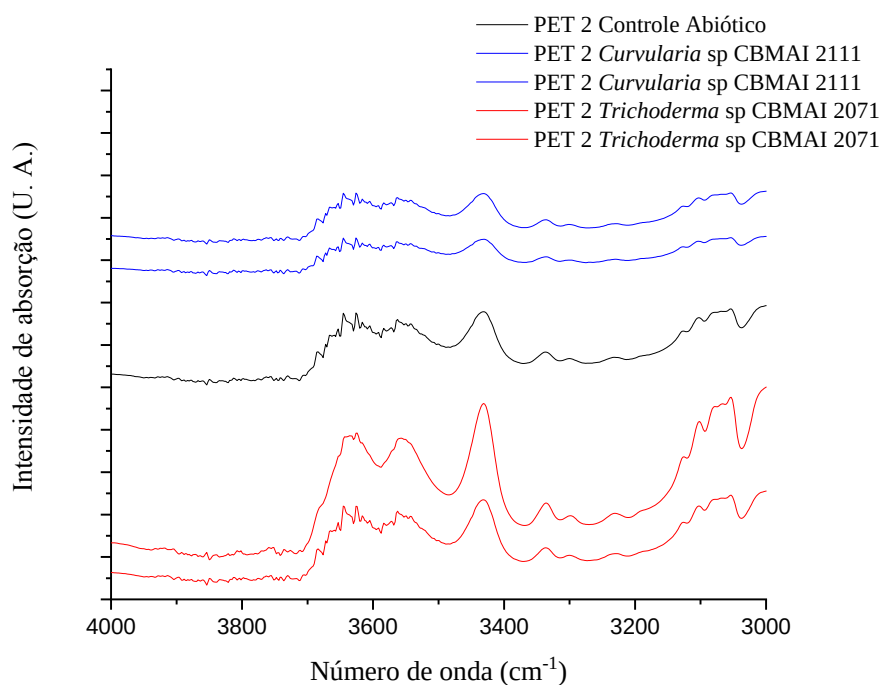


Figura S4 F. Espectros de FTIR da região 3000- 2000 cm^{-1} dos tratamentos com os isolados *Curvularia* sp CBMAI 2111 e *Trichoderma* sp CBMAI 2071 em PET 2.

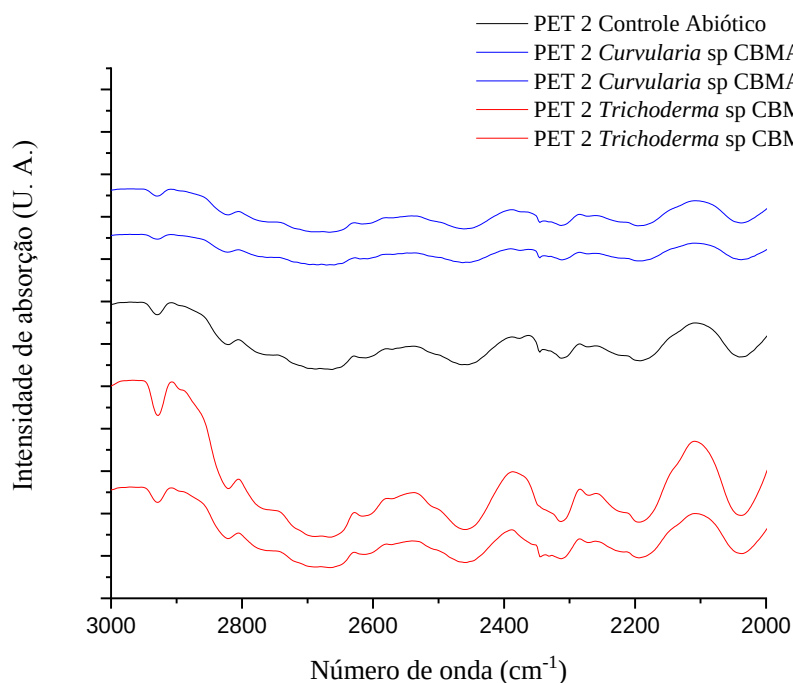


Figura S4 G. Espectros de FTIR da região 2000- 1000 cm^{-1} dos tratamentos com os isolados *Curvularia* sp CBMAI 2111 e *Trichoderma* sp CBMAI 2071 em PET 2.

