



**UNIVERSIDADE CATÓLICA DE PERNAMBUCO**  
PRÓ-REITORIA ACADÊMICA  
COORDENAÇÃO GERAL DE PÓS-GRADUAÇÃO  
MESTRADO EM DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS AMBIENTAIS

**ALÍCIA MARIA ANDRADE TORRES JARA**

**BIOFILMES E ENZIMAS SINTETIZADOS NO  
PROCESSO DE DEGRADAÇÃO DO TEREFTALATO  
DE POLIETILENO (PET) POR *Bacillus subtilis* e  
*Phanerochaete chrysosporium***

**Recife**

**2007**

**ALÍCIA MARIA ANDRADE TORRES JARA**

**BIOFILMES E ENZIMAS SINTETIZADOS NO  
PROCESSO DE DEGRADAÇÃO DO TEREFTALATO  
DE POLIETILENO POR *Bacillus subtilis* e  
*Phanerochaete chrysosporium***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais da Universidade Católica de Pernambuco, como pré-requisito para obtenção do título de **Mestre em Desenvolvimento de Processos Ambientais**.

Área de Concentração: Desenvolvimento de Processos Ambientais.

Linha de Pesquisa: Tecnologia e Meio Ambiente.

Orientadora: Profa. Dra. Galba Maria de Campos Takaki

**Recife**

**2007**

J37b

Jara, Alcía Maria Andrade Torres

Biofilmes e enzimas sintetizados no processo de degradação do tereftalato de polietileno (pet) por *Bacillus subtilis* e *phanerochaete chrysosporium* / Alcía Maria Andrade Torres Jará ; orientadora Galba Maria de Campos Takaki, 2007.

88 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Católica de Pernambuco. Pró-reitoria Acadêmica. Curso de Mestrado em desenvolvimento de Processos Ambientais, 2007.

1. Tereftalato de polietileno. 2. Biodegradação. 3. *Bacillus subtilis*. 4. Termoplásticos. I. Takaki, Galba Maria de Campos. II. Título.

CDU 628.4.043

**BIOFILMES E ENZIMAS SINTETIZADOS NO PROCESSO DE DEGRADAÇÃO DO  
TEREFTALATO DE POLIETILENO (PET) POR *Bacillus subtilis* e *Phanerochaete  
chrysosporium***

**Alicia Maria Andrade Torres Jara**

Examinadores:

---

Profa. Dra. Galba Maria de Campos Takaki  
Universidade Católica de Pernambuco- UNICAP  
Orientadora

---

Profa. Dra. Norma Buarque de Gusmão  
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

---

Prof. Dr. Carlos Alberto Alves da Silva  
Universidade Católica de Pernambuco - UNICAP

**A Deus pela vossa força,  
a minha querida MÃE  
Deuzonea Rodrigues de Andrade,  
por seu exemplo e incentivo, e  
a minha orientadora Profa. Galba Takaki,  
pelos grandiosos ensinamentos.**

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por iluminar meus caminhos e pela força do Espírito Santo;

À minha família, pelo incentivo e compreensão e em especial, minha prima Lúcia Araújo, ao meu primo Breno, ao meu sobrinho César Victor e minha irmã Lílian, pelo apoio em todos os momentos;

Ao Reitor da Universidade Católica de Pernambuco, Prof. Dr. Pe Pedro Rubens Ferreira Oliveira, S.J., por estar preocupado com a formação de recursos humanos, oferecendo ensino de qualidade;

Ao meu grande amigo Max Fonseca pela amizade, pelo incentivo e apoio;

Ao Prof. Dr. Nelson Durán e todos seus alunos do Laboratório de Química do Instituto de Química da UNICAMP, pela amizade, apoio e ensinamentos;

Aos Professores Dr. Elias Tambourgi e Flávio Vasconcelos pelo apoio dado na UNICAMP;

Aos funcionários da Universidade Católica de Pernambuco em especial Cristiano, Alexandre e Jorge pelo carinho e incentivo;

À Profa. Dra. Aline do Nascimento pelo auxílio com as eletromicrografias de varredura;

Aos professores do Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais Profa. Dra. Alexandra Amorim Salgueiro, Profa. Dra. Arminda Saconi Messias, Prof. Dr. Carlos Alberto Alves da Silva, Profa. Dra. Kaoru Okada e Profa. Dra. Leonie Asfora Sarubbo, Prof. Dr. Valdemir Alexandre dos Santos e Profa. Dra. Eliane Cardoso Vasconcelos pelos ensinamentos;

À Dra. Norma Suely Evangelista que mesmo tão distante contribuiu bastante para realização desta dissertação;

Aos meus queridos colegas do Mestrado em Desenvolvimento de processos Ambientais, em especial Ricardo, Antonio, Aline, Daniel e Humberto pelo companheirismo e amizade, construídos durante o curso;

Aos meus colegas do NPCIAMB, Glauber, Renato, Rafael, Marcelo, Adriana, Hélvia, Patrícia, Raquel, Juliana, Marcos, Petrusk, Luiza, Thayse, Charles, e em especial, Marta Cristina, pela grande amizade, companheirismo e apoio nos momentos difíceis;

Aos funcionários Sônia Maria de Souza, secretária do Núcleo e técnicos Severino Humberto de Almeida e Salatiel Joaquim, pela presteza, eficiência e apoio em todos os momentos;

À CAPES pela concessão da bolsa para realização do intercâmbio com a UNICAMP;

A todos que direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

# SUMÁRIO

<b>AGRADECIMENTOS</b>	i
<b>SUMÁRIO</b>	ii
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	iii
<b>LISTA DE TABELAS</b>	iv
<b>LISTA DE SÍMBOLOS</b>	v
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	vi
<b>RESUMO</b>	xiii
<b>ABSTRACT</b>	xiv
<b>CAPÍTULO 1</b>	
<b>1.1 Introdução</b>	16
<b>1.2 Objetivos</b>	18
<b>Objetivo Geral</b>	18
<b>Objetivos Específicos</b>	18
<b>1.3 Revisão da Literatura</b>	19
1.3.1 Histórico dos Polímeros	19
1.3.2 Consumo Mundial de Plásticos	19
1.3.3 Resíduos Sólidos e Impacto Ambiental	20
1.3.4 Classificação dos Plásticos	23
1.3.4.1 Termoplásticos	23
1.3.4.2 Termorrígidos (Termofixos)	24
1.3.4.3 Elastômeros (Borrachas)	24
1.3.5 Propriedades dos Plásticos	24
1.3.5.1 Aditivação de Polímeros	26
1.3.6 Produção de Polímeros	27
1.3.7 Tereftalato de Polietileno (PET)	29
1.3.7.1 Aditivação do PET	30
1.3.7.2 Obtenção da Garrafa PET	31
1.3.8 Utilização de Bactérias e Fungos na Degradação de Plásticos	33
1.3.8.1 Crescimento Microbiano e Alterações dos Polímeros Sintéticos	34

1.3.8.2 Enzimas Envolvidas no Processo de Degradação	36
<b>1.4 Referências Bibliográficas</b>	<b>37</b>
<b>CAPÍTULO 2</b>	
<b>Formação de Biofilmes e Produção de Enzimas por <i>Bacillus subtilis</i> em Superfícies de Tereftalato de Polietileno Simulando Degradação</b>	<b>43</b>
2.1. Resumo	46
2.2 Abstract	46
2.3 Introdução	46
2.4 Material e Métodos	47
2.5 Resultados e Discussão	51
2.6 Conclusões	55
2.7 Referências Bibliográficas	56
<b>CAPITULO 3</b>	
<b>Tratamentos com UV e Temperatura em Tereftalato de Polietileno Mediando Mudanças Poliméricas, Colonização e Detecção de Enzimas por <i>Phanerochaete chrysosporium</i></b>	<b>67</b>
3.1 Resumo	68
3.2 Abstract	68
3.3 Introdução	68
3.4 Material e Métodos	70
3.5 Resultados e Discussão	72
3.6 Conclusões	76
3.7 Referências Bibliográficas	76
<b>CONCLUSÕES GERAIS</b>	<b>86</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>88</b>



## LISTA DE FIGURAS

	<b>CAPÍTULO 1</b>	
Figura 1	Composição Média das Resinas nos Resíduos Plásticos Rígidos Separados em Programas de Coleta Seletiva (CEMPRE, 1998)	21
Figura 2	Estrutura Química do Eteno (GOMES, 2006)	27
Figura 3	Estrutura Química da Borracha – Butadieno (GOMES, 2006)	28
Figura 4	Estrutura do Tereftalato de Polietileno – PET (GOMES, 2006)	30
Figura 5	Pré- formas (LIMA, 2001)	32
Figura 6	Garrafa PET de 2L (LIMA, 2001)	32
	<b>CAPITULO 2</b>	
Figura 1	Microscopia Eletrônica de Varredura-MEV apresentando os biofilmes formados por <i>Bacillus subtilis</i> nas partículas de PET, após 60 dias de incubação em tereftalato de polietileno-PET, nas seguintes condições: A: e C - Controles (sem tratamento); B: Tratamento com temperatura de 35°C e D: Tratamento com 6 horas de irradiação da luz ultravioleta-UV	63
Figura 2	Toxicidade dos líquidos metabólicos livre de células após o contato contínuo do <i>Bacillus subtilis</i> com tereftalato de polietileno-PET, com e sem tratamento com luz ultravioleta e temperatura, após 60 dias de incubação, usando como bioindicador a <i>Artemia salina</i>	64
	<b>CAPITULO 3</b>	
Figura 1	Toxicidade dos líquidos metabólicos livre de células após o contato contínuo do <i>Phanerochaete chrysosporium</i> com tereftalato de polietileno-PET, com e sem tratamento, após 60 dias de incubação, usando como bioindicador a <i>Artemia salina</i>	83

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 2

Tabela 1	Crescimento bacteriano de <i>Bacillus subtilis</i> , formação de biofilme, proteínas totais produzidas e pH, com 30 e 60 dias de incubação com tereftalato de polietileno-PET com tratamento físico ou não	58
Tabela 2	Peso inicial das partículas do tereftalato polietileno-PET, com e sem tratamento com luz ultravioleta e temperatura com biofilme e após a remoção do biofilme, com 30 dias de incubação com o <i>Bacillus subtilis</i>	59
Tabela 3	Peso inicial das partículas do tereftalato polietileno-PET, com e sem tratamento luz ultravioleta e temperatura, com biofilme e após a remoção do biofilme, com 60 dias de incubação com o <i>Bacillus subtilis</i>	60
Tabela 4	Atividade enzimática detectada no líquido metabólico de <i>Bacillus subtilis</i> com 30 e 60 dias de incubação com tereftalato de polietileno-PET tratado ou não	61
Tabela 5	Biofilme formado por <i>Bacillus subtilis</i> em partículas de tereftalato de polietileno-PET, com e sem tratamento com ultravioleta e temperatura, após 60 dias de incubação	62
Tabela 6	CL <sub>50</sub> do teste de toxicidade com <i>Artemia salina</i> , com 30 dias de incubação do <i>Bacillus subtilis</i> com tereftalato de polietileno-PET com e sem tratamento com luz ultravioleta e temperatura	65

### CAPÍTULO 3

Tabela 1	Crescimento fúngico de <i>Phanerochaete chrysosporium</i> , formação de biofilme, proteínas totais produzidas e Ph, com 30 e 60 dias de incubação com tereftalato de polietileno-PET com tratamento com luz UV e temperatura	79
----------	--	----

Tabela 2	Peso inicial das partículas do tereftalato polietileno-PET, com e sem tratamento luz UV e temperatura, com biofilme e após a remoção do biofilme, com 30 dias de incubação com o <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	80
Tabela 3	Peso inicial das partículas do tereftalato polietileno-PET, com e sem tratamento luz UV e temperatura, com biofilme e após a remoção do biofilme, com 60 dias de incubação com o <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	81
Tabela 4	Atividade enzimática detectada no líquido metabólico de <i>Phanerochaete chrysosporium</i> com 30 e 60 dias de incubação com tereftalato de polietileno-PET tratado ou não com luz UV e temperatura	82
Tabela 5	CL <sub>50</sub> do teste de toxicidade com <i>Artemia salina</i> , com 30 dias de incubação do <i>Phanerochaete chrysosporium</i> com tereftalato de polietileno-PET com e sem tratamento com luz UV e temperatura	84

## LISTA DE ABREVIATURAS

PET	Tereftalato de polietileno
PEAD'S	Polietileno de Alta Densidade
PEBD'S	Polietileno de Baixa Densidade
PVC	Policloreto de Vinila
PR	Resina fenólica
PMMA	Poli (metilmetacrilato)
PS	Poliestireno
LDPE	Polietileno de baixa densidade
PU	Poliuretano
ER	Resina Epoxídica
POM	Polioximetileno
HDPE	Polietileno de alta densidade
PP	Polipropileno
PC	Policarbonato
ASTM	American Society for Testing Materials

## RESUMO

O Tereftalato de Polietileno – PET é um termoplástico polar, com elevada estabilidade dimensional e temperatura de fusão, alta impermeabilidade a gases e resistência química a ácidos e solventes, empregado na fabricação de garrafas no Brasil. A biodegradação tem sido descrita como uma possível metodologia para reduzir o acúmulo de plásticos. Neste trabalho foi avaliado o desempenho das linhagens de *Bacillus subtilis* e *Phanerochaete chrysosporium* isoladamente na biodegradação do tereftalato de polietileno. Neste sentido, foram preparadas partículas do polímero sendo submetidas aos tratamentos com luz ultra violeta (6 e 36 horas) e temperaturas (35°C e 50°C) em seguida, foram colocadas nos meios caldo nutriente (*B. subtilis*) e Sabouraud (*P. chrysosporium*), incubados por 30 e 60 dias, incubados a 35°C e 28°C, respectivamente. Com a degradação das partículas observou-se que o pH passou de 5 para >8, com formação de biofilmes e indução da produção de enzimas (amilase, protease, esterase e polifenoloxidasas). A formação do biofilme foi evidenciada por microscopia eletrônica de varredura. Os produtos metabólicos formados no meio de cultura foram avaliados pelo teste de toxicidade utilizando *Artemia salina*. A microscopia eletrônica demonstrou que *B. subtilis* colonizou completamente a superfície das partículas do PET, tanto nas condições controle (sem tratamento), como tratados. Os melhores resultados foram observados com o tratamento à temperatura de 50°C, onde ocorreu alteração na superfície do polímero, perda da massa polimérica, permitindo maior colonização de ambos os microrganismos. As enzimas hidrolíticas foram produzidas pelos microrganismos em todos os tratamentos, em especial, à temperatura de 50°C. Contudo, observou-se que *B. subtilis* não produziu polifenoloxidasas. Os subprodutos da degradação do PET nas condições estudadas apresentaram alta toxicidade para *Artemia salina* no caso do *P. chrysosporium* e baixa toxicidade para *B. subtilis*. Os resultados obtidos sugerem o tratamento o prévio com a temperatura de 50°C como importante para o processo de biorremediação.

**Palavras-Chave:** Tereftalato de polietileno, *Bacillus subtilis*, *Phanerochaete chrysosporium*, biodegradação, toxicidade.

## ABSTRACT

In recent years, the consumption of the poly ethylene terephthalate plastic - PET is used in the manufacture of bottles, comes increasing in Brazil. PET is a polar thermoplastic, with raised dimensional stability and temperature of fusion, high impermeability the acid gases and chemical resistance to solvents. The biodegradation has been described as a possible methodology to reduce the accumulation of plastics. In this work it was carried through the evaluation by *Bacillus subtilis* and *Phanerochaete chrysosporium* performance on the biodegradation of the polyethylene terephthalate. In this direction, particles of polymer were submitted to the treatments: exposition to ultra violet light (6 and 36 hours) and temperatures (35°C and 50°C), followed incubation with the microorganisms during 30 and 60 days. The polymer degradation process was accompanied by determination of pH, biofilm formation and the cells viability, enzymes detection (amylase, protease, esterase, and polyphenoloxidase), as well as the scanning electron microscopy of biofilm and toxicity tests. The results obtained observed the biofilm formation by *Bacillus subtilis* on polyethylene terephthalate surface particles. The treatment using the temperature of 50°C demonstrated a higher alteration in the surface of the polymer, supported the colonization of the microorganisms followed of the hydrolytic enzymes production. It was observed that *Bacillus subtilis* does not produced polyphenoloxidase. The results indicated the temperature (50°C), induces the esterase production and it is related to degradation process. The *P. chrysosporium* produced esterases and polyphenoloxidase, whose enzymes had demonstrated to be involved with the polyethylene terephthalate degradation process, and were formed products with higher toxicities to *Artemia salina*.

**Keywords:** Polyethylene terephthalate, *Bacillus subtilis*, *Phanerochaete chrysosporium*, biodegradation, toxicity.

## **CAPÍTULO 1**

## 1.1 Introdução

Nos últimos anos, o homem vem descobrindo a necessidade da preservação do ambiente em que vive, tendo em vista o aumento significativo do uso de polímeros sintéticos desde o começo do século XX (NDON et al., 1992). De acordo com estimativas, existem cerca de 100 milhões de toneladas por ano de polímeros sintéticos produzidos no mundo, no entanto, praticamente metade de toda esta produção é descartada rapidamente, permanecendo em depósitos de lixo e aterros sanitários por décadas. Desta forma, os plásticos sintéticos vêm se acumulando na natureza com uma taxa crescente de 25 milhões de toneladas/ano (AHN et al., 2001; REDIFF, 2006).

O tereftalato de polietileno (PET) foi introduzido no mercado brasileiro em 1988, e é um dos polímeros mais utilizados na atualidade, principalmente na fabricação de embalagens para refrigerantes (DUARTE, 2003). O manejo total dos resíduos plásticos requer combinações complementares de biodegradação, incineração e reciclagem (ALBERTSSON e HUANG, 1995). A biodegradação dos polímeros é um processo no qual bactérias, fungos filamentosos e leveduras expressam suas enzimas para utilizar parte da estrutura química, como fonte de carbono, modificando assim, a forma original do polímero (ROSA e CHUI, 2002; CHANDRA e RUSTIG, 1998).

Portanto, a busca de microrganismos capazes de degradar compostos xenobióticos é de grande interesse para os processos de biorremediação, principalmente na remoção de plásticos (CHANDRA e RUSTGI, 1998). Os microrganismos como *Streptomyces virisporus* e *Phanerochaete chrysosporium* são conhecidos pelo potencial enzimático na degradação da lignina (ROSA; PENTEADO; CALIL, 2000), e por conseguinte, os microrganismos que degradam lignina apresentam habilidade para degradar plásticos (LEE, 1991). Contudo, a biodegradabilidade do polímero depende de várias propriedades físico-químicas, incluindo o aumento da massa molar e número de ramificações nas cadeias, os quais dificultam o processo de biodegradação (KUSTER, 1979; KUMAR et al., 1983).

Os efeitos do ataque bacteriano aos plásticos, sob condições simuladas de ambientes aquáticos, em geral pode ocorrer por hidrólise, por oxidação de cadeias ou



grupo funcionais (LEONAS; GORDEN, 1996). A biodeterioração de um polímero sintético pode ser considerada como um fenômeno de adesão do biofilme, isto é, os microrganismos promovem uma colonização na superfície polimérica, na forma de biofilme, podendo ocorrer uma mistura complexa de microrganismos, água e substâncias poliméricas extracelulares (FLEMMING, 1998).

A biodegradação portanto, tem sido descrita como um processo fundamental para reduzir o acúmulo dos polímeros contaminantes ambientais. Pesquisas intensas com este objetivo vem sendo realizadas com a finalidade de degradar os plásticos sintéticos (ALBERTSSON e HUANG, 1995). O presente trabalho teve como objetivo utilizar formas alternativas para avaliar a biodegradação do tereftalato de polietileno por *Bacillus subtilis* e *Phanerochaete chrysosporium*, na perspectiva de obter resultados com a redução do tempo do processo de biodegradação.

## 1.2 Objetivos

### Objetivo Geral

Investigar a habilidade dos microrganismos *Bacillus subtilis* e *Phanerochaete chrysosporium* de produzir biofilmes e enzimas em superfície de tereftalato de polietileno submetido ou não a tratamentos físicos, nos períodos de 30 e 60 dias de incubação e avaliar o processo de degradação, através da avaliação da toxicidade com *Artemia salina*.

### Objetivos Específico:

Avaliar a influência da luz ultravioleta e da temperatura na perda de massa do polímero com incubação de 30 e 60 dias;

Investigar a formação de biofilmes por *B. subtilis* e *P. chrysosporium* na superfície do tereftalato de polietileno; submetidos ou não a tratamentos físicos;

Avaliar a modificação do pH, atividade fenoloxidase, esterase, amilase e protease produzidas por *B. subtilis* e *P. chrysosporium* nos líquidos metabólicos;

Investigar a toxicidade dos produtos formados durante o processo de biodegradação de tereftalato de polietileno com e sem tratamento por *B. subtilis* e *P. chrysosporium* utilizando *Artemia salina* ;

Investigar através de microscopia eletrônica de varredura, a formação do biofilme e possível degradação por *B. subtilis* e *P. chrysosporium* na superfície do tereftalato de polietileno com e sem tratamento.

## **1.3 Revisão da Literatura**

### **1.3.1 Polímero Sintético**

Staudinger (1920) considerou que a borracha natural e outros produtos de síntese, de estrutura química até então desconhecida, eram na verdade materiais constituídos de moléculas de cadeias longas, e não agregados coloidais de pequenas moléculas. Contudo, somente em 1928 foi definitivamente reconhecido pelos cientistas que os polímeros eram substâncias de elevado peso molecular (MANO; MENDES, 1999).

A palavra polímero, vem do grego e foi criada por Berzelius, em 1832, para designar compostos de peso moleculares múltiplos. Os polímeros representam a imensa contribuição da Química para o desenvolvimento industrial do século. Polímeros são macromoléculas caracterizadas por seu tamanho, estrutura química e interações intra – e intermoleculares, possuindo unidades químicas ligadas por covalência, repetidas regularmente ao longo da cadeia. O número de unidades da cadeia polimérica é denominada grau de polimerização, sendo geralmente simbolizado por  $n$  ou DP. Os primeiros materiais plásticos empregados na indústria foram obtidos de produtos naturais, por modificação química, como o nitrato de celulose, proveniente da celulose do algodão, a galalite originária da caseína do leite e a ebonite, da borracha natural (MANO; MENDES, 1999).