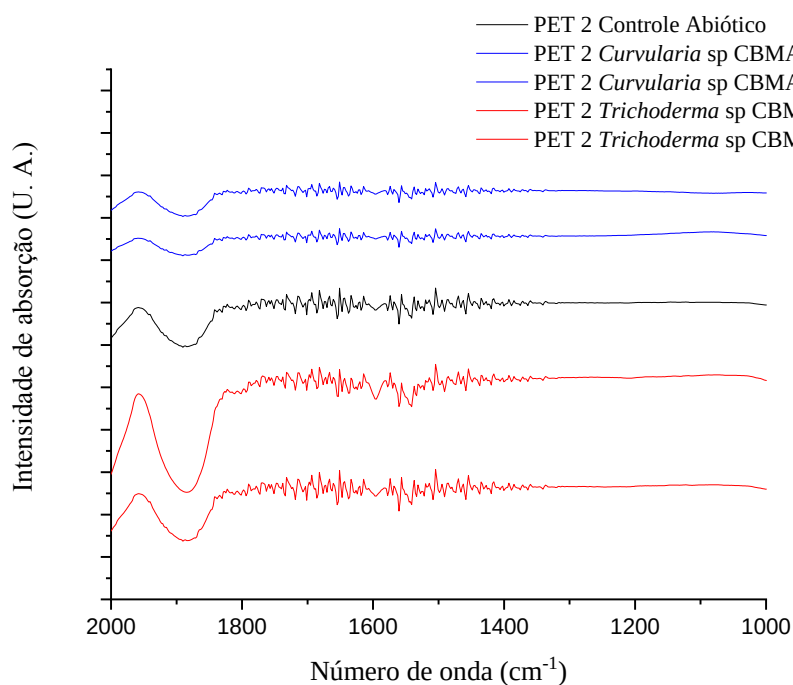


Figura S4 H. Espectros de FTIR da região 1000- 400 cm^{-1} dos tratamentos com os isolados *Curvularia* sp CBMAI 2111 e *Trichoderma* sp CBMAI 2071 em PET 1.

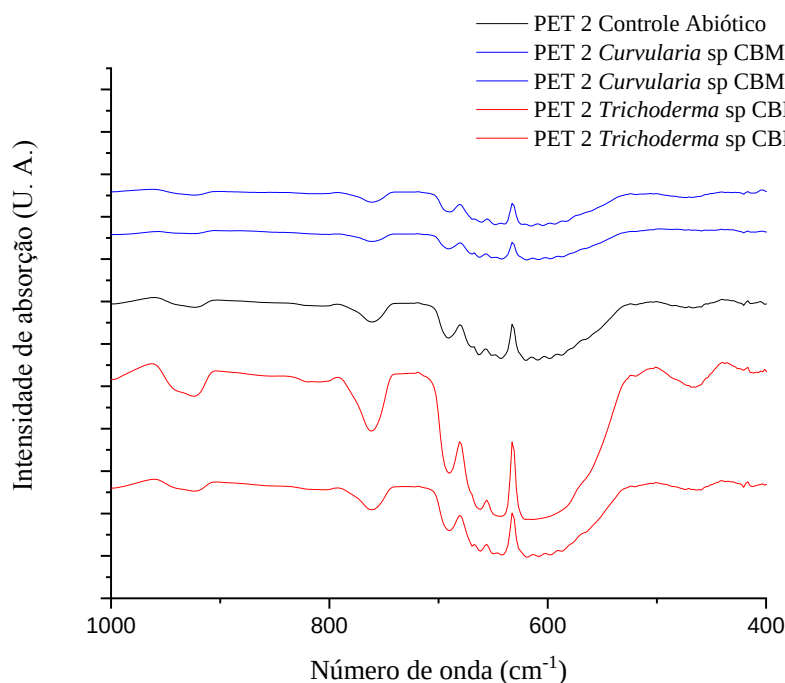


Tabela S1. Atividades de lipase e esterase determinada por HTS com sondas fluorescentes esterificadas (resultados expressos em média $\pm$ desvio padrão, n=4, tempo de análise 96 h.

Isolado (gênero e código)	% conversão	
	(sonda 2 carbonos)	(sonda 8 carbonos)
<i>Curvularia</i> sp CBMAI 2111	11,9 $\pm$ 0,1	10,8 $\pm$ 2,1
<i>Trichoderma</i> sp CBMAI 2073	37,2 $\pm$ 4,9	46,0 $\pm$ 3,4
<i>Trichoderma</i> sp CBMAI 2071	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
<i>Cladosporium</i> sp CBMAI 2075	41,66 $\pm$ 0,8	41,2 $\pm$ 0,9

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

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

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

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

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

- Uma segunda abordagem foi elencar linhagens produtoras de enzimas com

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

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

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

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

REFERÊNCIAS

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

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

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

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

35–44, 2011.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ANEXO



**Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO**

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Comprovante de Cadastro de Acesso

Cadastro nº A9EC78B

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro: **A9EC78B**
Usuário: **UNICAMP**
CPF/CNPJ: **46.068.425/0001-33**
Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**
Finalidade do Acesso: **Pesquisa**

Espécie

Deuteromycetes sp
Deuteromycetos spp.

Título da Atividade: **Despolimerização de PET (polietilenotereftalato) para produção de ácido tereftálico e etilenoglicol por fungos filamentosos.**

Equipe

Derlene Attili de Angelis **UNICAMP**
Lusiane Malafatti Picca **UNESP Rio Claro**

Parceiras Nacionais

48.031.918/0018-72 / UNESP Rio Claro

Resultados Obtidos

Divulgação de resultados em meios científicos ou de comunicação

Identificação do meio onde foi divulgado: **VIII Congresso Brasileiro de Micologia**

Data do Cadastro: **14/06/2018 16:12:34**

Situação do Cadastro: **Concluído**



Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **16:13** de **14/06/2018**.



**SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
ASSOCIADO - SISGEN**