A baquelita, uma resina fenólica (PR) foi um dos primeiros plásticos sintéticos comercializados sob forma de artefatos, em 1910, e mais tarde, na década de 30, o policloreto de venila (PVC), o polimetacrilato de metila (PMMA) e o poliestireno (PS). Na década de 40 surgiram o polietileno de baixa densidade (LDPE), o poliuretano (PU) e a resina epoxídica (ER). Na década de 50 foram introduzidos o polioximetileno (POM), o polietileno de alta densidade (HDPE), o polipropileno (PP) e o policarbonato (PC) (MANO; MENDES, 1999).

### **1.3.2 Consumo Mundial de Plásticos**

A indústria de plásticos vem movendo-se ao redor do mundo buscando oportunidades nos mercados emergentes de alto crescimento. O setor é dominado por um grande número de companhias multinacionais que atuam em várias etapas da cadeia produtiva. Embora seja uma indústria global, a base de produção de muitos materiais

plásticos, migrou para países como Arábia Saudita, China e Coréia do Sul. Os produtores dos mercados mais desenvolvidos – Estados Unidos, Europa Ocidental e Japão – responderam a esse movimento concentrando suas linhas em itens de maior valor agregado e racionalizando a capacidade de produção, a fim de elevar a rentabilidade. As três regiões respondem por 90% do consumo mundial de materiais plásticos (PLÁSTICO, 2007).

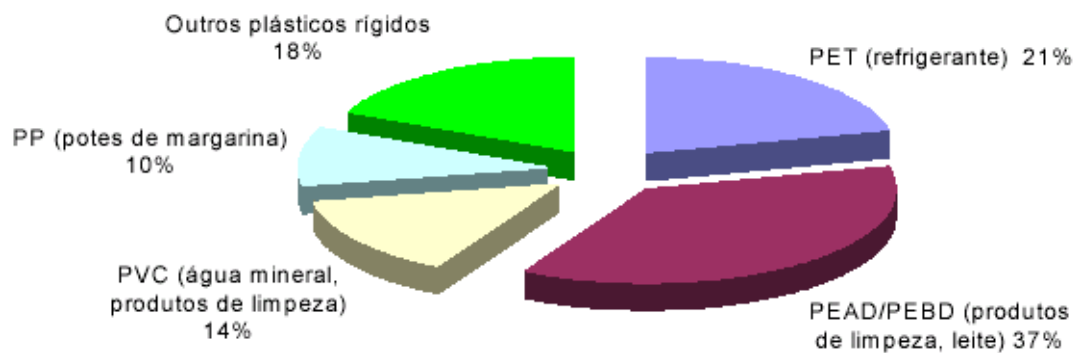
O mercado de plásticos em geral tende a crescer. Nos últimos anos, diversos materiais tradicionais, como vidro, metais e fibras naturais, vêm sendo crescentemente substituídos por produtos de origem plástica, com menores custos de obtenção e produção, maior flexibilidade, diversidade e assepsia, e possibilidade de reciclagem. Ásia e América do Sul são as áreas de maior potencial de expansão tanto no curto quanto no longo prazo. O consumo mundial de matérias plásticas foi de aproximadamente 114 milhões de toneladas em 1999. Desse total, Europa Ocidental e Estados Unidos representavam 27% cada. Em seguida aparecem China (13%), Japão (9%) e Coréia do Sul (3%). O Brasil ocupou a sexta posição, com 3,2% do mercado consumidor mundial (PLÁSTICOS, 2007).

### **1.3.3 Resíduos sólidos e Impacto Ambiental**

Esta parte aborda questões relacionados aos resíduos sólidos, com enfoque para os plásticos, bem como o seu aumento no lixo doméstico nos últimos anos. A composição de resíduos sólidos urbanos em algumas cidades do Brasil, em programas de coleta seletiva é mostrado na figura 1. Os tipos de plásticos mais encontrados no lixo urbano são: Polietileno de alta densidade, polietileno de baixa densidade, tereftalato de polietileno, policloreto de vinila, polipropileno e poliestireno (CEMPRE, 2006).

Estima-se que seriam necessários de 100 a 150 anos para que os polímeros sejam degradados na natureza. (ADELINA et al.,2005).

O PET, oriundo das embalagens de refrigerante, possui um dos maiores percentuais entre os plásticos encontrados em programas de coleta seletiva, 21%, ficando somente atrás dos polietilenos (PEAD e PEBD), 37%. Esta é uma indicação de nível de consumo deste material, demandando atenção para a importância de novos estudos com foco ambiental, que sejam dirigidos não só para o destino destes resíduos, mas também para a sua geração no processo produtivo.



**Figura 1** : Composição média das resinas nos resíduos plásticos rígidos separados em programas de coleta seletiva, fonte: CEMPRE (2006)

O plástico é um material proveniente de resinas geralmente sintéticas e derivadas do petróleo. Sob o ponto de vista ambiental, o uso do plástico é considerado problemático pela sua alta durabilidade e grande volume na composição total do lixo (OSE – COC, 2006). A demanda mundial de polímeros sintéticos é de cerca de 2,2 milhões de toneladas por ano, com previsão de dobrar nos próximos anos. O consumo de plásticos praticamente dobrou no Brasil onde no período de 1991 a 1998 foram produzidos 175 mil toneladas de plástico PET em 1998.

Os polímeros sintéticos persistentes no meio ambiente, não devem ser comumente incinerados em lixões municipais por gerarem os gases tóxicos e potencialmente indutor de chuvas ácidas (HUANG E EDELMAN et al., 1995; FRANCHETTI e MARCONATO, 2001). Além de garrafas PET e sacos de lixo depositados no litoral, o ecossistema marinho permanece carregado de microfibras e fragmentos de plásticos, resultantes da degradação de objetos maiores ao longo de décadas. Os sedimentos de várias praias na região de Plymouth, na Grã-Bretanha, apresentam fragmentos de plásticos incluindo acrílico, náilon, poliéster, polietileno, polipropileno, entre outros polímeros industriais. Pesquisadores coletaram animais entre as ilhas britânicas e a Islândia e avaliaram que os resíduos plásticos não estavam apenas em meio à água, mas também observaram dentro dos animais aquáticos (AMBIENTE BRASIL/ ESTADÃO ON LINE, 2006).

Fomos acostumados a associar a palavra lixo à sujeira, imundice e restos. Derivada do latim *lix* (cinza), o lixo tecnicamente é conhecido como “Resíduo Sólido Urbano” (RSU) (ZANIN et al. 2004). Se até o começo da Revolução Industrial o lixo era composto basicamente de restos e sobras de alimentos, a partir dessa era passou a ser

identificado, também, por todo e qualquer material descartado e rejeitado pela sociedade. O desenvolvimento para o conforto e o bem-estar humano produzido a partir da Revolução Industrial levou ao uso intenso de material descartado, ocasionando um aumento da quantidade de resíduos gerados e não utilizados pelo homem, muitos deles provocando a contaminação do meio ambiente e trazendo riscos à saúde humana, basicamente nas áreas urbanas.

O crescimento das áreas urbanas não levou em consideração a necessidade de adequação de locais específicos para depósito e tratamento dos resíduos sólidos. No Brasil de hoje, por exemplo, estima-se que a produção anual de lixo esteja em torno de 44 milhões de toneladas (CEMPRE, 2006), sendo que a maior parte dos resíduos recolhidos nos centros urbanos é simplesmente jogada sem qualquer cuidado em depósitos existentes nas periferias das cidades (AMBIENTARE BRASIL, 2006).

Existem várias opções de tecnologias para a o resíduo sólido urbano (aterros sanitários, reciclagem/ compostagem, incineração e biodegradação), destacam-se a importância das unidades de reciclagem e compostagem, que são alternativas importantes todas as vezes que se verificarem a existência de mercados para absorção de materiais recicláveis produzidos (FORLIN et al., 2002).

A falta de novas áreas para implantação de aterros sanitários (ou “lixões”, ou aterros controlados) é um fator que tem contribuído para a implementação de outras técnicas como as citadas acima. Estudos apontam que as técnicas utilizadas pela compostagem são capazes de reduzir à metade a massa dos resíduos processados e, num prazo de 60 e 90 dias, levar à obtenção de um composto para utilização na agricultura sem causar danos ao meio ambiente (FORLIN et al., 2002).

Estima-se que técnicas como a reciclagem pode fazer com que 44 milhões de toneladas anuais estimadas de lixo economizem pelo menos 30% da energia gerada na Hidrelétrica Binacional de Itaipu (MANCINE et al., 1998). Existem ainda, algumas rotas para aproveitamento energético dos resíduos sólidos, a utilização do seu poder calorífico por meio da queima direta ou da gaseificação ou aproveitamento calorífico do biogás; ou a produção de um combustível sólido a partir dos restos alimentares, para ser queimada em caldeiras ou mover turbinas a vapor, ou ainda, um combustor externo, sendo possível o aproveitamento em ciclos combinados (FORLIN et al., 2002).

De outro lado, a biodegradação, tem sido descrita como um processo fundamental para reduzir o acúmulo dos polímeros contaminantes ambientais. Pesquisas intensas com este objetivo vem sendo realizadas com a finalidade de degradar os plásticos sintéticos (ALBERTSSON e HUANG, 1995). Contudo, os polímeros têm sido considerados os grandes vilões ambientais, pois podem demorar séculos para se degradar, conseqüentemente, grandes partes dos aterros sanitários, são interferidos de forma negativa nos processos de compostagem e de estabilização biológica. Além disso, os resíduos poliméricos quando descartados em lugares inadequados, como lixões, rios, encostas, etc., causam um impacto ainda maior ao meio ambiente (SIPNACÉ e PAOLI et al., 2005).

### **1.3.4 Classificação dos Plásticos**

Há diversas maneiras de se classificar os polímeros. De uma maneira geral os polímeros podem ser divididos em termoplásticos, termorrígidos (termofixos e elastômeros (borrachas) (CANEVAROLO, 2002).

#### **1.3.4.1 Termoplásticos**

Os chamados plásticos constituem a maior parte dos polímeros comerciais. A principal característica desses polímeros é poder ser fundido diversas vezes. Dependendo do tipo do plástico, também podem dissolver-se em vários solventes sendo possível sua reciclagem, uma característica bastante desejável nos dias de hoje (MANO, 1985).

As propriedades mecânicas variam conforme o tipo de plástico e sob temperatura ambiente, podem ser maleáveis, rígidos ou mesmo frágeis. Exemplo deste tipo de material é: polietileno (PE), polipropileno (PP), poli (tereftalato de etileno) (PET), policarbonato (PC), poliestireno (PS), poli (cloreto de vinila) (PVC), poli (metilmetacrilato) (PMMA) (ANON, 1997).

#### **1.3.4.2 Termorrígidos (Termofixos)**

Os plásticos rígidos e frágeis são estáveis a variações de temperatura, contudo uma vez preparados não se fundem novamente. O aquecimento deste tipo de polímero promove decomposição do material antes de sua fusão, ou seja, não há a fusão do

polímero. Assim sua reciclagem é complicada. A estrutura molecular dos termorrígidos é constituída de monômeros formando uma rede ou ligação cruzada. As cadeias estão presas entre si por meio de numerosas ligações e se movimentam com alguma liberdade como no caso dos termoplásticos (CANEVAROLO, 2002).

Entre os termorrígidos a baquelita é um exemplo, usado em tomadas e no embutimento de amostras metalográficas, poliéster usado em caixas d'água, piscinas, etc., na forma de plástico reforçado (fiberglass) (CANEVAROLO, 2002).

#### **1.3.4.3 Elastômeros (Borrachas)**

Classe intermediária entre os termoplásticos e os termorrígidos, os elastômeros são infusíveis, mas apresentam alta elasticidade, não sendo rígidos como os termofixos. Sua reciclagem é complicada pela incapacidade de fusão, de forma análoga aos termorrígidos (CANEVAROLO, 2002).

Os elastômeros possuem uma estrutura molecular similar ao do termorrígido, mas, neste caso, há menor número de ligações cruzadas, ou seja, é como se fosse uma rede, mas com malhas bem mais largas que os termorrígidos. Exemplos deste tipo de material são pneus, vedações e mangueiras de borracha (CANEVAROLO, 2002).

#### **1.3.5 Propriedades dos Plásticos**

As propriedades dos polímeros dependem de diversos fatores, como natureza química, estrutura, massa molar, polidispersão, etc. O processo de polimerização conduz à formação de cadeias poliméricas de diferentes tamanhos, e conseqüentemente de massas molares diferentes. Os polímeros possuem propriedades físicas e químicas muito distintas das que tem os corpos formados por moléculas simples. Assim, por exemplo, são muito resistentes à ruptura e ao desgaste, muito elásticos e resistentes à ação dos agentes atmosféricos. Estas propriedades, juntamente com a sua fácil obtenção a baixas temperaturas, têm possibilitado a sua fabricação em grande escala.

Os polímeros de estrutura unidimensional têm elevada massa molar, e geralmente, são rígidos à temperatura ambiente, embora se tornem moles e flexíveis ao elevar a temperatura. Dependendo da natureza química dos monômeros e da técnica empregada para a polimerização, os polímeros podem exibir diferentes tipos de



estruturas e, com isso, diferentes propriedades físicas o que, no final, irá determinar a sua aplicabilidade (STRONG, 1999).

Conforme o tipo de polímero e aditivos usados na sua formulação pode-se obter material com flexibilidade bastante variável. Alta resistência ao impacto e a transparência, permite substituição do vidro em varias aplicações, como por exemplo, lentes de óculos (em acrílico ou policarbonato), faróis de automóveis (policarbonato), janelas de trens (policarbonato) etc. No caso do policarbonato a resistência à abrasão e a solventes não é tão boa quanto a do vidro. As lentes de acrílico riscam facilmente e são facilmente danificadas se entrarem em contato com solventes como, por exemplo, acetona. A conformação de peças utilizando materiais poliméricos requer, de uma maneira geral, aquecimento entre temperatura ambiente ( $T_{amb}$ ) e  $250^{\circ}\text{C}$ , o que pode ser considerada relativamente baixa. Disso decorre baixo consumo de energia para a conformação deste material, quando comparado com os metais, por exemplo, além de exigir equipamentos mais simples e não tão caros quanto o processamento de metais ou cerâmica. No entanto, alguns plásticos especiais requerem até  $400^{\circ}\text{C}$ , para serem processados (ANON, 1997).

Polímeros são altamente indicados para aplicações onde se requer isolamento elétrico, pois este material não contém elétrons livres, responsáveis pela condução de eletricidade nos metais. A adição de cargas especiais condutoras (limalha de ferro) pode tornar polímeros fracamente condutores, evitando acúmulo de eletricidade estática, que é perigoso em certas aplicações em polímeros condutores (ANON, 1997).

A condutividade térmica dos polímeros é cerca de mil vezes menor que a dos metais. Logo, são altamente recomendados em aplicações que requeiram isolamento térmico, particularmente na forma de espumas. A ausência de elétrons livres dificulta a condução de calor nos polímeros (MICHAELI et al., 1995). As ligações químicas presentes nos polímeros (de uma maneira geral covalentes/Van der Waals) conferem maior resistência à corrosão por oxigênio ou produtos químicos do que no caso dos metais (ligação metálica). Contudo, não quer dizer que os polímeros sejam completamente invulneráveis à baixa resistência química, como no ataque químico da terebentina ao policarbonato formando no CD.

De maneira geral, os polímeros são atacados por solventes orgânicos que apresentam estrutura similar a eles, ou seja; similares diluem similares (MANO,1985). Quanto à porosidade e o espaço entre as macromoléculas do polímero é relativamente grande. Isso confere baixa densidade ao polímero, o que é uma vantagem em certos aspectos, no entanto, esse largo espaçamento entre moléculas faz com que a difusão de gases seja alta. Em outras palavras, esses materiais apresentam alta permeabilidade a gases, que varia conforme o tipo de plástico (MICHAELI, 1995).

A principal consequência deste fato é a limitação dos plásticos como material de embalagem, que fica patente no prazo de validade mais curto de bebidas acondicionadas em garrafas de PET. Alguns polímeros, como termorrígidos e borrachas, não podem ser reciclados de forma direta: não há como refundi-los com o fornecimento de baixa quantidade de energia. A reciclagem de polímeros termoplásticos, como é o caso do PET, apesar de tecnicamente possível, muitas vezes não é economicamente viável devido ao seu baixo preço e baixa densidade (FORLIN e FARIA et al., 2002).

#### **1.3.5.1 Aditivação de polímeros**

Uso de fibras (vidro, carbono, boro) ou algumas cargas minerais (talco, mica, caulim, wolastonita) aumentaram a resistência mecânica. As cargas fibrosas podem assumir forma de fibras curtas ou longas. Cargas inorgânicas minerais inertes (ex:  $\text{CaCO}_3$ ) permitem reduzir custo da peça sem afetar propriedades. Exemplos: piso de vinil/ cadeiras de jardim (PP), que contém até 60% de cargas.

Negro de fumo em pneus (borracha) e filmes para agricultura (PE) aumentaram resistência mecânica e a resistência ao ataque por ozônio e raios ultravioletas (UV) (ANON, 1997). Aditivos conhecidos como plastificantes podem alterar completamente as características de plásticos como o PVC e borrachas, tornando-os mais flexíveis e tenazes (STRONG, 1999).

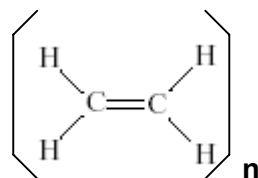
Já existe fabricação de espumas que é feita por meio de adição de agentes expansores, que se transformam em gás no momento da polimerização, quando ele se encontra no estado fundido (ANON, 1997).

### 1.3.6 Produção de polímeros

A matéria-prima que dá origem ao polímero chama-se monômeros. No caso do polietileno (PE) é o etileno (ou eteno), conforme já citado anteriormente, que é obtido a partir do petróleo ou gás natural, pois é a rota mais barata. É possível obter monômeros da madeira, álcool, carvão e até CO<sub>2</sub>, pois todas essas matérias-primas são ricas em carbono, o átomo principal que constitui os materiais poliméricos. Todas essas rotas, contudo, aumentam o preço do monômero obtido, tornando-se não competitivo (ANON, 1997).

Polímeros são materiais compostos por macromoléculas. Essas macromoléculas são cadeias compostas pela repetição de uma unidade básica, chamado mero. Daí o nome: poli (muitos) + mero. Os meros estão dispostos um após o outro (MICHAELI, 1995).

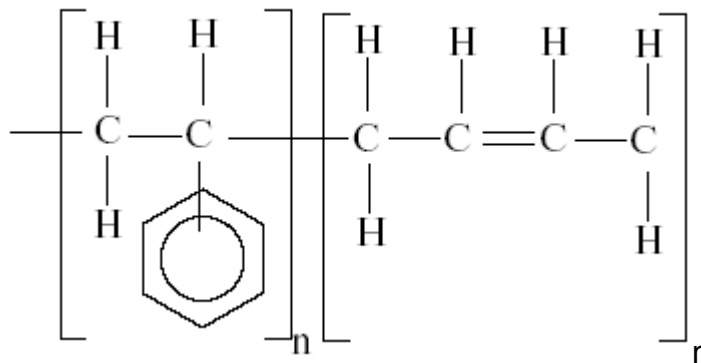
Logo, pode-se fazer uma analogia: as moléculas de um polímero estão dispostas de uma maneira muito semelhante a um novelo de lã. É difícil extrair um fio de um novelo de lã. Também é difícil remover uma molécula de uma porção de plástico, pois as cadeias “seguram-se” entre si. O polietileno (ou, abreviadamente, PE) – polímero extremamente comum usado, por exemplo, em saquinhos de leite – é composto pela repetição de milhares de unidades da molécula básica o etileno, conforme ilustra a figura 2.



**Figura 2:** Estrutura química do eteno (GOMES, 2006)

De uma maneira geral o número de unidade de repetição (n) é superior a 10.000 ou seja, uma molécula de polietileno é constituída da repetição de 10.000 ou mais unidades de etileno. O parâmetro não é definido como sendo o grau de polimerização do polímero, ou seja, o número de meros que constitui a macromolécula (MANO, 1985).

Alguns polímeros podem ser constituídos da repetição de dois ou mais unidades. Neste caso, eles são chamados copolímeros. Por exemplo, a macromolécula da borracha ou copolímero de butadieno-estireno (SBR) é formada pela repetição de dois meros: estireno e butadieno (CANEVAROLO, 2002), conforme ilustra a figura 3.



**Figura 3:** Estrutura química da borracha-butadieno (GOMES, 2006)

O polietileno é o plástico mais conhecido e utilizado no Brasil que está presente nas sacolas de embalagem utilizadas no comércio. Contudo, alterando as condições em que ocorre a polimerização, as indústrias conseguem variar bastante a aparência e as propriedades físicas de um plástico, podendo gerar os PET (tereftalato de polietileno) como mostra na figura 3, os PEAD's e os PEBD's, se diferenciam entre si pelo tamanho das cadeias e arranjos moleculares (LIMA, 2001).

O polipropileno é um plástico sintético usado, geralmente, para fabricar os pára-choques plásticos dos automóveis, que exigem uma alta resistência ao calor, ideal para ser empregado em objetos que requerem esterilização pelo aquecimento, como mamadeiras e cabos de instrumentos cirúrgicos (LIMA, 2001).

O policloreto de venila (PVC) é considerado o plástico mais fabricado e consumido no mundo contemporâneo. Apresenta uma estrutura bastante rígida, porém, com a propriedade de flexibilidade através do uso de plastificantes, os quais são responsáveis pela redução da força atrativa entre as moléculas do polímero. O polímero pode ser degradado por microrganismos, sendo adicionado biocida, que impedi a proliferação de microrganismos e o ressecamento do material (LIMA, 2001).

O poliestireno é usado para manufatura de seringas e copos plásticos, contudo quando fabricado de modo a conter bolhas de ar em seu interior, recebe o nome de isopor (LIMA, 2001). Os plásticos raion, náilon e poliéster apresentam um impacto econômico e até mesmo cultural, podendo ser usados para confecção das fibras têxteis sintéticas. No entanto, estes polímeros sintéticos não são degradados facilmente, depois

de completado os seus ciclos de vida úteis, são colocados em aterros e lixões a céu aberto, contribuindo para a poluição ambiental e todos os problemas decorrente dela (LIMA, 2001).

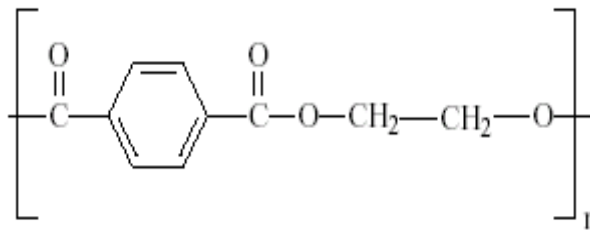
### **1.3.7 Tereftalato de Polietileno (PET)**

O tereftalato de polietileno é um termoplástico da família do poliéster que teve sua origem nas primeiras décadas do século passado na Universidade de Harvard. O Dr. Wallace H. Carothers foi um dos principais investigadores que dando continuidade ao trabalho do professor Staudinger, desenvolveu os princípios da policondensação de polímeros de cadeia longa (KAPLAN, 1998). Em 1928, a equipe após várias experiências chegou à obtenção do poliéster, procurando explorar o potencial de produção de fibras. Em 1941, Whinfield e Dickson, investigadores da “Calico Printers Association”, produziram e patentearam uma fibra de poliéster, a qual foi dado o nome de Terileno. Desde então as investigações sobre o poliéster se intensificaram pelo mundo dando origem a uma das principais matérias-primas termoplásticas para fabricação de fibras, filmes e embalagens (MANO, 1985).

As primeiras embalagens de refrigerantes PET foram fabricadas em 1977 nos Estados Unidos da América e desde então o seu uso tem sido intensificado ano a ano. Os passos da polimerização dos poliésteres são independentes e não necessitam de radicais ou íons transmissores de cadeia, na verdade resultam de uma reação gradual, com a intervenção de dois monômeros contendo cada um deles mais de um grupo funcional idêntico. Ao reagir, possibilita a formação de longas cadeias macromoleculares, de elevada massa molar. Em cada ligação estabelecida ocorre a liberação de uma molécula de água ou metano, sendo o processo designado de condensação. Quando os monômeros são ácidos carboxílicos e álcool, ambos com mais de um grupo funcional, a molécula resultante da reação apresenta, além da ligação éster, um grupo terminal carboxílico e um grupo terminal hidroxila, que permite a repetição das ligações, gerando uma macromolécula com muitas ligações éster (GOMES, 2006).

Na produção do PET utiliza-se como matérias-primas o ácido tereftálico e o etilenoglicol, que reúnem as características ideais para uma reação gradual de policondensação produzindo o tereftalato de polietileno (figura 4). As macromoléculas de

PET são constituídas de repetições da molécula mais simples do tereftalato de etileno (CANEVAROLO, 2002)



**Figura 4:** Estrutura do Tereftalato de Polietileno – PET (GOMES, 2006)

### 1.3.7.1 Aditivção do PET

O PET normalmente não necessita de adições de plastificantes ou outros aditivos para seu processamento. Mesmo nos casos em que ocorre o uso de aditivos, a formulação é feita pelo próprio produtor da resina e não pelo transformador, que já compra o produto pronto. Contudo, há diversas versões com propriedades especiais que podem conter outros agentes de reforço. Normalmente nas resinas de PET são usados como agente de reforço, fibras de aramida, esferas de vidro, carbonato de cálcio (por ex., em fitas magnéticas de PET, pois melhora o coeficiente de fricção da fita), asbestos e wollastonita (CANEVAROLO, 2002).

Os graus com agentes de reforço (fibras de vidro e carbono, mica) normalmente são direcionados para peças moldadas por injeção de alto desempenho. Note-se que estas cargas afetam negativamente a transparência do plástico. Componentes de PET para uso externo devem conter aditivos anti-rajios ultravioleta. Por exemplo, absorvedores de ultravioleta do tipo benzotriazona, pois afetam muito pouco a cor do plástico, que passa a ter grande estabilidade. A versão de alto grau de cristalinidade (CPET) contém aditivos para promover a formação de cristalitos na resina (iniciadores, agentes nucleantes) (CANEVAROLO, 2002).

O PET também pode ser usado na forma expandida, requerendo neste caso a adição de agentes de expansão. Obviamente, corantes são utilizados para colorir as resinas. No caso de filmes, podem ser usados aditivos para controlar a rugosidade superficial e, conseqüentemente, o coeficiente de atrito da superfície do filme. Outros aditivos podem ser usados para controlar o grau de transparência e de reflexão superficial. As principais propriedades do PET são boas resistências mecânicas, térmicas

e químicas, além de boas propriedades de barreira a absorção de oxigênio é de 10 a 20 vezes menor que nos plásticos “commodities” fácil reciclabilidade (CANEVAROLO, 2002).

Em seu trabalho Spinacé (2000), conclui que apesar da fácil reciclabilidade, ocorre perda das propriedades mecânicas após sucessivas reciclagens, fato que se acentua após o terceiro ciclo.

### **1.3.7.2 Obtenção da garrafa PET**

Moldagem por injeção: Nesta etapa o objetivo é obter mudanças físicas no PET. A matéria-prima seca, situada no sítio de secagem sobre a injetora, entrará por tubulações flexíveis pela entrada na injetora para sofrer o processo de plastificação. O processo de plastificação é assim denominado, pois o PET em estado sólido e a temperatura de aproximadamente de 150°C (temperatura proveniente da secagem), passará para um estado pastoso (atingindo a temperatura de 300°C). Isto ocorre em uma parte da injetora denominado extrusor (LIMA, 2001).

O PET entra pela garganta e é aquecido por resistência e numa rosca é cisalhado, até atingir o estado pastoso. O PET pastoso e compactado é transferido para um outro canhão, denominado canhão injetor, onde este também contém resistências para manter a temperatura e/ ou homogeneizar a mesma. O canhão injetor transfere o PET para o molde (LIMA, 2001).

No molde será dada a forma e realizada uma primeira resfriada nas pré-formas, onde elas atingem uma temperatura aproximada de 90°C. As pré-formas são retiradas do molde por um equipamento robô, onde as pré-formas serão resfriadas para o armazenamento (LIMA, 2001).

Após o resfriamento são descarregadas sobre uma esteira transportadora que as direciona para uma caixa de papelão à frente da injetora, onde são armazenadas para serem distribuídas para os clientes. A figura 5 ilustra uma pré-forma.

Estas pré-formas são semelhantes a um tubo de ensaio, com a aba suporte e rosca já estabelecidas. Pode ser nas cores cristal, verde, etc. Dependendo da coloração a ser solicitada pelo mercado (LIMA, 2001). Uma quantidade da produção já sai da empresa na forma de pré-forma, e poderá ser transportada para fábrica que irá desenvolver as próximas etapas. A parte final, moldagem por sopro, pode ser realizada na mesma fábrica, em outra especializada ou na fábrica de refrigerantes localizadas em alguns estados.



**Figura 5:** Pré- formas da garrafa PET(LIMA, 2001)

Moldagem por sopro: Esta etapa é normalmente realizada nas empresas de refrigerantes. O processo consiste no aquecimento da pré-forma e inserida no molde com formato da garrafa, a pré-forma é submetida a um estiramento, sofrendo orientação axial e ao mesmo tempo é insuflado ar comprimido, expandindo a pré-forma contra a parede do molde, proporcionando orientação radial, ao mesmo tempo em que a garrafa recém-formada é resfriada pela parede do molde. Em seguida a garrafa é retirada do molde. Um exemplo da garrafa é ilustrado na figura 6.



**Figura 6:** Garrafa PET de 2L. Forma industrializada (LIMA, 2001)

### **1.3.8 Utilização de bactérias e fungos na degradação de plásticos**

As bactérias e fungos são capazes de degradar a madeira, em ecossistemas terrestres naturais, porém sem dúvida alguma, fungos superiores, especialmente os da



classe Basidiomycetes, são os mais eficientes degradadores (BLANCHETE, 1991 e ERIKSSON, 1990). As bactérias do gênero *Bacillus*, que possuem forma de bastonetes, sendo em geral patogênicas para os seres humanos e demais mamíferos, como é o caso do *Bacillus anthracis*, causador do antraz. O *Bacillus cereus* causa gastroenterites e outras infecções. Todos os *Bacillus* produzem endósporos (esporos internos à bactéria). Muitos produzem toxinas. Classificação científica do *Bacillus* : Reino Bactéria, Filo Firmicutes, Classe Bacilli, Ordem Bacillales, Família Bacillaceae, Gênero *Bacillus* e espécie *subtilis* (SONENSHEIN, 1993).

O gênero *Bacillus* foi descrito desde o século XIX, com base na sua habilidade de motilidade e esporulação, evidenciando a morfologia e presença de flagelos que o diferenciava do gênero *Clostridium* ( FORSYTH et al., 1998). Segundo Sneath (1986), os *Bacillus* são descritos como aeróbios que degradam gelatina e formam colônia do tipo rizóide, e sua distinção do outro gênero da família Bacillaceae – *Clostridium* – está na utilização do oxigênio e na forma de seus esporos.

As espécies de *Bacillus* são consideradas bem distribuídas no solo, na água e no ar e seu estudo taxonômico evolui bastante nos últimos anos com o desenvolvimento das técnicas moleculares (RNA 16S), mas sua identificação e classificação ainda são dificultadas, pois consomem muito tempo e são consideradas laboriosas (DICKINSON et al., 2004), o que faz necessário o emprego de métodos de combinação tradicionais, quimiotaxonômicas, moleculares e genéticas para se obter um completo e definido perfil da família Bacillaceae ( FORSYTH et al. 1998).

Os fungos basidiomicetos são geralmente classificados com base nas diferenças dos respectivos padrões de degradação da madeira que apresentam, levando-se em consideração características macroscópicas da degradação. Assim, podem ser divididas em fungos de degradação clara (ou branca) (White-rot), degradação marrom (Brown-rot) e degradação macia (soft-rot) (BLANCHETE, 1991 e HATAKA, 1994).

Os fungos basidiomicetos são incluídos taxonomicamente no filo Basidiomycota do Reino Fungi. Morfologicamente são caracterizados como fungos que produzem esporos de origem sexuada em estruturas especializadas chamadas basídios, onde ocorre a cariogamia e a meiose. Apresentam micélio dicariótico durante a maior parte do ciclo de vida e hifas septadas que podem formar ansas, que são alças de conexão que

auxiliam na manutenção da dicariótica típica do grupo. Embora, nem todo basidiomiceto possua ansa, toda hifa com estrutura complexa, perfurado no centro e com a parede espessada envolta do poro, que por sua vez pode ser recoberto com uma membrana vinda do retículo endoplasmático (ALEXOPOULOS, 1996).

A degradação da lignina por fungos de decomposição branca é mais rápida do que a causada por outros microrganismos, sendo estes os responsáveis pela maioria da decomposição da lignina na natureza. O crescimento destes fungos diminui em condições limitadas de nitrogênio e carbono, e a atividade de enzimas lignolíticas aparece como forma de metabolismo secundário (KIRK e FARRELL, 1987; TUOMELA, et al., 2000). Para o fungo *Phanerochaete chrysosporium*, assim como outros de decomposição branca, o processo de degradação é maior quando há ausência de nitrogênio, enxofre e carboidratos no substrato (ALEXOPOULOS, 1996).

Na degradação da lignina, algumas enzimas fenol-oxidases extracelulares são produzidas, incluindo a lacase, a lignina peroxidase e manganês peroxidase. O processo completo de deterioração da lignina pode ocorrer parcialmente por reações não enzimáticas (ALEXOPOULOS, 1996; BLANCHETTE, 1991; ERIKSSON et al., 1990). A lignina contém uma variedade de ligações que estão comumente presentes em poluentes aromáticos. O sistema degradativo dos fungos de decomposição branca é inespecífico e oxidativo (BUMPUS ; AUST, 1987 ; HAMMEL, 1989).

#### **1.3.8.1 Crescimento microbiano e alterações dos polímeros sintéticos**

Entre os polímeros sintéticos, o poliuretano (PU) foi considerado biodegradável nas primeiras pesquisas realizadas em 1966 (EL-SAYED et al., 1996). Os poliéster-uretanos são mais suscetíveis à degradação fúngica em comparação aos poliésteres-uretanos (HOWARD et al., 1998; AKUTSU et al., 1998; NAKAJIMA-KAMBE et al., 1997, SANTERRE et al., 1993). Foi verificada em 1981, que, adicionando-se suplementos de nitrogênio, a biodegradação do poliéster PU por fungos filamentosos e pela levedura *Cryptococcus laurentii*, aumentava (EL-SAYED et al., 1996).

Em 1985, foi demonstrada a função das enzimas extracelulares na biodegradação do poliuretano (EL-SAYED et al., 1996). Geralmente os polímeros sintéticos e naturais podem ser atacados bioquimicamente por microrganismos através da produção de

enzimas hidrolíticas que catalisam a hidrólise das ligações éster, éter ou amida, como é o caso das esterases (SCHNABEL, 1981).

Desde então, um número crescente de fungos com capacidade de degradar poliéster PU tem sido isolados, e foi sugerido que o ataque enzimático do PU envolve a ação de enzimas hidrolíticas como ureases, proteases e esterases (HOWARD et al., 1998; AKUTSU et al., 1998; NAKAJIMA-KAMBE et al., 1997 e SANTERRE et al., 1993), como ocorrido em 1994, onde foram isolados quatro espécies de fungos, *Curvularia senegalensis*, *Fusarium solani*, *Aureobasidium pullulans* e *Cladosporium sp*, sendo caracterizada suas capacidades em degradar ésteres de PU. Observou-se que *C. senegalensis* secretou uma enzima extracelular com as mesmas propriedades das esterases (HOWARD et al., 1998).

O fungo *Phanerochaete chrysosporium* apresentou crescimento intenso, de difícil remoção, em filmes de polietileno, sendo sua degradação evidente quando comparados aos controles. As condições de cultivo foram aquelas adequadas a degradação de lignina. Foram verificadas também, que microrganismos ligninolíticos foram capazes de degradar componentes oxidados de tereftalato de polietileno, observando-se reduções de massa molecular deste polímero (LEE et al., 1991).

Filmes de policloreto de vinila (PVC) apresentaram-se opacos e menos flexíveis quando incubados com os fungos basidiomicetos *P. Chrysosporium*, *Peniophora cinerea* e *Trogia buccinalis*, e análise em espectro de UV revelaram mudanças significativas, indicando a presença de ácidos carboxílicos e de polímeros provenientes das quebras oxidativas da cadeia macromolecular, através de processos enzimáticos (FRANCHETTI et al., 1998).

Os efeitos esperados quanto ao crescimento microbiano em polímeros sintéticos são: ataque da superfície do polímero, descoloração e perda de transparência. A remoção dos plastificantes, modificadores e lubrificantes resulta no aumento da firmeza (menor flexibilidade), mudanças no peso, dimensões e outras propriedades físicas, assim como, em deterioração das propriedades elétricas, tais como, resistência, constante e força dielétrica e fator de potência (ASTM -G-21).

Freqüentemente, as mudanças nas propriedades elétricas ocorrem devidas, principalmente, ao crescimento microbiano na superfície e está associada à umidade e a mudanças no pH provocadas pela excreção de metabólitos. A não uniformidade de plastificantes, lubrificantes ou de outros aditivos de processamento na superfície polimérica também influencia no ataque microbiano, podendo ocorrer crescimento preferencial causado pela dispersão desigual destes compostos. Mudanças físicas são observadas em produtos, tais como, filmes ou revestimentos, nos quais a relação superfície/volume é alta e onde os materiais nutrientes, como os plastificantes e lubrificantes, continuam a se difundir para a superfície quando utilizados pelos microrganismos (ASTM G21-90, 1990).

### **1.3.8.3 Enzimas envolvidas no processo de degradação**

As Fenoloxidasas representam o maior grupo de enzimas envolvidas na atividade metabólica secundária, mas comumente associado a produção dos melanina e outros pigmentos. As reações catalisadas por estas enzimas estão também relacionadas com mudanças nas propriedades da parede celular (aumento da impermeabilidade e resistência hidrostática), interações intercelulares (agregação hifal) e a remoção/detoxificação de certos metabolitos secundários (MAYER, 1987; Mayer e Harel, 1979).

O termo fenoloxidase, fenolase de polifenol oxidase, são usados para descrever enzimas que catalizam a oxidação molecular de compostos aromáticos. A presença das enzimas tais como a catalase, a peroxidase e a superóxido dismutase que reagem com o oxigênio ativado, é também importante em determinar a estabilidade dos compostos aromáticos (Mayer ; Harel, 1979).

As fenoloxidasas são oxidoreduções que catalisam o óxido dos compostos fenólicos. São divididas em dois subgrupos (lacases e tirosinases) e ambos reagem com o oxigênio (DÚRAN et al., 2000). A atividade de fenoloxidase extracelulares, indicando a presença de enzimas lignolíticas foi descoberta na década de 30 em um fungo de degradação branca (ERIKSSON, 1990); logo depois foi demonstrado que as reações eram catalisadas por oxidoreduções do tipo de lacases e peroxidases (KIRK 1971; ANDER e ERIKSSON, 1976). A biodegradação da lignina é um processo oxidativo, no entanto, o

metabolismo dos fragmentos de lignina envolve uma combinação de reações de óxido-redução (SCHOEMAKER, 1990).

Devido à natureza e tamanho da molécula de lignina, as enzimas responsáveis pelo ataque inicial precisam ser extracelulares e não-específicas. As enzimas extracelulares melhores estudadas, produzidas por estes fungos, são: lignina peroxidase (LiP), manganês peroxidase (MnP), e lacase. O papel de LiP e MnP na degradação da lignina tem sido verificado, enquanto que outras enzimas são ainda incertas. Diferentes fungos de decomposição branca produzem diferentes combinações de enzimas: existem os produtores de LiP e MnP, outros que produzem MnP e lacase, fungos que produzem LiP e lacase, e ainda os que não produzem LiP nem MnP, mas sim lacase e álcool aril oxidase (AAO), ou ainda outras enzimas (TUOMELA et al., 2000).

## 1.4 Referências Bibliográficas

AHN, B.D; KIM, S.H.; YANG, J.S. Synthesis and characterization of the biodegradable copolymers from succinic acid and adipic acid with 1,4-butanediol. **Journal of Applied Polymer Science and Technology**. v.82, p.2808-2826, 2001.

AKUTSU, Y., NAKAJIMA-KAMBE, T., NOMURA, N.; NAKAHARA, T. Purification and properties of a polyester polyurethane – degrading enzyme from *Comamonas acidovorans* TB-35. **Applied Environmental Microbiology**. v.64. n.1, p. 62 – 67, 1998.

ALBERTSSON, A.C.; HUANG, S. J. **Degradable Polymers, Recycling, and Plastics Waste Management**. New York: Marcel Dekker. Inc. 1995. 317 p.

ALEXOPOULOS, C. J; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. **Introductory Mycology**. 4<sup>th</sup> ed. New York: John Wiley & Sons.1996. 869p.

**AMBIENTARE BRASIL** Disponível em: [http:// www.ambientarebrasil.org.br](http://www.ambientarebrasil.org.br) . Acessado em: junho 2006.

ANDER, P.; ERIKSSON, K.E. The importance of phenol oxidase activity in lignin degradation by the White-rot fungus *Sporotrichum pulverulentum*. **Archives of Microbiology**, v. 109, p. 1-8, 1976.

ANON. **Curso básico intensivo de plásticos**. Niterói, Jornal de Plásticos, 1997.

**American Society for Testing Materials.** 1985. ASTM standards on materials and environmental microbiology, p. 178 – 180. American Society for Testing Materials, Philadelphia, Pa.

BLANCHETTE, R. A. Delignification by Wood-Decay Fungi. **Annual Review Phytopathology**. v.29, p.381 – 398, 1991.

BLANCHETTE, R. A. Degradation of Lignocellulose Complex in wood. **Canadian Journal Botany**. Canadá. v. 73, p. 999-1010, 1991.

BUMPUS, J. A. e AUST, S. D. Biodegradation of environmental pollutants by white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. **Bioassays**. v. 6, p.166 – 170, 1987.

CANEVAROLO, S. V. **Ciência dos polímeros**. editora Art Líber. 1º ed. 2002. 184 p.

CHANDRA, R. e RUSTIGI. Biodegradable Polymers. **Program of Polymer Science**. v.3, p.1273-1335,1998.

**CSEMP**. Disponível em: [http:// www.packplast.org/prog/actualites.htm/2005/](http://www.packplast.org/prog/actualites.htm/2005/) . Acesso em: 22 de outubro 2006.

**CEMPRE** – Compromisso Empresarial para reciclagem. Reciclagem & Negócios – plástico granulado. 1998. Disponível em: <http://www.cempre.org.br>. Acesso em 25 outubro de 2006.

DICKINSON, D.N.; DUC, M.T.L.; HASKINS, W.E.; GORNUSHKIN, I.; WINEFORDNER, J.D.; POWELL, D.H.; VENKATESWARAN, K. Species differentiation of suite of *Bacillus* Spores by mass spectrometry based protein profiling. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70; p. 475-482, 2004.-

DUARTE, L. T.; LINS, V. F.C.; MARIANO, C.; BRANCO, J. R. T.; COLLARES M. P.; GALERY, R. Recobrimentos de poli ( tereftalato de etileno) depositados em aço por aspersão térmica a partir de pós obtidos em diferentes condições de moagem. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 13, p.198 – 204, 2003.

DURÁN, N. e ESPOSITO, E. Potencial applications of oxidative enzymes and phenoloxidase – like compounds in wastewater and soil treatment: a review. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 28, p. 83-99, 2000.

EL-SAYED, A. H. M. M., MAHMOUD, W. M., DAVIS, E. M. e COUGHLIN, R. W. Biodegradation of polyurethane coatings by hydrocarbon-degrading bacteria. **Journal International Biodeterioration and Biodegradation**. v.37, p.69-79, 1996.

ERIKSSON, K. E. L. Biotechnology in the Pulp and Paper Industry. **Wood Science Technology**. v.24,p.79-101, 1990.

ERIKSSON, K. E. L; BLANCHETTE, R. A. e ANDER, P. Microbial and Enzymatic Degradation of wood and wood components. **Springer Verlag**, Germany-Berlin.407 p, 1990.

FLEMMING, H. C. Relevance of Biofilms for the biodeterioration of surfaces of polymeric materials. **Polymer Degradation Stabil**, v. 59, p.309-316,1998.

FORLIN, F. J. e FARIA, J. A. F. Considerações sobre a reciclagem de embalagens plásticas. **Polímeros**, v. 12, n. 1, p. 1 – 10, 2002.

FRANCHETTI, S. M. M. e MARCONATO, J. C. Decomposição térmica do PVC e detecção do HCl utilizando um indicador ácido-base natural: uma proposta de ensino multidisciplinar. **Química Nova Escola**, v.14, p. 40-42, 2001.

FRANCHETTI, S. M. M., NICOLETI, J. e RODRIGUES, M. L. B. O. Biotransformação de filmes de PVC por fungos basidiomicetos. **II Reunião Nacional de Microbiologia Aplicada ao Meio Ambiente**, UFSC- Florianópolis, 12 – 15 out., 1998.

GENEAU, M. C. **Procede d' elaboration d' agromateriau composite naturel par extrusion bivis et injection moulage de tourteau de tournesol**. 2006. 381f. Tese de doutorado – Instituto Nacional Politécnica de Toulouse, França.

GOMES, H. A. S. **Obtenção, caracterização mecânica de PET, Amido plasticado e o calculo das incertezas das medições**. 2006. 89 f. Dissertação de Mestrado (Engenharia e Ciência dos Materiais) – Universidade de São Francisco, Itatiba, São Paulo.

HATAKA, A; Lignin-Modifying Enzymes from Selected White-Rot Fungi: Production and Role in Lignin Degradation. **FEMS Microbiol Reviews**. v.13, p.125-135 ,1994.

HAMMEL, K. E. Organopollutant degradation by lignilolytic fungi. **Enzyme Microbiol Technology**. v.11,p.776-777,1989.

HOWARD, G. T. e BLAKE, R.C. Growth of the *Pseudomonas fluorescens* on a polyester-polyurethane and the purification and characterization of a polyurethanase-protease enzyme. **Journal International Biodeterioration and Biodegradation**. v.42, p. 231 – 220, 1998.

HUANG, S. J. e EDELMAN, P. G. An overview of biodegradable polymers and biodegradation of polymer In: Scorr, G & Gilead, (Ed). Degradable polymers: principles & applications. **London Chapman and Hall**, p.18-23, 1995.

JARA, A. M. A. T. **Produção de Polifenoloxidasas por Bactérias**. 2005. 47f. Monografia (Tecnologia Ambiental) – Universidade Católica de Pernambuco, Recife.

KAPLAN, A. **Modern Plastics Encyclopedia**, Mc Grow Hill Book Company Highstown, 1998. 99p.

KIRK, T.K. Effects of microorganisms on lignin. **Annual Review of Phytopatology**, v.9, p.185-210, 1971.

KIRK, T. K. e FARRELL, R. L. Enzymatic “combustion”: the microbial degradation of lignin, Annu. **Reviews Microbiology**.v. 41, p. 465 – 505, 1987.

KUMAR, G. S; KALPAGAM, V. e NANDI, V.S. Biodegradable polymers: prospects, problems and progress. J. Mat. Sci. Macromol. **Chemistry Physical**. v. 22, n.2, p.225-260, 1983.

KUSTER, E. Biological degradation of synthtic polymers. **J. Appl. Polym**. v.35,p. 395-404, 1979.

LEE, B., POMETTO III, A. L., FRATZKE, A. e BAILEY JR., T. B. Biodegradation of Degradable Plastic Polyethylene. Phanerochaete and Streptomyces spect.**Applied and Environmental Microbiology**. v.57, p. 678-685,1991.

LEONAS, K. K. e GORDEN, R. W. Bactéria Associated with Desintegrating Plastics Films Under Simulated Aquatic Environments. **Bull Environ. Contam. Toxicol**.v. 56,p.948-955, 1996.

LIMA, A. M. F. **Estudo da cadeia produtiva do polietileno tereftalato (PET) na região metropolitana de Salvador como subsidio para analise do ciclo de vida**. 2001. 94 f. Monografia (Gerenciamento e Tecnologia Ambientais na Indústria) – Universidade Federal da Bahia, Salvador.

MANCINE S. D.; BEZERRA, M. N. e ZANIN, M. **Polimeros Ciência Tecnologia**. v. 3, n.2, p.68 – 75, 1998.

MANO, E. B. **Introdução a Polímeros**. Ed. Edgard Blucher, São Paulo, 1985.



MANO, E. B. e MENDES, L. C. **Introdução a Polímeros**. 2º. ed. Edgard Blucher, São Paulo, 1999. 191p.

MAYER, A. M. Polyphenol oxidases in plants – recent progress. **Phytochemistry**. v.26, p. 11-20, 1987.

MAYER, A. M. e HAREL, E Polyphenol oxidases in plants. **Phytochemistry**. v. 18, p. 193-215, 1979.

MICHAELI, W. **Tecnologia dos plásticos**. Editora Edgard Blucher Ltda. São Paulo, Introdução e Lição. v. 1. 1995. p. 1 a 13.

NAKAJIMA-KAMBE, T., ONUMA, F., AKUTSU, Y. e NAKAHARA, T. Determination of the polyester polyurethane breakdown products and distribution of the polyurethane degrading enzyme of *Comamonas acidovorans* strain TB-35. **J. Ferm. Bioeng.** v.83, n.5, p. 456-460,1997.

NASCIMENTO, A. M., SILVEIRA, A. P. C., COSTA, K., RIEHL, L. A. S.R., SANTOS, Z.A.M. Reciclagem de lixo e química verde. 2005. 71f. Curso de formação continuada ciências da natureza, matemática e suas tecnologias – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

NDON, U. J; LEVINE, A. D. e BRADLEY, B. S. Evaluation of biodegradability of starch – based plastics. **Wat. Sci. Tech.** v.26,n.9-11,p.2089-2092,1992.

**OSE – COC**. Disponível em: <http://www.ose.g12.br/vantagem.htm>. Acesso em: 15 de novembro de 2006.

**PLÁSTICOS**. Disponível em: <http://www.desenvolvimento.gov.br> . Acesso em: 09 de julho de 2007.

**RESBRASIL NOTÍCIAS**. Disponível em: <http://www.resbrasil.com.br/noticia11.htm>. Acesso em: 27 de setembro de 2005.

**REDIFF ON THE NET**. Disponível em: <http://members.rediff.com/jogsn/BP4.html> . Acesso em: 25/09/2006.

ROSA S. D; PENTEADO D. F. e CALIL, M. R. Propriedades Térmicas e Biodegradabilidade de PCL e PHB em um Pool de Fungos. **Revista de Ciência e Tecnologia**. v. 15, p. 75 - 80, 2000.

ROSA S. D. e CHUI Q.S.H. Avaliação da Biodegradação de poli- $\beta$ -(hidroxibutirato-co-valerato) e poli-e-(caprolactona) em solo compostado. **Polímeros : Ciência e Tecnologia**. v. 12,p. 311-317,2002.

SANTERRE, J. P., LABOW, R.S. e ADAMS, G.A. Enzyme-biomaterial interactions: Effect of biosystems on degradation of polyurethanes. **J. Biom. Mat. Res.** v.27.p.97-109, 1993.

SCHANABEL, W. **Polymer Degradation – Principles and Practical Applications**. 1<sup>o</sup> ed. New York: Macmillan Publishing Co, New York, 1981. 177p.

SCHOEMAKER, H. E. On the chemistry of lignin biodegradation. **Recl. Trav. Chim. Pays-Bas Neth.**v.109,p.255-272,1990.

SONENSHEIN, A. L. *Bacillus subtilis* and other gram-positive bacteria: biochemistry, physiology, and molecular genetics. **American Society Microbiolpgy**, 1993.1120 p.

SPINACÉ, M. A. S. Poli (tereftalato de etileno) processamento por extrusão e obtenção da garrafa PET. **Química Nova**.p. 34 – 48, 2000

SPINACÉ, M. A. S. e DE PAOLI, M. A. A tecnologia da reciclagem de polímeros, poli (tereftalato de etileno). **Química Nova**. v. 28, p. 65-72, 2005.

STRONG, B.A. **Plastics Materials and Processing**,2<sup>o</sup> ed, Upper Saddle River, New Jersey, Columbus, Ohio. Editora Prentice Hall, 1999.

TUOMELA, M; VIKMAN, M; HATAKKA, A. e ITAVARRA, M. Biodegradation of lignin in compost environment: a review. **Bioresource Technology**. v. 72,p.169-183, 2000.

ZANIN, M. e MANCINI, S. D. **Resíduos Plásticos e Reciclagem aspectos gerais e tecnologia**, São Carlos EDUFSCAR – Editora da Universidade de São Carlos. 2004. 143 p.

## **CAPÍTULO 2**

Primeiro Artigo

**Formação de Biofilmes, Produção de Enzimas  
por *Bacillus subtilis* em Superfícies de  
Tereftalato de Polietileno no processo de  
Degradação**

Manuscrito a ser submetido para publicação em  
**International Biodeterioration & Biodegradation**

---

## **Formação de Biofilmes e Produção de Enzimas por *Bacillus subtilis* em Superfícies de Tereftalato de Polietileno Simulando Degradação**

---

**Alicia Maria Andrade Torres Jara**

Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais  
Universidade Católica de Pernambuco  
Rua do Príncipe, 526 - Boa Vista - 50050900 - Recife - PE - Brasil.

**Norma Suely Evangelista**

Instituto de Ciências do Mar -LABOMAR  
Universidade Federal do Ceará  
Av. Abolição, 3207, Meireles, 60.165-081, Fortaleza, CE, Brasil.

**Nelson Duran**

Laboratório de Química Biológica  
Universidade Estadual de Campinas  
Cidade Universitária "Zeferino Vaz", Caixa Postal 6154, Distrito de Barão  
Geraldo, Campinas, SP, Brasil.

**Aline Elesbão do Nascimento**  
**\*Galba Maria de Campos Takaki**

Centro de Ciências e Tecnologia  
Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais  
Universidade Católica de Pernambuco  
Rua Nunes Machado, 42 - Bloco J - Boa Vista - Recife - PE - Brasil.

# Formação de Biofilmes, Produção de Enzimas por *Bacillus subtilis* em Superfícies de Tereftalato de Polietileno no processo de Degradação

Alícia Maria Andrade Torres Jara<sup>a,b</sup>, Norma Suely Evagelista<sup>c</sup>, Nelson Durán<sup>d</sup>,  
Aline Elesbão do Nascimento<sup>b</sup>, Galba Maria de Campos-Takaki<sup>b\*</sup>

<sup>1</sup>Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais, <sup>2</sup>Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais, Universidade Católica de Pernambuco. Recife – PE, Brasil. CEP: 50.050-590 ;

<sup>3</sup>Instituto de Ciências do Mar-LABOMAR, Universidade Federal do Ceará, Av. Abolição, 3207, Meireles, 60.165-081, Fortaleza, CE, Brasil. <sup>4</sup>Laboratório de Química Biológica, Universidade Estadual de Campinas, Cidade Universitária “Zeferino Vaz”, Caixa Postal 6154, Distrito de Barão Geraldo, Campinas, SP, Brasil;

---

## Abstract

The modification of polyethylene terephthalate (PET) fibres from used beverage bottles was investigated by treatment with UV (6 and 36h), temperature (35°C and 50°C), and without physic treatment on the production of extracellular enzymes, and biofilm formation by *Bacillus subtilis* under controlled conditions. The results showed partial degradation of the copolymer submitted to physic treatments and colonization by *B. subtilis*. The best results of degradation were associated with protease, amylase and esterase on surface of PET particles submitted to 50°C of temperature, during 60 days. However, the esterase activity simulating biodegradation of PET by *B. subtilis*, and suggest residual lost of weight, and the products showed low toxicity when compared with the PET particles without treatments.

**Keywords:** polyethylene terephthalate; enzymes; *Bacillus subtilis*

---

## 1. Introdução

Os plásticos em geral apresentaram uma grande difusão comercial nas últimas décadas, considerando a sua resistência e emprego industrial na síntese de novos polímeros com propriedades físico-químicas especiais. Paralelamente associado a essas qualidades, ocorrem problemas graves para o meio ambiente, devido a grande quantidade de descarte de polímeros no meio ambiente, permanecendo por um longo tempo em depósito de lixo e aterros sanitários. Esta situação tem permitido que os produtos manufaturados com plásticos, permaneçam visíveis em muitos ambientes terrestres e aquáticos, devido a sua difícil eliminação (Eggins et al., 1971, 1975).

O tereftalato de polietileno (PET) é um polímero sintético que tem sido muito utilizado na área de embalagens alimentares, especialmente, bebidas gaseificadas, apesar da maior parte da demanda mundial deste plástico, contudo, esta relacionada à

aplicação de fibras (Edge et al., 1996) . No Brasil, são produzidos anualmente cerca de 270 mil toneladas de tereftalato de polieileno (PET).

A biodegradação dos polímeros é um processo pelo qual bactérias, fungos filamentosos e leveduras excretam suas enzimas para utilizar parte da estrutura química, como fonte de carbono, modificando assim, a forma original do polímero (Chandra; Rustgi, 1998 e Rosa et al., 2002). Portanto, a busca de microrganismos capazes de degradar compostos xenobióticos é de grande interesse para os processos de biorremediação, principalmente na remoção de plásticos (Chandra; Rustgi, 1998).

Os plásticos, apresentam uma relação inversa entre peso molecular e biodegradabilidade. Oligômeros de hidrocarbonetos lineares com peso molecular abaixo de 620 suportam crescimento microbiano, contudo, pesos moleculares mais altos são dificilmente utilizados pelos microrganismos (Haines e Alexander, 1974; Potts, 1978).

Neste sentido, tem sido amplamente aceitável a resistência à degradabilidade do tereftalato de polietileno, considerando seu peso molecular, além da natureza hidrofóbica que interfere com a colonização e viabilidade dos microrganismos (Hadad et al. , 2005).

Portanto, explorar processos de transformações físico no plástico se faz necessária para proporcionar a perda de algumas de suas propriedades físicas, tornando-se assim, mais acessível à colonização microbiana e conseqüentemente, possibilitar o processo de biodegradação (Chanda e Roy, 1986; Cornelli et al.,1984).

Neste trabalho foi avaliada a formação de biofilme por *Bacillus subtilis* em superfície de tereftalato de polietileno - PET, submetido ou não ao tratamento com irradiação de luz ultravioleta (6 e 36 horas) e temperatura (35°C e 50°C por 72 horas), respectivamente, associados à produção de enzimas (polifenoloxidasas, amilase, protease e esterase), liberação de proteínas totais, pH e toxicidade.

## **2. Materiais e Métodos**

### **2.1 Microrganismo**

Foi utilizada a linhagem *Bacillus subtilis* UCP 999, isolada de solo contaminado por petróleo no porto do Recife-PE, procedente do Banco de Culturas da Universidade Católica de Pernambuco – UNICAP, mantida no meio ágar nutriente-AN, à temperatura de 5<sup>o</sup>C.

## 2.2 Tereftalato de Polietileno e Tratamentos com Irradiação UV e temperatura

O polímero sintético utilizado nos ensaios foi o tereftalato de polietileno industrial (garrafa de coca-cola) foram cortados em partículas, correspondente ao tamanho de 20 x 20 mm, com espessura de 0,35 mm. Em seguida as partículas de tereftalato de polietileno foram submetidas a 2 processos físicos: 1.1) irradiação UV por 2h (durante 3 dias) correspondendo ao total de 6h; 1.2) irradiação UV 12h (durante 3 dias) correspondendo ao total de 36h. O tratamento com irradiação UV foi realizado na capela de fluxo laminar, onde a lâmpada de UV estava na altura de 40 cm com o comprimento de onda entre 2.400 e 2.800 nm.

2) A influência da temperatura foi avaliada submetendo-se as partículas à 35°C e 50°C, respectivamente, durante 72h e como controle, partículas de PET sem tratamento físico.

## 2.3 Desinfecção das partículas de PETs

As partículas do PET foram previamente cortadas, pesadas e em seguida colocadas em placas de Petri, contendo álcool iodado, deixados em câmara de fluxo laminar, por 60 minutos, agitando-se ocasionalmente. A seguir, com o auxílio de uma pinça estéril, estes foram removidos e transferidos para outras placas de Petri com solução de etanol 70%, onde permaneceram por um período de 60 minutos, agitando-se ocasionalmente, segundo estabelecido pela ASTM-D-5247, (Lee et al., 1998, 1991). Após estes procedimentos, os plásticos foram transferidos, assepticamente, para placas de Petri com água destilada por 60 minutos, agitando-se ocasionalmente. Por fim, as partículas de PET permaneceram à temperatura ambiente, em dessecador, até peso constante.

## 2.4 Condições culturais para avaliar a colonização de *Bacillus subtilis*

O *Bacillus subtilis* foi crescido em placas de Petri contendo o meio Ágar nutriente, constituído por extrato de carne 5,0g, cloreto de sódio 5,0g, peptona 10,0g, ágar 15,0g, e 1000mL de água destilada, incubado à temperatura de 35°C durante 24 horas, pH 6,72. O crescimento do *B. subtilis* foi medido por turbidez a uma densidade óptica ( $D.O_{600}$ ) de 0.5. Foram utilizados frascos de Erlenmeyers com 250 mL de capacidade, contendo 100 mL do caldo nutriente, adicionado de 0.02-0.50% de Tween 80 e 1 mL da suspensão bacteriana, adicionados das partículas do PET, de acordo com os tratamentos utilizados, previamente pesadas e esterilizadas. Em seguida, os



frascos foram mantidos sob agitação de 150 rpm, à temperatura de 35°C, por um período de 30 e 60 dias. Após o período de incubação, dos cultivos foram avaliados a viabilidade celular, em seguida, filtrados com filtro Sterifil D-GV, Millipore 0,22µm. Do líquido metabólico livre de células foi utilizado para as seguintes determinações: da atividade enzimática, do pH, de proteínas totais e da toxicidade. As películas do PET foram removidas dos frascos, colocadas em estufa à 35°C até secar totalmente, sendo então transferidas para dessecador e mantidas até peso constante. Controles foram realizados com ausência de tratamento físico. Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

Determinação do pH - O pH do líquido metabólico livre de células foi medido utilizando-se um pHmetro Orion, modelo 310.

Viabilidade celular – a viabilidade celular foi realizada através da técnica “pour plate”, usando como meio inoculante o agar nutriente, 24h de incubação à temperatura de 35°C, seguido de contagem do número de colônias.

Determinação das proteínas totais - A concentração de proteínas totais do líquido metabólico livre de células foi determinada segundo o kit LABTEST Diagnóstica. O princípio dessa técnica consiste na reação das proteínas da amostra com o biureto (hidróxido de sódio, 1,86 mol/L; tartarato de sódio e potássio 430 mM/L; sulfato de cobre, 120 mM/L e iodeto de potássio 300 mM/L), desenvolvendo uma coloração roxa, proporcional à concentração de proteínas das amostras, determinadas a 545 nm, tendo como padrão albumina.

## 2.5 Avaliação da toxicidade dos metabólitos produzidos pela biodegradação do tereftalato de polietileno

Os testes de toxicidade foram realizados com os líquidos metabólicos dos ensaios com 30 e 60 dias de incubação do PET (tratado ou não), usando o crustáceo *Artemia salina* como bioindicador. O bioensaio foi baseado apenas na porcentagem de morte dos organismos em relação ao seu número total (10 larvas), na presença de diferentes concentrações do líquido metabólico (v/v de 25%, 50% e 75%), diluídas em 5 ml de uma solução aquosa de sal marinho sintético (33,3g L), incubados por 24h. O volume máximo da amostra teste (líquido metabólico) foi de 1,5ml (Mc Laughlin et al. 1985).

Em seguida, foi realizada a contagem dos organismos sobreviventes, determinando-se assim a dose limite (CL<sub>50</sub>) dos líquidos metabólicos. Os testes foram realizados em duplicata.

## 2.6 Remoção do biofilme bacteriano da superfície do Tereftalato de Polietileno

Para facilitar a avaliação do biofilme nas partículas do PET, dois tratamentos foram realizados de acordo com (Hadad et al., 2005) modificado, pela remoção inicial do biofilme pelo tratamento com água destilada estéril. Deste modo, as partículas de PET contendo colonização do *B. subtilis* foram inicialmente pesadas, transferidas para Erlenmeyers de 125 mL de capacidade, contendo 15 mL de água estéril, mantidos sob agitação de 150 rpm, à temperatura de 28°C, por um período de 12 horas. Em seguida, as partículas foram lavadas com uma solução de dodecil sulfato de sódio – (SDS) a 2% (v/v) durante 4 horas, seguido de cinco lavagens com água destilada até remoção total da solução. As partículas de tereftalato de polietileno foram colocadas em papel de filtro, secas “overnight” à 35°C, sendo colocadas em dessecador até peso constante. A porcentagem de perda de massa do PET foi estimada em relação ao peso inicial da partícula, após a remoção do biofilme.

## 2.7 Detecção de Atividade enzimática

Atividade esterase: A detecção da atividade esterase foi realizada pelo método descrito por (Kitancharoen e Hatai 1998), tendo Tween 80 como substrato. Discos de papel xarope de 6 mm foram embebidos com 100 µl, depositados no centro da placa de Petri contendo o meio para atividade esterase, incubadas à temperatura de 35°C, sendo observadas a cada 24 horas, após o aparecimento do halo púrpura ao redor do disco, medido e expresso em mm.

Atividade Amilase: A detecção da atividade amilase foi realizada de acordo com a metodologia de (Hankin e Anagnostakis 1979), tendo amido solúvel como substrato. Discos de 6 mm de papel xarope, contendo 100 µl do líquido metabólico (controle e tratados), depositados no centro da placa de Petri contendo o meio para atividade amilase, incubadas à temperatura de 37°C, sendo observadas a cada 24 horas, após a coloração com lugol o aparecimento do halo transparente ao redor do disco, medido e expresso em mm.

Atividade Protease: A detecção da atividade de protease nos líquidos metabólicos foi realizada de acordo a metodologia de (Hankin e Anagnostakis 1979), tendo gelatina a 2% como substrato. Discos de 6 mm de papel xarope contendo 100 µl do líquido metabólico (controle e tratados) foram colocados no centro da placa contendo o meio para atividade protease, incubados à temperatura de 37°C, sendo observados a cada 24 horas, até o aparecimento do halo transparente ao redor do disco, medido e expresso em mm.

Atividade de Polifenoloxidasas: A determinação da atividade fenoloxidase dos líquidos metabólitos foi realizada pelo método descrito por (Conceição et al. 2005), tendo ácido gálico como substrato. Discos de papel xarope de 6 mm contendo 100 µl do líquido metabólico (controle e tratados) foram colocados no centro da placa contendo o meio para atividade fenoloxidase, incubadas à temperatura de 37°C, sendo observadas a cada 24 horas, até o aparecimento do halo marrom ao redor do disco, medido e expresso em mm.

## 2.8 Microscopia Eletrônica de Varredura

O biofilme formado por *B. subtilis* coletadas com 30 e 60 dias de cultivo nas partículas do PET foram lavados em PBS, pH 7.2, por duas vezes, durante 10 minutos. Em seguida fixados com glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato 0,1M, pH 7.4, durante 1 hora, a temperatura ambiente. Finda a etapa de fixação, todas as amostras foram novamente lavadas com tampão fosfato, duas vezes, durante 10 minutos, seguido de pós-fixação com tetróxido de ósmio a 1%, em tampão fosfato, durante 1 hora à temperatura ambiente, na ausência de luz. Em seguida, as amostras foram mais uma vez lavadas com tampão fosfato 0,1M, sendo posteriormente, submetidas ao processo de desidratação. Para a desidratação das amostras foi utilizado álcool etílico, em proporções de 50%, 70%, 90% (5 minutos para cada troca) até a proporção de 100% (três vezes, 10 minutos cada troca). Após essa etapa, as amostras foram submetidas ao ponto crítico para eliminação total da fase líquida e montagem em suportes de alumínio, com posterior metalização. As amostras foram visualizadas, analisadas e fotografadas ao Microscópio Eletrônico de Varredura JEOL JSM T2000 (De Souza, 1998).

## 3. Resultados e discussão

A tabela 1 apresenta os valores da viabilidade celular de *B. subtilis* após 30 dias e 60 dias de incubação com as partículas do polímero, com e sem tratamentos físicos. Observou-se que ocorreu um aumento do número de células que foi de  $9,1 \times 10^7$  para as partículas do PET com irradiação UV por seis horas, em relação ao número inicial de células do controle. O efeito das temperaturas 35°C no PET acarretou uma redução na população bacteriana, com 60 dias de incubação, observando-se um número de células de  $4,3 \times 10^7$  no período de 60 dias de incubação, quando comparados ao PET controle (sem tratamento).

Observou-se ainda, que após 30 e 60 dias de incubação conforme mostra na tabela 1, o pH inicial de 6,72 aumentando para pH (>8,0) em todos os tratamentos, inclusive no controle. Contudo, as partículas submetidos à irradiação com UV apresentou no período de 36h de tratamento um pH de 8,41, após 30 dias de incubação e 8,60 após 60 dias, sugerindo a presença de metabólitos oriundos do processo de uma possível degradação, causando alteração do pH. Observou-se ainda, que com 30 dias o plástico tratado com temperatura de 35°C apresentou uma maior alteração do pH, passando para 8,51 com 30 dias de incubação, no qual com 60 dias o pH baixou para 8,05. Segundo a ASTM- G-21, ( Lee et al., 1991 e Raghavan, 1995), as mudanças nas propriedades elétricas dos plásticos ocorrem devido, principalmente, ao crescimento microbiano na superfície do plástico, estando associado à umidade e às mudanças do pH, provavelmente, causadas pela degradação química do PET ou pela formação de metabólitos secundários.

Com relação às proteínas totais produzidas no líquido metabólico com 30 e 60 dias de incubação, ocorreu um grande aumento no período mais prolongado de crescimento (60 dias), exceto para a irradiação com a luz ultravioleta por seis horas e a temperatura de 50°C. Nesta temperatura observou-se uma drástica redução no conteúdo de proteínas totais, possivelmente, devido ao processo de desnaturação e ou degradação, mediados pela alta temperatura (50°C) (Gilan et al 2004) analisou conteúdo de proteínas no processo de colonização, formação e biodegradação de polietileno por *Rhodococcus ruber*.

Nas tabelas 2 e 3 observam-se o peso inicial das partículas, peso com biofilme e peso após a remoção do biofilme, indicando a porcentagem de perda de massa nas partículas do PET tratado ou não com processos físicos, após a colonização de *Bacillus subtilis*.

Destacaram-se no período de 30 dias (tabela 2), a partícula tratada com irradiação UV com 6 horas e com temperatura de 50°C respectivamente, apresentaram diminuição de 0,06% e 0,07% da massa inicial da partícula do PET. A porcentagem da diminuição da massa da película sem tratamento foi igual a da irradiação ultravioleta (0,06%).

Observa-se na tabela 3 que, as porcentagens de perda de massa polimérica no período de 60 dias foram mais altas em comparação ao período de 30 dias, sendo a maior perda de 0,08% apresentada para a partícula tratada com temperatura de 50°C e com 0,07% para as tratadas com irradiação UV por 36 horas.

A literatura se refere a uma perda de massa na porcentagem de alongação do polímero (polyclean), como também na média do peso molecular, quando comparado ao controle (sem tratamento) (Lee et al., 1991).

### 3.1 Enzimas produzidas por *Bacillus subtilis* durante o processo de degradação do PET

Foram produzidas protease, amilase e esterase, com exceção da enzima polifenoloxidasas (tabela 4). A atividade amilase produzida pelo *B. subtilis* de uma forma geral apresentou halos de 10 a 48 mm, contudo, o controle apresentou a maior detecção com 60 dias de incubação. Observou-se com 60 dias de incubação halos superiores a 10mm. Observou-se ainda, que a amilase produzida pelo *B. subtilis* nas superfícies do PET tratadas com UV e temperatura foi mais expressiva com 60 dias de incubação ( tabela 4).

Resultados semelhantes também foram observados com a protease, sendo que o controle, apresentou halos de 45 mm, com sessenta dias de incubação. Ressalta-se que o tratamento com a temperatura de 50°C formou o maior halo com 60 dias de incubação, de 52mm.

Os resultados obtidos demonstraram ainda, que apenas quando o microrganismo colonizava o polímero previamente tratado com a temperatura de 50°C expressou atividade esterase (tabela 4). A literatura se reporta às enzimas hidrolíticas sintetizadas pelos microrganismos como amilase, protease e principalmente, esterase (Fische-Colbrie et al., 2004), estar envolvidas com o processo de degradação do PET, cujas informações apoiam os resultados obtidos, sugerindo uma possível degradação do PET nas condições estudadas.

Mayende et al 2006 descrevem a produção de enzimas polifenoloxidasas por *Bacillus thermophilic* spp. Diferentes dos resultados encontrados no presente trabalho.

### 3.2 Formação do biofilme por *Bacillus subtilis* na superfície de tereftalato de polietileno com e sem tratamento físico

Os conteúdos estimados de biofilme formado na superfície polimérica do tereftalato de polietileno, com e sem tratamento por *Bacillus subtilis* estão apresentados na tabela 5. Transformações físico-químicas no material plástico se faz necessária para que ele perca algumas de suas propriedades físicas e torne-se mais acessível à colonização microbiana e conseqüentemente, possibilitar o processo de biodegradação (Chanda et al., 1986 e Corneli et al., 1984). Segundo ( Xu et al.,1995), a biodegradação pode ser facilitada por aplicação de processos prévios de luz (UV) e/ou calor na matriz polimérica. Ambos os tratamentos com irradiação UV por 6 e com temperatura de 35°C possibilitaram uma superfície mais adequada para a colonização e formação do biofilme por *Bacillus subtilis* quando comparado às partículas controle (sem tratamento).

Após a quantificação do conteúdo de biofilme foi confirmada através da microscopia eletrônica de varredura a formação de biofilme pelo *Bacillus subtilis*, utilizando-se amostras com 60 dias de incubação, controle e tratado com luz ultravioleta, como também com a temperatura (figura 1. A,B,C e D). Observou-se uma distribuição homogênea e esparsa, com pontos de ligação dos microrganismos à superfície do polímero (figura A e C). Contudo, com o tratamento com temperatura de 35°C foram observados bacilos alongados, com alta densidade eletrônica, células estruturadas de forma agrupada, sendo essas informações corroboradas por (Gilan et al.2004), trabalhando com o processo de colonização de *Rhodococcus ruber*.

Contudo, com a irradiação ultravioleta por 6 horas verificou-se uma diminuição da população bacteriana aderida à superfície do polímero. As células apresentaram uma forma mais arredondada, com distribuição heterogênea. Observou-se ainda, uma diminuição da eletrondensidade celular. Os resultados observados sugeriram que a temperatura e o tratamento com a luz ultravioleta induzem variações na distribuição, da forma, homogeneidade e eletrondensidade da população bacteriana aderida à superfície do polímero, quando comparadas ao controle.

### 3.3 Toxicidade dos metabólitos formados pelas partículas PET

Após o período de incubação do *B. subtilis* por 30 e 60 dias com as partículas de PET com tratamento de irradiação ultravioleta por seis e trinta e seis horas e temperaturas de 35°C e 50°C por 72 horas, testes de toxicidade foram realizados com o líquido metabólico oriundo dos respectivos ensaios, utilizando o bioindicador *Artemia salina*. Os resultados obtidos nos testes de toxicidade são mostrados na figura 5. A porcentagem de mortalidade para *A. salina*, após exposição com as amostras de 60 dias de incubação quando comparadas ao controle (contendo apenas água do mar). O ensaio com irradiação UV 36h demonstrou maior toxicidade, com mortalidade entre 10 a 55%. No ensaio com a temperatura de 35°C observou-se uma mortalidade mais alta na concentração de 75% do líquido metabólico, comparando ao ensaio com a temperatura de 50°C (figura 2). Assim, amostras controle foram testadas, apresentando uma mortalidade de apenas 10% nas concentrações de 50% e 75%, respectivamente.

O valor da CL<sub>50</sub> das amostras (concentração que causa 50% de mortalidade) foi calculado pelo método de Trimmed Spearman-Kärber (Youn – Joo, 2006). A CL<sub>50</sub> das amostras com 30 dias de incubação foram calculadas segundo este método, onde a amostra controle apresentou uma CL<sub>50</sub> de 65,52 % (v. v<sup>-1</sup>), com uma faixa de variação

de 52,69 e 81,47%, para um intervalo de confiança de 95%. Com o tratamento da luz ultra violeta por seis horas observou-se uma  $CL_{50}$  de 62,24% ( $v.v^{-1}$ ), com uma faixa de variação de 44,73 e 83, 83%, para um intervalo de confiança de 95%, sendo um valor mais baixo em relação ao controle (tabela 6). Contudo, com 36h, não foi possível ser calculada segundo este método, uma vez que apresentou baixo percentual de mortalidade.

Para o tratamento com a temperatura de 35°C o valor da  $CL_{50}$  foi de 54,33% ( $v.v^{-1}$ ), com uma faixa de variação de 43,83 e 67,35%, para um intervalo de confiança de 95%. No entanto, com a temperatura de 50°C a  $CL_{50}$  foi de 45,74% ( $v.v^{-1}$ ) e faixa de variação de 37,85 a 55,27%, para um intervalo de confiança de 95% (tabela 6).

Estudos realizados por (Siqueira et al., 1998) demonstraram que a validade e a confiabilidade do bioensaio de toxicidade com *Artemia salina* estão relacionadas com as frações que continham uma substância reconhecidamente ativa. Portanto, a  $CL_{50}$  dos experimentos com 60 dias de incubação não foram calculados segundo este método, uma vez que apresentaram baixo percentual de mortalidade. Observou-se que o teste controle (contendo apenas água do mar e *Artemia*), não indicou que as larvas foram afetadas, validando a condição dos experimentos.

Cavalcante et al.2000 sugeriu que ensaios de letalidade proporcionam uma avaliação da toxicidade geral e, portanto, devem ser considerados essenciais para testes preliminares, considerando o estudo de compostos com potencial de atividade biológica.

Reginatto, 1998 usando a alga *Scenedesmus subspicatu*, observou que os testes de toxicidade com alga, mesmo padronizados, não são utilizados com cautela e que uma padronização internacional mais detalhada são necessárias, levando-se em consideração as características das amostras a serem avaliadas. Assim, nos estudos aqui descritos observou-se que uma possível degradação do PET pelo *B. subtilis* formou metabólitos com 60 dias de incubação, contudo, os mesmos apresentaram baixa toxicidade.

Os estudos realizados com o microrganismo *Bacillus subtilis* evidenciam a formação de um biofilme na superfície polimérica do tereftalato de polietileno sugerindo a ocorrência de degradação. Contudo, dos tratamentos físicos utilizados a temperatura de 50°C demonstra uma possível alteração na superfície, conduzindo portanto, a uma fácil e rápida colonização do microrganismo, possibilitando à expressão de enzimas hidrolíticas, responsáveis pelo fenômeno de degradação, e conseqüentemente, a perda de massa polimérica. Os estudos realizados evidenciam ainda que os tratamentos físicos (UV e temperatura) demonstram auxiliar na redução da toxicidade dos produtos de degradação. No entanto partículas de PET tratadas com irradiação

UV e temperatura torna-se mais acessível a adesão do microrganismo em relação a partícula sem tratamento.

### **Agradecimentos**

Os autores agradecem ao suporte financeiro do CNPq, CAPES e FINEP.

### **Referências**

- Albertsson, A.C. e Karlsson, S.; *Prog Polymer Sci.* 1990. The influence of biotic and abiotic environments on the degradation of polyethyene 15, 177, 192.
- ASTM G21-90 – Standard test method for tensile properties of plastics. *Annual Book of ASTM*, Philadelphia, Pa, 1990.
- ASTM D-5247-92 – Standard test method for tensile properties of plastics. *Annual Book of ASTM*, Philadelphia, Pa, 1992.
- Cavalcante, M.F., Oliveira, M.C.C., Velandia, J.R., Echevarria, A.S., 2000. Síntese de 1,3,5-triazinas substituídas e avaliação da toxicidade frente *Artemia salina* Leach. *Química Nova* 23, 20 -22.
- Conceição, D. M., Angelis, D.A, Bidoia, E. D., Angelis, D. F., 2005. Fungos filamentosos isolados do Rio Atibaia, SP e refinaria de petróleo biodegradadores de compostos fenólicos. *Arq. Inst. Biol* 72, 99 –106.
- Cornell, J., Kaplan, A. M., Rogers M.R., 1984. Biodegradability of photooxidized polyalkylenes. *J. Appl. Polym. Sci* 29, 2581-2597.
- Chanda, M., Roy S.K. *Plastic technology handbook*. Marcel Dekker, Inc., New York. 1986.
- Chandra, R., Rustigi., 1998. Biodegradable Polymers. *Program of Polymer Science*, (S.I), 3, 1273-1335.
- De Souza, W. *Técnicas básicas da Microscopia Eletrônica Aplicada às Ciências Biológicas*. Ed. Sociedade Brasileira de Microscopia, Rio de Janeiro. 156p. 1998.
- Edge, M., Wiles, R., Allen, N.S., McDonald, W. A., Mortlock, S. V., 1996. Characterization of the species responsible for yellowing in melt degraded aromatic polyesters – I: Yellowing of poly(ethylene terephthalate). *Polym. Degr and Stabil* 53, 141-151.
- Eggs, H.O.W., Allsopp, D., 1975. Biodeterioration and biodegradation by fungi. In: Smith. J. E & Berry, D.R. *The filamentous fungi*. Arnold. London 1, 301-319.
- Eggs, H.O.W., Mills., J., Holta., Scott, G., 1971. Biodeterioration and biodegradation of synthetic polymer. In: Sykes, G. & Skinner, F. A. *Microbial aspects of pollution*. London Academic Press, 267 – 279.
- Fischer-Colbrie, G., Heumann, S., Liebinger, S., Almansa, E., Cavaco-Paulo, A., Georg, M. G., 2004. New Enzymes with Potential for PET Surface Modification. *Biocatalysis and Biotransformation* 22, 341 – 346.



- Gilan, I., Hadar, Y., Sivan A., 2004. Colonization, biofilm formation and biodegradation of polyethylene by a strain of *Rhodococcus ruber*. *Applied Microbial and Cell Physiology* 65, 97-104.
- Hadad, D., Geresh S., Sivan A., 2005. Biodegradation of polyethylene by thermophilic bacterium *Brevibacillus borstelensis*. *Journal of Applied Microbiology* 98, 1093 – 1100.
- Haines, J. R., Alexander, M., 1974. Microbial degradation of high molecular-weight alkanes. *Applied Microbiology* 28, 1084.
- Hankin, L. E., Anagnostakis, S.L., 1979. The use of solid media for detection of enzymes production by fungi, *Mycologia* 67, 597 – 607.
- Kitancitaroen, N. E., Hatai, K., 1998. Some biological characteristics of fungus isolated from salmonid eggs. *Mycoscience* 39, 249 – 255.
- Lee, B., Pometto III, A. L., Fratzke, A., Bailey, J.R.T.B., 1991. Biodegradation of Degradable Plastic Polyethylene. *Phanerochaete and Streptomyces* species. *Applied and Environmental Microbiology* 57, 678-685.
- Mangiarotti, A. M., Caretta, G., Nelli, E., Piontelli, E., 1994. Biodeterioro de materiais plásticos por microhongos. *Boletim Micológico* 9, 39 – 47.
- Mc Laughlin, J. L., Saizarbitoria, T.C., Anderson, J. E., 1985. Tres biosensayos simples para químicos de productos naturales. *Revista de la Sociedad Venezolana de Química* 18, 13-18.
- Mayende, L., Wilhelm, B. S., Pletschk, B.I., 2006. *Biologia do solo e Biochemistry* 38, 2963-2966.
- Potts, J.E., 1978. Biodegradation. In *Aspects of Degradation and Stabilization of Polymers* ed. Jelinek, H.H.G. New York: Elsevier 617 – 658.
- Raghavan, D., 1995. Characterization of Biodegradable Plastics. *Polym. Plastics Technol and Eng.* 34, 41-42.
- Reginato, V. Avaliação do ensaio de toxicidade com a alga *Scenedesmus subspicatus* para o estudo de efluentes industriais. 1998. 263p. Tese (doutorado)- Universidade Estadual de Campinas, São Paulo.
- Rosa D. S., Chui Q.S.H., 2002. Avaliação da Biodegradação de poli-β-(hidroxibutirato-co-valerato) e poli-ε-(caprolactona) em solo compostado. *Polímeros : Ciência e Tecnologia* 12, 311-317.
- Siqueira, J. M., Bomm, M. D., Pereira N. F. G., 1998. Estudo Fitoquímico de *unonopsis lindmanii* – annonaceae, biomonitorado pelo ensaio de toxicidade sobre a *Artemia salina* leach. *Química Nova*, 21, 557-559.
- Youn – Joo., 2006. A. Assessment of comparative toxicities of lead and copper using plant assay. *Chemosphere* 8, 1359 – 1365.
- Xu, X., Guo, S.A., 1995. A Study on morphological structure of low molecular weight PVC prepared by vibromilling degradation. *Polym. Plastics Technol and Eng.*, 34, 621-632.

**Tabela 1:** Crescimento bacteriano de *Bacillus subtilis*, formação de biofilme, proteínas totais produzidas e pH, com 30 e 60 dias de incubação com tereftalato de polietileno-PET com tratamento físico ou não

PET	Crescimento bacteriano (UFC mL)		Biofilme (g)		Proteínas totais (mg mL)		pH	
	30d	60d	30d	60d	30d	60d	30d	60d
	Controle	$3,8 \times 10^7$	$8,4 \times 10^7$	0,0006	0,0003	32	46	8,40
UV 6h	$9,2 \times 10^7$	$9,1 \times 10^7$	0,0012	0,0007	42	28	8,11	8,09
UV 36h	$7,4 \times 10^7$	$9,1 \times 10^7$	0,0003	0,0003	14	52	8,41	8,60
T 35 °C	$5,7 \times 10^7$	$4,3 \times 10^7$	0,0005	0,0008	12	28	8,51	8,05
T 50 °C	$5,3 \times 10^7$	$7,6 \times 10^7$	0,0005	0,0004	16	8	8,02	8,35

\*pH inicial 6,72 \* Pré-inóculo=  $5,9 \times 10^2$

\*Controle : partículas do PET sem tratamento físico

**Tabela 2:** Peso inicial das partículas do tereftalato polietileno-PET, com e sem tratamento com luz ultravioleta e temperatura, com biofilme e após a remoção do biofilme, com 30 dias de incubação com o *Bacillus subtilis*

<b>PET</b>	Peso inicial da partícula(g)	Partícula com biofilme (g)	Partícula após a remoção do biofilme (g)	Perda de massa das partículas (%)
Controle	0,1835	0,1841	0,1834	0,06
<b>UV 6h</b>	0,1706	0,1715	0,1705	<b>0,06</b>
UV 36h	0,1633	0,1636	0,1633	0
T 35°C	0,1524	0,1527	0,1524	0
<b>T50°C</b>	0,1550	0,1555	0,1549	<b>0,07</b>

\*Controle : partículas do PET sem tratamento físico

**Tabela 3:** Peso inicial das partículas do tereftalato polietileno-PET, com e sem tratamento luz ultravioleta e temperatura, com biofilme e após a remoção do biofilme, com 60 dias de incubação com o *Bacillus subtilis*

PET	Peso inicial da partícula(g)	Partícula com biofilme (g)	Partícula após a remoção do biofilme (g)	Perda de massa das partículas (%)
Controle	0,1830	0,1836	0,1830	0
UV 6h	0,1706	0,1712	0,1706	0
<b>UV 36h</b>	0,1546	0,1551	0,1545	<b>0,07</b>
T35°C	0,1524	0,1531	0,1524	0
<b>T50°C</b>	0,1327	0,1331	0,1326	<b>0,08</b>

\*Controle : partículas do PET sem tratamento físico

**Tabela 4:** Atividade enzimática detectada no líquido metabólico de *Bacillus subtilis* com 30 e 60 dias de incubação com tereftalato de polietileno-PET tratado ou não

Tratamentos	Protease (mm)		Amilase (mm)		Esterase (mm)		Polifenoloxidase (mm)	
	30d	60d	30d	60d	30d	60d	30d	60d
	Controle	23	45	48	45	-	-	-
UV 6h	20	45	20	40	-	-	-	-
UV 36h	20	43	17	40	-	-	-	-
T 35 °C	23	45	44	42	-	-	-	-
T 50 °C	39	52	10	44	-	40	-	-

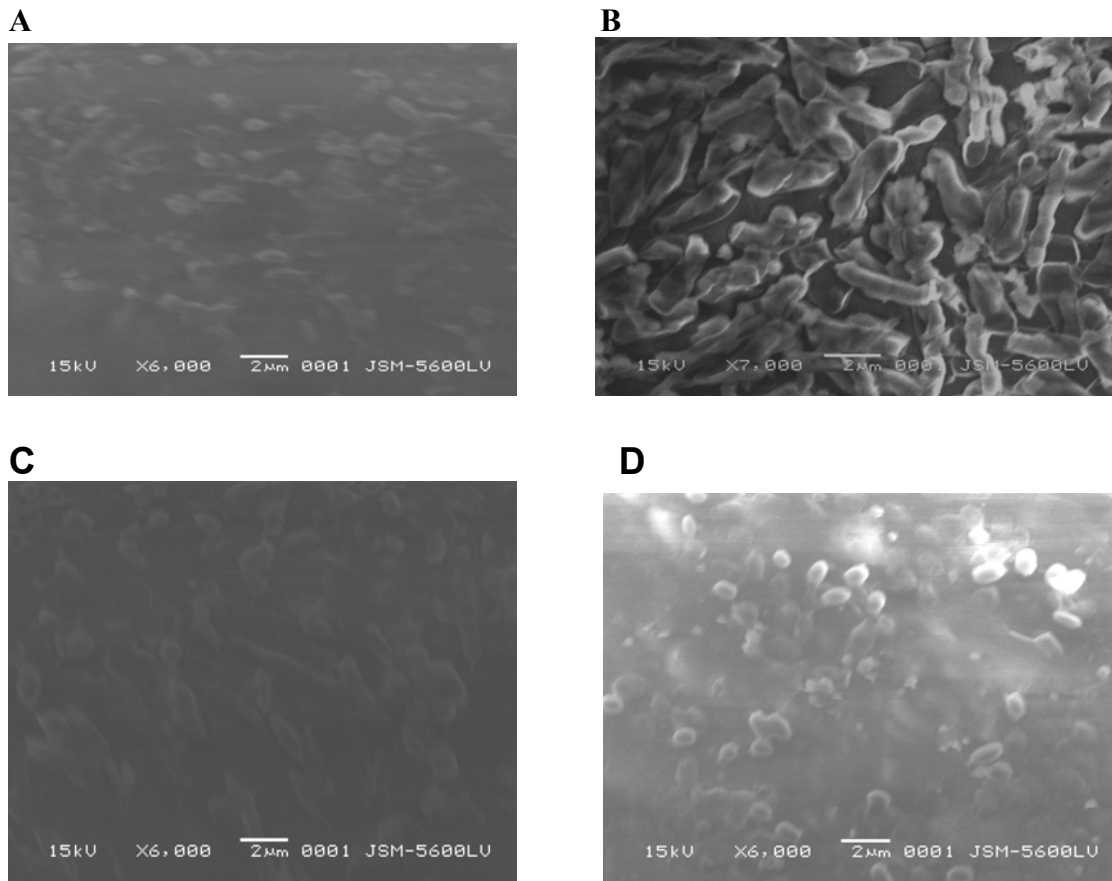
(-) negativo.

\*Controle : partículas do PET sem tratamento físico

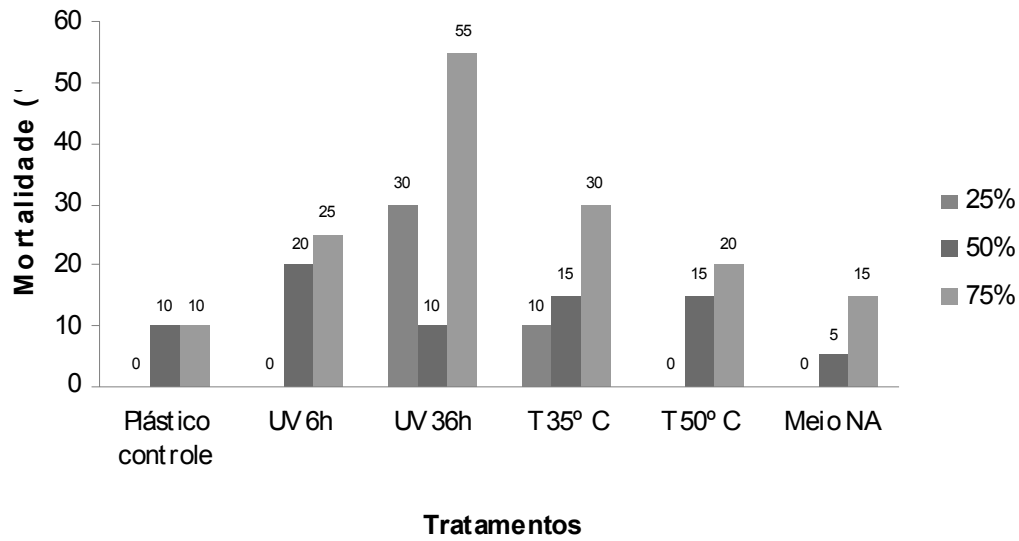
**Tabela 5.** Biofilme formado por *Bacillus subtilis* em partículas de tereftalato de polietileno-PET, com e sem tratamento com luz ultravioleta e temperatura, após 60 dias de incubação

Tratamentos	Tereftalato de polietileno-PET			
	Peso inicial (g)	Peso final (g)	Biofilme (g)	%
Controle	0,1835g	0,1838g	0,0003g	0,16
UV 6h	0,1672g	0,1679g	0,0007g	0,42
UV 36h	0,1633g	0,1636g	0,0003g	0,16
T 35 °C	0,1682g	0,1690g	0,0008g	0,48
T 50 °C	0,1550g	0,1554g	0,0004g	0,24

\*Controle : partículas do PET sem tratamento físico



**Figura 1.** Microscopia Eletrônica de Varredura-MEV apresentando os biofilmes formados por *Bacillus subtilis* nas partículas de PET, após 60 dias de incubação em tereftalato de polietileno-PET, nas seguintes condições: A: e C - Controles (sem tratamento); B: Tratamento com temperatura de 35°C e D: Tratamento com 6 horas de irradiação da luz ultravioleta-UV



**Figura 2.** Toxicidade dos líquidos metabólicos livre de células após o contato contínuo do *Bacillus subtilis* com tereftalato de polietileno-PET, com e sem tratamento com luz ultravioleta e temperatura, após 60 dias de incubação, usando como bioindicador a *Artemia salina*



**Tabela 6:** CL<sub>50</sub> do teste de toxicidade com *Artemia salina*, com 30 dias de incubação do *Bacillus subtilis* com tereftalato de polietileno-PET com e sem tratamento com luz ultravioleta e temperatura

<b>PET</b>	<b>CL<sub>50</sub> (%)</b>	<b>Faixa de variação (%)</b>	<b>Intervalo de confiança (%)</b>
Controle	62,52	52,69 e 81,47	95
<b><u>UV 6h</u></b>	<b><u>62,24</u></b>	44,73 e 83,83	95
UV 36h	-	-	-
<b><u>T35°C</u></b>	<b><u>54,33</u></b>	43,43 e 67,35	95
<b><u>T50°C</u></b>	<b><u>45,74</u></b>	37,85 e 55,27	95

\*Controle : partículas do PET sem tratamento físico

## **CAPÍTULO 3**

Segundo Artigo

**Tratamentos com UV e temperatura em tereftalato de polietileno mediando mudanças poliméricas, colonização e detecção de enzimas por *Phanerochaete chrysosporium***

Manuscrito a ser submetido para publicação em:

*Brazilian Journal Microbiology*

# TRATAMENTOS COM UV E TEMPERATURA EM TEREFTALATO DE POLIETILENO COMO INDUTOR DO PROCESSO DE COLONIZAÇÃO E PRODUÇÃO DE ENZIMAS POR *PHANEROCHAETE CHRYSOSPORIUM*

Alicia Maria Andrade Torres Jara, Marta Cristina de Freitas da Silva, Norma Suely Evangelista, Livia Cordi e Galba Maria Campos- Takaki\*

Núcleo de Pesquisa em Ciências Ambientais , Universidade Católica de Pernambuco. Rua Nunes Machado, 42- Boa Vista. 50050-590 Recife, Pernambuco, Brazil.

---

## ABSTRACT

To select polyethylene terephthalate-degrading conditions of UV and temperature, mediated colonization of *Phanerochaete chrysosporium* and the study of enzymes detection and evaluation the toxicity of the products of degradation. A ligninolytic *Phanerochaete chrysosporium* strain was used UCP (from culture collection of Nucleus of Research in Environmental Sciences, Catholic University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil) utilized high-density polyethylene terephthalate treated with u.v. (2 and 12 hours), and temperature (35 and 50°C) as the carbon source. Incubation of *P. chrysosporium* (30 and 60 days) added its gravimetric weights of 0,78% of biofilm. Biodegradation by u.v. and temperature oxidized the polymer when increasing the irradiation time or the temperature exposition. Colonization of *P. chrysosporium* and enzymes (protease, amylase, and esterase) were formed during stress conditions (u.v. 12 hours and temperature (50°C), and showed high toxicity to *Artemia salina*. This study demonstrates that polyethylene terephthalate – considered to be inert- can be biodegraded by *P. chrysosporium* strain. The maximum of biodegradation was obtained with 50°C of temperature, and probably was affecting the polymer chemical structure

**Key words:** biodegradation, *Phanerochaete chrysosporium*, UV photo-oxidation, temperature.

---

## INTRODUÇÃO

Hoje, o consumo da sociedade demanda a manufatura de milhões de produtos de plásticos, sendo não degradáveis são amplamente empregados nas indústria de um modo geral e na agricultura. Aproximadamente cem milhões toneladas de plásticos são

---

Correspondece to: Galba Maria de Campos-Takaki, Nucleus of Environmental Sciences, Catholic University of Pernambuco. Rua Nunes Machado, 42- Boa Vista. 50050-590 Recife, Pernambuco, Brazil. Phone/FAX/E.mail: 55 81 21194014/ 21194043/ [takaki@unicap.br](mailto:takaki@unicap.br) or [gmctakaki@pesquisador.cnpq.br](mailto:gmctakaki@pesquisador.cnpq.br)

produzidos em todo o mundo por ano, correspondendo a 40 toneladas de plásticos por pessoa, por ano. Entre 30 e 42% dos plásticos produzidos são usados para empacotar (22).

Os plásticos para empacotamento e os destinados para garrafas de polietileno tereftalato (PET) produzem uma quantidade significativa de resíduos municipais. A grande quantidade de resíduo da garrafa PET faz parte de uma significativa demanda dos produtos recicláveis, e cada vez mais a reciclagem dessas garrafas ganham maior atenção, devido à preservação ecológica e no sentido de obter produtos com maior valor agregado ( 27, 8 ).

Assim, o PET vem sendo considerado o polímero mais importante com uso também para produção de fibras sintéticas, onde a produção mundial de fibras foi de 33,6 milhões de toneladas, atingindo apenas 55% do mercado ( 7 ).

O PET é um polímero não degradável, resistente a hidrólise, inócuo para humanos, contudo é visto como material acumulativo em grandes volumes, com alta resistência na atmosfera aos agentes biológicos. Neste sentido, uma possível solução para evitar este problema seria a criação de polímeros biodegradáveis (20) e ou o desenvolvimento de processos capazes de mineralizar os plásticos, de modo a reduzir o seu tempo de permanência nos aterros sanitários, minimizando assim o acúmulo no ambiente.

Entre os agentes biológicos empregados para a degradação dos plásticos ressaltam-se os microrganismos lignocelulolíticos, considerando a produção enzimática que tem um alto potencial biotecnológico, e conseqüentemente, uma grande variedade de aplicações, incluindo produtos químicos, proteínas, ração animal ( 2, 4, 15 , 19 ).

O *Phanerochaete chrysosporium* pertence a classe dos Basidiomycetes, do grupo dos fungos da podridão branca e tem sido um dos microrganismos mais bem estudados, considerando a sua produção de enzimas da família lignolíticas ( 6, 23, 9, 12, 24).

O presente trabalho foi realizado usando a irradiação UV (6 e 36 horas) e temperatura (35°C e 50°C) nas partículas de PET, no sentido de alterar algumas propriedades físicas e químicas estrutura do tereftalato de polietileno (PET), facilitando a colonização do *Phanerochaete chrysosporium* na perspectiva de promover o processo de biodegradação, seguido de detecção das enzimas (polifenoloxidasas, esterases, proteases e amilases), envolvidas com a degradação do polímero, além de avaliar, modificação do pH, proteínas totais e a toxicidade dos produtos formados, com o objetivo de contribuir para um maior conhecimento sobre a biodegradação do PET.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Linhagem fúngica e condições culturais

Neste trabalho foi utilizada a linhagem de *Phanerochaete chrysosporium* UCP 963, mantido no meio Sabouraud dextrose agar, à temperatura de 5°C, gentilmente cedido pelo Banco de Culturas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais da Universidade Católica de Pernambuco – UNICAP, Recife, Pernambuco, Brasil. O *P. chrysosporium*, foi crescido em placas de Petri contendo meio de cultura sólido Batata Dextrose Ágar (BDA), da marca Merck, incubada à 28°C durante 12 dias. Após o crescimento, os esporos foram coletados em salina tamponada, contados até  $10^7$  esporos/mL em hemacitômetro, câmara de Neubauer labor optik, 0,0025mm<sup>2</sup>.

### Polímero: tereftalato de polietileno

O polímero sintético utilizado foi o da garrafa PET. Foram cortados em partículas de 20 x 20 mm, com espessura de 0,35 mm. Em seguida as partículas foram submetidas aos seguintes processos físicos químicos: irradiação à luz UV por 6h (duas horas por dia) e 36h (12 horas por dia), sendo a irradiação UV realizada na capela de fluxo laminar onde a lâmpada de UV encontrava-se na altura de 40 cm. O tratamento com a temperatura de 35°C e de 50°C, foram de 72h (3 dias consecutivos) em estufa. E partículas de PET sem tratamento físico. As partículas de tereftalato de polietileno foram previamente cortadas, pesadas e colocadas em placas de Petri, contendo álcool iodado e deixadas em câmara de fluxo laminar, por 60 minutos, agitando-se ocasionalmente. Em seguida, as partículas foram removidas para uma solução de etanol 70%, permanecendo por 60 minutos, sob agitação no shaker (1). Os plásticos foram lavados sob condições estéreis, secos, mantidos em dessecador até peso constante. Controles (sem tratamento) foram preparados seguindo as mesmas condições.

### **Colonização do *Phanerochaete chrysosporium* em tereftalato de polietileno e estimativa da biomassa**

Frascos de Erlenmeyers de 250 mL em duplicata, contendo 100 mL do meio Sabourand, caldo e 0,02 – 0,50% de Tween 80, pH 5,0 foram inoculados com as partículas de PET previamente cortadas, pesadas e desinfetadas como também com 5 mL de suspensão de  $10^7$  esporos/mL, correspondente a uma densidade óptica ( $D.O_{600}$ ) de 0,5. Em seguida, os frascos foram mantidos sob agitação de 100 rpm, à temperatura de 28°C por um período de 30 e 60 dias. Após o crescimento, as amostras foram filtradas em filtro Millipore de 0,22µm, separados partículas plásticas e líquido metabólico livre de células, onde, a biomassa (determinada por gravimetria) foi colocada em frasco previamente

tarados, submetidos ao processo de liofilização mantida em dessecador a vácuo, à temperatura ambiente.

Remoção do biofilme: as partículas de PET foram removidas do Erlenmeyer e lavadas com uma solução de dodecil sulfato de sódio a 2% (v / v) durante 4 horas. Em seguida, lavadas por 5 vezes com água destilada até remoção total da solução. As partículas de tereftalato de polietileno foram colocadas em papel de filtro e secas overnight a 60°C, sendo retiradas e colocadas em dessecador até peso constante. O peso residual de tereftalato foi estimado em relação ao peso da partícula contendo o biofilme. Do líquido metabólico foi determinado pH, foram realizados testes para detecção de enzimas, conteúdo protéico e avaliação da toxicidade. O pH do líquido metabólico livre de células foi medido utilizando-se um pHmetro Orion, modelo 310. Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

Determinação das proteínas -A concentração de proteínas nos biopolímeros obtidos foi determinada segundo o método de Proteínas Totais, utilizando-se o kit LABTEST Diagnóstica. O princípio dessa técnica consiste na reação das proteínas da amostra com o biureto (hidróxido de sódio, 1,86 mol/L; tartarato de sódio e potássio 430 mM/L; sulfato de cobre, 120 mM/L e iodeto de potássio 300 mM/L), desenvolvendo uma coloração roxa, proporcional à concentração de proteínas da amostra. As absorbâncias da amostra e padrão são determinadas a 545 nm e a concentração de proteínas totais, tendo uma solução de albumina como padrão.

#### **Detecção de Atividade enzimática**

Atividade esterase: A detecção da atividade esterase foi realizada pelo método descrito por (14), tendo Tween 80 como substrato. Discos de papel xarope de 6 mm foram embebidos com 100 µm, depositados no centro da placa de Petri contendo o meio para atividade esterase, incubadas à temperatura de 35°C, sendo observadas a cada 24 horas até o aparecimento do halo púrpura ao redor do disco, medido e expresso em mm.

Atividade Amilase: A detecção da atividade amilase foi realizada de acordo com a metodologia de (11), tendo amido solúvel como substrato. Discos de 6 mm de papel xarope, contendo 100 µm do líquido metabólico (controle e tratados), depositados no centro da placa de Petri contendo o meio para atividade amilase, incubadas à temperatura de 37°C, sendo observadas a cada 24 horas, após a coloração com lugol observou-se o aparecimento do halo transparente ao redor do disco, medido e expresso em mm.

Atividade Protease: A detecção da atividade de protease nos líquidos metabólicos foi realizada de acordo a metodologia de (11), tendo gelatina a 2% como substrato. Discos de 6 mm de papel xarope contendo 100 µm do líquido

metabólico (controle e tratados) foram colocados no centro da placa de Petri contendo o meio para atividade protease, incubados à temperatura de 37°C, sendo observados a cada 24 horas, até o aparecimento do halo transparente ao redor do disco, medido e expresso em mm.

Atividade de Polifenoloxidasas: A determinação da atividade feneloxidase dos líquidos metabólitos foi realizada pelo método descrito por (3), tendo ácido gálico como substrato. Discos de papel xarope de 6 mm contendo 100 µm do líquido metabólico (controle e tratados) foram colocados no centro da placa de Petri contendo o meio para atividade fenoloxidase, incubadas à temperatura de 37°C, sendo observadas a cada 24 horas, até o aparecimento do halo marrom ao redor do disco, medido e expresso em mm.

### **Efeito da toxicidade pelos metabólitos formados pela biodegradação do polietileno tereftalato**

Os testes de toxicidade foram realizados utilizando a metodologia de (18), nos ensaios com 30 e 60 dias de incubação. Cerca de 10 larvas de *Artemia salina* foram transferidas para frascos contendo a amostra teste produtos oriundos da degradação do tereftalato de polietileno, com diferentes concentrações (25, 50 e 75%), diluídas em 5 ml de uma solução aquosa de sal marinho sintético (33,3g L). Teste controle foi realizado contendo somente água salina. Os testes foram realizados em duplicata. A contagem dos microcústaceos mortos e vivos foi realizada após 24 h de exposição. Para obtenção das CL<sub>50</sub> e respectivos intervalos de confiança, utilizou-se o método de análise Trimmed Spearman-Kärber (26).

## **RESULTADOS e DISCUSSÃO**

A tabela 1 apresenta os valores da biomassa do *P. chrysosporium* após 30 dias e 60 dias de incubação com as partículas do polímero, com e sem tratamentos físico. Observou-se que ocorreu um aumento da biomassa que foi de 7317g/mL para as partículas do PET com irradiação 36 horas com UV, em relação ao número inicial de células do controle, após 60 dias de incubação.

O efeito das temperaturas 35°C e 50 °C no PET acarretaram uma redução na biomassa fúngica, após 60 dias de incubação. Observou-se ainda, que apenas o PET tratado com irradiação UV 2 à horas apresentou um número de células inferior 4945 g/mL no período de 60 dias de incubação, quando comparados ao PET controle (sem tratamento).

Observou-se que após 30 e 60 dias de incubação o pH inicial foi aumentado para pH >8,0 em todos os tratamentos, inclusive no controle, com exceção da partícula tratada com irradiação ultravioleta por duas horas, sendo esses resultados superiores aos apresentados por (17). Contudo, as partículas submetidos à irradiação com UV



apresentaram no período de 36h de tratamento um maior valor de pH de 8.99, após 30 dias de incubação, sendo diminuído para 8,06 após 60 dias, sugerindo uma provável produção de metabólitos oriundos do processo de degradação (tabela 1). Com 30 dias o plástico submetido temperatura de 35°C apresentou uma alteração do pH, passando de 5,0 para 8.75, quando comparado ao controle.

Segundo a “American Standard for Testing and Methods” (1), as mudanças nas propriedades elétricas dos plásticos ocorrem devido, principalmente, ao crescimento microbiano na superfície do plástico, estando associado à umidade e as mudanças do pH, provavelmente, causadas pela degradação química do PET ou pela formação de metabólitos secundários.

Com relação as proteínas totais produzidas no líquido metabólico com 30 e 60 dias de incubação ocorreu uma grande diminuição da quantidade de proteínas totais no período de 60 dias, exceto para o tratamento com irradiação UV 6h. O conteúdo de proteínas totais mostrou redução (520 mg/ mL), com o polímero tratado com irradiação UV por 36h, sugerindo uma possível degradação mediante o processo de irradiação.

Nas tabelas 2 e 3 observam-se o peso inicial das partículas, peso com biofilme e peso após a remoção do biofilme, indicando a porcentagem de perda de massa nas partículas do PET tratado ou não com processos físicos, após a colonização do *Phanerochaete chrysosporium*.

Pode-se verificar na tabela 2 que tanto a partícula com irradiação UV 36h e com temperatura de 50°C, apresentaram valores de perda de massa polimérica de 0,1%, sendo estes resultados inferiores aos apresentados por (21) onde utilizou o mesmo microrganismo com perda de 0,48% após 30 dias de incubação.

Todas as partículas de PET apresentaram decréscimo em sua massa polimérica após 60 dias de incubação exceto a partícula com tratamento de temperatura com 35°C. Pode-se verificar na tabela 3 que a partícula tratada com temperatura de 50°C, apresentou o maior valor (0.1%) de perda de massa do PET.

### **Produção de enzimas por *P. chrysosporium* versus degradação do PET**

Nos experimentos realizados com *P. chrysosporium* observou-se a produção de enzimas hidrolíticas (protease, amilase e esterase) e enzimas polifenoloxidase, todas envolvidas com o processo de degradação de plásticos (tabela 4).

A atividade proteasica produzida pelo *P.chrysosporium* de uma forma geral apresentou halos entre 25 a 50 mm, após 60 dias de incubação, contudo, o polímero tratado com temperatura de 35°C apresentou menor halo neste mesmo período de tempo. Com 60 dias de incubação que o maior halo foi de 50mm, referente ao tratamento com a temperatura à 50°C. A enzima protease produzida pelo *P. chrysosporium* na superfície do

PET tratadas com temperatura foi mais expressiva, comparando ao controle. Porém com 30 dias de incubação o tratamento com UV por 16h não apresentou formação de halo (tabela 4).

Resultados semelhantes também foram observados com a amilase cujos halos variaram de 20 a 50mm de uma forma geral, com 30 e 60 dias de incubação. O tratamento com a temperatura de 50°C foi indutor para a produção de amilase, sendo o maior halo com 50mm, contudo, para o controle, observou-se halo apenas de 35mm, após 60 dias de incubação.

A enzima esterase foi detectada apenas no período de 30 dias de incubação. Os halos variaram de 19 mm a 48 mm. Ressalta-se que resultados semelhantes também foram observados em relação ao tratamento com a temperatura de 50°C onde apresentou o maior halo com 48mm. Os resultados obtidos demonstraram que quando o microrganismo colonizava o polímero com tratamento expressou atividade esterase (tabela 4). A esterase tem sido descrita pela literatura como uma enzimas hidrolítica envolvida com o processo de degradação do PET (7). Essas informações da literatura estão de acordo com os resultados obtidos para *P. chrysosporium* e sugerem uma possível degradação do PET nas condições estudadas. Segundo (21) em seu trabalho ocorreu alterações estruturais do PET causadas pelo crescimento dos microrganismos estudados dentre os quais o *Phanerochaete chrysosporium* e produção de enzimas lignolíticas.

Considerando que *P. chrysosporium* trata-se de um fungo lignolítico as polifenoloxidasas apresentaram halos que variaram de 30 a 40 mm, em 30 e 60 dias de incubação. Observou-se que o maior halo (40 mm) foi com o tratamento à temperatura de 35°C. Com o tratamento com irradiação UV por 36 horas foi detectada a produção de polifenoloxidase em ambos os períodos de tempo (tabela 4).

Segundo (25), a enzima polifenoloxidase, apresenta uma ampla especificidade para compostos aromáticos que contem grupos hidroxila e amino. Visto que a lignina contém vários grupos fenólicos e hidroxila. Assim, a literatura tem sugerido que as polifenoloxidasas possuem uma importante função na degradação da lignina, e por conseguinte, apresentam habilidade para degradar compostos com anéis aromáticos, inclusive plásticos (16).

#### Degradação do PET Toxicidade dos metabólitos formados por *P. chrysosporium*

Ensaio de toxicidade usando *Artemia salina* nas amostras da simulação da biodegradação do PET com e sem tratamento de 6 e 36 horas com exposição a irradiação ultravioleta e temperatura de 35 °C e 50°C, após 30 dias de incubação, foram

realizados afim de determinar a toxicidade dos metabólicos secundários. Observou-se uma porcentagem de mortalidade, quando comparados aos controle contendo apenas água salina sintética. O ensaio com UV 6h demonstrou maior toxicidade, com percentual de mortalidade entre 10 a 45%. Com temperatura de 35°C observou-se uma mortalidade de 10% tanto na concentração de 25% como na de 50% (figura 1). A  $CL_{50}$  das amostras (concentração que causa 50% de mortalidade) com seus respectivos coeficientes de confiança mínimo e máximo foram calculados pelo método Trimmed Spearman-Kärber (26). A maior  $CL_{50}$  foi apresentado para o ensaio UV 36h (75% v.v<sup>-1</sup>), seguido do controle (58, 77 v.v<sup>-1</sup>) e T 50°C (51,42% v.v<sup>-1</sup>).

A  $CL_{50}$  das amostras com 60 dias de incubação foi calculada segundo este método, onde a amostra controle apresentou uma  $CL_{50}$  de 54,68 % (v. v<sup>-1</sup>), com uma faixa de variação de 46,16 e 64,77%, para um intervalo de confiança de 95% (tabela 5).

Com o tratamento da luz ultravioleta por 2 horas observou-se uma  $CL_{50}$  foi de 54,20% (v.v<sup>-1</sup>), com uma faixa de variação de 47,79 e 61,41%, para um intervalo de confiança de 95%, sendo um valor aproximado ao controle. Contudo, com 36h, não foi possível ser calculada segundo este método, uma vez que apresentou baixo percentual de mortalidade (tabela 5). Para o tratamento com a temperatura de 35°C o valor da  $CL_{50}$  foi de 49,15% (v. v<sup>-1</sup>), com uma faixa de variação de 40,72 e 59,33%, para um intervalo de confiança de 95%.

No entanto, com a temperatura de 50°C observando-se um valor da  $CL_{50}$  de 42,10% (v.v<sup>-1</sup>) e faixa de variação de 32,63 a 54,32%, para um intervalo de confiança de 95% (tabela 3). Observou-se ainda, que o controle (contendo apenas água do mar e *Artemia*), não indicou que as larvas foram afetadas, validando assim a condição dos experimentos. Em estudos recentes, (13) apontaram para a importância da manutenção do pH em ensaios de toxicidade e sugeriram o uso de tampão HEPES para realização do ensaio de toxicidade com daphnias. O uso do mesmo tampão foi sugerido para a cultura da alga verde *Ankistrodesmus convolutus* utilizada nos ensaios de daphnias. (5) estudando a biotoxicidade de um resíduo industrial têxtil usando *P. aeruginosa*, observaram que a toxicidade das amostras analisadas foram reduzidas para aquelas amostra controle (sem tratamento), sugerindo que durante a incubação, produtos intermediários ou mais tóxicos não foram formados.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio financeiro da FINEP, CNPq e CAPES (bolsa PROCAD).

## RESUMO

Selecionar e degradar o polietileno tereftalato nas condições de UV e temperatura, mediante a colonização do *Phanerochaete chrysosporium* e o estudo da detecção e avaliação da toxicidade dos produtos por enzimas. O *Phanerochaete chrysosporium* UCP (da coleção de cultura do Núcleo de Pesquisa em Ciências Ambientais, Universidade Católica de Pernambuco, Recife, PE, Brasil) utilizando o tereftalato de polietileno de alta densidade tratado com UV (2 e 12 horas), e temperatura (35°C e 50°C) como a fonte de carbono. Incubação do *Phanerochaete chrysosporium* (30 e 60 dias) adicionados a seus pesos por gavimetria de 0,78% de biofilme. A biodegradação por UV e temperatura oxidou o polímero quando aumentou o tempo de irradiação ou a exposição da temperatura. A Colonização do *P. chrysosporium* e enzimas (protease, amilase, e esterase) foram formadas em condições de tensão (UV 12 horas e temperatura (50°C), e demonstrou alta toxicidade a *Artemia salina*. Este estudo demonstra que o tereftalato de polietileno considerado estar inerte pode ser biodegradável através do *P. chrysosporium*. O máximo da biodegradação foi obtido com a temperatura de 50°C, e provavelmente estava afetando o polímero da estrutura química.

**Palavras-chaves:** biodegradação, *Phanerochaete chrysosporium*, irradiação UV, temperatura.

## REFERÊNCIAS

1. American Society for Testing Materials. (1985). ASTM standards on materials and environmental microbiology. American Society for Testing Materials. Philadelphia, Pa, pp 178 –180.
2. Bhat, M.K.; Bhat, S. (1997). Cellulose degrading enzymes and their potential Industrial applications. *Biotechnol Adv* .,15, 583 – 620.
3. Conceição, D.M.; Angelis, D.A.; Bidoia, E.D.; Angelia, D.F. (2005). Fungos filamentosos isolados do Rio Atibaia, SP e refinaria de petróleo biodegradadores de compostos fenólicos. *Arq Inst Biol* .,72, 99 –106.
4. Coughlan, M.P. (1985). The production of fungal and bacterial cellulases with comment on their production and application. *Biotechnol Genet Eng Ver* .,13, 39 – 109.
5. El- naggat, M.A.; El-aasar, S.A.; Barakat, K.L. (2004). Bioremediation of crystal violet using air bubble bioreactor packed with *Pseudomonas aeruginosa*. *Water Res.*, 38,4313-4322.
6. Fenn, P.; Kirk, T.K. (1981). Relationship of nitrogen to the onset and suppression of ligninolytic activity and secondary metabolism in *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch Microbiol* .,130, 59 – 65.
7. Fischer-Colbrie, G.; Heumann, S.; Liebming, S.; Almnsa, E.; Cavaco-Paulo, A.; Geotg, M.G. (2004). New Enzymes with Potential for PET Surface Modification. *Biocatalysis and Biotransformation* .22, 341 – 346.

8. Franchetti, S.M.M.; Marconato, J.C. (2006). Polímeros Biodegradáveis – Uma solução parcial para diminuir a quantidade dos resíduos plásticos. *Química nova.*, 29, 811 – 816.
9. Giardina, P.; Palmieri, G.; Scaloni, A.; Fontanella, B.; Faraco, V.; Cennamo, G.; Sanna, G. (1999). Protein and gene structure of a blue laccase from *Pleurotus ostreatus*. *Biochem J.*, 34, 655 – 663.
10. Hadad, D.; Geresh, S.; Sivan, A. (2005). Biodegradation of polyethylene by thermophilic bacterium *Brevibacillus borstelensis*. *Journal of Applied Microbiology.*, 98; 1093 – 1100.
11. Hankin, L.; Anagnostakis, S.L. (1979). The use of solid media for detection of enzymes production by fungi. *Mycologia.*, 67, 597 – 607.
12. Horward, R.L.; Masoko, P.; Abotsi, E. (2003). Enzyme activity of a *Phanerochaete chrysosporium* cellobiohydrolase (CBHI.1) expressed as a heterologous protein from *Escherichia coli*. *African Journal of Biotechnology.*, 2, 296 – 300.
13. Keating, K.; Caffrey, P.B.; Dagbusan, B.C. (1996). Buffers in daphnid culture and bioassay. *Environ Toxicol Chem.*, 15, 348-352.
14. Kitancitaroen, N.; Hatai, K. (1998). Some biological characteristics of fungus isolated from salmonial eggs. *Mycoscience.*, 39, 249 – 255.
15. Kotchoni, O.S.; Shonukan, O.O.; Gachomo, W.E. (2003). *Bacillus pumilus* BpCRI 6, a promising candidate for cellulase production under conditions of catabolite repression. *Afr J Biotechnol.*, 2, 140- 146.
16. Lee, B.; Pometto III, A.L.; Fratzke, A.; Bailey, J.R.T.B. (1991). Biodegradation of Degradable Plastic Polyethylene. *Phanerochaete* and *Streptomyces* species. *Applied and Environmental Microbiology.*, 57, 678-685.
17. Mangiarotti, A.M.; Caretta, G.; Nelli, E. Piontelli, E. (1994). Biodeterioro de materiales plásticos por microhongos. *Boletim Micológico.*, 9, 39 – 47.
18. Mc Laughlin, J.L.; Saizarbitoria, T.C.; Anderson, J.E. (1985). Tres biosensayos simples para químicos de productos naturales. *Revista de la Sociedad Venezolana de Química.*, 18, 13-18.
19. Ojumu, T.V.; Solomon, B.O.; Betiku, E.; Layokun, S.K.; Amigun, B. (2003). Cellulase production by *Aspergillus flavus* Linn isolate NSPR 101 fermented in sawdust, bagasse and corncob. *Afr J Biotechnol.*, 2, 150 – 152.
20. Okada, M.; Okada, Y.; Tao, A.; Aoi, K. (1996). Polymerization of oxazolines. *Prog Polym Sci.*, 21, 151-208.
21. Reyes, L.F. (2003). Estudo da degradação de polietileno tereftalato (PET) por fungos basidiomicetos ligniolíticos. Tese de Doutorado. Campinas, São Paulo, 104 p.
22. Stevens, E.S. (2002). Green Plastics: An Introduction to the New Science of Biodegradable Plastics. NJ: Princeton University Press.
23. Tien, M.; Kirk, T.K. (1983). Lignin – degrading enzyme from enzyme from hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Science.*, 221, 661 – 663.
24. Ubhayasekera, W.; Munoz, I.G.; Vasella, A.; Stahlberg, J.; Mowbray, S.L. (2005). Structures of *Phanerochaete chrysosporium* Cel7D in complex with product and inhibitors. *FEBS Journal.*, 272, 1952 – 1964.

25. Youn, H.D.; Hah, Y.C.; Kang, S.A. (1995). Role of laccase in lignin degradation by white- rot fungi. *FEMS Microb Lett* .,132, 183-188.
26. Youn – Joo, A. (2006) .Assessment of comparative toxicities of lead and copper using plant assay. *Chemosphere* .,8, 1359 – 1365.
27. Zope, V.S.; Mishra, S.; Patil, V.S.; Agrawal, K.K.; Mahajan, J.P.; Firke, S.A. (2003). Studies of Degradation of Waste Poly (ethylene terephthalate) using Autoclave Technique. *IE(I) Journal-CH.*, 84, 44 - 46.

**Tabela 1:** Crescimento fúngico de *Phanerochaete chrysosporium*, formação de biofilme, proteínas totais produzidas e pH, com 30 e 60 dias de incubação com tereftalato de polietileno-PET com tratamento com luz UV e temperatura

PET	Biomassa (g /L)		Biofilme (g)		Proteínas totais (mg/mL)		pH	
	30d	60d	30d	60d	30d	60d	30d	60d
Controle	7494	5304	0,0002	0,0001	600	560	8,58	8,36
UV 6h	8140	4945	0,0001	0,0002	240	440	8,50	7,56
UV 36h	6460	7317	0,0002	0,0001	760	240	8,99	8,06
T 35 °C	7188	5934	0,0002	0,0003	560	320	8,75	8,04
T 50 °C	6278	6202	0,0000	0,0002	160	80	8,66	8,30

\*pH inicial 5,0 \* Pré-inóculo=  $10^7$  esporos/mL

\*Controle : partículas do PET sem tratamento físico

**Tabela 2:** Peso inicial das partículas do tereftalato polietileno-PET, com e sem tratamento luz UV e temperatura, com biofilme e após a remoção do biofilme, com 30 dias de incubação com o *Phanerochaete chrysosporium*

<b>PET</b>	Peso inicial da partícula(g)	Partícula com biofilme (g)	Partícula após a remoção do biofilme (g)	Perda de massa das partículas (%)
Controle	0,1746	0,1748	0,1745	0,06
UV 6h	0,1760	0,1761	0,1760	0
<b>UV 36h</b>	0,1662	0,1663	0,1660	<b>0,1</b>
T 35°C	0,1726	0,1727	0,1726	0
<b>T50°C</b>	0,1442	0,1443	0,1440	<b>0,1</b>

\*Controle: partículas do PET sem tratamento físico



**Tabela 3:** Peso inicial das partículas do tereftalato polietileno-PET, com e sem tratamento luz UV e temperatura, com biofilme e após a remoção do biofilme, com 60 dias de incubação com o *Phanerochaete chrysosporium*

<b>PET</b>	Peso inicial da partícula(g)	Partícula com biofilme (g)	Partícula após a remoção do biofilme (g)	Perda de massa das partículas (%)
Controle	0,1843	0,1844	0,1842	0,06
UV 6h	0,1760	0,1763	0,1759	0,06
UV 36h	0,1676	0,1677	0,1675	0,06
T 35°C	0,1738	0,1740	0,1738	0
<b>T50°C</b>	0,1443	0,1444	0,1441	0,1

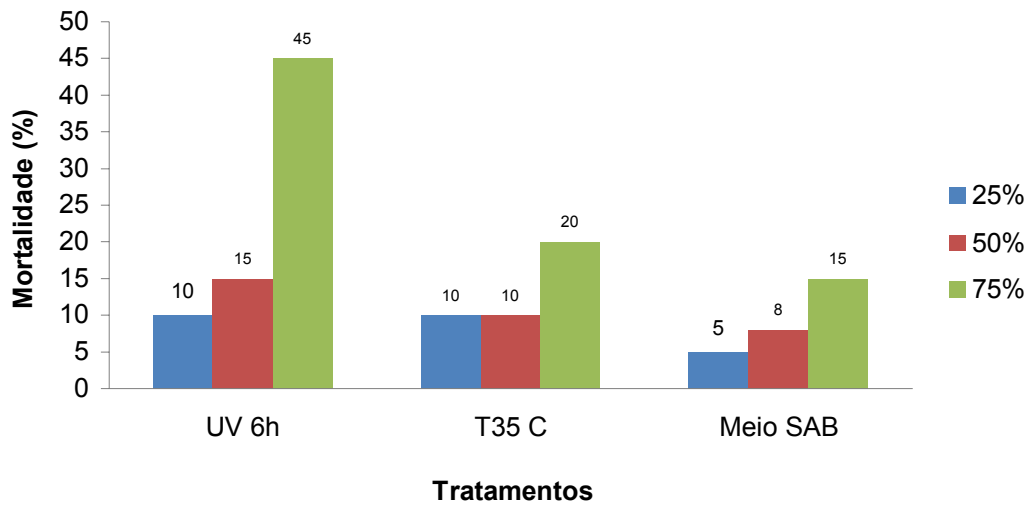
\*Controle : partículas do PET sem tratamento físico

**Tabela 4:** Atividade enzimática detectada no líquido metabólico de *Phanerochaete chrysosporium* com 30 e 60 dias de incubação com tereftalato de polietileno-PET tratado ou não com luz UV e temperatura

PET	Protease (mm)		Amilase (mm)		Esterase (mm)		Polifenoloxidas (mm)	
	30d	60d	30d	60d	30d	60d	30d	60d
Controle	48	47	40	35	-	-	-	20
UV 6h	44	40	20	38	19	-	34	-
UV 36h	-	43	33	35	40	-	35	30
T 35 °C	-	25	38	30	-	-	40	-
T 50 °C	38	50	48	50	48	-	-	-

(-) negativo

\*Controle : partículas do PET sem tratamento físico



**Figura 1.** Toxicidade dos líquidos metabólicos livre de células após o contato contínuo do *Phanerochaete chrysosporium* com tereftalato de polietileno-PET, com e sem tratamento, após 60 dias de incubação, usando como bioindicador a *Artemia salina*

**Tabela 5:** CL<sub>50</sub> do teste de toxicidade com *Artemia salina*, com 30 dias de incubação do *Phanerochaete chrysosporium* com tereftalato de polietileno-PET com e sem tratamento com luz UV e temperatura

PET	CL <sub>50</sub> (%)	Faixa de variação (%)	Intervalo de confiança (%)
Controle	54,68	46,16 e 64,77	95
UV6 h	54,20	47,79 e 61,41	95
UV36 h	-	-	95
T 35°C	49,15	40,72 e 59,33	95
T 50°C	42,10	32,63 e 54,32	95

\*Controle : partículas do PET sem tratamento físico

## **CAPÍTULO 4**

## CONCLUSÕES GERAIS

Os estudos realizados com a avaliação dos microrganismos *Bacillus subtilis* e *P. chrysosporium* na degradação do tereftalato de polietileno evidenciam:

Ocorrência de uma fácil e rápida colonização dos microrganismos possibilitando o fenômeno da biodegradação.

Confirmação de biofilme formados pelos microrganismos na superfície polimérica do PET, com tratamentos físicos (UV e temperatura), como também, nas condições controle (sem tratamento), através de microscopia eletrônica de varredura, sendo mais evidente nas partículas tratadas.

Dentre os tratamentos utilizados a temperatura de 50°C, demonstra maior perda de massa polimérica do polietileno tereftalato (PET) tanto com *B. subtilis* como para o *P. chrysosporium*.

Com relação às enzimas produzidas protease e esterase por *B. subtilis*, obteve melhores resultados, a partícula tratada com temperatura de 50°C em relação ao controle, cujas enzimas apresentam uma co-participação na degradação do polímero.

Observa-se a alta atividade enzimática de protease, amilase, esterase e polifenoloxidasas por *P. chrysosporium*, onde a partícula de PET tratada com temperatura de 50°C mostraram melhores resultados em relação ao controle, no entanto essas enzimas estão envolvidas na degradação de substâncias químicas com núcleos aromáticos.

Os tratamentos físicos (UV e temperatura) auxiliam na redução da toxicidade

Os produtos formados pela degradação do PET por *Bacillus subtilis* apresentaram baixa toxicidade para *Artemia salina*.

Ressalta-se que os produtos formados pela degradação do PET por *P. chrysosporium* demonstram alta toxicidade para *Artemia salina*.

## **ANEXOS**



**Brazilian Journal  
of  
Microbiology**  
(Formerly Revista de Microbiologia)

ISSN 1517-8382 printed  
version

ISSN 1678-4405 online version

## INSTRUCTIONS TO AUTHORS

- Scope of the journal
- Submission of a manuscript
- Publication of a manuscript
- Preparation of a manuscript

### Scope of the journal

**Brazilian Journal of Microbiology**, published by the Brazilian Society of Microbiology, publishes original research papers, short communications and, occasionally, reviews, covering all aspects of Microbiology. The publication is free of charge.

The following categories of papers are acceptable for publication in Brazilian Journal of Microbiology:

**Research paper:** the research paper reports results of original research, which has not been published elsewhere.

**Short Communication:** a Short Communication is a concise account of new and significant findings.

**Mini-review:** Review articles should deal with microbiological subjects of broad interest. Specialists will be called upon to write the reviews.

### Submission of a manuscript

Submission of a manuscript to **Brazilian Journal of Microbiology** is understood to imply that it has not previously been published (except in an abstract form) and that it is not being considered for publication elsewhere.

Manuscripts should be submitted on line at <http://www.bjmonline.com.br/>. Instructions for on line submission are available at that site.

Upon receipt of a manuscript all authors will receive an electronic message acknowledging the receipt. The message will also question each author if he (or she) agrees with the submission. No answer will be considered as an agreement with the submission.

Responsibility for the accuracy of the manuscript content lies entirely with the authors.

### Publication of a manuscript

Manuscripts are accepted for publication after having been critically reviewed by at least two referees, indicated by the Editors.

The suggestions and recommendations of the reviewers and Editors will be forwarded electronically to the corresponding author, who should return the reviewed manuscript to the Editors within the stipulated date, via online system. Whenever applicable, the corresponding author should explain or comment each modification introduced in the text.

The corresponding author will receive an electronic message whenever the manuscript moves from one status to the next.

Membership in Brazilian Society for Microbiology is not a prerequisite for submission of a manuscript for publication.

Nonmember scientists from Brazil and other countries are invited to submit papers for analysis.

### reparation of a manuscript

The manuscript should be submitted as one single PDF file, containing the whole text, figures, tables, etc. Only manuscripts written in English will be considered.

For **research** papers, the PDF file should contain:

- a. Title
- b. Abstract (up to 250 words)
- c. Three to five key-words
- d. Title (*Título*) in Portuguese\*
- e. Abstract (*Resumo*) in Portuguese (up to 250 words)\*
- f. Key words (*palavras-chave*) in Portuguese\*
- g. Introduction
- h. Materials and Methods
- i. Results
- j. Discussion
- k. Acknowledgements (optional)
- l. References

For **short communications**, the PDF file should contain:

- a. Title
- b. Abstract (up to 50 words)
- c. Three to five key-words
- d. Title (*Título*) in Portuguese\*
- e. Abstract (*Resumo*) in Portuguese\* (up to 50 words)
- f. Key words (*palavras-chave*) in Portuguese\*
- g. Text not divided in topics
- h. Acknowledgements (optional)
- i. References

For **mini-reviews**, the PDF file should contain:

- a. Title
- b. Abstract (up to 250 words)
- c. Three to five key-words
- d. Title (*Título*) in Portuguese\*
- e. Abstract (*Resumo*) in Portuguese\* (up to 250 words)
- f. Key words (*palavras-chave*) in Portuguese\*
- g. Text
- h. Acknowledgements (optional)
- i. References

\* BJM will provide the translation into Portuguese for non-Portuguese speakers.

All manuscripts should be typed double-spaced with 3 cm margins and pages should be numbered sequentially. The Editors recommend that a manuscript should be critically read by someone fluent in English before submission.

Manuscripts written in poor English will not be accepted.

*Research papers* and *mini-reviews* consist of 20 printed pages, including references, tables and figures.

*Short Communications* should be restricted to 10 printed pages. Figures and tables should be restricted to a maximum of two figures or two tables, or one table and one figure.

Abbreviations of terms and symbols should follow the recommendations of IUPAC-IUB Commission and the Metric System is to be used throughout.

As a rule, the references in the text should be cited by their numbers. The lines in each page should be numbered too. Exceptionally, when authors are mentioned in the text, the mention should be done according to the following examples:

Bergdoll (number) reported that..., Bailey and Cox (number) observed that..., or Smith *et al.* (number) mentioned that... Do not use capital letters.

## **ORGANIZATION**

The **Title** should be as brief as possible, contain no abbreviations and be truly indicative of the subject of the paper.

Expressions like "Effects of", "Influence of", "Study on", etc, should be avoided. Care should be exercised in preparing the title since it is used in literature retrieval systems.

The **Abstract** should summarize the basic content of the paper. The abstract should be meaningful without reference to the text. An abstract should not contain references, tables or unusual abbreviations. Abstracts are reprinted by abstracting journals and therefore will be read by persons who do not have access to the entire paper.

**Resumo** is the abstract written in Portuguese. Its preparation should follow the same recommendations for the Abstract in English. BJM will provide the Resumo for non-Portuguese speakers.

The **Introduction** should provide the reader with sufficient information so that the results reported in the paper can be properly evaluated without referring to the literature. However, the introduction should not be an extensive review of the literature. The introduction should also give the rationale for and objectives of the study that is being reported.

The **Materials and Methods** section should provide enough information for other investigators to repeat the work.

Repetition of details of procedures which have already been published elsewhere should be avoided. If a published method is modified, such modification(s) must be described in the paper. Sources of reagents, culture media and equipment (company, city, state, country) should be mentioned in the text. Names that are registered trade marks should be so indicated. Subheading often makes this section easier to read and understand.

The **Results** section should, by means of text, tables and/or figures, give the results of the experiments. If a *Discussion* section is to be included, avoid extensive interpretation of results but do so in the *Discussion* section. If *Results* and *Discussion* are combined, then results should be discussed where, in the text, is the more appropriate. Tables and figures should be numbered using Arabic numerals. All tables and figures must be mentioned in the text.

The approximate location of tables and figures in the text should be indicated.

The **Discussion** section should discuss the results in relation to the literature cited.

The **References** should be numbered consecutively and in alphabetical order, by last name of the first author. All authors must be cited. References should be cited in the text by their numbers, with a space between the number of the references (3, 7, 22). Journal names should be abbreviated according to the style of *BIOSIS*. All references given in the list should be cited in the text and all references mentioned in the text should be included in the list.

Examples:

**a. Journal article**

Brito, D.V.D.; Oliveira, E.J.; Darini, A.L.C.; Abdalla, V.O.S., Gontijo Filho, P.P. (2006). Outbreaks associated to bloodstream infections with *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative *Staphylococcus* spp in premature neonates in a university hospital from Brazil. *Braz. J. Microbiol.* 37 (2), 101-107.

**b. Paper or chapter in a book**

Franco, B.D.G.M.; Landgraf, M.; Destro, M.T.; Gelli, D.S. (2003).

Foodborne diseases in Southern South America. In: Miliotis, M.D., Bier, J.W.(eds). *International Handbook of Foodborne Pathogens*. Marcel Dekker, New York, USA, p.733-743.

**c. Book**

Montville, T.J.; Matthews, K.R. (2005). *Food Microbiology – an introduction*. ASM Press, Washington, D.C.

**d. Patent**

Hussong, R.V.; Marth, E.H.; Vakaleris, D.G. January 1964. Manufacture of cottage cheese. U.S. Pat. 3, 117, 870.

**e. Thesis and Dissertations**

Santos, M.V.B. (2005). *O papel dos anticorpos contra os componentes da parede celular de Paracoccidioides brasiliensis na evolução da doença experimental*. São Paulo, Brasil, 110p. (M.Sc. Dissertation. Instituto de Ciências Biomédicas. USP).

**f. Communications in events (Symposia, Conferences, etc)**

Silveira, T.S.; Martins, J.L.; Abreu, F.A.; Rosado, A.S.; Lins, U.G.C. (2005). Ecology of magnetotactic multicellular organisms in microcosms. XXIII Congresso Brasileiro de Microbiologia, Santos, SP, p. 272.

**g. Publication in the web**

Abdullah, M.A.F.; Valaitis, A.P.; Dean, D.H. (2006). Identification of a *Bacillus thuringiensis* Cry11 Ba toxin-binding aminopeptidase from the mosquito *Anopheles quadrimaculatus*. *BMC Biochemistry*. <http://www.biomedcentral.com/1471-2091/7/16>

**h. Webpage**

U.S. Food and Drug Administration. 2006. Enjoying Homemade Ice Cream without the Risk of *Salmonella* Infection. Available at: <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/fs-eggs5.html>. Accessed 26 May 2006.

References citing "personal communication" or "unpublished data" are discouraged, although it is recognized that sometimes they must be used. In these cases, they should be cited in the text and not in the list of references. References consisting of papers that are "accepted for publication" or "in press" are acceptable. However, references of papers that are "submitted" or "in preparation" are not acceptable.

**ACKNOWLEDGMENTS:** This section is optional. It acknowledges financial and personal assistance.

**TABLES:** Each table must be typed in a separate sheet and numbered sequentially in Arabic number. The title of a table should be placed in the top of it and should be brief but fully descriptive of the information contained. Headings and subheadings should be concise with columns and rows of data carefully centered below them.

**FIGURES:** Each figure must be typed in a separate sheet and numbered sequentially in Arabic number. Data presented in the tables should not be repeated in the figures. The legend of the figures should be placed at their bottom.

**PHOTOGRAPHS:** Photoprints should be of sufficient quality to ensure good reproduction (at least 150dpi).

[\[Home\]](#) [\[About this journal\]](#) [\[Editorial board\]](#) [\[Subscription\]](#)

---

© 2007 SBM

Departamento de Microbiologia - ICB II - USP  
Av. Prof. Lineu Prestes, 1374 - Sala 214  
Cidade Universitária  
05508-900 São Paulo SP - Brasil  
Tel./Fax: +55 11 3813-9647



[bjm@sbmicrobiologia.org.br](mailto:bjm@sbmicrobiologia.org.br)



## Products

International  
Biodeterioration and  
Biodegradation

Journal information  
Product description  
Editorial board

Audience  
Abstracting/Indexing  
Special issues and  
supplements

Subscription information

Bibliographic and  
ordering information  
Conditions of sale

Dispatch dates

Journal related  
information

Impact factor  
Most downloaded  
articles

Other journals in same  
subject area

Support & contact

About Elsevier

Select your view

## INTERNATIONAL BIODETERIORATION AND BIODEGRADATION

The Official Journal of the International Biodeterioration and  
Biodegradation Society

### Guide for Authors

#### Submission of papers

Submission of a manuscript implies that the author(s) have the authority to publish the work and that it is not being considered contemporaneously for publication elsewhere. Submission of a multi-authored manuscript implies the consent of all the participating authors. All papers will be independently refereed.

All manuscripts for *International Biodeterioration and Biodegradation* should be submitted electronically through Elsevier Editorial System (EES), which can be accessed at <http://ees.elsevier.com/ibb>. You will be guided stepwise through the creation and uploading of the various files.

The system automatically converts source files to a single Adobe Acrobat PDF version of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail and via the Author's homepage, removing the need for a hard-copy paper trail. The above represents a very brief outline of this form of submission. It may be advantageous to print this "Guide for Authors" section for reference in the subsequent stages of article preparation.

#### Types of contribution

Contributions may be original papers, review articles, case studies, short communications, reports of conferences or meetings, book reviews, or news of forthcoming meetings. The subject and content of review articles should be discussed with the Editors prior to submission to the journal. All papers should be written in English.

#### Format of manuscripts

Wherever possible, authors should consult a recent issue of the journal for style and layout. Manuscripts that do not conform to the style of the journal or in which the English is poor may be returned to authors before they are accepted for reviewing. It is in the interests of authors who are not familiar with the correct use of English to have someone proficient in the English language check their manuscript before it is submitted. The Editors reserve the right to adjust style to certain standards of uniformity.

Information on author-paid and pre-acceptance language editing services available to authors can be found at <http://www.elsevier.com/locate/languagepolishing>.

The manuscript should be prepared on a word-processor, in single-spaced typing on pages of uniform size with a 2.5cm margin all round. Artificial (hyphenated) word breaks should not be used at the end of lines. Footnotes to the text should be avoided. All pages should be numbered consecutively. To facilitate the review process

continuous line numbers should be inserted in the text of the manuscript.

The first page of the manuscript should give: - title of the paper; name (s) of author(s); address(es); and name, full post address, e-mail address, and telephone and fax numbers of the corresponding author, to whom page proofs will be sent. On the first page the author also needs to state what the scientific relevance of the paper is. Please note that papers with a routine nature and lacking originality, novelty, and uniqueness will not be accepted for publication.

In general, the manuscript should not exceed 10 000 words, or about 20 printed pages. It should comprise the following sections:

**Abstract.** This summary, consisting of about 150-200 words, should report concisely on the purpose and results of the work described. It should be followed by up to five keywords.

**Introduction.** This should give (a) a salient background to enable the reader to understand and assess the study presented and (b) a statement of the aims of the study.

**Materials and Methods.** Enough technical information should be given in this section for the experimental work to be repeated. New methods should be described fully, but for established methods reference to published papers or readily available manuals is adequate.

**Results.** Results should be presented as concisely as possible. Use should be made here of well-constructed tables and figures. The text here should not be used to reiterate or discuss the results presented in tables and figures, but should direct the attention of the reader to the important findings in them. Data should not be presented in tables and figures where they can be more concisely set down in the text.

**Discussion.** This section should interpret and discuss the results in the light of previous work; it should not repeat at length material presented in the Introduction or Results. In Short Communications, the Results and Discussion sections may be combined.

**Acknowledgements.** Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise.

**References.** Following the Harvard system, there should be a list of references in alphabetical order at the end of the paper, following the Harvard system. All references in this list must be cited in the text, and vice versa. The references should be indicated at the appropriate place in the text using surnames and year of publication, as in Canale-Parola (1992), Eaton and Hale (1993), and for three or more authors Björdal et al. (2000). Where in a series, references should be in ascending order of year, as in (Daniel and Nilsson 1986; Canale-Parola 1992; Eaton and Hale 1993; Björdal et al. 2000). Where two or more papers by the same author(s) are published in the same year they should be cited as Smith (1995a), Smith (1995b), etc. When together in parentheses they should appear as (Smith 1992a,b). Each reference in the list should give names and initials of ALL authors, and the year and the exact title of the paper or book. For journals there should follow the full title, volume number (but not part number), and initial and final page numbers of the article; for books there should follow the name of the publisher and place of publication. The styles for contributions to edited books and proceedings, reports and online articles are shown below.

Björdal, C.G., Daniel, G., Nilsson, T., 2000. Depth of burial, an important factor in controlling bacterial decay of waterlogged archaeological poles. *International Biodeterioration and Biodegradation* 45, 15-26.

Eaton, R.A., Hale, M.D.C., 1993. Wood - decay, pests and protection. Chapman and Hall, London.

Dillon, H.K., Heinsohn, Miller, J.D., (Eds.), 1996. Field guide for the



determination of biological contaminants in environmental samples. American Industrial Hygiene Association, Fairfax, VA.

Adan, O.C.G., 1994. On the fungal defacement of interior finishes, PhD thesis, Eindhoven University of Technology, Eindhoven, The Netherlands.

Canale-Parola, E., 1992. Free-living saccharolytic spirochetes: The genus *Spirochaeta*. In: Balows, A., Truper, M., Dworkin, M., Harder, W., Schleifer, K.H., (Eds.), *The Prokaryotes* (2nd ed.), Vol. 4, Springer-Verlag, New York, pp. 3524-3536.

Huang, S.J., Bell, J.P., Knox, J.R., Atwood, H., Bansleben, D., Bitritto, W., Broghard, W., Chapin, T., Leong, K.W., Natarjan, K., Nepumuceno, J., Roby, M., Soboslai, J., Shoemaker, N., 1976. Design, synthesis and degradation of polymers susceptible to hydrolysis by proteolytic enzymes. In: Sharpley, J.M., Kaplan, A.M., (Eds.), *Proceedings of the Third International Biodegradation Symposium*, Applied Science, London, pp. 731-741.

Daniel, G., Nilsson, T., 1986. Ultrastructural observations on wood-degrading erosion bacteria. IRG/WP/1283. The International Research Group on Wood Preservation, Stockholm.

Carey, J., Grant, C., 2002. The treatment of dry rot in historic buildings. Cathedral Communications Ltd, online at <http://www.buildingconservation.com/articles/rot/rot.htm>.

Unpublished data or private communications should not appear in the reference list. References to unpublished data will only be accepted at the discretion of the Editors.

#### Units

The SI system should be used for all scientific and laboratory data; if, in certain instances, it is necessary to quote other units, these should be added in parentheses. Temperatures should be given in degrees Celsius. The unit 'billion' (10<sup>9</sup> in America, 10<sup>12</sup> in Europe) is ambiguous and should not be used. Abbreviations for units should follow the suggestions of the British Standards publication BS 1991. The full stop should not be included in scientific abbreviations such as h (not h.), m (not m.), and ppm (not p.p.m.); '%' should be used in preference to 'per cent'; 'per', as in mg per liter, should be written in exponential notation as mg l<sup>-1</sup> (not mg/l). Where abbreviations are likely to cause ambiguity or cannot be readily understood by an international readership, units should be given in full. Greek symbols and unusual symbols used for the first time should be defined by name in the left-hand margin.

#### Abbreviations

Abbreviations of chemical or other names should be defined when first mentioned, unless the abbreviation is commonly used and internationally known and accepted, e.g. ATP, DNA, EDTA, GC-MS, GLC, HPLC, IU (International Unit). For approximately, use approx. or c. (not ca.); for versus, use vs (not v.); for the statistical terms standard deviation, standard error and standard error of the mean, use SD, SE, and SEM without definition.

#### Nomenclature

Authors should check all chemical, biochemical, and microbiological names before submission of the manuscript. Chemical Abstracts should be consulted for names of chemical compounds; The Merck Index, 13th ed., 2001, is a useful alternative source. For biochemicals, the Compendium of Biochemical Nomenclature and Related Documents, published for The Biochemical Society, London, by Portland Press (1992), should be consulted. Enzymes should be given the (trivial) names in Enzyme Nomenclature (Academic Press, 1992) as recommended by the International Union of Biochemistry and the assigned EC number appended. Latin binomials should be used for all organisms other than man and farm stock. At first mention in both the Abstract and the main body of the text the full names should be given, as in *Mangifera indica*, and thereafter abbreviated by using only the initial letter of the generic

name, as in *M. indica*. Where several genera have the same initial letter (and abbreviation of the generic names might cause confusion), the full generic name should be retained. For common generic names in bacteria, the abbreviations standardly used, e.g. Staph., Ser., and Strep. for Staphylococcus, Serratia, and Streptococcus, should be employed. For the correct spelling of bacterial names, authors should consult Bacterial Nomenclature Up to Date ☞ <http://www.dsmz.de/bactnom/bactname.htm> or List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature ☞ <http://www.bacterio.cict.fr/>. For fungal names, the Index Fungorum ☞ <http://www.indexfungorum.org/Names/Names.asp> or Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi, 8th edition (Commonwealth Agricultural Bureaux International, Egham, Surrey, 1995) should be consulted.

### Preparation of electronic illustrations

#### General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Save text in illustrations as "graphics" or enclose the font.
- Use only the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Helvetica, Times, Symbol.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide all illustrations as separate files and as hardcopy printouts on separate sheets.
- Provide captions to illustrations separately.
- Produce images near to the desired size of the printed version.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website: ☞ <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

**You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.**

#### Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalised, please "save as" or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS:

Vector drawings: Embed the font or save the text as "graphics".

TIFF: Colour or greyscale photographs (halftones): Always use a minimum of 300 dpi.

TIFF: Bitmapped line drawings: Use a minimum of 1000 dpi.

TIFF: Combinations bitmapped line/half-tone (colour or greyscale): A minimum of 500 dpi is required.

DOC, XLS or PPT: If your electronic artwork is created in any of these Microsoft Office applications please supply "as is".

Please do not:

- Supply embedded graphics in your word-processor (spreadsheet presentation) document;
- Supply files that are optimised for screen use (like GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

#### Language editing

Information on author-paid and pre-acceptance language editing services available to authors can be found at ☞ <http://www.elsevier.com/locate/languagepolishing>

**Proofs**

PDF proofs will be sent by e-mail to the corresponding author. To avoid delay in publication, only necessary changes should be made, and corrections should be returned promptly.

**Offprints**

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail or, alternatively, 25 free paper offprints. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use.

**Online Publication**

Your article will appear on Elsevier's online journal database ScienceDirect as an "Article in Press" within approximately 4-6 weeks of acceptance. Articles in Press for this journal can be viewed at <http://www.sciencedirect.com/science/journal/09648305>. An Article in Press may be cited prior to its publication by means of its unique digital object identifier (DOI) number, which does not change throughout the publication process.

**Services**

Authors can keep a track on the progress of their accepted article, and set up e-mail alerts informing them of changes to their manuscript's status, by using the 'Track a Paper' feature found at <http://www.elsevier.com/trackarticle>.

**Submission checklist**

Before submission, authors should ensure that the following has been done:

One Author designated as corresponding Author, and the article includes his or her:

- E-mail address
  - Full postal address
  - Telephone and fax numbers
- All necessary files have been uploaded

- Keywords
  - All figure captions
  - All tables (including title, description, footnotes) are complete
- Further considerations

- Manuscript has been "spellchecked"
  - All text, including References and Legend for Tables and Figures, is single-spaced
  - References are in the correct format for this journal
  - All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
  - Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
  - Colour figures are clearly marked as being intended for colour reproduction on the Web (free of charge) and in print or to be reproduced in colour on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
  - If only colour on the Web is required, black and white versions of the figures are also supplied for printing purposes
  - Enclose papers that are important for the understanding or judgement of the submitted manuscript, but which have either been submitted or are in press and are not yet published
  - Enclose, if desired, the names of up to three potential referees
- For any further information please contact the Author Support Department at [authorsupport@elsevier.com](mailto:authorsupport@elsevier.com)



Printer-friendly version

A Reed Elsevier company

Copyright © 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.